บทความพื้นฐูวิชาการ

เทคนิคใหม่ที่ใช้ผลิตวัคซีน

กนกวรรณ วรรธนะศักดิ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

Review

NEW TECHNOLOGY FOR VACCINE DEVELOPMENT

Kanokwan Wattanasak
Biology department, Faculty of Science,
Silpakorn University, Nakorn Pathom, 73000

ABSTRACT

Accumulation of experiences in experimental biochemistry has led to the development of new technology for vaccine production. In the past, vaccines were made of either killed pathogenic organism or non-pathogenic mutant. They were not absolutely safe since endotoxin or toxic substance was not excluded, and possibility of pathogenic reversion is still remained. Nowadays, purified protective antigens from different organisms have been produced. Their protential use as vaccine are investigated.

Recombinant DNA technology was applied to identify the gene and to use that gene to produce pure antigen. Specific peptides of bacterial toxin or of viral capsid protein have been synthesized chemically or through the recombinant DNA process. In addition, protein antigen from viral envelope has been solubilized and separated from the virus infected cells. Both solubilized antigen and antigen made through recombinant DNA technology are not potent immunogen. However, these antigens can be conjugated to carrier molecules to make them more immunogenic. Immunopotentiator becomes necessary for subunit vaccine production. Synthetic molecules such as (T, G)-A--L, muramyl dipeptide derivatives and glycoside quil A are among the components of immunopotentiator in newly developed vaccine.

บทนำ

การผลิตวัคซีนด้วยเทคนิค recombinant DNA เป็นวิธีที่ยุ่งยากว่าวิธีเพาะเลี้ยงธรรมดาและต้องใช้เงินและเวลาเพิ่มขึ้นมาก แต่ก็ยังมีผู้พยายามศึกษาลำดับของ genome จากไวรัสที่เป็นอันตรายเพื่อทำวัคซีนป้องกันโรค เช่น โรค AIDS, โรคตับอักเสบ, โรคพิษสุนัขบ้า เป็นต้น มีการทดลองวัคซีนชนิดใหม่ที่ประกอบด้วย surface antigen ของไวรัสหรือประกอบด้วย toxin ของแบคทีเรีย ในขบวนการผลิตวัคซีนใหม่นี้ gene ของโปรทีนที่จำเป็นในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคถูกนำมาผ่านพาหะ และพาหะนั้นต้องพา gene ไปอาศัยใน host cell ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียหรือ mammalian cell เพื่อเพิ่มจำนวน antigen antigen ที่ผลิตขึ้นมาจะมีคุณสมบัติเหมือนกับ antigen ที่มีในธรรมชาติและใช้ทำวัคซีนได้อย่างปลอดภัย เราเรียกวัคซีนที่ทำจากโปรทีนเฉพาะโดยปราศจากตัวเชื้อโรคนี้ว่า subunit vaccine การผลิต subunit vaccine ไม่จำเป็นต้องใช้ recombinant DNA เสมอไป อาจใช้การสังเคราะห์ทางเคมีหรืออาจใช้วิธีสะกัดโปรทีนจากไวรัสที่ทำให้สลายตัว โปรทีนที่ได้จาก recombinant DNA หรือจากการสะกัดหรือจากการสังเคราะห์ มักเป็น hapten ที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อย จึงต้องมีการพัฒนา carrier ชนิดต่าง ๆ และพัฒนาวิธีการ conjugate ระหว่าง carrier กับ hapten เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การผลิต subunit vaccine นับเป็นก้าวใหม่ของการผลิตสารชีวภาพเชิงอุตสาหกรรมที่อาศัยเทคโนโลยีชีวภาพชั้นสูง

พาหะของ immunogene

gene ที่แสดงลักษณะของ antigen เรียกในที่นี้ว่า immunogene immunogene ถูกนำไปใส่ในพาหะซึ่งหมายถึง plasmid ที่ได้ถูกทำขึ้นมาใหม่โดยนักชีววิทยาเพื่อส่ง immunogene นั้นให้เพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและยีสต์ พาหะอาจหมายถึงไวรัส เช่น vaccinia virus และ SV40 virus เป็นต้น พาหะเป็นตัวพา gene จากเซลล์หนึ่งไปใส่ไว้ใน host cell อีกชนิดหนึ่ง โปรทีนที่ผลิตได้จาก host cell เหล่านี้จะถูกนำมาสะกัดให้บริสุทธิ์และใช้ทำเป็นต้นแบบของวัคซีน เช่น surface antigen ของไวรัสตับอักเสบ (HBsAg) และ VP_1 จากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เป็นต้น

การใช้ vaccinia virus ทำ recombinant vaccine

ปัจจุบันได้มีผู้สนใจใช้ vaccinia virus ซึ่งเป็นไวรัสชนิดที่ใช้ป้องกันโรคไข้ทรพิษ vaccinia มี DNA ใหญ่มากขนาด 180,000 base pairs เป็นไปได้ที่จะสอด immunogene ของไวรัสชนิดอื่น ๆ ให้เข้าไปอยู่ในบริเวณที่ vaccinia ไม่ได้ใช้ในการเพิ่มจำนวน ซึ่งถ้าทำได้สำเร็จก็จะมี transcription และ translation ของ immunogene หลังจากนั้นเมื่อ recombinant vaccinia นี้ infect เข้าเซลล์ โปรทีนที่เป็น immunogen ก็จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์นั้นเสมอ สิ่งที่ต้องทำเพื่อสอด gene เข้าไปคือ

