PRODUCTION OF HUMAN ScFv THAT NEUTRALIZES INFLUENZA A VIRUS INFECTION

UMAPORN THATHAISONG

Ph. D. (BIOMEDICAL SCIENCE)
MAJOR IN MOLECULAR IMMUNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

DISSERTATION ADVISORS: WANPEN CHAICUMPA, D. V. M. (HONS.), Ph. D.,
PRAMUAN TAPCHAISRI, Ph. D., POTJANEE SRIMANOTE, Ph. D.,
PONGSRI TONGTAWE, Ph. D., THAWEESAK SONGSERM, D. V. M., Ph. D.

ABSTRACT

The world is facing a threat of new influenza pandemic that might be caused by either the highly pathogenic strains of avian influenza A virus, H5N1 subtype, that have adapted to more efficient human-to-human transmission, or the emergence of a new influenza virus subtype from the genetic reassortment. Current influenza vaccines are likely to have low, if there is any, protective efficacy against the new virus. Besides, the supply of the only one family of the effective anti-influenza drug, *i.e.*, neuramindase inhibitors, might not meet the high demands during the large outbreak/pandemic. The drug must be given to the patient as early as possible in the course of the infection to be effective and the drug resistant virus mutants start to emerge. Thus, for the influenza pandemic preparedness, it is necessary that a vaccine that confers broad protection against infection caused by heterologous influenza strains/subtypes and new anti-influenza drugs should be developed. Alternatively, a therapeutic antibody that can interfere with the virus pathogenicity should be sought.

The influenza viral RNA dependent-RNA polymerase complex consists of nucleoprotein (NP) binds to three polymerase subunits, *i.e.*, acidic polymerase (PA) and two basic polymerases, *i.e.*, PB1 and PB2. The PB1 has endonuclease activity required to snatch the capped primers from host pre-mRNAs for viral RNA transcription; it also binds to the vRNA and cRNA promoters. The PB2 is responsible for recognition and binding the cap structure of host mRNAs before the virus

replication takes place in the host nucleus. Although the exact role of the PA is less well understood, but evidences indicate that it has a central role in both transcription and replication. Because of the pivotal role of the polymerase proteins in the influenza virus infectious cycle, targeting polymerase subunits provides a novel strategy to develop anti-virus compounds: drugs and/or therapeutic antibody, against the influenza A virus.

In this study the recombinant N-terminal halves of the PA, PB1 and PB2 proteins were produced in a prokaryotic protein expression system. Complementary DNA (cDNA) was prepared from genomic RNA of a highly pathogenic influenza A virus, A/duck/144/Thailand/2005 (H5N1). The cDNA was used as a template for PCR amplification of 5'-gene segments encoding the N-terminal halves of the PA, PB1 and PB2 polymerase proteins. The cDNA amplicons were individually cloned into appropriate plasmid vectors and the recombinant vectors were introduced into appropriate *E. coli* strains. Selected *E. coli* transformants were individually grown and induced to express the respective recombinant polymerase proteins; then individual proteins, *i.e.*, N-terminal PA, PB1 and PB2, were purified from the bacterial lysates by using nickel column. Individual recombinant proteins were used as antigens in the phage bio-panning process to select phage clones displaying human single chain antibody fragments (HuScFv) from a large human antibody repertoire-phage library constructed in the laboratory from multiple Thai blood donors using M13 filamentous bacteriophages. The individual phage clones were allowed to infect HB2151 *E. coli* that could recognize a stop codon between the HuScFv coding sequence and the *g3p* of the phagemid; thus the soluble HuScFv could be induced to express by the phagemid transformed *E. coli*. The HuScFv binding specificities to the homologous recombinant polymerase proteins were determined by using several immunological assays, *i.e.*, indirect ELISA, Western blot analysis, and dot ELISA.

The HuScFv specific to the recombinant PA protein were tested for their ability to inhibit the biological function, *i.e.*, nuclear localization, of recombinant N-terminal PA (which has a nuclear localization signal located at the amino acid residues 124-139 and 186-240 in the molecule). The HuScFv were found to block the entry of the PA into the nucleus of the digitonin permeated Vero cells cultured on glass cover slips suggesting that the HuScFv bound to or mediating steric hindrance of the nuclear

localization signal of the PA. Thus, it is appropriate to speculate that the HuScFv in their cell penetrating version would be able to block the transcription initiation of the virus.

