การผลิตโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ชนิดโมโนโคลนาลต่อพิษงูเห่าไทย

นายเกษม กุลแก้ว

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)
สาขาวิชาหลักวิทยาภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

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

บทคัดย่อ

การได้รับพิษจากการถูกงูพิษกัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศในเขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอเชียและแอฟริกา ในปัจจุบันการรักษาผู้ที่ได้รับพิษของงูพิษ ได้แก่ การรักษาประคับประคองตามอาการและการใช้เซรุ่มแก้พิษงูที่ผลิตจากม้าซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการ กล่าวคือ ความเป็นพิษของพิษงูจำกัดปริมาณของแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของม้าซึ่งไม่สามารถใช้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการได้เพราะจะเป็นพิษแก่ม้าก่อนที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนั้นเท่าที่ทำอยู่ในปัจจุบันคือต้องใช้พิษงูในปริมาณน้อยๆ แบ่งฉีดในแต่ละครั้ง ฉีดที่หลายตำแหน่งโดยต้องฉีดกระตุ้นซ้ำอีกหลายครั้งซึ่งใช้เวลานานมากกว่าจะได้ระดับภูมิคุ้มกันที่ต้องการ นอกจากนี้ยังผลิตได้ในปริมาณที่จำกัด ในการรักษาผู้ป่วยด้วยเซรุ่มดังกล่าว จำเป็นต้องให้เซรุ่มแก่ผู้ป่วยในปริมาณสูงซึ่งมักก่อให้เกิดอาการแพ้และภาวะภูมิไวเกินทั้งแบบเฉียบพลันและ/หรือแบบที่เกิดช้า ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว จึงมีความต้องการใช้โมเลกุลแอนติบอดีแก้พิษงูที่เป็นโมเลกุลของมนุษย์ในการรักษาผู้ที่ได้รับพิษงูเพื่อไม่ให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์

เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ได้รับการประดิษฐ์ขึ้นโดยสมิธในปี ค.ศ. 1985 เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการนำโมเลกุลของเปปไทด์และโปรตีนต่างๆรวมทั้งแอนติบอดีที่อาจมีความหลาก หลายสูงถึง 10^{10} ชนิด ไปแสดงบนผิวของอนุภาคของฟาจในคลังของฟาจซึ่งส่วนมากนิยมใช้ฟาจชนิดเอ็ม 13 ซึ่งในงานวิจัยนี้ คลังแอนติบอดีของมนุษย์ในรูปแบบของคลังฟาจได้ถูกประดิษฐ์ขึ้นเพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือทางชีววิทยาในการเตรียมโมเลกุลแอนติบอดีของมนุษย์สำหรับใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ในการประดิษฐ์ได้นำยีนที่เป็นรหัสควบคุมการสร้างแอนติบอดีของมนุษย์ส่วนที่ใช้จับกับแอนติเจนทั้งสายหนัก (*VH*) และสายเบา (*VL*) ไปเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้สายไพรเมอร์ที่

ออกแบบและปรับปรุงจากฐานข้อมูลแอนติบอดีมนุษย์ แหล่งของยีนดังกล่าวมาจากเซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิดบีในกระแสโลหิตของอาสาสมัครห้าสิบรายและจากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวของผู้บริจาคโลหิต ณ สภากาชาดไทยอีก 10 ตัวอย่าง ในการสร้างยีนของแอนติบอดีสายเดียวได้นำท่อน *VH* และ *VL* ที่เพิ่มปริมาณไว้ไปเชื่อมต่อให้เป็นสายเดียวกันด้วยเทคนิคที่เรียกว่า spliced overlapped extension-PCR โดยเรียกสายดีเอ็นเอที่ผลิตขึ้นใหม่นี้ว่า *huscFv* หรือท่อนดีเอ็นเอของโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยว หลังจากตัด *huscFv* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วได้นำ *huscFv* ต่อกับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ฟาจมิดเวกเตอร์ จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ฟาจมิดเวกเตอร์ (*huscFv*-phagemid vectors) เข้าสู่ TG1 *E. coli* โดยการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) ซึ่งได้จำนวนแบคทีเรียที่ถูกเปลี่ยนแปลง (transformants) ถึง 10^8 โคโลนี โดย แบคทีเรีย (transformants) เหล่านี้ได้ถูกนำไปเตรียมอนุภาคฟาจโดยการทำให้ติดเชื้อ (infect) ด้วยฟาจผู้ช่วยชนิดเอ็มสิบสามเคโอเจ็ด (M13KO7) ซึ่งช่วยในการสร้างฟาจที่มีอนุภาคสมบูรณ์ตัวใหม่ จำนวน 6.5×10^{12} อนุภาคต่อหนึ่งมิลลิลิตรของสารอาหารชนิดเหลวที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งฟาจที่ได้ คือ คลังฟาจที่แสดงแอนติบอดีของมนุษย์ (human antibody phage display library) โดยในคลังนี้มีประชากรของฟาจปริมาณสูงถึงร้อยละ 85 ที่มียีนของแอนติบอดีชนิดสายเดี่ยวของมนุษย์อยู่ในยีโนมของฟาจและมีแอนติบอดีชนิดสายเดี่ยวของมนุษย์ที่ผลิตจากยีนเหล่านั้นปรากฏอยู่บนผิวของอนุภาคของฟาจในรูปแบบของการเชื่อมต่อกับโปรตีนชนิดที่สามของฟาจ (pIII) และยีนดังกล่าวมีความหลากหลายสูงเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเอ็มวาหนึ่ง (*Mva*I) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแอนติบอดีสายเดี่ยวจากการเลือกแบคทีเรีย 17 โคลนไปวิเคราะห์ความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *huscFv* พบว่ามีความต่างกันถึง 15 แบบ แสดงว่า คลังฟาจที่ได้มีความหลากหลายของแอนติบอดีสูงมาก

