HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY FRAGMENTS THAT NEUTRALIZE BIO-FUNCTIONS OF SURFACE EXPOSED PROTEINS OF TYPE A INFLUENZA VIRUSES

TIPPAWAN PISSAWONG 5136954 SIIM/D

Ph.D. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: WANPEN CHAICUMPA, D.V.M. (Hons.), Ph.D.; TAWEESAK SONGSERM, D.V.M., Ph.D.; POTJANEE SRIMANOTE, Ph.D.; SANTI MANEEWATCHARARANGSRI, Ph.D.

ABSTRACT

The surface proteins of the influenza A virus, namely hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), and matrix protein-2 (M2) are surface exposed and thus are vulnerable targets for neutralizing antibodies. HA is the most abundant protein on the viral surface and the virus uses this protein as a ligand for host cell receptor binding and subsequent cellular entry by receptor mediated endocytosis. In the acidic endosome, a conformational change in the cleavage-active HA molecule induces fusion of the HA to the host endosomal membrane, allowing the exit of the viral RNPs into the host cytoplasm and subsequent nuclear import for replication. NA is a sialidase enzyme that cleaves the NeuAcα2,3Gal or NeuAcα2,6Gal on new virions and releases them from the infected cell. The M2 protein forms a homotetramer which is a highly selective channel for H^+ influx into the intra-endosomal virion causing a dissociation of matrix protein-1 (M1) from the viral RNPs, allowing entry of the latter into the host cytosol. In the late stage of viral replication, M2 prevents acid-induced conformational change of newly synthesized hemagglutinin molecules that are cleaved in the trans-Golgi network. M2 functions also in inhibition of autophagy in infected cells causing accumulation of autophagosomes (macroautophagosome) to help the survival of the influenza virus in the infected cell. In addition, HA, NA, and M2 proteins also work together in viral assembly and budding. HA and NA help the M2 amphipathic helix in causing membrane curvature at the neck of the budding virion leading to membrane scission and virus release. As such, antibodies that interfere with HA, NA, and M2 functions have high potential as sole or adjunct therapeutic agents for influenza.

In this study, fully human monoclonal single chain antibody variable fragments (HuScFv) specific to HA, NA, and M2 of the influenza A virus were generated by using phage display technology. Influenza viruses adsorbed on the human erythrocyte ghosts were used as a phage biopanning antigen for selecting phage clones that dispalyed HuScFv from a human ScFv phage display library. The HuScFv specific to HA, NA and/or M2 derived from *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* clones can be classified into 4 groups: HuScFv that bound to HA, NA, and M2 (clones no. 2, 10, 26, and 54); HuScFv that bound to HA and NA (clone no. 53); HuScFv that bound to M2 (clones no. 15 and 51); and HuScFv that bound to HA (clone no. 99). HuScFv from four selected clones which had different antigenic specificities and amino acid sequences particularly at their complementarity determining regions (CDRs), *i.e.*, clones no. 26, 51, 53, and 99, were tested for their efficacies in interfering with the influenza virus replication cycle in mammalian cell cultures. The results of the plaque assay revealed that the HuScFv of all clones could reduce the numbers of influenza virus foci in the HuScFv treated-infected cells.

Phage clones displaying HuScFv that bound specifically to full length recombinant M2 (rM2) were also selected from the human ScFv phage display library. Four *huscfv*-phagemid transformed *E. coli* clones, *i.e.*, no. 2, 19, 23 and 27, expressed HuScFv that bound not only to the rM2 but also to native M2 (nM2) in influenza virus infected cell homogenates and inside the cells. The HuScFv2, 19, 23, and 27 which had different amino acid sequences in immunoglobulin frameworks and CDRs could similarly reduce the amounts of viruses both in the culture supernatants and inside the cells infected with adamantane sensitive and resistant A/H5N1 strains belonging to different clades. A phage mimotope (peptide) search and multiple alignments revealed that conformational epitopes of HuScFv2 located at the residues important for ion channel activity, anti-autophagy, and M1 binding. Epitopic residues of HuScFv19 located at the M2 amphipathic helix and cytoplasmic tail important for anti-autophagy, virus assembly, morphogenesis, and release. The epitope of HuScFv23 involved residues important for the M2 activities similar to HuScFv2 and also amphipathic helix residues for viral budding and release. For the HuScFv27 epitope, it spanned ectodomain, ion channel, and anti-autophagy residues. The results of computerized homology modeling and molecular docking conformed to the epitope identification by phages. M2 epitopes bound by HuScFv2, 19, 23, and 27 are conserved across influenza A subtypes and human pathogenic clades of H5N1, indicating that the HuScFv have anti-influenza A activity.

