



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีของมนุษย์ที่
จำเพาะต่อเชื้อไวรัสแดงก๊ทั้ง 4 ซีโรไทป์

โดย ดร.ปานน้ำทิพย์ พิทักษ์สัจจะกุล

กันยายน 2557

Abstract (บทคัดย่อ)**Project Code : MRG5580153****Project Title :** การสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์**Investigator :** ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

ดร. ปานน้ำทิพย์ พิทักษ์สัจจะกุล ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : pannamthip.pit@mahidol.ac.th**Project Period : 2 ปี****1. Abstract**

ที่มาของปัญหา: เชื้อไวรัสเดงกีเป็นเชื้อไวรัสที่มีอยู่กลายเป็นพาหะ โดยมีการประมาณว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อ 50-100 รายทั่วโลก ซึ่งปัญหาที่สำคัญของกลไกการเกิดโรคของเชื้อไวรัสเดงกีคือ ในการติดเชื้อครั้งแรกร่างกายจะสร้างสารภูมิคุ้มกันที่สามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ ซึ่งสารภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นจะสามารถยับยั้งเชื้อเดงกีซีโรไทป์จากการติดเชื้อครั้งแรกได้เป็นระยะเวลานาน แต่ไม่สามารถยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกีสายพันธุ์อื่น แต่กลับส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงขึ้นได้ เรียกกลไกที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคเช่นนี้ว่า Antibody Dependent Enhancement จนกระทั่งปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตวัคซีน หรือยารักษาไข้เลือดออกที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ ในระยะหลังจึงมีการศึกษาถึงการนำสารโมโนโคลนแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อโรค โดยเฉพาะเชื้อไวรัสมาใช้ในการรักษา ซึ่งทีมวิจัยของเราได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัส

ไข้เลือดออกทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ โดยวิธีไฮบริโดมา และยังผ่านการทดสอบในหนูทดลอง และในลิงแล้ว ในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา และการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อไวรัสได้ดีเช่นเดิมเมื่อเทียบกับแอนติบอดีที่ได้จากไฮบริโดมา โดยการผลิตในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) เพื่อนำไปใช้ในการผลิตในปริมาณมากขึ้น (large scale) เพื่อสามารถศึกษาลักษณะ และคุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในด้านต่างๆ ได้ละเอียดมากขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย: โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ ถูกคัดเลือกมาจำนวน 19 โคลนที่เป็นแอนติบอดีชนิด IgG เพื่อศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ ซึ่งในจำนวนนี้ 3 โคลน (1A10H7, 1B3B9, 1G7C2) ได้ถูกคัดเลือกมาเพื่อใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ Human Embryonic Kidney (HEK) และจำนวน 1 โคลน (1B3B9) ถูกนำไปสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัด

ผลการทดลอง: ในการศึกษาคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 19 โคลนพบว่ามียกไลหลายอย่างก่อให้เกิดความหลากหลายของแอนติบอดีที่นำมาศึกษาทั้ง 19 โคลนนี้ คือการรวมกันระหว่าง Variable heavy (VH) และ Variable light (VL) ที่ต่างกัน การเพิ่มหรือลดกรดอะมิโนในส่วน CDR3 ของ heavy chain หรือแม้กระทั่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางตำแหน่ง ซึ่งผลของความหลากหลายของแอนติบอดีเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาส่วนเอพิโทปของแอนติเจนต่อไป หลังจากนั้นจึงได้นำชิ้นส่วน VH และ VL ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 3 โคลนที่แยกได้จากเซลล์ไฮบริโดมาไปใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีในเซลล์ mammalian ได้เป็นผลสำเร็จโดยมีความสามารถในการจับและการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ใกล้เคียงกับแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมา โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 1 โคลนได้นำมาสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้อย่างไม่จำกัด และยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อเพิ่มปริมาณในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

Keywords: Recombinant IgG; Neutralization; Dengue virus; Cross-neutralizing; Germline

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อแยกชิ้นส่วน VH และ VL จาก ไฮบริโดมาเซลล์ ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ทั้งหมด 19 โคลน

2.2 เพื่อสร้าง mammalian expression plasmid ของ heavy chain และ light chain เพื่อใช้ในการผลิต recombinant IgG จำนวน 3 โคลน ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ดีที่สุด

2.3 เพื่อผลิต recombinant IgG ของโมโนโคลนอล 3 โคลนดังกล่าว ใน mammalian cells

2.4 เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีของ recombinant IgG ที่ผลิตขึ้น

2.5 เพื่อสร้าง CHO stable cell lines ที่สามารถหลั่งสาร recombinant IgG ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้

3. บทสรุปผู้บริหาร

ไวรัสเดงกีเป็นเชื้อไวรัสที่มีอยู่หลายเป็นพาหะนำโรค โดยมีการรายงานว่ามีผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีถึง 50-100 ล้านคนต่อปีทั่วโลก (World Health Organisation) เชื้อไวรัสเดงกีจัดอยู่ในกลุ่ม Flavivirus เป็น RNA virus ชนิดหนึ่ง ที่สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ซีโรไทป์ ซึ่งปัญหาที่สำคัญของเชื้อไวรัสเดงกีคือผู้ที่ติดเชื้อเดงกีไวรัสครั้งแรกต่อหนึ่งซีโรไทป์ สามารถมีภูมิคุ้มกันต่อซีโรไทป์นั้นเป็นระยะเวลานาน แต่จะมีภูมิคุ้มกันต่อซีโรไทป์อื่น ในระยะเวลาดังนั้น ถ้ามีการติดเชื้อซ้ำกับซีโรไทป์ที่ต่างจากการติดเชื้อครั้งแรก อาจก่อให้เกิดอาการรุนแรงของโรคมากขึ้นได้ เรียกกลไกการก่อโรคในลักษณะนี้ว่า Antibody dependent enhancement (Schmidt

et al., 2010) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตวัคซีน หรือยารักษาโรคสำหรับโรคไข้เลือดออกนี้ ได้เป็นผลสำเร็จ ในระยะหลังจึงมีการพัฒนายารักษาโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โดยการใช้สารที่ชื่อว่า “โมโนโคลนอลแอนติบอดี” จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาของทีมผู้วิจัย เราสามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีมนุษย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ ได้เป็นผลสำเร็จโดยใช้วิธีไฮบริโดมา ซึ่งจากทั้งหมด 136 โคลนที่พัฒนาขึ้น มีทั้งหมด 19 โคลน ที่เป็นแอนติบอดีชนิด IgG ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ได้ดีที่สุด ซึ่งทั้ง 19 โคลนนี้จับกับ envelop protein ของเดงกีไวรัส (Setthapramote et al., 2012) ดังนั้น เพื่อเป็นการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 19 โคลน ชิ้นส่วน VH และ VL ได้ทำการแยกออกจากเซลล์ไฮบริโดมา โดยสกัด Ribonucleic acid (RNA) สังเคราะห์ Complementary Deoxyribonucleic acid (cDNA) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยวิธีปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำไปหาลำดับเบส โดยใช้ฐานข้อมูล IMGT ในการวิเคราะห์โมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงกลไกการทำให้เกิดความหลากหลายของแอนติบอดีแต่ละตัว ทำให้ทราบถึงชนิดของ antibody germline ที่ใช้, การรวมกันของส่วน variable, diversity และ joining (VDJ recombination), การจับคู่กันระหว่าง VH และ VL และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่ง (Somatic hypermutation, SHM) ซึ่งพบว่าแอนติบอดีทั้ง 19 โคลน เกิดจากแอนติบอดี germline ที่ไม่เหมือนกันของ heavy chain (HC) ถึง 10 แบบ และ light chain (LC) จำนวน 11 แบบ ซึ่งสังเกตว่าแอนติบอดีแต่ละโคลนมีการประกอบของ HC และ LC ที่ต่างกัน ซึ่งส่งผลให้แอนติบอดีแต่ละโคลนมีความสามารถในการจับกับเดงกีไวรัสได้ไม่เหมือนกัน

นอกจากนี้เรายังพบว่าแอนติบอดีบางตัวมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันมาก มีการใช้ลำดับกรดอะมิโนของ antibody จาก germline เดียวกัน แต่มีความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งที่ไม่เหมือนกัน ส่งผลให้ความสามารถในการจับและยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีแตกต่างกันด้วย ซึ่งสามารถตั้งสมมุติฐานได้ว่า ตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้แอนติบอดีนั้นๆ สามารถจับกับเชื้อไวรัสเดงกีได้ดีขึ้น ซึ่งมีประโยชน์ในการพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต

นอกจากการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของแอนติบอดีแต่ละตัวแล้ว เราได้คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 3 โคลน (1A10H7, 1B3B9, 1G7C2) ที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ดีที่สุด (Sasaki et al., 2013) มาใช้ในการผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีในรูปแบบรีคอมบิแนนท์ (rIgG) โดยทำการศึกษาในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cells) โดยเริ่มจากการตัดต่อชิ้นส่วน VH และ VL เข้าใน mammalian expression plasmid pQCX ทั้งหมด 3 ชนิด คือ pQCXIP-CH ที่มี human constant region (C) ตัดต่ออยู่ก่อนแล้ว ซึ่งใช้ในการตัดต่อส่วน VH เข้ากับส่วน constant heavy (CH) เพื่อให้ได้เป็น heavy chain ทั้งเส้น ส่วนพลาสมิดอีก 2 ชนิด คือ pQCXIH-CL และ pQCXIH-CK ซึ่งมีส่วนของ constant lambda light chain (CL) และ constant kappa light chain (CK) ตัดต่ออยู่ตามลำดับ โดย variable lambda (VL) หรือ variable kappa (VK) ที่แยกได้จากเซลล์ไฮบริโดมาได้ถูกตัดต่อเข้าพลาสมิดทั้งสองชนิดนี้แล้วแต่ชนิดของ variable light chain ที่ได้ พลาสมิดของ heavy chain และ light chain ที่ได้จึงนำไปทำการ transfection เข้าในเซลล์ HEK293T เพื่อใช้ในการผลิตเป็น rIgG แล้วเก็บน้ำเลี้ยง

เซลล์ที่มีแอนติบอดีไปทดสอบการจับกับเชื้อเด็งกีไวรัสด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA) และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ด้วยวิธี Focus Reduction Neutralization Test (FRNT) ซึ่งพบว่า rIgG ที่ได้ทั้ง 3 โคลนสามารถจับ และยับยั้งเชื้อเด็งกีไวรัสได้คล้ายคลึงกับแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจากเซลล์ไฮบริโดมา จากนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 1 โคลน (1B3B9) ได้ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการนำไปใช้ในการผลิตในระดับใหญ่หรือระดับอุตสาหกรรม (Kim et al., 2012) โดยทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเด็งกีของแอนติบอดีที่ได้จาก stable cell อีกครั้งหนึ่ง พบว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจาก stable cell สามารถยับยั้งเชื้อเด็งกีไวรัสได้คล้ายคลึงกับแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมาเช่นกัน Stable cell ที่สร้างขึ้นได้สามารถนำไปพัฒนาต่อโดยการปรับเปลี่ยนให้กลายเป็นเซลล์ลอย และสามารถเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงที่ปราศจากซีรั่มได้ เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณ และหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตในปริมาณมากขึ้นต่อไปได้

4. วิธีทดลอง

4.1 การแยกชิ้นส่วน VH และ VL จากเซลล์ไฮบริโดมา

เซลล์ไฮบริโดมา จำนวน 19 โคลน ได้ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM ที่เติม 15% Fetal Bovine Serum จนได้ เซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ (1×10 cm dish) แล้วจึงสกัด RNA จากเซลล์ที่ได้ เพื่อนำมาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแอนติบอดียีนส์ดังตารางที่ 1 ซึ่งจะ เป็นไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ของ VH ทั้งหมด 12 คู่ V kappa 10 คู่ และ V lambda 4 คู่

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนแอนติบอดี heavy และ light chain

Name	sequence
Variable heavy chain	
hIGHV1/7-5'L	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTC
hIGHV2__-5'L	ATGGACATACTTTGTTCCACGCTCCT
hIGHV4__-5'L	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCT
hIGHV6__-5'L	ATGTCTGTCTCCTTCTCATCTTCTCCT
hIGHV3__-5'L	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTT
hIGHV5__-5'L	ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGC
37, hlgG1234(-)_PCR Center	CTCCCGCGGCTTTGTCTTGGCATT
17, hlgG1234(-)_nPCR	CCTTGGTGTGCTGGGCTTGTGAT
Variable kappa light chain	
IGKV1-5'L	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG
IGKV2-5'L	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTG
IGKV3-5'L	ATGGAARCCCCAGCGCAGCTTCTC
IGKV4-5'L	ATGGTGTGTCAGACCCAGGTCTTCAT
IGKV5-5'L	ATGGGGTCCCAGGTTACCTCCTC
18, hlgK_PCR(-)	GTGACACTCTCCTGGGAGTTACCC
11, Human specific 3' primer for nested PCR	GAGTTACCCGATTGGAGGGCGTTAT
Variable lampda light chain	
IGLV_1/3/5/7-5'L	ATGGCCTGGWYYCCTCTCYTYCTS
IGLV_8-5'L	ATGGCCTGGATGATGCTTCTCCTCG
IGLV_2/9/10-5'L	ATGSCCTGGGCTCYKCTSCCTCTS
IGLV_4-5'L	ATGGCCTGGRYCYCMYTCYWCCTM
19, hlgL_nPCR(-)	TGGCAGCTGTAGCTTCTGTGGGACT

เมื่อได้ผลผลิตพีซีอาร์ แล้วจึงนำมาตรวจสอบด้วยการทำ agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วนที่สนใจจะมีขนาดตั้งแต่ 600-900 bps ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Nucleospin Extract II (Machery Nagel, Germany) เพื่อนำไปใช้ในการต่อเข้ากับ plasmid pGEM-T easy จากนั้นจึงสกัดพลาสมิด และหาลำดับเบส

4.2 การวิเคราะห์ชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยฐานข้อมูล IMGT

ชิ้นส่วน VH และ VL ที่ได้จากการหาลำดับเบสได้นำมาวิเคราะห์ด้วยฐานข้อมูล IMGT โดยตัดเฉพาะส่วนของ variable region เท่านั้น ไม่รวม constant region โดยฐานข้อมูล IMGT นี้จะทำการกำหนดตำแหน่งของ variable region ในส่วน Complementary Determining Region (CDR) และ Framework (FRW) และบ่งบอกชนิดของ germline ตั้งต้นที่ใช้เพื่อสร้างเป็นแอนติบอดีของโมโนโคลนต่างๆ

4.3 การสร้าง mammalian expression plasmid ที่ประกอบด้วยส่วน variable and constant region

พลาสมิดที่ใช้ในการตัดต่อชิ้นส่วน variable region ของแอนติบอดีในการวิจัยครั้งนี้เป็นพลาสมิด pQCXIP/pQCXIH ที่มีส่วนของ human constant region ติดต่อกันอยู่ โดย constant heavy chain จะติดต่อกันอยู่ในพลาสมิด pQCXIP ใช้ชื่อว่า pQCXIP-CH และ constant light chain จะติดต่อกันอยู่ในพลาสมิด pQCXIH ใช้ชื่อว่า pQCXIH-CL (pQCXIH-CLampda, pQCXIH-Ckappa) ซึ่งพลาสมิดทั้ง 2 ชนิดจะนำมาใช้ในการตัดต่อชิ้นส่วน variable region เข้าไปในส่วน 5' ของ constant region โดยมีรายละเอียดดังนี้