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาหารายละเอียดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในพิษงูเห่าไทยด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) ประกอบด้วย การแยกโปรตีนแบบสองทิศทางบนเจลร่วมกับการวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยแมสสเปคโตรเมตรี (mass spectrometry) การแยกสายเปบไทด์แบบสองทิศทางในสภาวะสารละลายร่วมกับการวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วย mass spectrometry (2D-LC/MS-MS) และการสืบค้นหาโปรตีนที่มีสายเปปไทด์เหมือนกับสายเปปไทด์ที่ได้จากวิธีแมสสเปคโตรเมตรีจากข้อมูลที่มีอยู่ในคลังข้อมูลบนเครือข่ายชีวสารสนเทศ สำหรับวิธีแรกพบว่า พิษงูเห่าไทยประกอบด้วยโปรตีนที่แบ่งได้หกกลุ่ม คือ cobra venom factor, nerve growth factor β-chain, phospholipases, venom protein 2, cytotoxin I และ long neurotoxin สำหรับวิธีที่สองพบว่ามีโปรตีนในพิษงูเห่าไทยถึง 61 ชนิดโดยสามารถแบ่งได้เป็น 12 กลุ่มตามหน้าที่ทางชีววิทยา คือ cardiotoxin, cobra venom factor, cysteine-rich venom toxin, cytotoxin, kaouthiagin, mocarhagin, muscarinic

toxin-like proteins, neurotoxin, oxoglutarate dehyfrogenase complex, phospholipases, serum albumin และ weak toxin

นอกจากนี้โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบย่อยในพิษงูเห่าไทยยังถูกนำไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมโครมาโตกราฟีซึ่งแยกโปรตีนโดยความแตกต่างของประจุบนผิวของโปรตีน (ion exchange column chromatography) เป็นส่วนต่าง ๆ 11 ส่วนให้ชื่อว่าพี 1 ถึง พี 11 (P1-P11) จากนั้นทำการจำแนกชนิดโปรตีนที่แยกได้ในแต่ละส่วน ด้วยเทคนิคแมทริกแอสซิสเทดเลเซอร์ดีซอบชัน/ไอออไนเซชัน ไทม์ออฟไฟลท์ แมสสเปคโตรเมตรี (Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF) สำหรับโปรตีนที่แยกได้ในเจล หรือจำแนกโดยวิธี 2D-LC/MS-MS สำหรับโปรตีนที่อยู่ในสภาวะสารละลาย พบว่า โปรตีนส่วนใหญ่ในส่วน P1 คือคอบบราวีนอมแฟกเตอร์ (cobra venom factor) โปรตีนส่วนใหญ่ในส่วน P3 และ P5 คือเอนไซม์ชนิดฟอสโฟไลเปส (phospholipases) โปรตีนส่วนใหญ่ในส่วน P4 คือนาทริน (natrin) และโปรตีนส่วนใหญ่ในส่วน P8 คือพิษต่อระบบประสาท (long α-neurotoxin) โดยโปรตีนเหล่านี้ถูกนำไปใช้ในการคัดเลือกฟาจจากคลังแอนติบอดีของมนุษย์ที่สร้างขึ้น ฟาจที่เลือกได้ถูกนำไปเตรียมโมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยวโดยการนำฟาจเข้าไปในแบคทีเรียอีโคไลชนิดเอชบีย่ีสิบเอ็ดห้าสิบเอ็ด (HB2151 *E. coli*) แล้วโน้มนำให้แบคทีเรียผลิต HuScFv จากนั้นนำแอนติบอดีสายเดี่ยวไปทดสอบการจับกับโปรตีนด้วยเทคนิคอินไดเร็กอิไลซา (indirect ELISA), ดอทอิไลซา (dot-ELISA) และเวสเทอร์นบลอท (Western blot analysis) ซึ่งสามารถเลือกฟาจที่จับแบบจำเพาะกับโปรตีนต่างๆของพิษงูได้