Although molecular mechanisms of the HA-, NA-, and/or M2-specific-HuScFv(s) in interfering with the influenza virus replication cycle await experimental validations, these small antibody fragments which are fully human proteins have high potential for developing further as safe, novel, and mutation tolerable anti-influenza agents, especially against drug resistant variants.

KEY WORDS: INFLUENZA A VIRUSES/ HEMAGGLUTININ (HA)/ NEURAMINIDASE (NA) / MATRIX PROTEIN-2 (M2) / HUMAN SCFV/ PHAGE DISPLAY / MIMOTOPE / HOMOLOGY MODELING AND MOLECULAR DOCKING

216 pages

แอนติบอดีสายเดี่ยวมนุษย์แบบโมโนโคนาลที่สามารถลบล้างฤทธิ์การทำงานของโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวของไวรัสไข้หวัดใหญ่//ไวรัสไข้หวัดใหญ่นก ชนิด เอ
HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY FRAGMENTS THAT NEUTRALIZE BIO-FUNCTIONS OF SURFACE EXPOSED PROTEINS OF TYPE A INFLUENZA VIRUSES

ทิพวรรณ พิศวง 5136954 SIIM/D

ปร.ด. วิทยาภูมิคุ้มกัน

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: วันเพ็ญ ชัยคำภา , D.V.M. (Hons.), Ph.D., ทวีศักดิ์ ส่งเสริม, D.V.M., Ph.D., พจนีย์ศรีมาโนชญ์, Ph.D., สันติ มณีวัชระรังษี, Ph.D.

บทคัดย่อ

โปรตีนที่ผิวของไวรัสไข้หวัดใหญ่/นกชนิดเอซึ่งว่าฮีแมกกลูตินิน (เอชเอ), นิวรามินิเดส (เอ็นเอ) และแมทริกซ์สอง (เอ็มสอง) เป็นโปรตีนที่ผิวของไวรัสซึ่งง่ายต่อการเป็นเป้าหมายของแอนติบอดีที่จะทำการลบล้างฤทธิ์ โดยที่โปรตีนเอชเอนั้นมีมากที่สุดบนผิวของไวรัสและไวรัสใช้โปรตีนนี้เพื่อเป็นแกนสำหรับจับกับตัวรับซึ่งอยู่บนผิวของโฮสท์เซลล์ เพื่อใช้ในการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยขบวนการเอ็นโดไซโตสิส และในถุงเอ็นโดโซมนั้นเองจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลเอชเอเพื่อให้เกิดการรวมกันของผิวไวรัสและผิวโฮสท์เซลล์เพื่อทำการปลดปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของโฮสท์เซลล์เพื่อทำการจำลองสารพันธุกรรมใหม่ของอนุภาคไวรัสตัวลูกต่อไป ส่วนโปรตีนเอ็นเอนั้นมีคุณสมบัติเป็นเอ็นไซม์เซียลิซิเดสที่ใช้ในการตัดพันธะ (NeuAcα2,3Gal หรือ NeuAcα2,6Gal) ที่เชื่อมระหว่างโฮสท์และอนุภาคไวรัสตัวใหม่ เพื่อทำการปล่อยอนุภาคไวรัสตัวลูกออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อนั้น ในขณะที่โปรตีนเอ็มสองจะรวมตัวเป็นเททราเมอร์ซึ่งทำตัวเป็นช่องที่ใช้ตรวจจับโปรตอนเข้ามาในอนุภาคไวรัสขณะที่อยู่ในถุงเอ็นโดโซมเพื่อใช้ในการแยกกันของโปรตีนเอ็มหนึ่งและสารพันธุกรรมไวรัสออกจากกัน เพื่อที่สารพันธุกรรมของไวรัสนั้นจะเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของโฮสท์เซลล์ต่อไป และในขั้นท้ายของการจำลองอนุภาคไวรัสใหม่นั้น โปรตีนเอ็มสองมีส่วนช่วยในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนเอชเอที่สังเคราะห์ใหม่ขณะที่อยู่ในทรานซ์กอนจิเน็ตเวิร์ค โปรตีนเอ็มสองยังมีหน้าที่ในการขับยั้งกระบวนการออโตฟาจิในเซลล์ติดเชื้อโดยการทำให้เกิดการสะสมตัวของถุงฟาโกโซม (แม็กโครออโตฟาโกโซม) เพื่อ ช่วยในการอยู่รอดของไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อ นอกจากนี้โปรตีนเอชเอ, เอ็นเอ และเอ็มสองยังทำงานร่วมกันในขณะการจำลองอนุภาคใหม่และการปลดปล่อยจากเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยที่โปรตีนเอชเอและเอ็มสองช่วยกับโปรตีนเอ็มสองส่วนแอมฟิพาติกเฮลิกซ์ในการทำให้ผิวแมมเบรนของโฮสท์เซลล์เกิดการโค้งงอเพื่อให้ง่ายต่อการตัดอนุภาคไวรัสตัวใหม่ออกจากโอสท์เซลล์และปล่อยออกสู่ภายนอก จากเหตุผลดังกล่าวนี้เองแอนติบอดีที่สามารถรบกวนการทำงานของโปรตีนเอชเอ, เอ็นเอ และเอ็มสองจึ งน่าจะมีประสิทธิภาพสูงในการนำไปใช้ในการรักษาหรือเป็นตัวช่วยขาในการรักษาโรคไข้หวัดใหญ่/นก