4.3.1 การตัดต่อชิ้นส่วน variable region เข้าสู่ pQCX พลาสมิด

พลาสมิด pGEMT-easy ที่มีชิ้นส่วน variable region ของ heavy chain และ light chain อยู่จะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ variable region โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีส่วนที่จำเพาะกับแอนติบอดีอิน และส่วนจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI/XhoI* หลังจากเพิ่มปริมาณได้แล้ว จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ ก่อนนำไปตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว เช่นเดียวกับพลาสมิด pQCXIP-CH และ pQCXIH-CL โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอประมาณ 1-2 μ g ในการตัด แล้วนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมงถึง 1 คืน ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย agarose gel purification พลาสมิดที่ผ่านการตัดแล้ว ได้นำมาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วน variable region ด้วยเอนไซม์ ligase โดยการปมที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 1 คืน

4.3.2 การใส่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli*

Recombinant DNA จากปฏิกิริยา ligation ได้นำมาผสมกับ competent cell DH5 α แล้ววางในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปมใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 42 °C เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำมาใส่ในน้ำแข็งอีกเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติม SOC medium ปริมาตร 1 ml ลงไป นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเซลล์ที่ได้ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง คงค้างไว้ประมาณ 100 μ l แล้วละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วย media ที่เหลืออยู่ spread เซลล์ที่ได้ลงบน LB agar ที่มียา ampicillin แล้วนำไปปมที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงสุ่มเลือกโคโลนีบน plate มาตรวจสอบชิ้นส่วนที่ติดต่อด้วยวิธี colony PCR และ digestion test ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสของโคลนที่ผ่านการตัดต่อแล้ว

พลาสมิดที่ผ่านการตัดต่อ และการตรวจสอบขนาดของ insert แล้ว ได้นำไปหาลำดับเบส และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

4.4 การแสดงโปรตีน recombinant IgG ด้วยเซลล์ HEK293T โดยวิธี transient transfection

4.4.1 พลาสมิดที่ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จะนำมาเพิ่มปริมาณใน *E.coli* เซลล์ที่ปริมาตร 100 ml และทำการสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์ด้วย Purelink plasmid midiprep kit (Invitrogen, USA) เพื่อใช้ในการทำ transfection

เซลล์ HEK293T ถูกนำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM, 4.5 g/L glucose และ 10% Fetal Bovine Serum โดยก่อนที่จะทำ transfection จะนับเซลล์เพื่อใช้ในการ seed ลงใน 10-cm dish เพื่อให้ได้ประมาณ 85-90% confluence ในวันต่อมา

สำหรับการทำ small scale transfection จะทำใน 24 well plate ที่มีเซลล์ HEK293T จำนวน 1.5×10^5 เซลล์ โดยการเลี้ยงเป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการเตรียม plasmid DNA ของ heavy chain (HC) และ light chain (LC) อย่างละ 0.4 μ g ผสมลงใน 50 μ l ของ OPTI-MEM I Reduced serum medium เช่นเดียวกับ lipofectamine (2 μ l ลงใน 50 μ l OPTI-MEM) รอเวลา 5 นาที จึงใส่สารละลาย DNA ลงใน สารละลาย lipofectamine แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงหยดลงในเซลล์ที่เลี้ยงไว้ แล้วนำเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน จึงเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาตรวจสอบการหลั่งสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี IFA

สำหรับการเตรียมแอนติบอดีเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป จะทำใน 10-cm dish โดยทำทั้งหมด 5 dish โดยแต่ละ dish ใช้พลาสมิด light chain 12 μ g และ พลาสมิด heavy chain 12 μ g โดยผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ OptiMEM (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1.5 ml และผสม Lipofectamine 2000 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ OptiMEM (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1.5 ml เช่นกัน จากนั้นผสม DNA และ Lipofectamine 2000 เข้าด้วยกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่ลงในเซลล์ แล้วนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 3-5 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวัน อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทั้งหมดถูกนำมารวมกัน เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย protein A sepharose column

4.4.2 การวัดปริมาณ IgG ในน้ำเลี้ยงด้วยวิธี ELISA

ตรึง captured antibody (anti-human IgG) บน ELISA plate โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน ล้าง plate แล้วเติม blocking buffer จนเต็ม แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate แล้วจึงเติมตัวอย่างที่เป็นน้ำเลี้ยง เช่นเดียวกับ IgG มาตรฐานที่รู้ความเข้มข้น แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate แล้วจึงเติม anti-human IgG-HRP ที่ทำให้เจือจางใน blocking buffer แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายซับสเตรต TMB เพื่อศึกษาปฏิกิริยา

4.4.3 การทดสอบปฏิกิริยาการจับกันระหว่างแอนติบอดีและเชื้อไวรัสแดงกีด้วยวิธี Immunofluorescence assay

การทดลอง IFA จะศึกษาในเซลล์ Vero โดยการเตรียมเซลล์ Vero ลงใน 96 well plate ที่ปริมาตร 2×10^5 cell/ml และเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเชื้อไวรัสแดงกีจะถูกเตรียมในน้ำเลี้ยงที่ปราศจากซีรัม โดยคำนวณให้ได้จำนวนไวรัสที่ใช้ที่ MOI=0.1 แล้วจึงเติม

สารละลายไวรัสปริมาตร 50 μ l ลงในแต่ละหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมปริมาตร 100 μ l ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 2 % แล้วจึงเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงตรึงเซลล์กับ plate ด้วยสารละลาย 3.7% formaldehyde และ 0.1% Triton X-100 เพื่อนำไปใช้ในการทำ immunostaining ต่อไป

ในการทำ immunostaining ทำได้โดยเติมสารละลายแอนติบอดีที่สนใจ ปริมาตร 50 μ l ลงในหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง plate จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม secondary antibody anti-human Alexa (1:1000) ปริมาตร 50 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที ล้างหลุมด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปดูการเรืองแสงด้วยกล้อง fluorescence microscope

4.5 การทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ protein A

น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทำ transfection ที่มีแอนติบอดีอยู่ถูกนำมาตกตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 40% นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย binding buffer เพื่อนำเข้าเครื่อง AKTA Prime ที่ใช้ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แอนติบอดีที่ได้จะนำมาตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE

4.6 การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ ด้วยวิธี Focus Reduction Neutralization Test

รีคอมบิแนนท์ IgG ที่ได้หลังถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้น แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในสารละลาย PBS ก่อนนำไปวัดความเข้มข้นโดยใช้ BCA protein assay kit (Pierce, USA)

การทำ Focus Reduction Neutralization Test ได้ทำการศึกษาด้วยเซลล์ Vero ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ที่มี 10% Fetal Bovine Serum โดยทำการ seed vero cell ลงใน 96-well cell culture plate ที่ปริมาณเซลล์ 2×10^5 cell/ml เลี้ยงเซลล์ไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

รีคอมบิแนนท์ IgG และ IgG แอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมา ที่ทราบความเข้มข้นได้นำมาทำ 2-fold dilution ในสารละลาย PBS ที่ฆ่าเชื้อ ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 90 μ l จากนั้นจึงเติมสารละลายไวรัสปริมาตร 90 μ l ลงไป (ปริมาตรรวม 180 μ l สำหรับการทำให้ 3 ซ้ำ) โดยปรับให้ได้จำนวน focus 75-120 focus ใน 1 well นำแอนติบอดี ไวรัสที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำ 5 μ l $\times$ 3 ของสารผสมมาใส่ลงในเซลล์ vero ใน 96 well plate (จำนวน 3 หลุม) ที่ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติม overlayed medium ที่ประกอบด้วย MEM, 2% FBS, 1% CMC ปริมาตร 100 μ l แล้วจึงนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 2-3 วัน

เมื่อครบ 2-3 วัน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วจึง fix plate ด้วย สารละลาย 3.7% formaldehyde และ Triton-X 100 แล้วจึงล้างด้วยสารละลาย PBS

จำนวน 3 ครั้ง ก่อนนำไปทำ immunostaining โดยใช้ human anti-dengue virus antibody เป็น primary และ anti-human Alexa เป็น secondary antibody หลังจากนั้นจึงนำไปนับจำนวน focus ที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับ well ที่ไม่ได้ใส่ antibody ในการบ่มกับไวรัส

4.7 การสร้าง CHO stable cell ที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.7.1 การหาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดเพื่อใช้ในการทำ Stable transfection (Kill curve)

เซลล์ CHO จะถูกเตรียมเพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ที่ 60-70% confluence ใน 24 well plate โดยการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมา ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดที่จะใช้ในการทำ stable transfection จะเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.5, 1, 2, 4, และ 8 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับยา puromycin และ 0, 50, 100, 200, 400 และ 800 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับยา hygromycin แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่มียาปฏิชีวนะที่เตรียมไว้ แล้วสังเกตการตายของเซลล์ทุกวัน โดยความเข้มข้นของยาที่เลือกใช้เป็นความเข้มข้นของยาที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ CHO ได้หมดภายในเวลา 4-6 วัน

4.7.2 การทำ stable transfection

เซลล์ CHO จะถูกเตรียมเพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ที่ประมาณ 90% confluence ใน 6 well plate โดยการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1 คืน วันต่อมา พลาสมิดของแอนติบอดียีนส่วน light chain และ heavy chain จึงนำมาทำ transfection ด้วย lipofectamine 2000 ด้วยวิธีเดียวกับ transient transfection ดังที่กล่าวข้างต้น โดยใช้เซลล์ที่ไม่ได้ทำการ transfection เป็น control และ incubate เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่มียา 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นที่หาได้จากขั้นตอนข้างต้น เพื่อเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีพลาสมิดของทั้ง heavy chain และ light chain อยู่ในโครโมโซม แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อเพื่อสังเกตการตายและการอยู่รอดของเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ทำการ transfection

เซลล์จากหลุมที่มียาและสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ จะถูกเลี้ยงต่อจนได้ 70-80% confluence แล้วจึงทำการ passage และเก็บเซลล์ที่ได้เพื่อเป็น stable cell pool

4.7.3 การคัดเลือกเซลล์เดี่ยวที่สามารถผลิตแอนติบอดี

จากเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการทำ transfection (stable cell pool) ได้นำมาคัดเลือกเซลล์เดี่ยวด้วยวิธี limiting dilution โดยการนับจำนวนเซลล์ และเตรียมเซลล์ให้ได้ 1 เซลล์/well ใน 96 well plate จากนั้นเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 10-14 วันเพื่อสังเกตโคโลนีเดี่ยว หลังจาก 10-14 วัน เมื่อสังเกตเห็นโคโลนีเดี่ยว หลุมที่มีโคโลนีเพียงกลุ่มเดียวจะนำไปทดสอบความสามารถการผลิตแอนติบอดีที่จับเฉพาะกับเชื้อ登革กีไวรัสด้วยวิธี IFA โดยนำอาหารในหลุมปริมาตร 50 μl ใส่ลงในหลุมของ IFA plate ที่เตรียมไว้ กลุ่มเซลล์จากโคโลนีเดี่ยวจะถูกคัดเลือกไว้ประมาณ 15-20 โคโลนี เพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี ELISA, IFA ตามขั้นตอนข้างต้น

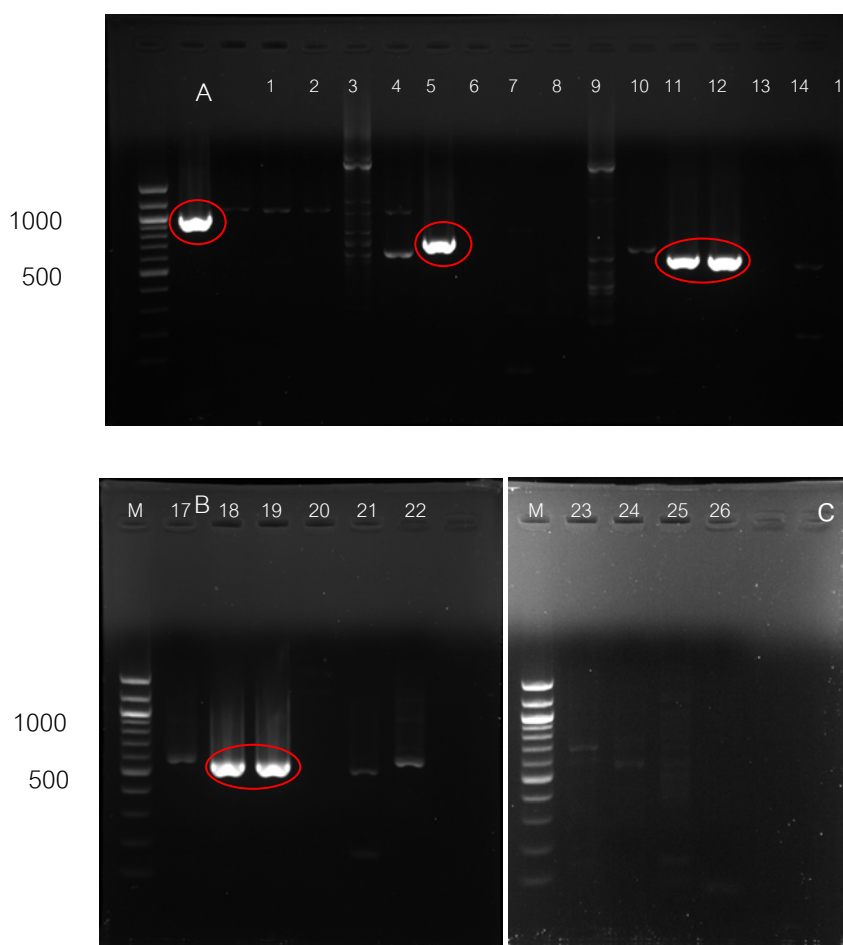
4.7.4 การทดสอบความเสถียรในการผลิตแอนติบอดี

Single stable cell จากทั้งหมดประมาณ 20 โคลน เมื่อวัดปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตด้วยวิธี ELISA จากขั้นตอนข้างต้น ได้ทำการคัดเลือกมาทั้งหมด 4 โคลนที่ผลิตแอนติบอดีได้มากที่สุด เพื่อนำมาทดสอบความเสถียรในการผลิตแอนติบอดี โดยการ passage stable cell ดังกล่าวในสภาวะที่ไม่มียา เป็นจำนวน 20 passage โดยการนับจำนวนเซลล์ที่ได้ในแต่ละ passage และนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาวัดปริมาณ IgG ที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี ELISA โคลนที่สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณมากที่สุดและเสถียรที่สุด ได้ทำการเพิ่มปริมาณเซลล์เพื่อเก็บเป็น stock

5. ผลการทดลอง

5.1 การแยกชิ้นส่วน VH และ VL จากเซลล์ไฮบริโดมา

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน variable region จะมีขนาดอยู่ระหว่าง 500 – 900 bps ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้นี้ ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ ก่อนจะนำไปต่อเข้ากับ pGemT-easy เพื่อใช้ในการหาลำดับเบส