1) ใส่ gene ที่ต้องการเข้าไปในพาหะเช่น plasmid เพื่อเพิ่มจำนวน DNA นั้นให้มากขึ้น แล้วนำ DNA ที่ได้ใส่เข้าไปใน vaccinia virus อีกทีหนึ่ง

2) ที่ปลายทั้งสองของ gene ใน plasmid จะต้องมีลำดับของ DNA ที่ homologous กับลำดับของ DNA ของ vaccinia virus จึงจะทำให้เกิด recombination

3) recombination จะต้องเกิดที่บริเวณไม่สำคัญสำหรับการเพิ่ม gene ของ vaccinia virus

4) immunogene จะต้องติดกับ regulatory sequence ที่ recognize โดยระบบที่ vaccinia ใช้ในการทำ transcription

วัคซีนที่ได้ทดลองทำมาแล้วคือ ใช้ HBsAg gene จากไวรัสตับอักเสบต่อกับ thymidine kinase (TK) gene ของ vaccinia virus พบว่า vaccinia virus ปล่อย HBsAg ได้ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ hemagglutinin (HA) gene ของไวรัสไข้หวัดใหญ่สอดเข้าไปใน gene ของ vaccinia virus เมื่อ vaccinia นี้ infect เซลล์จะพบว่ามันปล่อย HA ออกมาที่ผิวเซลล์ได้

หรือถ้าฉีด recombinant vaccinia ให้กระต่ายพบว่ามันสร้าง antibody ที่ทำลายไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ และสำหรับหนูที่ฉีด recombinant vaccinia ที่มี glycoprotein D ของ herpes simplex virus (HSV) ก็พบว่าสามารถทนทานต่อ HSV ในขนาดที่ทำให้ตายได้เช่นเดียวกัน เมื่อเร็ว ๆ นี้ vaccinia virus ได้ถูกใช้ให้เป็นพาหะของ circumsporozoite antigen ของ malaria (Plasmodium knowlesi) กระต่ายที่ฉีด recombinant นี้จะผลิต antibody ต่อ P.knowlesi ได้จึงมีแนวโน้มที่จะผลิต recombinant สำหรับ malarial antigen stage อื่น ๆ ต่อไป

vaccinia virus ไม่ได้เป็นพาหะเพียงชนิดเดียว แต่มีไวรัสชนิดอื่น ๆ คือ SV40, adenovirus, bovine papilloma virus, herpes virus และ retrovirus ที่ใช้เป็นพาหะได้ด้วย แต่ไวรัสเหล่านี้ถูกคาดว่าจะเป็นสาเหตุของมะเร็ง ขณะที่ vaccinia ไม่มีปัญหาเช่นนั้น ข้อดีอีกอย่างหนึ่งของ vaccinia ก็คือ มันเคยถูกใช้เป็นวัคซีนปราบโรคไข้ทรพิษมานานแล้ว และ genome ของมันใหญ่มากพอที่จะรับ genome เพิ่มเข้าไปได้อีกกว่า 20,000 base pairs มันจึงมีศักยภาพในการเป็นพาหะของ polyvalent vaccine ที่ดีอีกประการหนึ่ง vaccinia virus เข้าไปอยู่ใน host cell ได้หลายชนิด ซึ่งทำให้เหมาะสำหรับทำวัคซีนสำหรับสัตว์ได้ เช่นทำวัคซีนโรค infectious bronchitis ในไก่ หรือ coccidiosis ในไก่เป็นต้น

การค้นพบที่ตื่นเต้นกันมากคือการสามารถป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ จากการฉีด vaccinia ที่มี influenza HA gene เข้าไปใต้ผิวหนังของหนู hamster การใช้พาหะที่มีชีวิตเช่น vaccinia ทำให้มีการปล่อย immunogen จาก infected cell เข้าใจว่าทำให้เกิดการกระตุ้น immune response อย่างซับซ้อนกว่าที่จะใช้วัคซีนที่ทำจากไวรัสที่ตายแล้วหรือจากบางชิ้นส่วนของไวรัส การมีไวรัสอยู่บนผิวเซลล์อาจเป็น immunogen ที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อดีของ vaccinia ในแง่ที่มันเคยใช้มานานนับสิบปีแล้วจะได้ผลในการกำจัดโรคไข้ทรพิษนั้นจะต้องไม่ลืมว่ามันไม่ได้ปลอดภัย 100% หนึ่งในล้านคนจะเกิดปัญหาและตายได้เมื่อใช้วัคซีนนี้ แต่เมื่อเทียบถึงความจำเป็นที่จะหาพาหะที่จะใช้ปราบโรคมาเลเรียที่ระบาดใน 160 ล้านคนในอาฟริกาก็ดี โรคตับอักเสบที่มีผลต่อประชากร 200 ล้านคนก็ดี ย่อมจำเป็นที่จะต้องหาวัคซีนมาใช้ วัคซีนนั้นจะต้องปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลิตออกมาแล้วต้องใช้ได้ในราคาถูก วัคซีนที่ทำจากพาหะ vaccinia จึงคุ้มที่จะพยายามทำโดยเฉพาะในประเทศที่มีโรคนี้อยู่และสามารถหาเงินมาจ่ายในโครงการนี้ วิธีการใช้พาหะนี้เมื่อศึกษาให้ถ่องแท้ครั้งหนึ่งแล้วย่อมช่วยให้การผลิตวัคซีนครั้งต่อ ๆ ไป สำหรับ immunogen อื่น ๆ มีโอกาสมากขึ้น ซึ่งจะยังประโยชน์แก่มนุษย์อย่างมหาศาล

