Thesis Title Development of Human Tissue Plasminogen Activator (t-PA) Production in Bacterial System

Author Mr. Chatchai Tayapiwatana

Ph.D. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Chairman
Prof. Dr. Rolf G. Werner	Member
Prof. Dr. Friedrich Götz	Member
Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi	Member
Assoc. Prof. Dr. Amphawan Apisariyakul	Member

ABSTRACT

Tissue plasminogen activator (t-PA) is a thrombolytic agent of choice for the treatment of acute myocardial infarction. It is a polypeptide containing 527 amino acid residues. T-PA molecule is divided into five structural domains. In this study, the production of a secreted form small molecule t-PA in bacterial system will be developed. The DNA fragment coding for kringle 2 plus serine protease domains (K2S) of tissue plasminogen activator (t-PA) was inserted into a phagemid vector, pComb3HSS. The phagemid containing K2S gene, pComb3H-K2S obtained was transformed and expressed in *E. coli* XL-1 Blue. The fibrin binding site of kringle 2 was demonstrated in all expressed versions (phage-

bound, periplasmic, and secreted forms) using the monoclonal anti-kringle 2 antibody (16/B). Only the secreted from of rK2S revealed a fibrinogen-dependent amidolytic activity with the specific activity of 236 IU/μg. No amidolytic activity of rK2S was observed in either the periplasmic or the phage-bound form. The secretion of rK2S as an active enzyme offers a novel approach for the production of the active-domain deletion mutant t-PA, rK2S, without any requirements for bacterial compartment preparation and *in vitro* refolding processes. For fermentation studies, a batch-mode cultivation in 4L fermentors was carried out to obtain rK2S (Lekteplase), which was secreted and correctly folded from *Exccherichia coli* with the yield of 100 mg/L. This finding is an important pharmaceutical biotechnological innovation in the development of large-scale, bacterium-based t-PA production systems.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาการผลิตฮิวแมน ทิสชูพลาสมิโนเจนแอคติเวเตอร์ (ที-พีเอ) ในระบบของเชื้อแบคทีเรีย

ชื่อผู้เขียน นายชัชชัย ตะยาภิวัฒนา

วท.ด. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. จีรเดช มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
ศ. ดร. รอล์ฟ จี. แวร์เนอร์	กรรมการ
ศ. ดร. ฟรีดริช เกิ้ทซ์	กรรมการ
รศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	กรรมการ
รศ. ดร. อัมพวัน อภิสริยะกุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

ทิชชูพลาสมิโนเจนแอคติเวเตอร์ (ที-พีเอ) เป็นยาละลายลิ่มเลือดที่นิยมใช้ในการรักษาโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน ที-พีเอเป็นโพลีเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 527 ตัว โดยโมเลกุลของที-พีเอแบ่งเป็น 5 โดเมน ในการศึกษานี้จะทำการพัฒนาการผลิตที-พีเอโมเลกุลเล็กที่อยู่ในรูปที่ถูกขับออกมาในระบบของเชื้อแบคทีเรีย ชิ้นส่วนของดีเอนเอที่กำหนดการสร้างคริงเกิล 2 พลัสซีรีนโปรตีเอส (K2S) โดเมนของที-พีเอจะถูกใส่เข้าไปในเฝจมิดเวคเตอร์ pComb3HSS ซึ่งถูกทรานสฟอร์มเข้าไปและแสดงออกในแบคทีเรียอิโคไล XL-1 Blue จากการตรวจสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติ

คริงเกิล 2 แอนติบอดี้ (16/B) พบว่าส่วนที่จับกับไฟบรินของคริงเกิล 2 จะปรากฏในทุกแบบของที-พีเอคือแบบที่ติดกับตัวเฝจ แบบเพอริพลาสมิค และแบบที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ มีเพียง rK2S รูปแบบที่ถูกขับออกสู่นอกเซลล์เท่านั้นที่มีไฟบริโนเจน-ดีเพนเดนท์อมิโดไลติคแอคติวิตี้ โดยมีสเปซิฟิคแอคติวิตี้ 236 IU/μg ส่วน rK2S ที่อยู่ในเพอริพลาสมิคและแบบติดตัวกับตัวเฝจจะไม่มีอมิโดไลติคแอคติวิตี้ การปล่อย rK2S ออกมาในรูปเอนไซม์ที่มีฤทธิ์นี้เป็นวิธีการใหม่ที่สามารถใช้ในการผลิต rK2S ซึ่งเป็นแอคทิฟโดเมนดีลีชั่นมิวแตนท์ที-พีเอโดยไม่ต้องนำแบคทีเรียมาผ่านขบวนการใดๆต่อและไม่ต้องทำการม้วนตัวใหม่แต่อย่างใด ในการศึกษาเกี่ยวกับการหมัก ได้ทำการผลิต rK2S (Lekteplase) ซึ่งถูกปล่อยออกมาจากเชื้ออิโคไลและม้วนตัวอย่างถูกต้อง ได้ผลผลิต 100 mg/L จากการหมักแบบแบทช์โมดในถังหมักขนาดความจุ 4 ลิตร การค้นพบนี้เป็นนวัตกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรมที่สำคัญซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการผลิตยาละลายลิ่มเลือดจากเชื้อแบคทีเรียในระดับอุตสาหกรรมต่อไป