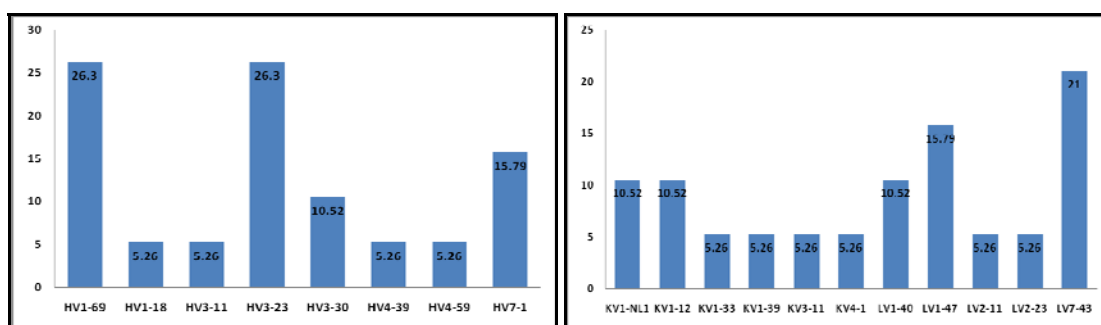


รูปที่ 1 ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน variable region ของ heavy chain และ light chain โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 26 คู่ เป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณส่วน variable heavy

chain 12 คู่ (lane 1-12) variable kappa light chain 10 คู่ (lane 13-22) และ variable lambda light chain 4 คู่ (lane 23-26). ชิ้นส่วนที่จะนำไปใช้ในการต่อเข้า pGemT-easy คือ ชิ้นส่วนที่ 1,7,13,14,18,19 แสดงดังรูป

5.2 การวิเคราะห์ชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยฐานข้อมูล IMGT

ลำดับเบสของ VH และ VL ที่ได้ ถูกแปลงเป็นกรดอะมิโนและวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IMGT/V-Quest เพื่อเปรียบเทียบกับแอนติบอดี germline ที่อยู่ในฐานข้อมูล IMGT รวมถึงกลไกการทำให้เกิดความหลากหลายของแอนติบอดี พบว่าแอนติบอดีทั้ง 19 โคลนนี้จัดแบ่งเป็นทั้งหมด 10 กลุ่มสำหรับ heavy chain และ 11 กลุ่มสำหรับ light chain ตามชนิดของ germline ที่ใช้ดังแสดงได้ในตารางที่ 2



รูปที่ 2 จำนวนของ germline แต่ละชนิดที่ใช้สำหรับ 19 HuMAbs. (A) จำนวนของ heavy chain germline แต่ละชนิด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (B) จำนวนของ light chain germline แต่ละชนิด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ แกน Y แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของ germline แต่ละชนิด แกน X แสดงชนิดของ germline แต่ละชนิด

ตารางที่ 2. การวิเคราะห์แอนติบอดียีนส่วน variable จาก IMGT โดยบอกถึงชนิดของ germline sequences และความหลากหลายของแอนติบอดียีน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์

HuMAbs	IGHV gene	IGKV/IGLV gene	No. of aa mutations /Identity (% variation)		HCDR3 aa sequence (length)
			VH	VL	
MAb 8 (1A10H7)	HV1-69*01F	KV1-NL1*01 F	12 /85(12.4)	9/85 (9.6)	ARSRYYYDSDASNYGMDV (18)
MAb 54 (1G7C2)	HV1-69*01F	LV2-23*01 F	17/80(19.5)	11/85 (11.5)	ATLIAVAGSEGAGSFDI (17)
MAb310 (1E7B8)	HV1-69*01F	KV3-11*01 F	17 /81(17.3)	4/90 (4.2)	ARHRAVAGGDSHDENNWFPG (21)
MAb 491 2D1G5	HV1-69*01F	LV2-11*01 F	14 /84(14.3)	11/86 (11.3)	ARAGPIAATGVQYEMDV (17)
MAb57 (1H5A11)	HV3-23*01F	LV1-47*02 F	12 /84(12.5)	5/93 (5.1)	ATGSQWPGDY (10)
MAb 87 (3A10G12)	HV3-23*01F	LV1-47*02 F	10 /87(10.3)	5/93 (5.1)	AAGSQWPGDY (10)
MAb 106 (4A6F9)	HV3-23*01F	KV1-12*01 F	6 /91(6.2)	4/90 (4.2)	ANTLWTVGSKGGFDY (15)
MAb118 (4D10E9)	HV3-23*01F	KV1-12*01 F	21 /76(21.6)	12/82 (12.8)	TKIDWSIRGTFDN (13)
MAb 131 (4F5E1)	HV3-23*01F	KV4-1*01 F	6 /92(6.1)	5/96 (5)	ARVTGGWSDY(10)
MAb 19 (1B3B9)	HV7-4*02F	LV7-43*01 F	14 /83(14.4)	13/83 (13.5)	TTLSGYSADWPEDY (14)
MAb 135 (4H12C8)	HV7-4*02F	LV7-43*01 F	5 /92(5.1)	3/93 (3.1)	TTLSGYSADWPEDY (14)
MAb 165 (5E6B1)	HV7-4*02F	LV7-43*01 F	13 /84(13.4)	13/83 (13.5)	TTLSGYSADWPEDY (14)
MAb25 (1C2D2)	HV4-59*01F	KV1-33*01 F	13 /84(13.4)	10/84 (10.6)	ARVAKLFGSATYGMVDV (16)
MAb 183 (5G8E3)	HV3-30*04F	LV1-40*01 F	12 /86(12.2)	12/87 (12.1)	AVYYCARRGDYSSSAENFQH (20)
MAb 216 (1C1G4)	HV1-18*01F	LV1-47*02 F	9 /89(9.2)	6/92 (6.1)	ARGPDYESSDSPWFDY (16)
MAb 358 (3A1E2)	HV3-11*01F	LV1-40*01 F	17 /80(19.5)	9/90 (9.1)	ARGMTGFTTSNTESFDL (17)
MAb 411 (3B6C7)	HV4-39*01F	LV7-43*01 F	15 /83(15.3)	8/89 (8.2)	ASPGGLISDEAMAGYFDY (18)
MAb 533 (2H8G1)	HV3-30*03F	KV1-39*01 F	13 /85(13.3)	12/83 (12.6)	ATGGGRFSGSGNYYYYGMDV (20)
MAb 178 (5G2D2)	HV1-69*06F	KV1-NL1*01 F	14 /83(14.4)	6/88 (11.7)	ARSTYYYDGSDLTYGMDV (18)

ตารางที่ 3 แสดงรายละเอียดของลำดับกรดอะมิโนของ 3 กลุ่มหลักแยกด้วยชนิดของ heavy chain germline จาก HuMAbs จำนวน 13 โคลนใน 19 โคลน

HC	FRW1	CDR1	FRW2	CDR2	FRW3	CDR3-IMGT	VL germline used	NT50 (µg/ml)
IGHV1-69	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCAS	GGTFSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPIFGTA	NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYC			
MAb8 (D23-1A10H7)	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCAS	GGTF R NYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	V IPTLHTT	NY V ERFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYC	ARSRYYYDSASNYGMDV	IGKV1-NL1*01 F	1.6
MAb54 (D23-167C2)	QVQLVQSGAEVKKPK A SSVKVSCAS	GGTF G TYA	ISWVRQAPG K GLEWMGG	IIP L YKQS	T YAKFRGRVTITADESTNTAYMELNGLSLED TAVFYC	ATLIAVAGSEGAGSFDIW	IGLV2-23*01 F	1.1
MAb310 (D30-1E7B8)	QVQLVQSGAEVKKPKGSS R VSCRAS	GGAL A NYA	ISWVRQAPGQGLEWMGA	IIP M SR T T	D YAKFRGRVTISADES R STAYMEL N SLRSD TAVYYC	ARHRVAGGSDSDHENDNWFGPW	IGKV3-11*01 F	1.5
MAb491 (D32-2D1G5)	QVQL M QSG P EVKKPGSS M KVSCAS	GGT L R S YS	ISWVRQAPGQGLEWMGG	T I P F F GRA	S YAKFQGRVTITADE A T S TAF M ELSSL S SED TAVY F C	ARAGPIAATGVQYEMDVW	IGLV2-11*01 F	13
MAb178 (D23-5G2D2)	QVQLVQSGAEV E KPGSSVKVSCAS	GDT F SKYA	I NWVRQAPGGLDWMGG	IIP I L T T T	T YAQ R FQGRVTITADKSTNTAYMEL R SLR F DD TAVYYC	CARSTYYDGS L TYGMDVW		
IGHV3-23	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGGST	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC			
MAb57 (D23-1C1G4)	EVQLLESGG D LVPGGSLRLSCAAS	GFTF S TYA	MSWVRQAPGKGLEWV S G	I G D S G H S I	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC	CATGSQWP GDYW	IGLV1-47*02 F	1.6
MAb87 (D23-3A10G12)	EVQLLESGGLVQPGGSLRLS C TAS	GFTF S NYA	M TWVRQAP R KGLEWVSA	I G G S G H S I	YY G DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNT L RAED TAVYYC	CAAGSQWP GDYW	IGLV1-47*02 F	1.4
MAb106 (D23-4A6F9)	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTF S N A	MSWVRQAPGKGLEWV S G	V S N SGG D T	YYADSVKGRF A ISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC	CANTLWTVGSKG GFDYW	IGKV1-12*01 F	2.3
MAb118 (D23-4D10E9)	EVQLLESGGL A QPGGSLRLSCAAS	GF S F S T Q A	M AWVRQAPGKGLEWVSA	I G G R D E G S	YYA E SLKGR L TISRDN SKNT V YLQMD R LRA D DTAVY F C	CTKIDWSIRGT FDNW	IGKV1-12*01 F	
MAb131 (D23-4F5E1)	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAAS	GF S F S N SA	MSWVRQA Q GKGLEWVSA	F SGSGGST	YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC	CARVTGGWSDYW	IGKV4-1*01 F	4.6
IGHV7-4	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS	GYTFTSYA	MNWVRQAPGQGLEWMGW	INTNTGNP	TYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYC			
MAb19 (D23-1B3B9)	QV H LVQS E EVKKPGASVKVSC Q AS	GY P F T RY I	MNWVRQAPGQGLEWMGW	I D T K T GNP	TYA A FTGRFVFLDTSVSTAYLQ I N L KAED TAVY F C	CTTLSGYSADWPEDYW	IGLV7-43*01 F	3.1
MAb135 (D23-4H12C8)	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCAS	GYTFT T YP	MNWVRQAPGQGLEWMGW	I D T NTGNP	TYA A FTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYC	CTTLSGYSADWPEDYW	IGLV7-43*01 F	5.5
MAb165 (D23-5E6B1)	QV H LVQSG E VKKPGASVKVSC Q AS	GY P F T RY I	MNWVRQAPGQGLEWMGW	I D T K T GNP	TYA A FTGRFVFLDTSVSTAYLQ I N L KAED TAVY F C	CTTLSGYSADWPEDYW	IGLV7-43*01 F	3.1

5.3 การสร้าง mammalian expression plasmid ที่ประกอบด้วยส่วน variable และ constant region

เมื่อได้ชิ้นส่วน variable region (VH และ VL) ที่เป็น human immunoglobulin ที่ต่ออยู่ในพลาสมิด pGem เรียบร้อยแล้ว หลังจาก subclone ชิ้นส่วนนี้ใส่ใน mammalian expression plasmid pQC จะได้พลาสมิดของ heavy chain (pQCXIP-VHCH) และพลาสมิดของ light chain (pQCXIH-VLCL) ซึ่งสามารถแสดงลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนดังรูปที่ 3

1A10H7 Heavy chain

```

NotI   kozaq  <-----Signal Peptide----->
GCGGCCGCTGCCACC ATGGACTGGACCTGG AGGATCCTCTTTGTG GTGGCAGCAGCTACA GGTGTCCGGTCCCAG
A A A A T M D W T W R I L F V V A A A T G V R S Q

<-----FRW1-----> <-----FRW1----->
GTGCAGCTGGTGAG TCTGGGGCTGAGGTG AAGAAAGCTGGGTCC TCGGTGAGGGTCTCC TGCAAGGCTTCTGGA
V Q L V Q S G A E V K K P G S S V R V S C K A S G

-----><-----CDR1-----> <-----FRW2-----> <----->
GGCACCTTCAGGAAT TATGCTATCAGCTGG GTGCGCCAGGCCCT GGACAAGGGCTTGAG TGGATGGGAGGGGTC
G T F R N Y A I S W V R Q A P G Q G L E W M G G V

-----CDR2-----> <----->
ATCCCCACGTTGCAT ACAACAACTACGTA GAGCGGTTCCAGGGC AGAATCACGATTACC GCGGACGAGTCCACG
I P T L H T T N Y V E R F Q G R I T I T A D E S T

-----FRW3-----> <-----CDR3-->
AGCACAGCTACATG GAGCTGAGCAGCCTG AGATCTGAGGACACG GCCGTGTATTACTGT GCGAGGTCGAGGTAT
S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R S R Y

-----CDR3-----> <-----FRW4-----> <----->
TACTATGATAGTGAT GCCTCGAATTACGGT ATGGACGTCTGGGGC CAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCAGCC
Y Y D S D A S N Y G M D V W G Q G T T V T V S S A

-----constant region-----> XhoI
TCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCCTG GCACCTCGAG
S T K G P S V F P L A P S

```

1A10H7 Light chain

NotI kozak ←-----Signal Peptide-----→
GCGGCCGCTGCCACC ATGAGGCTCCCTGCT CAGCTCCTGGGGCTC CTGCTGCTCTGGCTC CCAGGTATGAGATGT
 A A A A T M R L P A Q L L G L L L L W L P G M R C

←-----FRW1-----→←-----
 GACATCCAGATGACC CAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTA GGAGACAGAGTCACC ATCACTTGCCGGGCG
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A

-----CDR1-----→ ←-----FRW2-----→←-----
 AGTCAGGGCAATAGC AATGCTGTAGCCTGG TATCAGCAGAAAGCA GGGAAAGCCCCTAAG CTCCTGCTCTATGGT
 S Q G N S N A V A W Y Q Q K A G K A P K L L L Y G

-----CDR2-----→←-----FRW3-----→←-----
 GCATCCAGATTGGAG AGGGGGTCCCATCC AGGTTCACTGGCAGT GGATCTGGGACGGAT TACAGTCTCACCATC
 A S R L E R G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I

-----→ ←-----CDR3-----→ ←-----
 AGCAGCCTGCAGCCC GAAGATTTTGCAACT TATTACTGTCAACAG TATTCTAGTATCCCG TACACTTTTGCCAG
 S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S S I P Y T F G Q

-----FRW4-----→←-----constant region-----→←-----
 GGGACCAAGCTGGAG ATCAAACGAAGTGTG GCTGCACCATCTGTC TTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTG
 G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L