Recombinant vaccine ที่ผลิตจาก E. coli

แบคทีเรียที่น่าจะเป็นพาหะที่ดีของ immunogene ที่จะทำวัคซีนสำหรับโรคต่าง ๆ คือ E.coli มี E.coli บางชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรคและสามารถเจริญในช่องทางเดินอาหารได้นานพอที่จะก่อให้เกิดภูมิต้านทานต่อ immunogen ที่มันปล่อยออกมา immunogen ที่แสดงออกบนผิวของ E.coli ที่ยังมีชีวิต ย่อมจะดีกว่า immunogen ที่มีอยู่ในตัว host cell ที่แตกออกเมื่อ host cell ตายแล้ว การที่จะได้ immunogen มาปรากฏบนผิวของแบคทีเรียนั้นจะต้องมีการเลือกแบคทีเรีย และเลือก plasmid ที่จะเป็นพาหะของ immunogene ให้เหมาะสม นอกจากนี้ยังต้องทำให้มัน express และปล่อย immunogen ออกมานอกเซลล์ได้อีกด้วย

ปัญหาของเทคโนโลยีนี้ก็คือ (1) ต้องไม่ให้โปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นใหม่นี้ถูกทำลายไปอย่างรวดเร็ว และโปรตีนนี้ต้องไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรีย (2) โปรตีนที่ได้อาจจะขาด glycosylation ซึ่งอาจจะเป็นส่วนสำคัญ (3) อาจไม่มีการ assembly ของ oligopeptide ทำให้ลด antigenicity ลง

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสร้างโปรตีนของไวรัสสำเร็จมาแล้วเช่น สร้าง VP_1 protein ของ FMDV

และ hepatitis B core antigen ของ hepatitis virus เทคโนโลยีของการผลิตแบคทีเรียจำนวนมากเรามีอยู่แล้ว และผลผลิตที่ได้มีลักษณะคงที่กว่า live virus vaccine การใช้แบคทีเรียก็ง่ายเพียงแต่ผสมน้ำหรืออาหารให้กินเท่านั้น

ข้อดีของการใช้ recombinant E.coli ในการทำวัคซีนคือ

1) การผลิตทำให้ง่ายขึ้น
2) เพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้ผลิตและผู้ใช้วัคซีน
3) เพิ่มความคงทนของวัคซีน
4) เพิ่มศักยภาพของวัคซีน
5) ลดการแพ้ เนื่องจากส่วนประกอบอื่น ๆ ของวัคซีน
6) สามารถจดลิขสิทธิ์ได้

ผลผลิตใหม่นี้อาจจะราคาแพงและจะต้องมีข้อดีกว่าจึงจะสู้ผลผลิตแบบเก่าที่มีอยู่แล้วได้วัคซีนชนิดที่ไม่เคยมีมาก่อน ก็อาจจะโดยใช้เทคนิคนี้ เช่น วัคซีนต่อต้านโรค coccidiosis ในไก่และต่อโรค herpes simplex virus เป็นต้น วัคซีนที่อาจจะผลิตได้อย่างปลอดภัยกว่าวัคซีนที่ผ่านมาผลิตแบบเดิมคือ วัคซีนต่อต้าน hepatitis B virus และ infectious bronchitis virus

เหตุผลของการเปลี่ยนกรรมวิธีการผลิต toxoid vaccine

ได้มีการศึกษาหาวิธีใหม่เพื่อพัฒนาการผลิตวัคซีน สืบเนื่องมาจากการมีความรู้เกี่ยวกับเชื้อโรคในแง่ของการทำให้เกิดโรค ความรู้เรื่องระบบและกลไกที่ต้านทานเชื้อโรคเพิ่มขึ้นและรู้จักวิธีการใช้สารเคมีเพื่อการกระตุ้นความต้านทาน ในสมัยก่อนวัคซีนต่อต้านโรคบาดทะยักทำจาก toxoid ที่มาจากแบคทีเรีย โดยการเพาะแบคทีเรียและฆ่าด้วยฟอร์-มาลิน toxoid ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย salt precipitation หรือ ultrafiltration หรือ column chromatography แต่เมื่อใช้วัคซีนที่ทำจาก toxoid ด้วยวิธีนี้หลาย ๆ ครั้งเกิดผลข้างเคียงประเภท hypersensitivity จึงได้มีการพัฒนา split-type tetanus toxin vaccine เพื่อแยกส่วน hypersensitive antigen ออกไป

ในบางกรณี toxoid ที่ทำจาก toxin ผสมฟอร์มาลินอาจกลับเป็น toxin ได้อีก เช่น toxoid ที่ทำจาก toxin ของอหิวาต์ทำให้บริเวณที่ฉีดวัคซีนเกิดการอักเสบมาก จึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนา subunit vaccine ซึ่งประกอบด้วย enzyme ที่ไม่เป็นพิษ คือ enzyme ใน toxin หมด activity แล้ว