The data obtained from this research have demonstrated the following:

1) Recombinant polymerase proteins of influenza virus could be convenient produced in bacteria, *i.e*., *E. coli*, which to the best of my knowledge, is the first reported evidence.

2) Fully human monoclonal antibodies (HuScFv) to the N-terminal PA (*which contains nuclear translocation signal*), N-terminal PB1 (*binds to 3' and 5' of vRNA at amino acid positions 1-83, binds to PA in the polymerase complex at amino acid residues 1-25, and has also two nuclear translocation signals at amino acid residues 180-195 and 202-252*), and N-terminal PB2 (*contains viral nucleoprotein binding site at amino acids 1-269, PB1 binding site at amino acids 206-258, and cap binding site at amino acids 242-282*), were successfully produced using phage display library. The technology used has several advantages including the human monoclonal antibodies can be unlimitedly produced without the prolonged immunization schedule and the normal immunological regulation mechanisms that usually occurred *in vivo*. Besides, they are unlikely to induce anti-isotype response in the human recipient.

3) The so-produced specific HuScFv to the N-terminal PA blocked the nuclear import of the PA.

While the activities of the HuScFv specific to the PB1 and PB2 and all of the specific HuScFv in combination need testing of their inhibitory effects to the homologous proteins and the role in virus replication, the results of the HuScFv that blocked the PA function encourages the use of the fully human monoclonal antibodies to the virus polymerase proteins, in the form of transbody, as influenza therapeutics.

KEYWORDS: INFLUENZA A VIRUS/RNA DEPENDENT-RNA POLYMERASE/ HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY/PHAGE DISPLAY/SCFV/N-TERMINAL PB1/N-TERMINAL PB2/N-TERMINAL PA/NUCLEAR LOCALIZATION SIGNAL

174 P.

การผลิตแอนติบอดีชนิดสายเดี่ยวของมนุษย์ที่ต่อต้านการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ

นางสาวอุมาพร ทาไธสง

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)
สาขาวิชาหลักวิทยาภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

คณะกรรมการควบคุมสารนิพนธ์: ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา รศ. ดร. ประมวญ เทพชัยศรี
ผศ. ดร. ผ่องศรี ทองทวี ผศ. ดร. พจนีย์ ศรีมาโนชญ์ และ รศ.ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม

บทคัดย่อ

สถานการณ์การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในปัจจุบันเป็นอาณัติสัญญาณบ่งชี้ความเป็นไปได้ว่าอาจมีการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในคนครั้งถัดไปโดยมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกชนิดเอ สายพันธุ์ เอชห้า เอ็นหนึ่ง ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงและมีความสามารถติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ง่ายขึ้น หรืออาจมีสาเหตุมาจากเชื้อสายพันธุ์อุบัติใหม่ที่เกิดจากกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่แตกต่างกันสองสายพันธุ์ (genetic reassortment) ที่เข้าไปอยู่ในโฮสต์เดียวกันได้ ในปัจจุบันการป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่โดยการฉีดวัคซีนมีผลสัมฤทธิ์ต่ำเนื่องจากไม่สามารถให้ผลป้องกันการติดเชื้อข้ามสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากำลังการผลิตวัคซีนและยาต้านไวรัสที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นิวรามินิเดส ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อไวรัสกลุ่มเดียวที่ยังคงให้ผลดีในการรักษาไข้หวัดใหญ่หากผู้ป่วยได้รับตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อนั้นมีจำกัด ดั้งนั้นหากเกิดการระบาดใหญ่ของโรคไข้หวัดใหญ่ขึ้นวัคซีนและยาจะมีไม่พอใช้ป้องกันและรักษาผู้ป่วย ยิ่งไปกว่านั้นขณะนี้เริ่มมีรายงานการพบเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ดื้อยาต้านไวรัสดังกล่าวแล้วด้วย ดังนั้นการเตรียมพร้อมรับมือกับการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่โดยการพัฒนาทั้งยาต้านเชื้อไวรัสชนิดใหม่ และวัคซีนชนิดที่ให้ผลป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ครอบคลุมข้ามสายพันธุ์ ตลอดจนการพัฒนาคิดค้นแอนติบอดี เพื่อใช้เป็นทางเลือกใหม่ในการยับยั้งการติดเชื้อเชื้อไวรัสจึงเป็นสิ่งจำเป็นยิ่ง