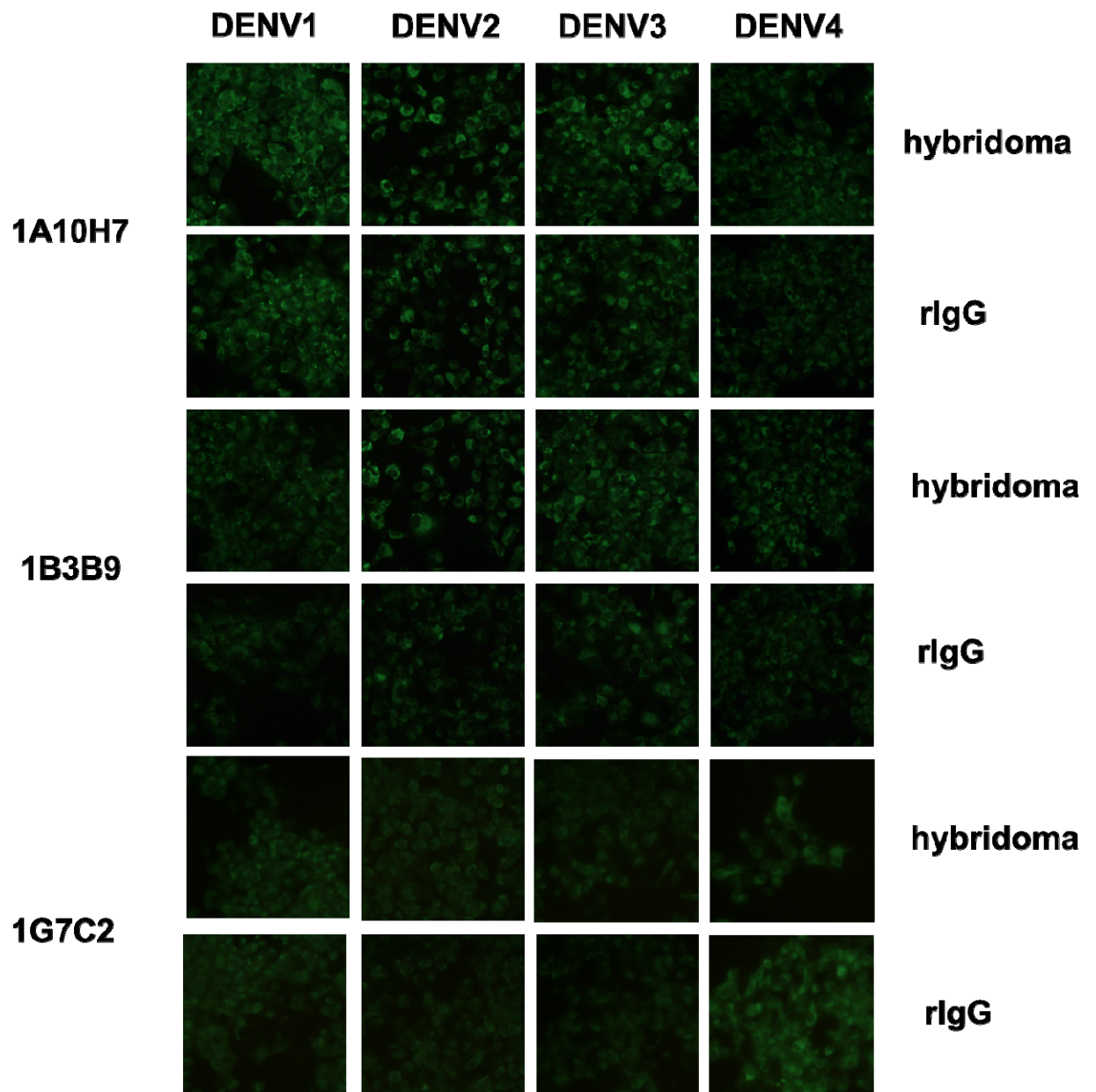
-----→ XhoI
 AAATCTGGAAGTGGC TCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTAT CCTCGAG
 K S G T A S V V C L L N N F Y P R

รูปที่ 3 แสดงลำดับเบส และการดอะมิโนของชิ้นส่วน variable region heavy and light chain ของโคลน 1A10H7

5.4 การแสดงโปรตีน recombinant IgG ด้วยเซลล์ HEK 293T โดยวิธี transient transfection

5.4.1 การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่ได้ด้วยวิธี IFA

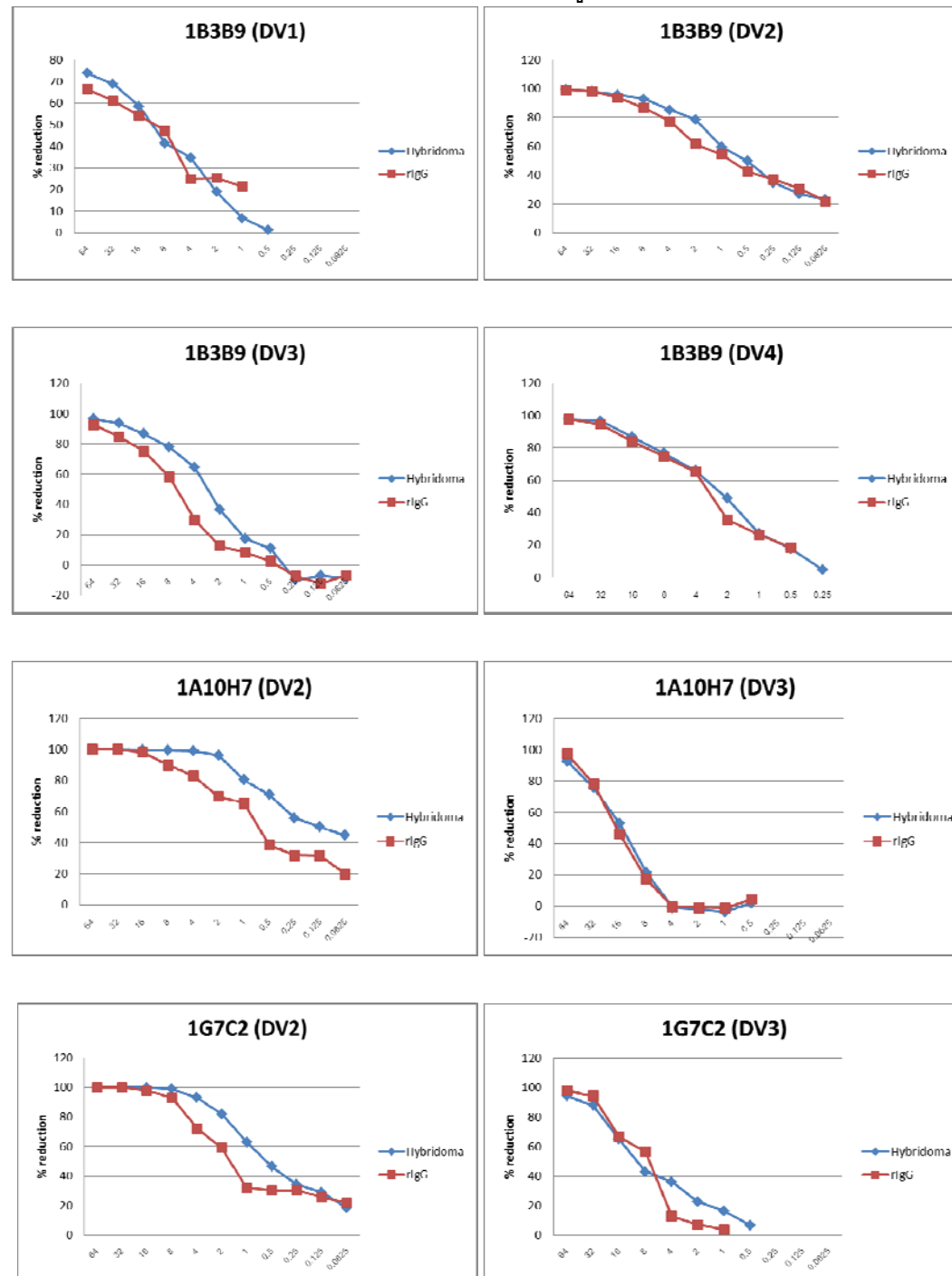
หลังจากการทำ transfection เพื่อส่งผ่านพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293T และการเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรีคอมบิแนนท์แอนติบอดีอยู่เพื่อนำมาทดสอบความสามารถการจับกับเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ด้วยวิธี immunofluorescence assay ได้ผลดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ความสามารถในการจับกับเชื้อไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ ของรีคอมบิแนนท์ IgG ทั้ง 3 โคลน เปรียบเทียบกับ IgG จากเซลล์ไฮบริโดมา ด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA)

5.4.2 การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกเดงกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ ด้วยวิธี Focus Reduction Neutralization Test

การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อไวรัสของ รีคอมบิแนนท์ IgG โดยเปรียบเทียบกับ IgG ที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมา ทั้งหมด 3 โคลน ได้แก่ 1B3B9, 1A10H7, และ 1G7C2 โดยได้ทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีของโคลน 1B3B9 กับทั้ง 4 ซีโรไทป์ และโคลน 1A10H7, และ 1G7C2 กับซีโรไทป์ 2 และ 3 ได้ผลดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีของแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน โดยเปรียบเทียบระหว่าง recombinant IgG และ IgG ที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมา

5.5 การสร้าง CHO stable cell ที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ในการทำ stable CHO cell ที่สามารถผลิตสารแอนติบอดีได้นั้น ผู้วิจัยคัดเลือก HuMAbs จำนวน 1 โคลน คือ 23-1B3B9 เพื่อนำมาทำเป็น stable cell โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.5.1 การทำ kill curve เพื่อหาปริมาณยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในการคัดเลือก stable cell

จากการทดลองเลี้ยงเซลล์ CHO-K1 ในสภาวะที่ยาที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ความเข้มข้นของยาที่สามารถฆ่าเซลล์ตายได้หมดภายใน 4-6 วันคือ 8 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับยา puromycin และ 800 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับยา hygromycin ดังแสดงได้ในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การหาปริมาณยาปฏิชีวนะ Hygromycin และ puromycin ที่น้อยที่สุดที่สามารถทำลายเซลล์ CHO-K1 ได้ทั้งหมด

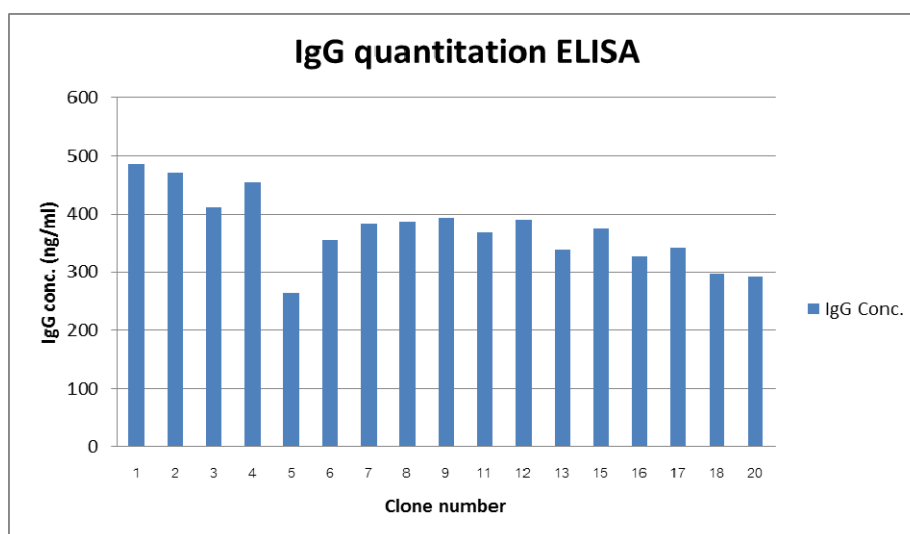
5.5.2 การสร้าง stable CHO cells

5.5.2.1 การทำ transfection และการคัดเลือก stable เซลล์

หลังจาก transfect เซลล์ CHO-K1 ด้วยพลาสมิดสำหรับ heavy chain และ light chain ตามขั้นตอนข้างต้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารที่มียา hygromycin และ puromycin ที่ความเข้มข้น 800 $\mu\text{g/ml}$ และ 8 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เซลล์ตายได้ ถูกล้างออก และรอจนเซลล์ที่เหลือเพิ่มปริมาณจนได้ความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 70% เซลล์ที่ได้นี้เป็นเซลล์ที่มีพลาสมิดทั้งสองชนิดอยู่บนโครโมโซม จากนั้นจึงเก็บ stock เซลล์นี้เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5.5.2.2 การคัดเลือก sub-clone (single clone) ด้วยวิธี limiting dilution

เซลล์ที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น ได้นำมาทำ limiting dilution เพื่อให้ได้โคลนเดี่ยว หลังจากเลี้ยงเซลล์ไปประมาณ 10-14 วัน โดยการเปลี่ยนอาหารทุก 3 วัน เราได้โคลนเดี่ยวมาทั้งหมด 20 โคลน ซึ่งมี 17 โคลนที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เฉพาะต่อเชื้อเด็งกีไวรัสซึ่งตรวจสอบโดยวิธี IFA โดยทั้ง 17 โคลนนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณจาก 96-well ไปที่ 24-well เพื่อเก็บเป็น stock และนำมาหาปริมาณแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นด้วยวิธี ELISA พบว่าโคลนเดี่ยวจำนวน 4 โคลนสามารถผลิตแอนติบอดีได้มากที่สุด คือ โคลนที่ 1-4 ดังแสดงได้จากรูปที่ 7



รูปที่ 7 การหาปริมาณของแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจาก stable ทั้ง 17 โคลน พบว่าโคลนที่ 1-4 สามารถผลิตแอนติบอดีได้ในปริมาณมากที่สุด

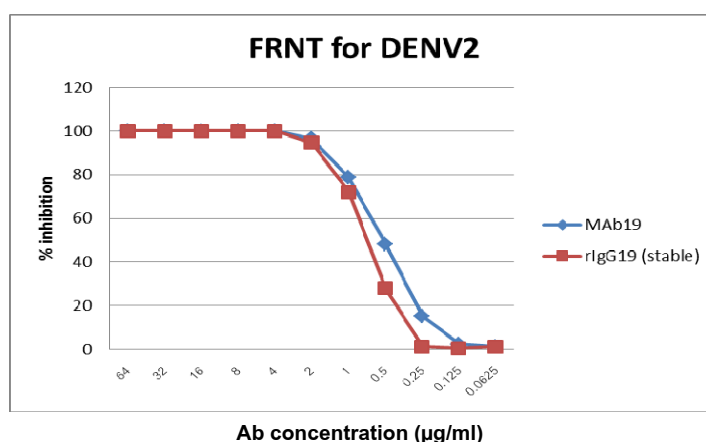
5.5.2.3 การศึกษา stability ของ stable clone ที่ผ่านการคัดเลือก

Stable clone ที่ 1-4 ที่ผลิต IgG ได้ในปริมาณมากที่สุดได้นำมาเลี้ยงเป็นจำนวน 20 passages เพื่อศึกษาความเสถียรในการผลิต IgG โดยเลี้ยงในอาหารที่ไม่มียาปฏิชีวนะ แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละ passage เพื่อนำไปวัดความเข้มข้นของ IgG ที่ผลิต

ขึ้นด้วยวิธี ELISA พบว่ามีจำนวน 2 โคลนที่สามารถผลิต IgG ได้อย่างสม่ำเสมอจนถึง passage ที่ 20 จึงเพิ่มปริมาณ stable cell ทั้ง 2 โคลนเพื่อเก็บเป็น stock ไว้ใช้ต่อไป

5.5.2.4 การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้เลือดออกเดงกีของ IgG ที่ได้จาก stable cell ด้วยวิธี Focus Reduction Neutralization Test

Stable cell โคลนที่ 4 ได้นำมาเพิ่มปริมาณโดยการ passage เซลล์ไปที่ 10 cm dish จนได้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี IgG อยู่ในปริมาตร 50 ml แล้วนำไปให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ protein A และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ให้อยู่ในสารละลาย PBS เพื่อนำมาทำปฏิกิริยา FRNT พบว่า IgG ที่สร้างขึ้นจาก stable cell สามารถยับยั้งเชื้อเดงกีไวรัสได้เหมือน IgG ที่สร้างขึ้นจากเซลล์ไฮบริโดมาดังแสดงได้จากรูปที่ 8



รูปที่ 8 การทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อไข้เลือดออกซีโรไทป์ 2 ของแอนติบอดีที่ได้จาก stable cell เปรียบเทียบกับแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ไฮบริโดมา

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิจัยที่ผ่านมาของทีมผู้วิจัย เราสามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้เป็นผลสำเร็จด้วยวิธีไฮบริโดมา ซึ่งสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ โดยแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเหล่านี้เป็นแอนติบอดีมนุษย์ที่สร้างขึ้นจากการรวมกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ และเซลล์ SPYMEG ที่เป็นเซลล์ myeloma ที่เกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดของคนและเซลล์ myeloma ของหนู จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้จากการสร้างด้วยเซลล์ SPYMEG สามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ได้ (Kubota-Koketsu et al., 2009; Setthapramote et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตาม ในการพัฒนาสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้เพื่อใช้ในการรักษาในอนาคต จำเป็นต้องสร้างสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีเฉพาะส่วนของแอนติบอดีของมนุษย์ นอกจากนี้ในการผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีไฮบริโดมามีความยากลำบากในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ การเก็บเซลล์ และความไม่เสถียรของโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวเนื่องจากมีราคาแพง และต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญโดยเฉพาะ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึง

ต้องการผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีส่วนประกอบเป็นลำดับกรดอะมิโนของมนุษย์ เพียงอย่างเดียวโดยใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาในการแยกส่วนของ variable fragment ของ มนุษย์ออกจากเซลล์ไฮบริโดมา เพื่อนำมาตัดต่อเข้าไปในพลาสมิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian expression plasmid) ที่มีส่วนของ constant region ของมนุษย์ตัดต่อก่อนแล้ว ทำให้ได้เป็นชิ้นส่วนของแอนติบอดีทั้งโมเลกุลที่เป็นของมนุษย์โดยสมบูรณ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ อย่างมากในการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม

โดยการผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธีนี้เริ่มจากการนำเซลล์ไฮบริโดมาที่เลี้ยง และผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตสารโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ในที่นี้มีทั้งหมด 19 โคลนที่เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สามารถผลิตสารโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ยับยั้งเชื้อไวรัสเด็งกีได้ทั้ง 4 ซีโรไทป์ ซึ่งได้มาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนไข้ ทั้งหมด 3 คน มาทำการสกัด RNA และสังเคราะห์เป็น cDNA ก่อนนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการ เพิ่มปริมาณแอนติบอดียีนของมนุษย์ในส่วน variable heavy และ light chain (VH และ VL) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ เมื่อได้เป็นชิ้นส่วน VH และ VL แล้วจึงนำไปตัดต่อเข้าไปในพ ลาสมิด pGEMT-easy เพื่อนำไปหาลำดับเบส และการวิเคราะห์ต่อไป สำหรับการสร้างรีคอม บิแนนท์ IgG นั้น เราใช้ VH และ VL ที่ได้ตัดต่อกอยู่ในพลาสมิด pGEMT เป็นสารตั้งต้นในการ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL เพื่อใช้ในการตัดต่อเข้า mammalian expression plasmid โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่ให้มีจุดจดจำสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยแยกกันระหว่างพ ลาสมิด heavy chain และพลาสมิด light chain โดยการทำให้ co-transfection เข้าในเซลล์ HEK293T เพื่อผลิตเป็นโมเลกุลของแอนติบอดีที่ถูกหลั่งออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสนั้น เราใช้ฐานข้อมูล IMGT เป็นตัววิเคราะห์ผล (Giudicelli et al., 2006) โดยสามารถวิเคราะห์ถึงตำแหน่งของ FRW และ CDR รวมถึงการนำ ลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับแอนติบอดีของ germline ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล เพื่อ ศึกษาถึงที่มาของแอนติบอดีแต่ละตัว ศึกษาถึงกลไกของการเกิด affinity maturation เช่นการ จับคู่กันระหว่าง VH และ VL ของโมโนโคลนแต่ละตัว การแทรกและการลดกรดอะมิโนในส่วน ของ CDR3 ซึ่งเป็นส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุด รวมทั้งการเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิ โนบางตำแหน่งที่ต่างไปจากลำดับเดิมของ germline ซึ่งพบว่าจากทั้งหมด 19 โคลน ทุกโคลนมี ลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนของโมโนโคลนอลแอนติบอดี เหล่านี้ได้รับการจดทะเบียนลงในฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ)

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ฐานข้อมูล IMGT ดังที่กล่าวมา เพื่อ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ germline พบว่า จากจำนวนทั้งหมด 19 โคลนที่ทำการ วิเคราะห์โดยใช้ชนิดของ germline ในการจัดกลุ่ม พบว่ามี germline ของ heavy chain ทั้งหมด 10 แบบ และ germline ของ light chain ทั้งหมด 11 แบบ ซึ่งสำหรับ heavy chain ชนิดของ germline ที่มีจำนวนมากที่สุดมีอยู่ 2 ชนิด คือ IGHV1-69 และ IGHV3-23 เป็นจำนวนแบบละ 5 โคลน ส่วนชนิดของ germline light chain ที่มีจำนวนมากที่สุดคือ IGLV7-43 ซึ่งพบว่ามีสำหรับ germline heavy chain นั้น germline IGHV1-69 เป็น germline ชนิดเดียวกับที่เคยมีรายงานมา

ก่อนว่าเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสส่วนใหญ่ เช่น แอนติบอดีต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ (Chen et al., 2012b; Prabakaran et al., 2012) เชื้อไวรัส HIV, SAR CoV, ไวรัส Hendra และ ไวรัส Nipah (Prabakaran et al., 2012)

จากการศึกษาของ Prakaran ในปี 2012 พบว่าเมื่อใช้ B cell ที่สร้าง IgM มาทำการสร้างเป็นฟาจแอนติบอดีไลบรารี เพื่อคัดเลือกรับกับไวรัสหลายชนิด พบว่า IGHV1-69 เป็นชนิดของ germline ที่มีจำนวนมากที่สุดที่คัดเลือกได้จากกลุ่มของแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิด ซึ่งผลการทดลองที่ความคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Chen et al. ในปี 2012 ซึ่งได้ทำการสร้างฟาจแอนติบอดีไลบรารีจากคนที่ติดเชื้อ HIV จำนวน 2 กลุ่ม เลือดจากคนที่ติดเชื้อมาเป็นเวลา 40 วัน และ 8 เดือน พบว่าแอนติบอดีที่คัดเลือกได้เป็นจำนวนมากที่สุดก็จัดอยู่ในกลุ่มของ germline IGHV1-69 เช่นกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ อาจสมมุติฐานได้ว่า เนื่องจากโมโนโคลนทั้ง 19 โคลนนี้ได้จากเซลล์ PBMC ของผู้ป่วยในระยะเฉียบพลัน จากการติดเชื้อครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นไปได้ว่า หลังจากการติดเชื้อครั้งแรกนั้น germline ของ heavy chain ชนิด IGHV1-69 จะมีการสร้างขึ้นมากในปริมาณมากที่สุด หลังจากนั้นจึงถูกเก็บอยู่ในรูปแบบของ memory B cells ของร่างกายเป็นระยะเวลานาน เมื่อเกิดการติดเชื้อครั้งที่ 2 จึงมีการกระตุ้นให้ B cell ผลิตแอนติบอดีขึ้น จึงเป็นไปได้ว่า PBMC ที่ได้มาซึ่งอยู่ในระยะเฉียบพลัน จะสร้างจาก memory B cell ที่ไหลเวียนอยู่ในระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นเป็นชนิด IGHV1-69 ที่อาจมีปริมาณมากที่สุดในขณะนั้น

นอกจากนี้เรายังพบความหลากหลายที่ได้จากการเพิ่มหรือลดจำนวนกรดอะมิโนในส่วนของ CDR3 ของ heavy chain ซึ่งพบว่าความหลากหลายของส่วน heavy chain CDR3 มีความหลากหลายตั้งแต่ 10 – 21 กรดอะมิโนสำหรับ heavy chain เมื่อเทียบกับ 9-11 กรดอะมิโนสำหรับ light chain ซึ่งความหลากหลายของ heavy chain CDR3 นี้ยังพบในแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส HIV ด้วยคือ มีความหลากหลายตั้งแต่ 4-27 กรดอะมิโน

ต่อมาผู้วิจัยได้ศึกษาถึงความหลากหลายที่เกิดขึ้นจากกลไกที่เรียกว่า Somatic hypermutation ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อร่างกายถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน และเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตำแหน่งเพื่อให้จับกับแอนติเจนเป้าหมายได้ดีขึ้น ซึ่งพบว่าเมื่อนำแอนติบอดีที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ germline เดียวกันมาเปรียบเทียบกัน พบว่าโคลนที่ต่างกันสามารถมีความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปตั้งแต่ 5.1-21.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ VH และ 3.1-12.8 สำหรับ VL แต่ที่น่าสนใจ เราพบว่าบางโมโนโคลนที่มีความคล้ายคลึงกับ germline มาก สามารถจับและยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีได้ในระดับดี ซึ่งสามารถพบได้ในแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นด้วย (Chen et al., 2012a)

หลังจากที่เราได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนเรียบร้อยแล้ว ชิ้นส่วนของ VH และ VL ที่แยกได้นี้ ได้นำมาใช้ในการผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์แอนติบอดี (rIgG) ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian cells) โดยผู้วิจัยได้เลือกมาทั้งหมด 3 โคลนในการนำมาผลิตเป็น rIgG คือ 1B3B9, 1A10H7, 1G7C2 ในเซลล์ HEK293T พบว่าความสามารถในการจับ และการยับยั้งไวรัสเดงกีของ rIgG ที่ผลิตขึ้นนั้นยังคงเหมือนกับ IgG ที่ผลิตจากเซลล์

ไฮบริโดมา ผู้วิจัยจึงได้เลือก rlgG จำนวน 1 โคลน (1B3B9) มาใช้ในการสร้างเป็น stable cell ในเซลล์ CHO ที่สามารถผลิต rlgG ได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่า stable cell ที่ได้สามารถผลิต rlgG ได้ในปริมาณ 500 ng/ml ในสภาวะที่เป็นเป็นเซลล์เกาะ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาต่อได้โดยการปรับเปลี่ยน stable cell นี้ให้อยู่ในสภาวะเซลล์ลอย โดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่ม ซึ่งโดยวิธีนี้สามารถได้ปริมาณของแอนติบอดีต่อจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น เพื่อเตรียมที่จะนำ stable cell นี้เพื่อผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

References

- Chen W, Prabakaran P, Zhu Z, Feng Y, Streaker ED, Dimitrov DS. Characterization of human IgG repertoires in an acute HIV-1 infection. *Exp Mol Pathol.* 93 (2012a) 399-407.
- Chen W, Streaker ED, Russ DE, Feng Y, Prabakaran P, Dimitrov DS. Characterization of germline antibody libraries from human umbilical cord blood and selection of monoclonal antibodies to viral envelope glycoproteins: implications for mechanisms of immune evasion and design of vaccine immunogens. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 (2012b) 1164-9.
- Giudicelli V, Duroux P, Ginestoux C, Folch G, Jabado-Michalud J, Chaume D, et al. IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) D781-4.
- Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93 (2012) 917-930.
- Kubota-Koketsu R, Mizuta H, Oshita M, Ideno S, Yunoki M, Kuhara M, Yamamoto N, Okuno Y, Ikuta K. Broad neutralizing human monoclonal antibodies against influenza virus from vaccinated healthy donors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Sep 11;387(1):180-5.
- Prabakaran P, Zhu Z, Chen W, Gong R, Feng Y, Streaker E, et al. Origin, diversity, and maturation of human antiviral antibodies analysed by high-throughput sequencing. *Frontier Microbiol.* 3 (2012) 1-7.
- Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, Nishimura M, Asai A, Omokoko MD, Pipattanaboon C, Pitaksajakul P, Limkittikul K, Subchareon A, Chaichana P, Okabayashi T, Hirai I, Leaungwutiwong P, Misaki R, Fujiyama K, Ono K, Okuno Y, Ramasoota P, Ikuta K. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res.* 98 (2013) 423-31.

Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajakul P, Pipattanaboon P, Sasayama M, Leuangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmittraphap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K. Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue-virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. Biochem Biophys Res Commun. 423 (2012) 867-72.

Schmidt AC. Response to dengue fever- The good, the bad, and the ugly? *N Engl J Med.* 363 (2010) 484-487.

7. ภาคผนวก

7.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น ผู้วิจัยได้ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 20 เส้น ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH และ VL ทั้งหมด 26 คู่ ซึ่งทั้ง 26 คู่นี้เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน VH จำนวน 12 คู่ จากไพรเมอร์ forward จำนวน 6 เส้น และไพรเมอร์ reverse จำนวน 2 เส้น ส่วน V kappa จะใช้ทั้งหมด 10 คู่ จากไพรเมอร์ forward จำนวน 5 เส้น และไพรเมอร์ reverse จำนวน 2 เส้น และ V lambda จำนวน 4 คู่ โดยเป็นจากไพรเมอร์ forward จำนวน 4 เส้น และไพรเมอร์ reverse จำนวน 1 เส้น ทำให้ได้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั้ง 26 ปฏิกิริยา โดยกำหนดให้เป็นปฏิกิริยาที่ 1-26 ตามลำดับ ซึ่งหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว ผลผลิตที่ได้เมื่อนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าจะเลือกปฏิกิริยาที่ให้ผลผลิตที่จำเพาะที่มีขนาด 600-900 bps ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่นำไปใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pGEMT-easy แสดงได้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชั้นส่วนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ VH และ VL ด้วยวิธีพีซีอาร์

Clone No.	Code	VH (fragments amplified)	VL (fragments amplifies)	Total	Isotype
8	D23-1A10H7	IGVH/1,7	IGVK /18,19	4	IgG
25	D23-1C2D2	IGVH/3,9,12,13,14	IGVK /18,19,22	8	IgG
57	D23-1H5A11	IGVH/3,5,9,11	IGVL /23,24,25,26	8	IgG
87	D23-3A10G12	IGVH/3,5,9,11	IGVL /23,24,25,26	8	IgG
165	D23-5E6B1	IGVH/1,5,6,7,11,12	IGVL /23,25	8	IgG
183	D23-5G8E3	IGVH/5,11	IGVL /23,24,25,26	6	IgG
216	D23-1C1G4	IGVH/1,7			IgG
310	D30-1E7B8	IGVH/1,7	IGVK /13,14,15,18,19,20	8	IgG
358	D30-3A1E2	IGVH/5,11	IGVL /23,24,25,26	6	IgG
325	D30-3B10E7	-	-		IgA
491	D32-2D1G5	IGVH/1,7,8	IGVL /23,24,25,26	7	IgG
19	D23-1B3B9	IGVH/1,7	IGVL /23,24,25	5	IgG
54	D23-1G7C2	IGVH/1,7	IGVL /24,25	4	IgG
106	D23-4A6F9	IGVH/5,11	IGVK /13,14,18,19	6	IgG
118	D23-4D10E9	IGVH/5,11	IGVK /13,14,18,19	6	IgG
131	D23-4F5E1	IGVH/5,11	IGVK /16,21	4	IgG
135	D23-4H12C8	IGVH/1,7	IGVL /23,25	4	IgG
178	D23-5G2D2	IGVH/1,5,7,11	IGVK /13,14,18,19	8	IgG
411	D30-3B6C7	IGVH/3,9	IGVL /23,24,25,26	6	IgG
533	D32-2H8G1	IGVH/5,11	IGVK/ 13,14,18,19	6	IgG

เมื่อนำชิ้นส่วนดังกล่าวใส่เข้าไปในพลาสมิด pGEMT-easy เพื่อการหาลำดับเบส ลำดับเบสที่ได้ ได้นำมาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกเฉพาะชิ้นส่วนที่เป็นแอนติบอดีมนุษย์เท่านั้น จากนั้นจึงนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเซลล์ SPYMEG ชิ้นส่วนที่เป็นแอนติบอดีของมนุษย์ และไม่ใช้ของเซลล์ SPYMEG เท่านั้นที่นำไปใช้ในขั้นต่อไป

7.2 การกำหนดตำแหน่งของส่วน framework และส่วน complementary determining region โดยใช้ระบบการกำหนดตำแหน่งของ kabat