ในการศึกษาครั้งนี้ แอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์แบบโมโคลนาลที่จำเพาะกับโปรตีนเอชเอ, เอ็นเอ และเอ็มสองของไวรัสไข้หวัดใหญ่/นกถูกผลิตขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ โดยที่อนุภาคไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ถูกตรึงบนผิวของเม็ดเลือดแดงที่ไม่มีฮีโมโกลบิลจะถูกใช้เป็นเป้าหมายสำหรับการคัดเลือกโคลนฟาจที่มีแอนติบอดีสายเดี่ยวแสดงอยู่บนผิวจากคลังฟาจแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ ซึ่งแอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะกับโปรตีนเอชเอ, เอ็นเอ และหรือเอ็มสองจะได้รับจากอีโคไลโคลนที่บรรจุฟาจมิดที่มียีนแอนติบอดีสายเดี่ยวอยู่ และสามารถแบ่งแอนติบอดีสายเดี่ยวที่ได้รับออกเป็นสี่กลุ่มดังนี้ แอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะกับโปรตีนเอชเอ, เอ็นเอ และเอ็มสองจำนวน ๔ โคลน (โคลนเลขที่ ๒, ๑๐, ๒๖ และ ๕๔) แอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะกับโปรตีนเอชเอและเอ็นเอจำนวน ๑ โคลน (โคลนเลขที่ ๕๓) แอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะกับโปรตีนเอ็มสองจำนวน ๒ โคลน (โคลนเลขที่ ๑๕ และ ๕๑) และ แอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะกับโปรตีนเอชเอจำนวน ๑ โคลน (โคลนเลขที่ ๕๕) โดยที่แอนติบอดีสายเดี่ยวจำนวน ๔ โคลน (โคลนเลขที่ ๒๖, ๕๑, ๕๓ และ ๕๕) ซึ่งจำเพาะกับโปรตีนเป้าหมายที่แตกต่างกัน และยังมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันโดยเฉพาะบริเวณซีดีอาร์ ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการรบกวนกระบวนการจำลองอนุภาคไวรัสในเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งผลจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อ (ไวรัสโฟไซ) เผยให้เห็นว่าทุกโคลนของแอนติบอดีสายเดี่ยวสามารถลดจำนวนไวรัสโฟไซได้ในเซลล์ติดเชื้อที่ได้รับแอนติบอดีสายเดี่ยว