การพัฒนาวัคซีนที่ทำจาก toxin ของอหิวาต์

โรคอหิวาต์เกิดจาก cholera toxin หรือ choleragen ซึ่งเป็น homogeneous protein (นน. 84,000) ที่ประกอบด้วย 2 subunits คือ ส่วนนอกเรียกว่า subunit B ประกอบด้วย peptide 5 ชั้นขนาด 11,500 เกาะกันแบบ non-covalent เป็นส่วนสำคัญของ holotoxin และใช้ในการจับกับ receptor บนผิวเซลล์ซึ่งประกอบด้วย oligosaccharide ของ ganglioside GM_1 ส่วนในเรียกว่า subunit A เป็น single polypeptide chain ขนาด 28,000 แบ่งออกเป็น 2 fragment คือ A_1 และ A_2 A_1 เป็น peptide มีน้ำหนัก 21,000 เป็นส่วนที่มีพิษคือเป็น enzyme ซึ่งย้าย ADP-ribose จาก NDA ไปเป็น GTP ซึ่งเป็น binding protein ที่รับผิดชอบในการควบคุม adenylate cyclase activity ของเซลล์

ในอดีตเคยมีการผลิตวัคซีนโรคอหิวาต์แบบใช้ฉีดโดยทำจากตัวแบคทีเรียที่ตายแล้ว มันให้ความคุ้มโรคระยะสั้นไม่เป็นที่นิยม และอัตราการคุ้มโรคไม่ถึง 100% วัคซีนนี้กระตุ้น antibody ต่อ cell wall lipopoly-saccharide (LPS) ในปัจจุบันวัคซีนทำจากพิษของอหิวาต์ที่ถูกทำลายแล้วด้วยฟอร์มาลิน ซึ่งอาจกลับเป็นพิษได้อีก และเมื่อฉีดเข้าไปในคนจะไม่เป็น immunogenic ต้องทำเป็น glutaraldehyde toxoid จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ และป้องกันโรคได้เพียง 6 เดือน แต่ถ้าเป็นผู้ที่หายจากโรคอหิวาต์จะมีภูมิคุ้มโรคอยู่ถึง 3 ปี หากทำวัคซีนจากพิษของอหิวาต์ตัมขณะที่ควบคุมอุณหภูมิ หรือทำ

จากพิษผสมกับ bacterial antigen แล้วให้ลูกสุกรกิน ขนาด 2.5 มก. จะป้องกันลูกสุกรจากโรค colibacillosis ได้หากใส่ฟอร์มาลินเพื่อทำลายพิษของ procholeragenoid จะลดพิษที่เหลืออยู่ได้และไม่เสียสภาพ antigen ของ toxin

วัคซีนโรค enterotoxigenic E.coli ในลูกสุกร

โรคท้องเสียจาก E.coli เกิดจาก toxin ที่ประกอบด้วย LT (heat labile toxin) ซึ่งเป็นโปรทีนที่มีโครงสร้างและการทำงานเช่นเดียวกับ choleragen ของอหิวาต์ และ ST (heat stable toxin) ที่เป็นโปรทีนขนาดเล็ก (2,000-10,000) มีหน้าที่ปล่อยน้ำออกมาจากลำไส้โดยผ่านการทำงานของ guanylate cyclase activity

การป้องกันลูกสุกรอาจทำได้หลายวิธีคือ ใช้วัคซีนที่ทำจาก LT ฉีดให้กับแม่สุกรแล้วแม่สุกรจะให้ antitoxin ผ่านทางนมไปให้ลูกสุกร ดังกล่าวมาแล้วว่า procholeragenoid จากอหิวาต์สามารถปกป้องลูกสุกรจากโรค neonatal colibacillosis ได้ จึงได้มีการคิดทำ procoligenoid เลียนแบบ choleragenoid ซึ่งเข้าใจว่าจะให้ผลดีในการรักษาโรคที่เกิดจาก E.coli ขณะเดียวกันก็มีความคิดที่จะทำทั้ง toxin ของ E.coli และของอหิวาต์มาทำเป็นวัคซีนรวมเพื่อใช้ประโยชน์ให้กว้างขวางขึ้น

ปัจจุบันได้มีการทำวัคซีนรวมระหว่าง subunit คือใช้ ST ที่สังเคราะห์ขึ้นนำมาเชื่อมต่อกับ B subunit จาก E.coli ที่แยกมาได้จากสุกรแล้วผสม Freund's adjuvant ซึ่งใช้ได้ผลในการฉีดป้องกันโรค แต่ STa (active ในลูกสุกร) เมื่อเชื่อมกับ bovine IgG แล้วฉีดให้แม่สุกรจะไม่สามารถปกป้องลูกสุกรจาก Sta^+ LT^- E.coli ได้ การทดลองรวม subunit ของ toxin หรือ LPS หรือใช้ mutant สำหรับพัฒนาวัคซีนต่อต้านโรคจาก E.coli ยังคงดำเนินต่อไป

อนึ่ง E.coli จะทำให้เกิดโรคได้ถ้าสามารถเกาะและเจริญอยู่ในลำไส้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้น การป้องกันมิให้ E.coli ใช้ pili เกาะผนังลำไส้จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ป้องกันโรค วัคซีนต่อต้านการเกาะของ pili ของ E.coli เช่น K88 pilus vaccine ก็ได้มีการพัฒนาโดยอาศัย mutant ที่มี pili จำนวนมาก