Code	Clone name	FRW1	CDR1	FRW2	CDR2	FRW3	CDR3	FRW4
8	23-1A10H7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSKAS GGTFR	NYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GVIPTLHTTNYVERFQG	RITITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAR	SRYYYSDASNY GMDV	WGQGTTVTVSS
25	23-1C2D2	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVS GGGIS	SYAWS	WIRQTPGKRLEWIG	NFHYSGSTNDNPSLKS	RLTMSADTSKNQLSLRLRSVTAADNAVYYCAR	VAKLFGSATYGM DV	WGQGTTVIVSS
57	23-1H5A11	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAAS GFTFS	TYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	GIGDSGHSIYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAT	GSQWPGDY	WGQGTTLTVSS
87	23-3A10G2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFS	NYAMT	WVRQAPRGKLEWVS	AIGGSGHSIYYGDSVKG	RFTISRDNKNNTLYLQMNTLRAEDNAVYYCAA	GSQWPGDY	WGQGTVVTVSS
165	23-5E6B1	QVHLVQSGSEVKKPGASVKVSCQAS GYPFT	RYIMN	WVRQAPGQGLEWMG	WIDTKTGNPTYAQFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQINRLKAEDNAVYFCTT	LSGYSADWPEDY	WGQGTTLTVSS
183	23-5G8E3	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAAS GFAFS	DYAMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISHVGTSTYQAESYYA	NSVKGRFSISRDTSKNTIYLQMNSLRPEDTAV	YYCARRGDYSSS AENFQH	WGQGTLVAVSS
216	30-1E7B8	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS GYTFT	SYGVS	WVRQAPGQGLEWMG	WISAYNGDTNFAQKFQG	RLTVTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAMYYCAR	GPDYESSDSPWF DY	WGQGTTLTVSS
310	30-3A1E2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCRAS GGALA	NYAIS	WVRQAPGQGLEWMG	AIIPMSRTTDYAQKFRG	RVTISADESRSTAYMELNSLRSDDTAVYYCAR	HRAVAGGDSHD ENNWFPG	WGRGTLTVSS
358	30-3B10E7	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFS	DYYMI	WIRRAQGKGLEWLS	YISNSGDMTYHADSVKG	RFTLSRDNTKSLSLQMHNLRANDNAVYYCAR	GMTGFTTSNTES FDL	WGQGTMTVSS
491	32-2D1G5	QVQLMQSGPEVKKPGSSMKVSKAS GGTLR	SYSIS	WVRQAPGQGLEWMG	GTIPFFGRASYAQKFQG	RVTITADEATSTAFMELSSLSEDNAVYFCAR	AGPIAATGVQYE MDV	WGQGTTVTVSS
19	23-1B3B9	QVHLVQSESEVKKPGASVKVSCQAS GYPFT	RYIMN	WVRQAPGQGLEWMG	WIDTKTGNPTYAQFT	GRFVFSLDTSVSTAYLQINNLRKAEDNAVYFCT	TLSGYSADWPED Y	WGQGTTLTVSS
54	23-1G7C2	QVQLVQSGAEVKKPASSVKVSKAS GGTFG	TYAIS	WVRQAPGKGLEWMG	GIIPLYKQSTYAQKFRG	RVTITADESTNTAYMELNGLSLEDNAVYFCAT	LIAVAGSEGAGS FDI	WGQGTMTVSS
106	23-4A6F9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFS	SNAMS	WVRQAPGKGLEWVS	GVSNSGGDTYYADSVKGR	FAISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAN	TLWTVGSKGGFD Y	WGQGTTLTVSS
118	23-4D10E9	EVQLLESGGGLAQPGGSLRLSCAAS GFSFS	TQAMA	WVRQAPGKGLEWVS	AIGGRDEGSYYAESLKG	RLTISRDNKNTVYLQMDRLRADDTAIFYCTK	IDWSIRGTFDN	WGRGTLTVSS
131	23-4F5E1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFS	NSAMS	WVRQAQGKGLEWVS	AFSGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDNAVYYCAR	VTGGWSDY	WGQGTTLTVSS
135	23-4H12C8	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKAS GYTFT	TYPMN	WVRQAPGQGLEWMG	WIDTNTGNPTYAQFTG	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLRKAEDNAVYYCTT	LSGYSADWPEDY	WGQGTTLTVSS
178	23-5G2D2	QVQLVQSGAEVEKPGSSVKVSKAS GDTFS	KYAIN	WVRQAPQGGLDWMG	GIIPILTTTTYAQRFG	RVTITADKSTNTAYMELRSLRFDDTAVYYCAR	STYYDGSDLT GMDV	WGQGTTVTVSS
411	30-3B6C7	QLQLQEAGPRLVKPSETLSLCTVS GGSMS	GSSFY	WGWIRQAPGRGLEW	IGSIDYRGNTYYNPSLKS	RVTISVDTSRNQFSLNLRSVTAADNAVYFCAS	PGGLISDEAMAG YFDY	WGQGTTLTVSS
533	32-2H8G1	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCVAS QFTFS	SSGMH	WVRQAPGKGLEWVG	VVSFDGSKTYADSAKG	RFTISRDNKNTLYLQMTSLRVDDTAVYYCAT	GGGRFSGSGNYY YYGMDV	WGQGTTVSVSS

ตารางที่ 5 การกำหนดตำแหน่งของ FRW และ CDR ของ heavy chain โดยระบบของ Kabat

Code	Clone name	FRW1	CDR1	FRW2	CDR2	FRW3	CDR3	FRW4
8	23-1A10H7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGSNAVA	WYQQKAGKAPKLLLY	GASRLER	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSLQPEDFATYYC	QQYSSIPYT	FGGGTKLEIK
25	23-1C2D2	DIQMTQSPSSLAASVGDRVSFTC	QASQDIKNHLN	WYQQKPGKAPKLLIY	DASNLGT	GVPSRFSGSGSGTHFTFTISSLQPEDLATYYC	HQYENLPIT	FGGGTKVEIK
57	23-1H5A11	QSVMTQRPSASGTPGQRTVISC	SGSSSNIGSNFVY	WYQQLPGTAPKLLIY	SDNQRP	GVPDFRFSGSGSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	ATWDDSLSGPV	FGGGTKLTVLS Q
87	23-3A10G2	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC	SGSSSNIANNNYVY	WYQQLPGTAPKLLIY	STNQRP	GVPARFSGSGSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	AAWDDSLSAPL	FGGGTKLTVLG
165	23-5E6B1	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	ASSTGAVTSGNYAN	WFQHPGQAPRGLIY	RTDKKHS	WTHARFSGSLLGGKAALTLGARSEDEADYYC	LLYRDGGVV	FGGGTKLTVLS
183	23-5G8E3	QSVLTQPPSVSGAPGQRVISIC	TGNSSNIGAGYDVH	WYQQLPGSVPRLLIF	SNTNRPS	GVPARFSGSGSGASASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLFACV	FGGGTKVTVLG
216	30-1E7B8	QSVVTQPPSASGTPGQRTVISC	SGSSSNIGNNNYVY	WYQQLPGTAPKLLIY	SNNQRP	GVPRFSGSGSGTSASLAISGLRSDDEADYYC	ATWDDSLSRPV	FGGGTKLTVLG
310	30-3A1E2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYL	WYQHKGQAPRLLIY	DASNRAT	GIPARFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFAVYYC	QQRDNPYT	FGGGTKLEIK
358	30-3B10E7	QSVLTQPPSVSGAPGQRTVISC	TGRSSNIGAGHDVH	WYQLLPGAAPKLLIY	GNNIRPS	GVPERFSGSGSGTTASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDGSLSGLV	FGGGTKLTVLG
491	32-2D1G5	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC	TGSSRDFGDDYHVS	WYQQEPGKAPKLLIY	DVTKRPS	GVPDFRFSASKSVNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSYIIV	FGGGTKVSVLG
19	23-1B3B9	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	ASSTGAVTSGHYAN	WFQHPGQAPRGLIY	RTDKKHS	WTHARFSGSLLGGKAALTLGARPEDADYYC	LLYRDGGVV	FGGGTKLTVLS
54	23-1G7C2	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSGDVGGDSLVS	WYQQHPGKAPKLLIY	EDHKRPS	GVSSRFFGSGSGNAASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAISSVRVL	FGGGTKVTVLG
106	23-4A6F9	VVQLTQSPSSVSASVGDRVITTC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	ATSSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQANSFPWT	FGGGTKVEIK
118	23-4D10E9	DVQMTQSPSSVSASVGDKVTMTTC	RASQGVGTLLA	WYQQKPGMAPTLLIY	GASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYFC	QQANSFPWT	FGGGTKVEIK
131	23-4F5E1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	RSSQTILYSSNNNNY LA	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRES	GVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYC	QQYYSSPPT	FGGGTKLEIK
135	23-4H12C8	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	ASSTGAVTSGYYPN	WFQKPGQAPRALIY	STSSKHS	WTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEADYYC	LLYYRGGVV	FGGGTKLTVLS Q
178	23-5G2D2	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGSNSLA	WYQHKGKAPKLLLY	AASRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDSATYYC	QQYSSIPYT	FGGGTKLDIK
411	30-3B6C7	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC	ASSTGAVTSDYFPN	WFQKPGQAPRALIY	HTGKKHS	WTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYC	LLYHVD AHLV	FGGGTKLTVLS
533	32-2H8G1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQNI AKYLN	WYQHKGKPPKFLIH	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDCATYYC	LQTYTAPLT	FGGGTKVEIK

ตารางที่ 6 การกำหนดตำแหน่งของ FRW และ CDR ของ light chain โดยระบบของ Kabat

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

Pitaksajjakul P, Benjathummarak S, Pipattanaboon C, Wongwit W, Okabayashi T,

Kuhara M, Misaki R, Fujiyama K, Ramasoota P. Antibody germline characterization of cross-neutralizing human IgGs against 4 serotypes of dengue virus. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Apr 4; 446(2): 475-80.

Pitaksajjakul P, Jai-krom P, Pipattanaboon C, Benjathummarak S, Ramasoota P.

Stable chinese hamster ovary cell lines producing human monoclonal antibody with cross-neutralizing to 4 serotypes of dengue virus. Protein Expression and Purification (submitted Manuscript)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

วิธีการแยกชิ้นส่วน VH และ VL รวมถึงการสร้าง stable cell ในเซลล์ CHO ได้ถ่ายทอดให้นักศึกษา เพื่อใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาโท โดยการสร้าง stable cell สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่เฉพาะต่อเชื้ออื่น นอกจากนั้น การใช้ IMGT database ในการวิเคราะห์ข้อมูลของแอนติบอดียีนได้นำไปสอนในหัวข้อชีวสารสนเทศให้นักศึกษาในระดับปริญญาโท และปริญญาเอก

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

Pitaksajjakul P., Benjathummarak S., Setthapramote C., Misaki R., Fujiyama K., Sasaki T, Kazuyoshi Ikuta, Pongrama Ramasoota. Recombinant IgG and genetic basis of cross-neutralizing human monoclonal antibody against 4 serotypes of Dengue virus. Antibody Engineering and Therapeutics, 2013, 8-12 December, 2013. Huntington Beach Resort, Huntington, California, USA.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Antibody germline characterization of cross-neutralizing human IgGs against 4 serotypes of dengue virus



Pannamthip Pitaksajjakul^{a,b}, Surachet Benjathummarak^a, Chonlatip Pipattanaboon^a, Waranya Wongwit^b, Tamaki Okabayashi^{c,e}, Motoki Kuhara^e, Ryo Misaki^d, Kazuhito Fujiyama^d, Pongrama Ramasoota^{a,b,*}

^a Center of Excellence for Antibody Research (CEAR), Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^b Department of Social and Environmental Medicine, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^c Mahidol Osaka Center for Infectious Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^d International Center for Biotechnology, Osaka University, Japan

^e Medical & Biological Laboratories Corporation, Ltd., Ina, Nagano, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2014

Available online 14 March 2014

Keywords:

Recombinant IgG
Neutralization
Dengue virus
Cross-neutralizing
Germline

ABSTRACT

Dengue virus (DENV), a re-emerging virus, constitutes the largest vector-borne disease virus, with 50–100 million cases reported every year. Although DENV infection induces lifelong immunity against viruses of the same serotypes, the subsequent infection with the heterologous serotypes can cause more severe form of the disease, such as Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) or Dengue Shock Syndrome (DSS). However, there is neither approved vaccine nor specific drugs available to treat this disease. In this study, previously developed 19 human monoclonal antibodies (HuMAbs) showing strong to moderate cross neutralizing activity were selected. Most of them (13/19) were targeted to domain II of envelop glycoprotein. To understand and clarify the recognition properties, the maturation mechanisms comprising Variable/Diversity/Joining (VDJ) recombination, Variable Heavy (VH)/Variable Light (VL) chain pairing, variability at junctional site, and somatic hypermutation (SHM) of those antibodies were studied and compared with their predecessor germline sequences. IMGT/V-QUEST database was applied to analyze the isolated VH and VL sequences. To confirm the correction of isolated VH/VL, 3 HuMAbs (1A10H7, 1B3B9, 1G7C2) was transiently expressed in HEK293T cell. All three clones of the expressed recombinant IgG (rIgG) showed the same binding and neutralizing activity as same as those from hybridomas. The data obtained in this study will elucidate the properties of those HuMAbs for further genetic modification, and its binding epitopes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is transmitted to humans by infected *Aedes* mosquitoes in tropical and subtropical areas. It is a member of the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. It is the enveloped icosahedral, positive-stranded RNA viruses. The approximately 11-kb genome is translated as a single polyprotein, which is cleaved into three structural proteins (capsid [C], premembrane/membrane [prM/M], and envelop [E]), and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) by host and viral protease [1]. They comprise four distinct serotypes, DENV1 through DENV4. This virus is the major cause of morbidity in trop-

ical and subtropical regions, and have been estimated that there are 50–100 millions of infected cases annually around the world. However, nowadays, there is neither proven vaccine nor specific anti-viral drug to all serotypes available. Infection with DENV can cause a spectrum of clinical symptoms ranging from flu-like illness, dengue fever (DF), to a severe fatal disease known as DHF or DSS. These fatal forms are often attributed to re-infection by heterologous serotypes [2]. Primary infection with any of the four serotypes can produce lifelong immunity to that serotype, but only temporary immunity to the others; moreover, the sequential infections in the presence of heterologous dengue antibodies often lead to a more severe secondary infection of DHF/DSS [3]. These is attributed to antibody-dependent enhancement (ADE) when non-neutralizing antibodies form a complex with the virus and infect phagocytes via Fc receptors, causing more viral load and enhance infection involving DHF/DSS [3].

* Corresponding author at: CEAR, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, 420/6 Ratchawithi Road, Ratchadhevi, Bangkok 10400, Thailand.

E-mail address: pongrama.ram@mahidol.ac.th (P. Ramasoota).

Passive antibody therapies, based on targeted-specific monoclonal antibodies (MAb) have been widely studied in several infectious diseases including viral diseases, such as cytomegalovirus (CMV), respiratory syncytial virus (RSV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), rabies, vaccinia, varicella-zoster virus (VZV), and West Nile virus (WNV), which some of them have been approved to use both in prophylaxis or treatment in the US market [4]. However, therapeutic antibodies to treat dengue virus are still limited.

Several studies on both mouse and human antibodies to DENV have implied that antibodies targeted to envelope protein of DENV (ED) are the principal determinants of virus neutralization [5]. For ED itself, it is composed of 3 domains (DI, DII, and DIII). DII is located at one end of the molecule covering the fusion peptide and responsible for host cell-viral fusion. At the other end is located DIII which is involved in host cell binding [6]. Both DI/II and DIII have been studied to be targeted by several mouse and human antibodies.