เอนไซม์อาร์เอ็นเอดีเพนเดนท์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรสของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ประกอบด้วยนิวคลีโอโปรตีน (เอ็นพี) ที่จับรวมกับโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ โพลีเมอเรส สามชนิดคือ แอซิดิก โพลีเมอร์เรส (พีเอ; PA) และ เบสิก โพลีเมอร์เรส สองชนิด คือ พีบีหนึ่ง (PB1) และ พีบีสอง

(PB2) โปรตีนพีบีหนึ่ง มีฤทธิ์เป็นเอนโดนิวคลีเอสที่สามารถแย่งจับแคปไพรเมอร์จาก พรี-เอ็มอาร์เอ็นเอของโฮสต์ เพื่อการลอกแบบรหัสสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส (Virus transcription) และยังสามารถเกาะกับส่วนโปรโมเตอร์บนสายอาร์เอ็นเอ และสายคอมพลิเมนทารีอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ โปรตีนพีบีสองทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นของกระบวนการลอกแบบรหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสในนิวเคลียสของโฮสต์ โดยการทำการทำความรู้จัก (recognize) และเกาะจับกับโครงสร้างแคปของอาร์เอ็นเอของโฮสต์แม้ว่าหน้าที่จำเพาะยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจนแต่ก็มีข้อมูลบ่งชี้ว่าโปรตีนพีเอมีหน้าที่สำคัญทั้งในกระบวนการลอกแบบรหัสสารพันธุกรรมและการผลิตสารพันธุกรรมของตัวเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้น (replication) จากการที่โปรตีนโพลีเมอเรสทั้งสามชนิดมีหน้าที่หลักในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ภายในเซลล์ของโฮสต์และเป็นกิจกรรมหลักของวงจรการติดเชื้อของไวรัสไข้หวัดใหญ่ ดังนั้นการพัฒนายาต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และ/หรือ แอนติบอดีที่สามารถหยุดยั้งการทำหน้าที่ของโพลีเมอเรสทั้งสามชนิดนี้น่าจะเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้

ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนส่วนปลายเอ็น (N-terminus) ของโปรตีนพีเอ พีบีหนึ่ง และพีบีสอง ด้วยระบบโปรคารีโอติก โดยใช้คอมพลิเมนทารีดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง (highly pathogenic strains of avian influenza A virus) สายพันธุ์A/duck/144/Thailand/2005 (H5N1) เป็นต้นแบบเพื่อเพิ่มขยายจำนวนยีนที่เป็นรหัสของโปรตีนดังกล่าวข้างต้นด้วยวิธี พีซีอาร์ จากนั้นนำยีนที่ได้ไปใส่ในพาหะพลาสมิดที่เหมาะสม แล้วนำรีคอมบิแนนต์พลาสมิดไปทรานสฟอร์มเชื้อแบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์ที่เหมาะสม ต่อมาทำการเพาะเลี้ยงและเหนี่ยวนำทรานสฟอร์แมนต์ที่คัดเลือกได้ให้ผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีน พีเอ พีบีหนึ่ง และ พีบีสอง แล้วทำให้โปรตีนโพลีเมอเรสทั้งสามชนิดบริสุทธิ์ด้วยเอ็นทีเอนิกเกิลคอลัมน์ จากนั้นนำโปรตีนบริสุทธิ์เหล่านี้ไปคัดเลือกอนุภาคฟาจที่แสดงโมเลกุลของแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (human single chain fragment, HuScFv) ที่จำเพาะต่อโปรตีนโพลีเมอเรสแต่ละชนิดบนผิวของอนุภาคจากคลังฟาจแอนติบอดีของมนุษย์ (human phage display library) ฟาจแต่ละโคลนที่คัดเลือกได้ ถูกนำไปใส่เชื้อแบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์เอชบีสองหนึ่งห้าหนึ่งแล้วทำการเหนี่ยวนำแบคทีเรียเพื่อให้ผลิตโปรตีน HuScFv ซึ่งภายหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอฟฟินิตีคอลัมน์แล้ว ได้นำไปตรวจความจำเพาะในการจับกับโปรตีนโพลีเมอเรสชนิด พีเอ พีบีหนึ่ง และ พีบีสอง ด้วยวิธีทางด้านภูมิคุ้มกัน คือวิธีอินไดเรคอีไลซา (indirect ELISA) การวิเคราะห์ด้วยวิธีเวสท์เทอร์นบลอท (Western blot) และ วิธีดอทอีไลซา (dot ELISA)