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเฉพาะฟาจที่จำเพาะต่อพิษต่อโปรตีนใน P8 คือ P8/0/1, P8/9/1, P8/19/1, P8/7/2, P8/10/2, P8/22/3, P8/31/3 โดยการศึกษาหามิโมโทป ซึ่งได้ใช้คลังฟาจที่มีเปบไทด์ที่มีความยาวของกรดอะมิโน 12 ตัวแสดงอยู่บนผิวของฟาจแต่ละอนุภาคเพื่อหาเปบไทด์บนฟาจที่โมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยวสามารถจับได้ พบว่า โมเลกุลแอนติบอดีสายเดี่ยวจากฟาจทั้ง 7 ตัวอย่างมีสายเปปไทด์มิโมโทปคือทรีโอนีน วาลีน แอสพาราจีนและทรีโอนีน (TVNT) ซึ่งเมื่อทำการเทียบกับสายเปปไทด์ของพิษงูเห่าไทยจากข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของเครือข่ายชีวสารสนเทศ พบว่าสายเปบไทด์เส้นนี้ปรากฏอยู่บนห่วงของกรดอะมิโนห่วงที่สามของโมเลกุลพิษต่อระบบประสาท ซึ่งมีบทบาทในการจับกับโปรตีนตัวรับของสารสื่อประสาทชนิดอะเซทิลโคลีน (acetylcholine binding receptor of long α-neurotoxin of *N. kaouthia*)

โมเลกุลแอนติบอดีของมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่มีความเฉพาะต่อพิษต่อระบบประสาทนี้ได้ถูกเตรียมจนบริสุทธิ์จากฟาจและนำไปทดสอบความสามารถในการลบล้างความเป็นพิษของพิษงูเห่าไทยตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก ซึ่งพบว่า แอนติบอดีมนุษย์ชนิดสายเดี่ยวที่สามารถจับบริเวณห่วงของกรดอะมิโนห่วงที่สามของพิษต่อระบบประสาทสามารถช่วยชีวิตหนูทดลองที่ได้รับ

พิษงูเห่าไทยในปริมาณที่ปกติทำให้หนูตายได้โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือดีกว่าเซรุ่มแก้พิษงูเห่าไทยที่ผลิตจากม้าที่ใช้ในการรักษาผู้ที่ได้รับพิษงูเห่าไทยในปัจจุบัน

375 หน้า

PRODUCTION OF HUMAN ANTI-*NAJA KAOUTHIA* VENOM BY ANTIBODY PHAGE DISPLAY LIBRARY

KASEM KULKEAW

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., PONGSRI TONGTAWE, Ph. D.,
POTJANEE SRIMANOTE, Ph. D.

ABSTRACT

Ophitoxemia or venomous snakebite remains a public health problem in many countries especially in the tropical areas like Asia and Africa. Treatment of snake envenomation requires proper medical management and antivenom therapy. Most of the conventional antivenoms are produced by immunizing horse. There are several limiting factors in the production and use of the horse-derived antivenoms. Toxicity of the venoms limits the amount of an antigenic dose. As such, multiple-, spaced-, low dose, formulated in adjuvant and/or delivery vehicle, must be given intramuscularly at multi-sites to the animal over an extended period of time. For successful treatment, large amount of the heterologous antibodies must be infused into the snake bitten victim. Reactions including full range of anaphylactic manifestations, serum sickness, and other forms of hypersensitivity often occur. These limitations emphasize the requirement of the immunotherapy using human derived antivenoms.