Even though mouse MAbs can normally show strong neutralizing activity with serotype specific to dengue virus that targeted to EDIII [7–8], human MAbs (HuMAbs) usually show more diversity of antibody response; serotype- or cross reactive with weak to strong neutralizing activity with several target epitope (DI/II or DIII) of E protein [9–10]. Similar with our 20 anti-DENV HuMAbs (19 IgGs and 1 IgA) that have been previously generated, using hybridoma technique [11], all of them showed strong to moderate cross-neutralizing activity to 4 serotypes of dengue virus tested *in vitro*. They were targeted to envelop protein of DENV. Moreover, thirteen of them were further characterized and found to target to domain II of E protein using truncated E protein [12].

Other than epitope mapping studies for vaccine design, the genetic analysis of variable region sequences of anti-viral Abs have recently shown its potential for vaccine development. This germline characterization has recently been widely studied in several anti-viral MAb including HIV-1 virus [13–14], Influenza virus [15], and SARS coronavirus, Hendra virus, and Nipah virus [16] using phage display and high-throughput sequencing. One study of anti-influenza antibodies have shown that mutation at only 7 amino acids in the Heavy chain Complementary Determining Region 2 (HCDR2) and Framework Region 3 (FR3) are evolved for the full activity of neutralization, which can be applied for the rational design of epitope-specific vaccine inducing broadly-neutralizing antibody [15]. For anti-DENV MAbs characterization, there is one study characterizing mouse MAb 4E11 that targeted to EDIII which has been raised against serotype 1 dengue virus, but can neutralize all 4 serotypes with different efficacy. It was found that mutation at only some hotspot can greatly affect the binding activity of that MAb [17]. However, germline study of anti-DENV HuMAbs is still limited. For this reason, further characterization of genetic sequences of our 19 hybridoma IgGs – all targeted to E, mostly targeted to EDII and show strong to moderate neutralizing activity – is needed. These should be a good model of antibody's genetic study that will enlighten dengue vaccine development through the induction of cross-neutralizing activity.

2. Materials and methods

2.1. Hybridoma sample

Previously generated 19 hybridomas secreting HuMAb IgGs with cross-neutralizing activity were selected. These 19 neutralizing HuMAbs (NHuMAbs) were produced from 3 acute dengue patients of secondarily infection with dengue virus serotype 2.

2.2. Isolation of VH and VL from hybridoma cell

Ribonucleic acids (RNAs) were isolated from hybridoma cells using Trizol reagent (Invitrogen, USA). Complementary DNA

(cDNA) was synthesized from the isolated RNA, and then used as the template for amplification of Heavy chain (HC) and Light chain (LC) using 26 pairs of primer. Twelve reactions for HC, 10 reactions for LC kappa, and 4 reactions for LC lambda were performed (Table 1). Specific products of both HC and LC were purified and cloned to pGemT easy vector (Promega, USA) for sequencing.

2.3. Antibody gene analysis with its germline

The isolated HC/LC antibody gene covering the entire antibody variable domain with 3 CDRs and 4 FRs characterized by IMGT unique numbering system were entered to the immunogenetic IMGT/V-QUEST database [18,19]. The localization of CDR and FR, including % variation and mutation from its original germline sequence were analyzed.

2.4. Subcloning of VH and VL to mammalian expression vector

The VH and VL fragments were amplified from pGemT-easy vector with primers containing extended restriction site. The amplified VH and VL as well as the human antibody constant region-containing pQCX plasmid were then digested with *NotI* and *XhoI* restriction enzymes. The VH fragments were cloned to pQCXIP-CH containing HC constant region. Similarly, VL fragments were cloned to either pQCXIH-CKappa or CLambda, containing constant kappa or lambda LC, respectively. The recombinant DNA was transformed to DH5 α competent cell. Plasmids were amplified from positive clones using Purelink plasmid midiprep kit (Invitrogen, USA.)

2.5. Transient expression of recombinant IgG (rIgG) in mammalian cells

Human embryonated kidney (HEK) 293T cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) without sodium pyruvate (Gibco, USA). The cells were seeded to 10 cm cell culture dish at 5.5×10^5 cell/ml, and incubated at 37 °C under 5% CO₂ overnight. On the next day, twelve micrograms

Table 1

Primers used to amplify Variable Heavy chain, and Variable Light chain (kappa and lambda).

Name	Sequence	N
<i>Variable heavy chain</i>		
hIGHV1/7-	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTC	24
hIGHV2	ATGGACATACCTTTGTCACGCTCCT	26
hIGHV4	ATGAAACACCTGTGGTCTCTCCTCT	26
hIGHV6	ATGTCTGTCTCCTCTCATCTCTCT	26
hIGHV3	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTT	24
hIGHV5	ATGGGGTCAACCGCCATCCTCGC	23
37, hlgG1234(–) PCR Center	CTCCCCGGCTTTGTCTTGGCATT	25
17, hlgG1234(–) nPCR	CCTTGTTGTGCTGGGCTTGTGAT	24
<i>Variable kappa light chain</i>		
IGKV1–5'L	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG	24
IGKV2–5'L	ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTG	24
IGKV3–5'L	ATGGAARCCCCAGCGCAGCTTCTC	24
IGKV4–5'L	ATGGTGTGTCAGACCCAGGTCTTCAT	26
IGKV5–5'L	ATGGGGTCCCAGGTTCACCTCCTC	24
18, hlgK_PCR(–)	GTGACACTCTCTGGGAGTTACCC	24
11, Human specific 3' primer for nested PCR	GAGTTACCCGATTGGAGGCGTTAT	25
<i>Variable lambda light chain</i>		
IGLV_1/3/5/7–5'L	ATGGCCTGGWYYCCTCTCYTYCTS	24
IGLV_8–5'L	ATGGCCTGGATGATGCTTCTCCTCG	25
IGLV_2/9/10–5'L	ATGSCCTGGGCTCYKTSCTCCTS	24
IGLV_4–5'L	ATGGCCTGGRYCYMYTYWCCTM	24
19, hlgL_nPCR(–)	TGGCAGCTGTAGCTTCTGTGGGACT	25

of each pQC plasmid containing HC or LC were co-transfected to the cell using lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA.). Briefly, 60 μ l of lipofectamine 2000 was diluted in 1.5 ml of Opti-MEM I reduced serum (Gibco, USA), and then incubated at room temperature for 5 min. At the same time, 12 μ g each of pQCXIP-CH-VH, and pQCXIH-CL-Vkappa or -VLambda was diluted in Opti-MEM I reduced serum (Gibco, USA). Then, 1.5 ml of diluted lipofectamine was added to the tube containing diluted DNA. They were gently mixed and the complex was incubated at room temperature for 30–40 min. Then, 3 ml of lipofectamine-DNA complex was added to the cell, and incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 4–6 h. After incubation, the medium was replaced with fresh 10 ml of culture medium, and incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 3 days. The presence of IgG and binding activity were checked by immunofluorescence assay (IFA) using transfected culture medium.

The collected culture fluid from transfected cell was filtered before purification using Hitrap protein A affinity column (GE bioscience, Sweden). The concentration of purified IgGs was then measured using BCA protein assay kit (Pierce Thermo Scientific, USA).

2.6. Indirect immunofluorescence assay (IFA)

Vero cells monolayer in 96-well microplate were mock-infected or infected with DENV serotype 1–4 separately. After incubation for 2–3 days, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. The cells were stained with hybridoma HuMAbs or rIgG at 4 °C overnight using anti-flavivirus HuMAbs as positive control. The bound antibodies were reacted with an AlexaFluor 488-conjugated anti-human IgG (1:1000; Invitrogen), and observed under fluorescence microscope.

2.7. Neutralization test using Focus Reduction Neutralization Test (FRNT)

The neutralization test was performed using Vero cells. The focus number was firstly adjusted to obtain approximately 100–150 foci/well. Vero cells were seeded to 96 well plate at 2.0×10^4 cells/well. Twofold serial dilution of antibodies were prepared on 96 well round bottom plate, then added with the adjusted focus number of dengue virus serotype 1–4. The Ab-virus mixtures were

then incubated at 37 °C for 30 min. After that, 50 μ l of the mixtures were added to Vero cells, and incubated for 2 h with gently tapping every 30 min. One hundred μ l of overlaid medium (2X MEM, 2% CMC, 3% FBS) were then added to the well and incubated for 3 days for Dengue virus serotypes 1, 2, and 3, and 2 days for serotype 4. The assays were performed in triplicate. After 2 or 3 days incubation, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde, followed by Triton X-100. The focus number was immunostained by incubated with anti-DENV Mab, as for IF assay. The number of focus was counted and compared with that of no antibody control to calculate NT₅₀.

3. Results and discussions

In general, to generate mature B cell for antibody production, 4 main mechanisms including the rearrangement of V, D, and J segments, the pairing of different VH and VL germline, the addition or deletion at the junctional site, encoded for CDR3 loop are involved. More diversity is further increased once the B cells have been stimulated with target antigen, inducing SHM at some hotspot to increase the affinity toward the foreign antigen. These four genetic processes have built a high diversity of variable region of antibodies [20].

To study the genetic basis of our anti-DENV HuMAbs, the variable sequences of 19 IgGs isolated from acute dengue patients was studied. All of them were derived from blood sample of 3 patients of secondarily infected dengue virus serotype 2, within one week after the onset of fever [10]. HC and LC of all 19 IgGs were sequenced starting from human IgG leader peptide until constant region of IgG HC and LC. Only the variable regions were submitted to IMGT/V-QUEST to localize the FR and CDR. All sequences were productive IG rearranged sequences with no stop codon and in-frame junction, except 1 clone (23-5G8E3) have 5 aa insertion at CDR2. Variable region of heavy and light chain of 17 clones of them were submitted to database of DNA Data Bank of Japan (DDBJ) [12].

After comparing those sequences with germline database, 10 germline HCs and 11 germline LCs was used (Table 2). IGHV1–69 (5/19) and IGHV3–23 (5/19) are the major germline HC whereas IGLV7–43 is the major germline LC (Fig. 1A and B). As IGHV1–69 was the highest HC germline used in our anti-DENV HuMAbs, interestingly, the highest percentage of IGHV1–69 HC germline was also

Table 2
Analysis of anti-DENV HuMAbs including its germline sequences, and immunogenetic data.

HuMAbs	IGHV gene	IGKV/IGLV gene	No. of aa mutations /Identity(% variation)		HCDR3 aa sequence (length)
			VH	VL	
1A10H7	HV1–69*01F	KV1–NL1*01 F	12 /85(12.4)	9/85 (9.6)	ARSRYYYDSASNYGMDV (18)
1G7C2	HV1–69*01F	LV2–23*01 F	17/80(19.5)	11/85 (11.5)	ATLIAGVAGSEAGSFDI (17)
1E7B8	HV1–69*01F	KV3–11*01 F	17 /81(17.3)	4/90 (4.2)	ARHRAVAGGSDSDHDENNWFGP (21)
2D1G5	HV1–69*01F	LV2–11*01 F	14 /84(14.3)	11/86 (11.3)	ARAGPIAATGVQYEMDV (17)
1H5A11	HV3–23*01F	LV1–47*02 F	12 /84(12.5)	5/93 (5.1)	ATGSQWPGDY (10)
3A10G12	HV3–23*01F	LV1–47*02 F	10 /87(10.3)	5/93 (5.1)	AAGSQWPGDY (10)
4A6F9	HV3–23*01F	KV1–12*01 F	6 /91(6.2)	4/90 (4.2)	ANTLWTVGSKGGFDY (15)
4D10E9	HV3–23*01F	KV1–12*01 F	21 /76(21.6)	12/82 (12.8)	TKIDWSIRGTFDN (13)
4F5E1	HV3–23*01F	KV4–1*01 F	6 /92(6.1)	5/96 (5)	ARVTGGWSDY(10)
1B3B9	HV7–4*02F	LV7–43*01 F	14 /83(14.4)	13/83 (13.5)	TTLSGYSADWPEDY (14)
4H12C8	HV7–4*02F	LV7–43*01 F	5 /92(5.1)	3/93 (3.1)	TTLSGYSADWPEDY (14)
5E6B1	HV7–4*02F	LV7–43*01 F	13 /84(13.4)	13/83 (13.5)	TTLSGYSADWPEDY (14)
1C2D2	HV4–59*01F	KV1–33*01 F	13 /84(13.4)	10/84 (10.6)	ARVAKLFGSATYGMVDV (16)
5G8E3	HV3–30*04F	LV1–40*01 F	12 /86(12.2)	12/87 (12.1)	AVYYCARRGDYSSSAENFQH (20)
1C1G4	HV1–18*01F	LV1–47*02 F	9 /89(9.2)	6/92 (6.1)	ARGPDYESSDSPWFDY (16)
3A1E2	HV3–11*01F	LV1–40*01 F	17 /80(19.5)	9/90 (9.1)	ARGMTGFTTSNTESFDL (17)
3B6C7	HV4–39*01F	LV7–43*01 F	15 /83(15.3)	8/89 (8.2)	ASPGGLISDEAMAGYFDY (18)
2H8G1	HV3–30*03F	KV1–39*01 F	13 /85(13.3)	12/83 (12.6)	ATGGGRFSGSGNYYYGMDV (20)
5G2D2	HV1–69*06F	KV1–NL1*01 F	14 /83(14.4)	6/88 (11.7)	ARSTYYDDGSDLTGYMDV (18)

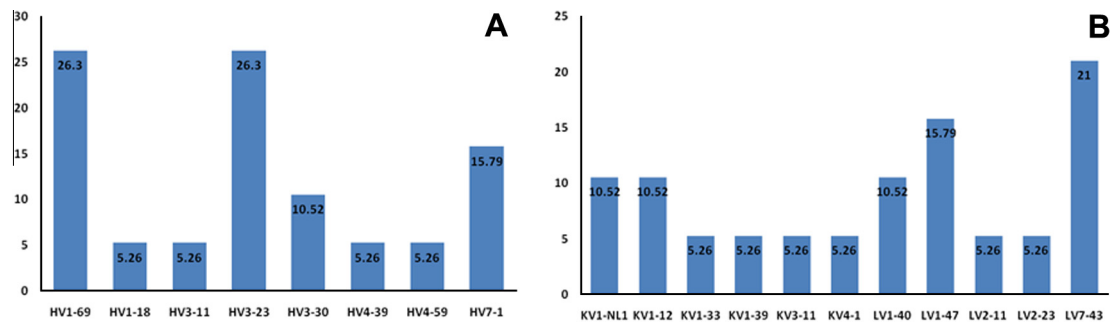


Fig. 1. Germline usage frequencies. (A) The heavy chain variable (HV) germline sequences. (B) The light chain variable (kV for kappa and LV for lambda) germline sequences related to 19 cross-neutralizing anti-DENV HuMAbs derived from acute secondarily infected dengue patients. The Y axis represents the usage percentage of each germline sequences, as also indicated at the top of bar graph.

Table 3
The amino acid sequences of heavy chain from 3 major groups, classified by type of heavy chain germline, of 13 HuMAbs in alignment of their predecessors germline, including type of its germline light chain and NT₅₀. The CDRs and FR are located according to the immunogenetic annotation. The somatic mutations in the VH of each HuMAb are highlighted in gray color.