ในการวิจัยนี้ได้นำแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จับจำเพาะต่อรีคอมบิแนนต์โปรตีนพีเอไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งความสามารถของรีคอมบิแนนต์พีเอ ในการเดินทางเข้านิวเคลียส

ของเซลล์วีโร (Vero) ที่เลี้ยงไว้บนแผ่นกระจกและผิวเซลล์ถูกเจาะเป็นรูด้วยสารดิจิโทนิน (digitonin) การที่ส่วนครึ่งปลายเอ็นของรีคอมบิแนนต์โปรตีนพีเอที่ผลิตขึ้นที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 124-139 และ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 186-240 มีนิวเคลียร์โลโคไลเซชั่นซิกแนล (nuclear localization signal; NLS) จึงสามารถทำให้โปรตีนพีเอเดินทางสู่นิวเคลียสของเซลล์วีโรได้ จากการทดสอบพบว่า HuScFv สามารถยับยั้งรีคอมบิแนนต์โปรตีนพีเอไม่ให้เดินทางเข้านิวเคลียสของเซลล์วีโรได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่ากระบวนการยับยั้งดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากการที่ HuScFv ไปจับที่บริเวณนิวเคลียร์โลโคไลเซชั่นซิกแนล ของโปรตีนพีเอโดยตรงหรือไปบดบังบริเวณดังกล่าวไม่ให้สามารถทำหน้าที่ได้ ดังนั้นหากพัฒนา HuScFv ดังกล่าวให้เป็นโมเลกุลที่สามารถแทรกเข้าไปในเซลล์ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้เองก็อาจมีความเป็นไปได้สูงที่ HuScFv เหล่านี้จะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์พันธุกรรมของเชื้อไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อได้

ผลและข้อมูลที่ได้รับจากจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนโพลีเมอเรสทั้งสามชนิดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ คือพีเอ พีบีหนึ่ง และพีบีสอง ได้ในเชื้อแบคทีเรียอีโคไล

2. ผู้วิจัยสามารถผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ (HuScFv) ต่อส่วนครึ่งปลายเอ็นทั้งของโปรตีนพีเอ พีบีหนึ่ง และพีบีสองได้ด้วยเทคนิคฟาจดิสเพลย์ ซึ่งด้วยเทคนิคนี้ทำให้สามารถผลิตโมโนโคนาลแอนติบอดีได้โดยไม่ต้องมีการรอการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันและไม่ต้องกังวลเกี่ยวกับการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเกิดขึ้นในร่างกาย นอกจากนี้โมโนโคนาลแอนติบอดีที่ผลิตได้เป็นโปรตีนของมนุษย์โดยสมบูรณ์ จึงน่าจะปลอดภัยและไม่มีปฏิกิริยาข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในผู้รับ เนื่องจากไม่มีการผลิตแอนติไอโซไทป์ (anti-isotype) เกิดขึ้นในผู้รับ

3. HuScFv ที่มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนต์โปรตีนพีเอที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเดินทางของโปรตีนพีเอเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ยูคารีโอติกได้

ประสิทธิภาพของ HuScFv ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนพีบีหนึ่งและพีบีสอง และ HuScFv ต่อพีเอ พีบีหนึ่งและพีบีสองรวมกันต่อกระบวนการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ยังคงต้องทำการทดสอบต่อไป อย่างไรก็ดีผลการยับยั้งการทำงานของโปรตีนพีเอโดย HuScFv ได้พิสูจน์ความเป็นไปได้ของโมโนโคนาลแอนติบอดีของมนุษย์ว่าหากปรับให้อยู่ในรูปแบบที่แทรกเข้าไปทำงานในเซลล์ติดเชื้อ (transbody) ได้ก็จะสามารถใช้รักษาโรคไข้หวัดใหญ่ได้