ฟาจโคลนที่ดิสเพลย์แอนติบอดีสายเดี่ยวมนุษย์ที่จับจำเพาะกับตัวเต็มของโปรตีนรีคอมบิแนนท์เอ็มสอง (อาร์เอ็มสอง) ยังถูกคัดเลือกจากคลังฟาจแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์อีกด้วย อีโคไลโคลนที่บรรจุฟาจมิดที่มียีนแอนติบอดีสายเดี่ยวอยู่จำนวน ๔ โคลนดังนี้ โคลนเลขที่ ๒, ๑๕, ๒๓ และ ๒๗ สามารถจับได้กับโปรตีนอาร์เอ็มสอง และ เนทีฟโปรตีนเอ็มสองที่ได้จากเซลล์โฮโมจีเนทของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และที่อยู่ภายในเซลล์ แอนติบอดีสายเดี่ยว๒, ๑๕, ๒๓ และ ๒๗ ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในส่วนอิมมูโนโกบลูลินเฟรมเวิร์คและซีดีอาร์ สามารถลดจำนวนไวรัสได้ทั้งในส่วนอาหารเลี้ยงเซลล์และภายในเซลล์ที่ติดเชื้อกับไวรัสไข้หวัดใหญ่/นก ซัปทัยป์ เอช๕เอ็น๑ ที่ดื้อและไม่ดื้อยา ซึ่งแตกต่างกันตามเคลดที่อยู่ การหาฟาจมิโมโทป (เปปไทด์) และการทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่จะเป็นอิพิโทปบนโปรตีนเอ็มสอง เผยให้เห็นว่า แอนติบอดีสายเดี่ยว๒ จับบริเวณที่ทำหน้าที่เป็นอิออนชาแนล, แอนติออโตฟาจิ และบริเวณที่ใช้จับกับโปรตีนเอ็มหนึ่ง แอนติบอดีสายเดี่ยว๑๕ จับบริเวณแอมฟิพาติกเฮลิกซ์ และไซโตพลาสมิคของโปรตีนเอ็มสองที่สำคัญต่อการเป็นแอนติออโตฟาจิ และการประกอบและปลดปล่อยอนุภาคไวรัสใหม่ แอนติบอดีสายเดี่ยว๒๓ จับบริเวณที่สำคัญต่อการเป็นอิออนชาแนลคล้ายกับแอนติบอดีสายเดี่ยว๒ แต่ยังสามารถจับส่วน แอมฟิพาติกเฮลิกซ์ที่สำคัญต่อการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสใหม่อีกด้วย ในขณะที่แอนติบอดีสายเดี่ยว๒๗ จะจับส่วนเอ็กซ์โตโดเมน, อิออนชาแนล และส่วนที่จะเป็นแอนติออโตฟาจิ นอกจากนี้ผลของโฮโมโลจีเดลลิ่งและโมเลกุลาร์ด็อกซ์กิ้งยังสนับสนุนผลอิพิโทปที่ได้จากฟาจอีกด้วย ซึ่งอิพิโทปบนเอ็มสองที่จับโดยแอนติบอดีสายเดี่ยว๒, ๑๕, ๒๓ และ ๒๗ มีลักษณะที่อนุรักษ์ในระหว่างซัปทัยป์ของไวรัสไข้หวัดใหญ่/นก และ ไวรัสไข้หวัดนกซัปทัยป์ เอช๕เอ็น๑ ที่ติดเชื้อในมนุษย์ จากผลตรงนี้สามารถบอกเป็นนัยได้ว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวสามารถใช้เป็นสารต่อต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่/นกได้ในวงกว้าง

ถึงแม้ว่ากลไกการทำงานของด้านโมเลกุลาร์ของแอนติบอดีสายเดี่ยวที่จำเพาะกับโปรตีนเอชเอ, เอ็นเอ และหรือเอ็มสอง ที่ใช้ในการรบกวนการจำลองอนุภาคใหม่ของไวรัสไข้หวัดใหญ่/นกยังรอคอยการทดลองที่จะมาประเมินผล แต่แอนติบอดีสายเดี่ยวโมเลกุลเล็กเหล่านี้ที่ผลิตจากมนุษย์ก็มีประสิทธิภาพสูงพอที่จะพัฒนาต่อไปเป็นสารที่ใช้ในการต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่ปลอดภัย และทนต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมายในไวรัสสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา