

## ABSTRACT

---

**Project Code :** TRG5480006  
**Project Title :** Production of human single chain variable fragment antibody (HuScFv) specific to NS1 protein of dengue virus  
**Investigator :** Dr. Ornnuthchar Pongpair Mahidol University  
**E-mail Address :** ornnuthchar.pou@mahidol.ac.th  
**Project Period :** 15 June 2011-14 June 2013

Dengue hemorrhagic fever caused by dengue virus infection is the major health problem in tropical countries including Thailand. Even the disease may be fatal; there is no protective vaccine or effective anti-viral agent available. Level of non-structural protein 1 (NS1) secreted from dengue virus-infected cells highly associates with disease severity. Thus, it is postulated that neutralizing or interfering of NS1 function would be the therapeutic strategy for relieving the disease severity. In this study, we generated the human single-chain variable fragment (HuScFv) specific to dengue NS1 and determined the HuScFv inhibitory effect to dengue virus infection in cell culture. The recombinant NS1 protein was produced and purified for using as the target antigen in selection of NS1-specific HuScFv from the human antibody phage display library by phage display technology. Phage-transformed *E. coli* clones were induced for expression of monoclonal HuScFv which were further tested for the binding activity to native NS1 secreted from dengue virus-infected cells by indirect ELISA. From 19 HuScFv tested, all clones showed higher ELISA signal than negative control and 2 of them with the highest signal; i.e. HuScFv11 and HuScFv13, were selected for further large-scale production and purification. Immunofluorescence study demonstrated that HuScFv11 and HuScFv13 could interact with cytoplasmic NS1 in dengue virus-infected cells but no interaction was observed in MOCK-infected cells. HuScFv supplemented in culture medium of dengue virus-infected cells also significantly reduced viral released into the culture supernatant. Studies of NS1-HuScFv interaction by mimotope searching and molecular docking concordantly revealed that HuScFv11 bound to N-terminal of NS1 while HuScFv13 bound to C-terminal of NS1 molecule with low-binding energy. Therefore, HuScFv11 and HuScFv13 worth further development to be therapeutic antibody for dengue virus-infected patient in the near future.

**Keywords :** Human single-chain variable fragment (HuScFv), non-structural protein-1 (NS1), dengue virus, phage display, therapeutic antibody

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5480006

ชื่อโครงการ : การผลิตแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ที่จำเพาะต่อโปรตีนเอ็นเอส-วันของไวรัสเดงกี

ชื่อนักวิจัย : ดร. อรณัชชา พวงแพ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : ornnuthchar.pou@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2554 – 14 มิถุนายน 2556

โรคไข้เลือดออกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศในเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทยซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเดงกี ผู้ติดเชื้ออาจมีอาการของโรคอย่างรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรค หรือยาด้านไวรัสเดงกีที่มีประสิทธิภาพ โปรตีนเอ็นเอส-วันที่ถูกสร้างและหลังจากเซลล์ติดเชื้อมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงของโรคในผู้ป่วย ดังนั้นการลดหรือยับยั้งการทำงานของโปรตีนเอ็นเอส-วันจึงเป็นแนวทางในการรักษาเพื่อลดความรุนแรงของการติดเชื้อได้ ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์จะสร้างแอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์โดยสมบูรณ์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเอ็นเอส-วันของไวรัสเดงกี และศึกษาผลของแอนติบอดีดังกล่าวในการลดการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยการผลิตโปรตีนลูกผสมเอ็นเอส-วันและทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายในการคัดเลือกฟาจที่แสดงแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับโปรตีนเอ็นเอส-วันจากคลังแอนติบอดีมนุษย์โดยเทคโนโลยีฟาจดิสเพลย์ และเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียอีโคไลที่ติดเชื้อฟาจเหล่านั้นสร้างโมโนโคลนาลแอนติบอดีสายเดี่ยวเพื่อใช้ทดสอบการจับกันของแอนติบอดีสายเดี่ยวกับโปรตีนเอ็นเอส-วันหลังจากเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธีอินไคเรทอีไลซ่า พบว่าแอนติบอดีสายเดี่ยวที่ทดสอบจำนวน ๑๙ โคลนให้ผลบวกสูงกว่าการทดลองควบคุมทั้งหมด และได้คัดเลือก ๒ โคลนที่ให้ผลอีไลซ่าสูงสุด ได้แก่ แอนติบอดีสายเดี่ยวหมายเลข ๑๑ และ ๑๓ เพื่อนำไปผลิตในระบบใหม่เพื่อให้ได้ปริมาณและความบริสุทธิ์สูงขึ้นเหมาะสมกับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์พบว่า แอนติบอดีสายเดี่ยวหมายเลข ๑๑ และ ๑๓ สามารถจับกับโปรตีนเอ็นเอส-วันในเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีได้ และไม่จับกับโปรตีนอื่นใดในเซลล์ไม่ติดเชื้อ อีกทั้งยังพบว่าเมื่อเติมแอนติบอดีดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกี มีผลลดการสร้างไวรัสออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม จากผลการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของแอนติบอดีสายเดี่ยวทั้ง ๒ โคลนกับโปรตีนเอ็นเอส-วัน โดยการหาเปปไทด์มิโมโทปและการสร้างแบบจำลองโมเลกุลทางคอมพิวเตอร์ พบว่า แอนติบอดีสายเดี่ยวหมายเลข ๑๑ จับกับบริเวณปลายด้านเอ็นเทอร์มินอล ในขณะที่แอนติบอดีสายเดี่ยวหมายเลข ๑๓ จับกับกรดอะมิโนทางด้านซีเทอร์มินอลของโปรตีนเอ็นเอส-วันด้วยระดับพลังงานที่สามารถเกิดขึ้นจริงได้ตามธรรมชาติ ดังนั้น แอนติบอดีสายเดี่ยวหมายเลข ๑๑ และ ๑๓ เหมาะสมในการพัฒนาต่อไปเพื่อใช้เป็นแอนติบอดีเพื่อการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีในอนาคต

คำหลัก : แอนติบอดีสายเดี่ยวของมนุษย์ โปรตีนเอ็นเอส-วัน ไวรัสเดงกี ฟาจดิสเพลย์ แอนติบอดีเพื่อการรักษา