วัคซีนต้านโรค anthrax

โรค anthrax เกิดจาก toxin ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนคือ edema factor, lethal factor และ protective antigen (PA) วัคซีนป้องกันโรค anthrax ในปัจจุบันทำด้วย alum-precipitated material จาก avirulent strain ของ B.anthracis ได้เคยมีการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่า protective antigen เป็น antigen ที่ใช้ป้องกันโรคได้ ปัจจุบันได้รู้ว่า anthrax มี plasmid ซึ่งสามารถ clone ออกมาให้ผลิต PA บริสุทธิ์ จึงหวังว่าจะทำวัคซีนที่ปลอดภัยสำหรับคนและสัตว์ได้ โดยไม่มีส่วนอื่น ๆ ของ Bacillus ปนอยู่

การใช้ recombinant mammalian cell line เพื่อการผลิตวัคซีน

ความนิยม recombinant E.coli ได้ลดลงเมื่อได้พิจารณาปัญหาต่าง ๆ ต่อไปนี้

(1) ความไม่ง่ายที่จะจัดการกับ gene ของ host cell

(2) ราคาค่าผลิต antigen จาก host cell

(3) ราคาค่าสะกัด antigen ออกมาให้บริสุทธิ์

(4) ประสิทธิภาพของการผลิต

(5) ความปลอดภัย

เมื่อเริ่มใช้ recombinant DNA technology ได้นิยมใช้ E.coli เป็น host cell ในการผลิต recombinant protein เรามีเทคนิคการจัดการกับ DNA ของ E.coli ดีที่สุดแต่มีข้อเสียคือ E.coli มักไม่ secrete โปรทีนแต่กลับเก็บไว้ใน refractile body ก่อให้เกิดปัญหาโปรทีนถูกเก็บไว้ในสภาพ inactive ดังนั้นการผลิตวัคซีนที่มีโมเลกุลที่ active จะต้องผ่านวิธี solubilization และ folding ทำให้เพิ่มราคาค่าทำให้บริสุทธิ์ และอาจจะทำให้โมเลกุลเสีย immunogenicity ระหว่างที่ทำให้บริสุทธิ์ได้ บางกรณีก็ได้โปรทีนที่ active น้อย E.coli จึงเป็น host cell ที่ไม่คุ้มกับการลงทุน

yeast ก็เลยถูกทดลองใช้ให้เป็น host cell มันสามารถปล่อยโปรทีนและทำ glycosylate โปรทีนที่มันผลิตออกมาได้ ขณะเดียวกันก็มีเทคโนโลยีสำหรับการผลิต yeast จำนวนมากด้วย yeast มีข้อเสียคือเซลล์ของมันไม่เหมือนเซลล์สัตว์ เช่น ถ้าให้ yeast express HBsAg มันจะไม่ secrete และไม่เกิด glycosylate จึงต้องหา host cell อื่นเพื่อผลิต HBsAg

ในสมัยก่อนเคยมีความเชื่อกันว่าการใช้ mammalian cell เป็น host ของ recombinant DNA จะแพงกว่าการใช้แบคทีเรียหรือ yeast เพราะว่าอาหารและสภาพการเลี้ยง mammalian cell นั้นยุ่งยากกว่า แต่ mammalian cell เป็น host ตามธรรมชาติของไวรัสที่รบกวนคนและสัตว์เลี้ยง โปรทีนจากไวรัสจึงถูก express ในเซลล์ของ mammall ได้และจะถูกตัดต่อและปล่อยออกมาแบบเดียวกับที่เกิดในธรรมชาติ คือมีการ glycosylate และการ modify เช่นมีการเติม sulphate group และ phosphate group หรือเติม fatty acid เป็นต้น การสะกัดโปรทีนชนิดนี้ทำได้ง่ายโดยไม่เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมากนัก

ในปัจจุบันได้มีการใช้ mammalian cell เป็น host ของ recombinant ที่มี HBsAg gene antigen ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์มีลักษณะเหมือนกับ antigen ที่เคยเก็บจากซีรัมของคนไข้ (ซึ่งเป็นวิธีการผลิต antigen แบบเดิม) นับว่า HBsAg เป็น antigen ชนิดแรกที่ผลิตจาก mammalian cell ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนได้ดีกว่า antigen ที่สะกัดจากซีรัมอีกด้วย

mammalian cell ได้ถูกใช้ให้ผลิต glycoprotein D(gD) จาก herpes simplex virus ซึ่งทำได้โดยการตัดส่วน gD gene และให้ gene นี้ express ในเซลของ mammal โดยใช้เทคนิคสำหรับ express HBsAg ผลผลิตที่ได้เหมือน gD ในธรรมชาติคือ เป็น glycosylated protein ที่เป็น antigen gD นี้ใช้ทำวัคซีนเพื่อฉีดป้องกันโรคที่เกิดจาก herpes simplex type 1 และ type 2 ได้ ขณะที่ gD ที่ผลิตจาก E.coli มีปัญหาเรื่องการ secrete และ glycosylation และมี immunogenicity น้อย

ปัญหาเรื่องความปลอดภัยจากวัคซีนที่ทำจาก recombinant DNA technology เป็นเรื่องสำคัญ การที่ cell line สะอาดและปล่อย protein โดยที่ไม่มีเซลล์แตก วัคซีนย่อมมีสิ่งเจือปนน้อย ยกเว้น cell line เหล่านี้จะมีลักษณะผิดปกติ เช่น ปล่อยไวรัสหรือปล่อยส่วนอื่น ๆ ของเซลล์ออกมา ปัญหาเรื่องการทำให้เกิดมะเร็ง และการมีไวรัสแฝงอยู่ใน cell line จึงเป็นเรื่องที่ต้องระวัง และเมื่อหลีกเลี่ยงได้แล้วการใช้ mamalian cell line ในการผลิตวัคซีนย่อมจะเป็นสิ่งที่ดีที่สุดในอนาคต