Phage display technology invented by Smith in 1985 is a powerful tool for the production of human monoclonal antibodies using phage library that display more than 10^{10} HuScFv variants. In this research, human antibody phage display library for use as a biological tool in the production of human therapeutic antibodies was constructed. The large repertoire of human antibody-encoding DNA sequences in the form of single-chain variable fragments (*huscFv*) were generated by linking the VH-encoding DNA sequences (*VH*) with Vκ-encoding DNA sequences (*Vκ*). The *VH* and *Vκ* sequences were amplified from a large pool of human antibody-producing cells

(B lymphocytes) collected from non-immune 50 donors (gave informed consent) and 10 buffy coat samples. Degenerate and non-degenerate primers used in the DNA amplification were designed from the available database of the human antibody genes and were modified by adding oligonucleotide linker and sites for restriction endonucleases. DNA encoding human single-chain variable fragments (VH-linker-VL; HuScFv) called *huscFv* were generated by spliced overlapped extension-PCR (SOE-PCR). The *huscFv* sequences were ligated into phagemid vectors and the *huscFv*-phagemid vectors were introduced into TG1 *E. coli* by electroporation. From one eletroporation, a total 2.6 x 10^8 TG1 *E. coli* colonies were obtained. All transformed TG1 *E. coli* were infected with M13KO7 helper phages in phage rescue process. Progeny phage particles (6.5 x 10^{12} cfu/ml) were obtained and used as human antibody phage display library. Eighty-five percent of the recombinant phagemid-transformed TG1 *E. coli* contained *huscFv*. Among the 17 representative *huscFv*-containing TG1 *E. coli* clones that were randomly selected for *huscFv* diversity screening, 15 RFLP patterns of *huscFv* were obtained, implying high diversity of the *huscFv* sequences in the phage library.

Protein components of the Thai cobra, *Naja kaouthia*, venom were studied by proteomics: 1) two dimensional gel electrophoresis (2DE) coupled with peptide generation by liquid chromatography, tandem mass spectrometry (LC/MS-MS); 2) two dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC/MS-MS), and 3) orthologous protein identification. From the 2DE+LC/MS-MS, six groups of protein were identified as: cobra venom factor, nerve growth factor β-chain, phospholipases, venom protein 2, cytotoxin I, and neurotoxins. From the 2D-LC/MS-MS, 61 orthologous proteins of the database matched with the venom peptide sequences generated by the 2D-LC/MS-MS. The orthologs of the *N. kaouthia* venom components could be classified into 12 different groups according to their putative biological functions/activities. These are: cardiotoxins, cobra venom factors, a cysteine-rich venom toxin, cytotoxins, kaouthiagin, mocarhagin, muscarinic toxin-like proteins, neurotoxins, an oxoglutarate dehydrogenase complex, phospholipases, serum albumin, and a weak toxin.

Protein components of *N. kaouthia* venom were separated by using ion exchange column chromatography and were identified by either gel-based MALDI-TOF or

2D-LC/MS-MS. The venom protein fractions: *i.e.*, P1 (cobra venom factor), P3 (predominantly contained phospholipase), P4 (predominantly contained a novel component of *N. kaouthia* venom, *i.e.*, natrin), P5 (predominantly contained phospholipase), and P8 (predominantly contained long α-neurotoxin) were used as antigens to select phages displaying HuScFv specific to the proteins in those fractions from the own constructed human antibody phage display library. The soluble HuScFv derived from the bio-panning were tested for their specific binding with target antigens by indirect ELISA (HuScFv-ELISA), dot-ELISA, and Western blot analysis.

In this study, only the HuScFv derived from phage clones that bond to P8 of the venom (designated as P8/0/1, P8/9/1, P8/19/1, P8/7/2, P8/10/2, P8/22/3, and P8/31/3) were studied for mimotope searching by using the 12-mer peptide displaying M13 phage library, and the *in vivo* venom neutralization test. The phage mimotopes that were bound by the HuScFv were "TVNT" and this peptide is a homolog of TVKT peptide located in the loop III of long α-neurotoxin which is an **acetylcholine receptor binding domain of the Thai cobra venom**.

Purified HuScFv derived from individual phage clones [all were specific to TVK(N)T of the acetylcholine receptor binding domain of the venom long α-neurotoxin] were tested for their venom neutralizing activity *in vivo* according to WHO protocol**.** The HuScFv could rescue the mice from lethal envenomation at the efficacy equal to or better than the conventional horse anti-Thai cobra venom at an equal protein weight basis.

The phage display library derived-HuScFv specific to other venom components can be similarly produced. The HuScFv especially those that are specific to the lethal and highly toxic venom components (neurotoxins and phospholipases) have high potential as a human derived-alternative of the conventional horse derived-anti-venom for immunotherapy of the ophitoxemia.

KEY WORDS: ANTIBODY ENGINEERING/ ANTI-SNAKE VENOM/ HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY/ IMMUNOTHERAPEUTICS/ PHAGE/ *Naja kaouthia*/ THAI COBRA SNAKE/ THAI COBRA VENOM/ SCFV/ PCR/ B-LYMPHOCYTE/ MIMOTOPE/ PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY/ NEUTRALIZATION TEST

375 P.