วัคซีนที่ทำจากโปรทีนสังเคราะห์

การทำ peptide vaccine เป็นที่สนใจมากเพราะจะไม่มี contamination ของสารที่ไม่ใช่ antigen และเป็นการเปลี่ยนจากวิธีใช้ขบวนการทางชีววิทยาเป็นใช้ขบวนการทางเคมี วิธีการทำ peptide vaccine มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

(1) วิเคราะห์ DNA เพื่อดูว่าส่วนใดเป็น DNA ที่เป็นรหัสของโมเลกุลที่ยื่นออกมานอกผิวของโปรทีนที่พบได้นั้น

(2) ดูว่าเมื่อยืดโมเลกุลนั้นออกจะเป็นอย่างไรก่อน แล้วจึงดูว่า hydrophobic กับ hydrophilic site แยกกันที่ใด ซึ่งจะแสดงว่าส่วนนั้นเป็นส่วนผิวนอกของโปรทีน (วิธีนี้ใช้กับ VP_1 ของ FMDV)

(3) ทดสอบ peptide โดยวิธีต่าง ๆ คือดูว่าจะจับกับ carrier อะไร เพื่อที่จะให้เกิดกระตุ้นภูมิต้านทานได้มากที่สุด วัคซีนชนิดนี้อาจจะไม่ฉีดให้กับคนเพราะว่า adjuvant อาจจะทำให้มีปัญหาเรื่อง hypersensitivity เมื่อฉีดซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งได้

ตัวอย่างของโปรทีนสังเคราะห์คือ B subunit ของ choleragen เฉพาะ peptide ลำดับที่ 69-85 เมื่อนำ peptide นี้มาต่อกับ tetanus toxoid สามารถทำให้เกิด antibody ที่ cross react กับ choleragen ได้ นอกจากนี้ยังมี peptide ชื่อ CTP_3 (ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 50-64) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำปฏิกริยากับ antibody ต่อ choleragen ได้ peptide เหล่านี้ไม่ได้ทำให้เกิด cellular หรือ local immunity ใน

intestinal tract แต่เข้าใจว่ามันขัดขวาง action ของ cholera gen ในลำไส้ได้

วัคซีนต้านโรคคอตีบ

Diphtheria toxin ถูกปล่อยออกจากแบคทีเรีย เป็น polypeptide สายเดียวขนาด 62,000 มี disulfide bridge 2 แห่ง มีลักษณะเป็น loop ที่ตำแหน่งระหว่างกรดอะมิโนที่ 187-201 toxin นี้เป็น proenzyme ซึ่งเมื่อถูกย่อยโดย trypsin แล้วจะ active มี adenosine diphosphate ribosyl transferase activity ซึ่งจะระงับการสร้างโปรทีน

ในการทำวัคซีนต่อต้านโรคคอตีบได้มีการสังเคราะห์ "loop" ส่วนที่มีกรดอะมิโนลำดับที่ 186-201 loop นี้แทนโมเลกุล toxin ของโรคคอตีบ ส่วนหนึ่งของ loop คือ tetradecapeptide บริเวณ 188-201 เรียกว่า STDP STDP นี้สามารถนำมา conjugate กับ protein หรือ synthetic carrier และฉีดพร้อม adjuvant เพื่อให้เป็นวัคซีนที่กระตุ้น antibody ที่ทำลาย toxin ได้ นับเป็นวัคซีนชนิดแรกที่ทำจากโปรทีนสังเคราะห์ที่ conjugate กับ carrier (poly A-L) แล้วให้ความคุ้มต่อโรค แต่ต้องใช้ขนาดสูงมากและทำให้สัตว์สร้างภูมิต้านทานต่ำเมื่อเทียบกับ toxid ที่ทำจากการใช้ฟอร์มาลินทำลาย toxin

การทำวัคซีนจาก spike protein ของ enveloped virus

enveloped virus จะมีส่วน spike ที่ยื่นออกมาจาก envelope spike เป็น glycoprotein ที่เป็น antigen สำหรับสำหรับกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มันเป็น amphiphilic protein ที่ฝังเข้าไปในส่วนของ lipid bilayer ของ envelope การแยกเอาส่วน spike protein ออกมาเป็นเรื่องยาก เพราะ hydrophobic membrane ที่เป็นที่ยึดของโปรทีนนี้มักจะเข้ามารวมกันเป็นกระจุก โปรทีนมีการเกาะกับ membrane โดย hydrophobic molecule เช่น detergent และเกาะกับ lipid หรือโปรทีนอื่น ๆ หรือเกาะกันเอง จึงมีส่วนประกอบที่ไม่แน่นอน วัคซีนที่ทำจาก spike protein ในสมัยก่อนจึงเป็นก้อนที่มีโมเลกุลผสมกันหลายอย่าง

ต่อมามีการศึกษาเพื่อแยกส่วนของ enveloped virus โดยการใช้ sodium dodecyl sulphate (SDS) กับ influenza virus จึงได้แยก spike protein ออกเป็น 2 ชนิด คือ hemagglutinin และ neuraminidase แยกจากกันโดย density gradient centrifugation

วิธีสะกัด amphiphilic protein ง่าย ๆ คือใช้ non-ionic detergent ชื่อ Triton X-144 ซึ่งมี cloud point ที่ 22°C (triton X-100, 67°C) การละลายของไวรัสจะเกิดที่จุดต่ำกว่า cloud point และการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นมาถึง 30°C จะทำให้มีการแยกออกเป็นชั้นของ lipid และชั้นของ amphiphilic protein complex กับ detergent และละลายอยู่ในส่วน detergent ส่วน nucleocapsid และ hydrophilic protein จะอยู่ในส่วนน้ำ วิธีนี้ใช้ได้ผลกับ semliki forest virus และ vesicular stomatitis virus หลังจากนั้นทำการแยก detergent ออกจาก protein โดยอาศัย sucrose gradient และเมื่อ detergent แยกออกไปแล้วโปรทีนจะเกาะกันเกิดเป็น protein micelles

การทำ reconstitution ของ spike protein กับ phospholipid เพื่อใช้เป็นวัคซีน

spike glycoprotein สามารถเกาะกับ phospholipid อีกเพื่อทำให้เกิดเป็น liposome liposome เป็นเทคนิคการทำ conjugate แบบหนึ่งที่ประกอบด้วย antigen กับ artificial lipid bilayer เพื่อให้ liposome นั้นคงทนจึงได้ทำ lipid bilayer หลาย ๆ ชั้นเรียกว่า multilamellar phosphatidyl choline liposome ซึ่งมี protein antigen อยู่ทั้งภายในและภายนอก liposome นั้น เมื่อ antigen specific lymphocyte มี recognition ต่อ antigen ที่ผิวนอก มันจะได้รับ antigen ที่ค่อย ๆ ถูกเปิดออกหลังจาก liposome สลายตัว ทำให้ lymphocyte สร้างภูมิต้านทานได้ดีเนื่องจากมีการกระตุ้นจาก antigen เป็นระยะเวลานาน การทำให้ protein antigen เกาะติดกับ lipid bilayer ทำได้หลายวิธีคือใช้ hydrophobic reaction หรือทำ cross-linking

กับ glutaraldehyde หรือโดย incorporation ระหว่าง specific receptor กับ lipid bilayer

liposome ซึ่งมี spike protein ที่ผิวนอกเรียกว่า virosome virosome นี้ต้องเติม amphiphilic adjuvant เพื่อให้กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่นเติม D-steroyl-muramyl dipeptide กับ Lipid A หากใช้ protein micelle เป็น antigen อาจจะเติม amphiphilic adjuvant ให้โดยวิธี hydrophobic interaction

โปรทีนจาก spike ของ parainfluenza virus จะทำให้เป็น immunogenic ได้โดยเติม quil A เรียก complex ที่ได้ว่า iscom (immunostimulating complex)

ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ spike protein

spike protein สมัยก่อนเป็นก้อนของโปรทีนผสมกัน แต่ปัจจุบันได้จำแนกตามลักษณะองค์ประกอบคือเป็น peplomer (monomer) หรือเป็น protein micelles (spike protein aggregate กันเอง) หรือเป็น virosome (spike protein รวมกับ phospholipid vesicle) สำหรับ peplomer นั้นไม่มี immunogenicity แต่ถ้าเป็น protein micelles จาก semliki forest virus, influenza, hepatitis B virus, rubella virus หรือจาก rabies virus ก็จะสามารถกระตุ้น antibody ได้ immunogenicity ของ virosome จะแตกต่างกันแล้วแต่ขนาดของ liposome, ประจุ, ความหนาแน่นของ epitope และแล้วแต่ชนิดของ lipid ที่อยู่ใน liposome ถ้าเป็น cholesterol จะมี immunogenicity เพิ่มขึ้น adjuvant ที่สามารถใส่เข้าไปใน liposome คือ muramyl dipeptide หรือ Lipid A แต่ adjuvant อาจจะทำให้ส่วน lipid เสี่ยงต่อการเกิด hypersensitive reaction ได้ การใช้ iscom จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าการใช้ protein micelle ถึง 10 เท่า iscom ใช้ได้ดีกับ feline leukemia virus (FLV)-โดยให้ Quil A ต่อกับ glycoprotein 85 ของ FLV, สำหรับ parainfluenza, iscom เป็น immunogen ที่ดีสามารถใช้ป้องกันสัตว์จากโรคดังกล่าวได้

แนวคิดเพื่อแก้ปัญหา spike protein ไม่มี antigenicity ก็คือนำเอา spike protein มาทำให้เป็น amphiphilic โดยวิธีทางเคมี เช่น ให้จับกับ fatty acid แล้วเอา amphiphilic molecule นี้ ใส่เข้าไปใน liposome หรืออาจจะนำเอา peptide มาเชื่อมกับ amphiphilic carrier protein โดยตรงก็ได้หรืออาจจะทำเป็น complex กับ glycoside Quil A

การเพิ่มศักยภาพของวัคซีนโดยการทำ conjugates

เทคโนโลยีในการต่อ peptide ที่เป็น antigenic site เข้ากับ carrier molecule เรียกว่าการทำ conjugate วัตถุประสงค์ของการทำ conjugate ก็เพื่อเพิ่ม immunogenicity ในสมัยก่อนเคยใช้ mycobacterial cell ผสมกับ oil emulsion (เรียกว่า Freund's complete adjuvant) เป็นสารเพิ่ม immunogenicity ให้กับ peptide จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของ mycobacteria พบว่ามีสารประกอบพวก peptidoglycolipid และ peptidoglycan สาร peptidoglycan ไม่ได้พบเฉพาะใน mycobacteria เท่านั้น ในส่วนประกอบของผิวเซลล์ของ S.aureus Wood 46 และ B. subtilis ก็พบว่ามี peptidoglycan และ teichoic acid ที่สามารถกระตุ้นให้เกิด lymphocyte แบ่งตัวและปล่อย inhibitory factor ได้ ในกรณีที่มี infection ดูเหมือนว่ามันทำให้เกิด polyclonal activation ใน host นอกจากนี้ยังมี lipopolysaccharid จากผิวเซลล์ของพวกแบคทีเรียกรัมลบที่สามารถทำให้เกิด polyclonal B cell activation ได้เช่นเดียวกัน

Martin Davies และ Stuwart-Tull ได้ศึกษา affinity ของ natural mycobacterial polymers คือ glycopeptide และ peptidoglycan ที่มีต่อ membrane พบว่า mycobacterial glycopeptide เกาะกับ cell membrane ได้ ขณะที่ mycobacterial peptidoglycolipid ทำให้ membrane รั่วเสียหาย ความสามารถของ polymer ในการจับกับ membrane ของ lymphocyte มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติในการเพิ่มภูมิต้านทานของ polymer นั้น

ที่น่าสังเกตคือไม่นานมานี้ได้มีการพบว่าเฉพาะ

ส่วน muramyl dipeptide (MDP) ใน peptidoglycan เท่านั้น ก็พอเพียงสำหรับการเพิ่มภูมิคุ้มกัน จึงได้มีการสังเคราะห์ muramyl dipeptide เพื่อใช้ในการนี้ muramyl dipeptide น่าสนใจตรงที่มันจะไม่ทำให้เกิดการเป็นฝีเมื่อฉีดเข้าไปในสัตว์ มันไม่มีส่วนของ "oil" เช่นเดียวกับ oil adjuvant และ muramyl dipeptide ดีกว่า lipid solvant พวก short chain hydrocarbon เช่น Bayol F ที่มีปัญหาทำให้เกิดจุดห้อเลือดหรือเกิดแผลหลังฉีดวัคซีน

ในปัจจุบันได้มีการทดสอบ derivative ของ muramyl dipep tid สังเคราะห์หลายชนิดในแง่ต่าง ๆ คือ (1) มันกระตุ้นส่วนใดของ immune response (afferent หรือ efferent arm) (2) ควรจะใส่เข้าไปด้วยวิธีใดจึงจะได้ผลดี (3) ควรใช้ขนาดเท่าใด derivative แต่ละชนิดอาจกระตุ้น immunity แบบ humoral และ cellular ไม่เหมือนกันหรืออาจจะกระตุ้น non-specific immune reaction ก็ได้

งานวิจัย immunopotentiating conjugate ที่สำคัญอีกชิ้นหนึ่งคือการสังเคราะห์ polymer ที่มี backbone เป็น poly-L-Lysine และมี side chain poly DL-alanine ซึ่งต่อท้ายด้วย peptide L-tyrosine และ L-glutamic acid เรียกย่อ ๆ ว่า (T,G)-A--L polymer นี้เมื่อฉีดพร้อมกับ FCA จะกระตุ้นการสร้าง antibody (T,G)-A-L ได้ถูกนำมา conjugate กับ MDP ด้วย carbonidiimide method พบว่าได้ antibody titer สูงเมื่อฉีดเข้าอุ้งเท้าของหนู ในเวลาเดียวกันได้มีการพัฒนา synthetic peptide ของ diphtheria toxin โดยนำเฉพาะ B unit loop (186-201 peptide) มาต่อกับ MDP-(T,G)-A--L โดยต่อกันที่ SH และ COOH group ด้วย-glutaraldehyde วัคซีนนี้สามารถป้องกันพิษจาก diptheria toxin ให้กับหนูตะเภา ได้ผลการทดลองดังกล่าวคาดว่าการใช้ immunopotentiating conjugate ที่ประกอบด้วย backbone carrier, immunopotentiator และ protective antigen คงจะพัฒนาขึ้นมาในอนาคตและหวังว่าการพัฒนาวัคซีนในแนวนี้จะประสบความสำเร็จดังตัวอย่างที่อ้างมาแล้ว

เอกสารอ้างอิง

1. **Cavanagh, D., 1985. Viral and bacterial vectors of immunogenes. Vaccine 3:45-48.**

2. **Davies, M. and Stuwart-Tull, D.E.S., 1981. The affinity of bacterial polysaccharide-containing fractions for mammalian cell membrane and its relationship to immunopotentiating activity. Biochim. Biophys. Acta. 643:17.**

3. **Dorner, F. and Mc Donel, J.L. 1985. Bacterial toxin vaccines. Vaccine 3:94-102.**

4. **Morein, B. and Simons, K. 1985. Subunit vaccines against enveloped viruses : virosomes, micelles and other protein complexes. Vaccine 3:83-93.**

5. **Patzer, E.J. and Lasky L.A. 1984. Use of recombinant mammalian cell lines for vaccine production : Vaccine 2:234-235.**

6. **Stewart-Tull, D.E.S. 1985. Immunopotentiating conjugates, Vaccine 3:40-44.**