HC	FRW1	CDR1	FRW2	CDR2	FRW3	CDR3-IMGT	VL germline used	NT50 (µg/ml)
IGHV1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS	GGTPSSYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPFGTA	NYAQKPGQRTVITADESTSTAYMELSSLSRSEDVAVYC			
1A10H7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS	GGTPFRNYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	VIPTLHTT	NYVERPGQRTITADESTSTAYMELSSLSRSEDVAVYC	ARSRYYYDSASNYGMDV	IGKV1-NL1*01 F	1.6
1G7C2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS	GGTPGTNYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPLYKQS	TYAQKFRGRVITADESTNTAYMELNGLSLSDTAVFYC	ATLIAVAGSEGAGSFDIV	IGLV2-23*01 F	1.1
1E7B8	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCRAS	GGALANYA	ISWVRQAPGQGLEWMGA	IIPMSRTT	DYAKQFRGRVITADESTSTAYMELNGLSLSDTAVFYC	ARHRVAGGSDSDHEDNWFPGW	IGKV3-11*01 F	1.5
2D1G5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS	GGTLLSYE	ISWVRQAPGQGLEWMGG	TIIPFGRA	SYAQKPGQRTVITADESTSTAYMELSSLSRSEDVAVYC	ARAGPIAATGVQYEMDVW	IGLV2-11*01 F	13
5G2D2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS	GGTFSKYA	ISWVRQAPGQGLEWMGG	IIPILMTT	TYAQKFRGRVITADESTSTAYMELSSLSRSEDVAVYC	CARSTYYDGSGLTYGMDVW		
IGHV3-23	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAAS	GFTPSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGST	YYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYC			
1H5A11	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAAS	GFTFSNYA	MSWVRQAPGKGLEWVSG	IGDSGHSI	YYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYC	CATGSQWPGDYW	IGLV1-47*02 F	1.6
3A10G12	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAAS	GFTFSNYA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	IGDSGHSI	YYDSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYC	CAAGSQWPGDYW	IGLV1-47*02 F	1.4
4A6F9	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAAS	GFTPSSNA	MSWVRQAPGKGLEWVSG	VSSGSDT	YYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYC	CANTLWTGSGKGGFDYW	IGKV1-12*01 F	2.3
4D10E9	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAAS	GFSPSTQA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	IGORDBSG	YYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYC	CTKIDWSIRGTFDNW	IGKV1-12*01 F	
4F5E1	EVQLLESGGGLVQPQGSRLRLSCAAS	GFSPSTNSA	MSWVRQAPGKGLEWVSA	ISGSGST	YYADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYC	CARVTGWSWDYW	IGKV4-1*01 F	4.6
IGHV7-4	QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKAS	GYPFTSYE	MNWRQAPGQGLEWMGW	INTNTGNP	TYAQKFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYC			
1B3B9	QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKAS	GYPFTSYE	MNWRQAPGQGLEWMGW	IDTNTGNP	TYAQKFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYC	CTTLSGYSADWPEDYW	IGLV7-43*01 F	3.1
4H12C8	QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKAS	GYPFTSYE	MNWRQAPGQGLEWMGW	IDTNTGNP	TYAQKFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYC	CTTLSGYSADWPEDYW	IGLV7-43*01 F	5.5
5E6B1	QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKAS	GYPFTSYE	MNWRQAPGQGLEWMGW	IDTNTGNP	TYAQKFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYC	CTTLSGYSADWPEDYW	IGLV7-43*01 F	3.1

previously reported from other anti-viral MAbs, such as influenza virus [14,19], HIV, SARS CoV, Hendra, and Nipah virus [16].

In 2012, Prabakaran et al., used IgM derived B cell for naïve Fab antibody library construction and screened for several viral targets. They found that IGHV1–69 were the highest heavy chain germline gene used. Similar with the result from Chen et al. (2012a) who constructed 2 libraries from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HIV-1 patients from different time point after infection, one from 40 days, and the other from 8 months post infection. It was found that germline gene usages of both HC and LC were different among two libraries. HV1–46, HC3–33, and HV5–51 were most frequently found from library constructed from 40 days post infection PBMCs. In contrast, HV1–69 (26%) was the most frequently used HC germline from library constructed from 8 months PBMCs. Comparing with our study, that all 19 IgGs were generated from acute patient PBMCs from secondary dengue infection, it can be suggested that after primary infection, this IGHV1–69, which is the high frequency heavy chain germline presence in IgM repertoires [16], should be the major group of germline heavy chain responsible for antibody production. After recovery, the human immune response can stay long in the human blood circulation. Once re-infection has occurred, the memory B cells were stimulated; therefore, high possibility of antibody production from this kind of germline heavy chain was observed.

Other than the different combination of VH/VL to generate a high diversity of our anti-DENV HuMAbs, more variable were also found at the junctional site (length of CDR3). We found more variable occurred in HCDR3 of our HuMAbs, which ranged from 10 to 21 aa (Table 2), but not for LCDR3 which ranged from 9 to 11 aa (data not shown). This high diversity of HCDR3 was also observed from anti-HIV-1 antibody, which ranged from 4 to 27 aa, and considering as the determination of VH diversity of antibody repertoire [13].

Once the mature B cells have faced the dengue virus antigen, more diversity was enhanced by SHM. We observed these mutations throughout the variable regions with different degree, 5.1–21.6% variation for VH, with less variation for VL at 3.1–12.8%.

Among 19 IgGs, three major groups are classified by type of germline HC. These 3 kinds of HC germline, which combined with 8 kinds of germline LC shared 13 HuMAbs. The other 7 HuMAbs have unique HC germline as shown in Table 2. The alignment of HuMAbs HC from these 3 groups, along with their closest germline sequences, including their germline LC, as well as annotated FRs and CDRs are shown in Table 3. It was noticed that among 4 HuMAbs in Gr. 1, which used IGHV1–69 as HC germline, all of them used different germline LC (Table 3). However, there is 1 HuMAb that showed the highest NT₅₀, at 13 µg/ml, comparing with the other 3 which have NT₅₀ ranged from 1.1 to 1.6 µg/ml. It is implied

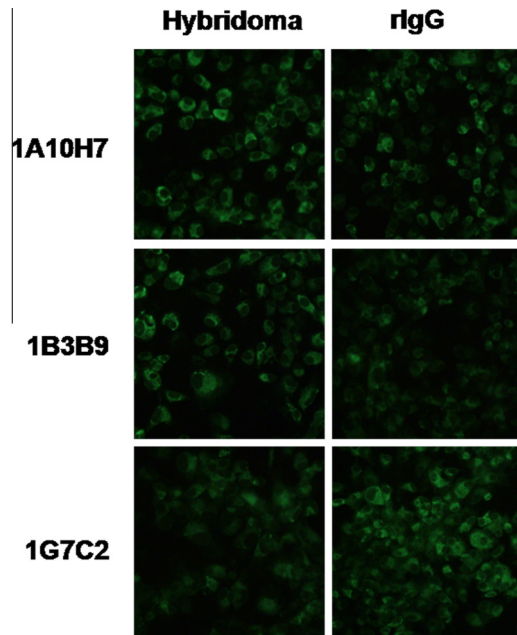


Fig. 2. Fluorescence immunostaining of three expressed rIgG to Dengue virus serotype 2 compared with IgG from hybridoma secretion.

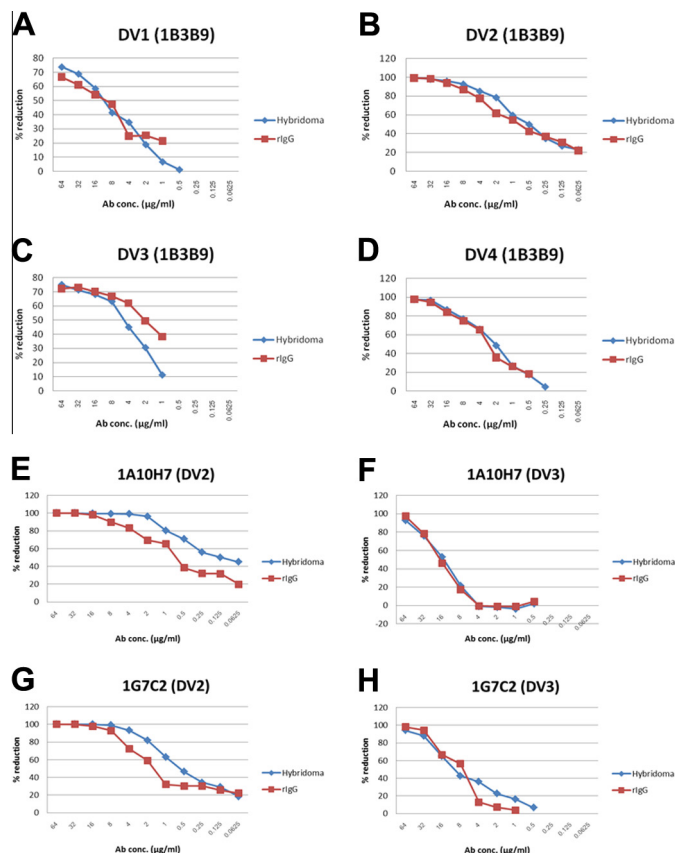


Fig. 3. Neutralizing activity (NT) of HuMAb 1B3B9 to 4 serotypes of dengue virus (A–D), and 1A10H7 (E and F), 1G7C2 (G and H) to dengue virus serotype 2 and 3, demonstrated by the comparison of rIgG and IgG from hybridoma secretion.

that the combination of different HC and LC can greatly affect the binding of our antibodies with the target antigen (IGHV1–69 paired with IGLV2–11 is the less matched). In contrary, Gr. 3 composing of 3 HuMAbs (HuMAb 1B3B9, 4H12C8, 5E6B1) used the

same HC and LC germline with different level of mutations. We found that, using the same originated germline, hypermutation also affect their NT₅₀ (Table 3). Among these 3 HuMAbs, there are 2 HuMAbs (1B3B9 and 5E6B1) that showed the same level of mutation (14.4% and 13.4% for VH, and the same 13.5% for VL, respectively). Both of them showed the same NT₅₀. In contrast, the other HuMAb (4H12C8) which have less variation comparing with its germline counterpart (5.1% for VH and 3.1% for VL) showed almost 2 times higher NT₅₀ concentration (Table 3).

However, for the less variation of same germline sequences, it can be suggested that germline-like antibody with low level of SHM can showed the relatively high binding with target antigen. This phenomenon was also previously evidenced by Chen et al. (2012b). They supported that antibodies with minimally mutated can bind virus causing acute infection like SARS CoV, and Hendra virus with relatively high affinity, but not for chronic disease like HIV-1 [14].

Moreover, after detail characterization, 3 HuMAbs (1A10H7, 1B3B9, 1G7C2), which show the highest activity both in binding and neutralizing activities as previously described [12] was selected. It was noticed that these 3 clones did not showed the highest variation. Hence, it was suggested that the 4 mechanisms was generally play a role in increasing the binding affinity of one antibody toward the target antigen.

To study the function of isolated VH and VL, those 3 best HuMAbs were selected for production of rIgG, by subcloning of variable region of HC and LC to another 2 mammalian expression plasmids containing either constant HC or constant LC (kappa or lambda). The constructed plasmids were co-transfected to human embryonated kidney (HEK) 293T cell for rIgG expression, for testing of both binding and neutralizing activity. All three clones can bind to 4 serotypes of dengue virus infected Vero cell with the same manner as IgG secreted from hybridoma cell (Fig. 2). Moreover, three of them also show almost the same neutralizing activity as those from hybridomas (Fig. 3).

To confirm the right combination of VH/VL from each monoclonal antibody, using the same constructed plasmid, different combinations of VH and VL constructs of those 3 HuMAbs were tested in the total of 9 combinations including the original VH/VL pairing. It was found that only the correct combination of each three clones can show the optimal binding activity by IFA. It was implied that the CDR loop, which is the region much responsible for antigen binding of these three clones need the correct combination of VH and VL and conformation to form the antigen binding site.

For more understanding of affinity pathway, many more HuMAbs with various activity, for example, low, moderate, and high NT titer are needed in identification of the critical position (hotspot) that are most likely to have a major impact on antibody activity and affinity.

Acknowledgments

The authors would like to thanks Dr. Pratap Singhasivanon for his continuous encouragement. This work was supported by JST-JICA (SATREPS; 08080924), Faculty of Tropical Medicine ICTM grant, and Thailand Research Fund Grant number MRG5580153.

References

- [1] R.F. Qi, L. Zhang, C.W. Chi, Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design, *Acta Biochem. Biophys. Sin.* 40 (2008) 91–101.
- [2] K. Clyde, J.L. Kyle, E. Harris, Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis, *J. Virol.* 80 (2006) 11418–11431.
- [3] S. Murrell, S.C. Wu, M. Butler, Review of dengue virus and the development of a vaccine, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 239–247.

- [4] W.A. Marasco, J. Sui, The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1421–1434.
- [5] H.E. Lin, W.Y. Tsai, I.J. Liu, P.C. Li, M.Y. Liao, J.J. Tsai, Y.C. Wu, C.Y. Lai, C.H. Lu, J.H. Huang, G.J. Chang, H.C. Wu, W.K. Wang, Analysis of epitopes on dengue virus envelope protein recognized by monoclonal antibodies and polyclonal human sera by a high throughput assay, *Plos Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1447, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001447>.
- [6] R.T. He, B.L. Innis, A. Nisalak, W. Usawattanakul, S. Wang, S. Kalayanaroj, R. Anderson, Antibodies that block virus attachment to Vero cells are a major component of the human neutralizing antibody response against dengue virus type 2, *J. Med. Virol.* 45 (1995) 451–461.
- [7] W.D. Crill, J.T. Roehrig, Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells, *J. Virol.* 75 (2001) 7769–7773.
- [8] S. Sukupolvi-Petty, S.K. Austin, M. Engle, J.D. Brien, K.A. Dowd, K.L. Williams, S. Johnson, R. Rico-Hesse, E. Harris, T.C. Pierson, D.H. Fremont, M.S. Diamond, Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2, *J. Virol.* 84 (2010) 9227–9239.
- [9] M. Beltramello, K.L. Williams, C.P. Simmons, A. Macagno, L. Simonelli, N.T. Quyen, S. Sukupolvi-Petty, E. Navarro-Sanchez, P.R. Young, A.M. de Silva, F.A. Rey, L. Varani, S.S. Whitehead, M.S. Diamond, E. Harris, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity, *Cell Host Microbe* 8 (2010) 271–283.
- [10] R. de Alwis, S.A. Smith, N.P. Olivarez, W.B. Messer, J.P. Huynh, W.M.P.B. Wahala, L.J. White, M.S. Diamond, R.S. Baric, J.E. Crowe, A.M. de Silva, Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions, *PNAS* 8 (2012) 7439–7444.
- [11] C. Setthapramote, T. Sasaki, O. Puiprom, K. Limkittikul, P. Pitaksajjakul, P. Pipattananaboon, M. Sasayama, P. Leungwutivong, W. Phumratanapapin, S. Channachanan, T. Kusolsuk, A. Jittmittraphap, A. Asai, J.F. Arias, I. Hirai, M. Kuhara, Y. Okuno, T. Kurosu, P. Ramasoota, K. Ikuta, Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue-virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423 (2012) 867–872.
- [12] T. Sasaki, C. Setthapramote, T. Kurosu, M. Nishimura, A. Asai, M.D. Omokoko, C. Pipattananaboon, P. Pitaksajjakul, K. Limkittikul, A. Subchareon, P. Chaichana, T. Okabayashi, I. Hirai, P. Leungwutivong, R. Misaki, K. Fujiyama, K. Ono, Y. Okuno, P. Ramasoota, K. Ikuta, Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection, *Antiviral Res.* 98 (2013) 423–431.
- [13] W. Chen, P. Prabakaran, Z. Zhu, Y. Feng, E.D. Streaker, D.S. Dimitrov, Characterization of human IgG repertoires in an acute HIV-1 infection, *Exp. Mol. Pathol.* 93 (2012) 399–407.
- [14] W. Chen, E.D. Streaker, D.E. Russ, Y. Feng, P. Prabakaran, D.S. Dimitrov, Characterization of germline antibody libraries from human umbilical cord blood and selection of monoclonal antibodies to viral envelope glycoproteins: implications for mechanisms of immune evasion and design of vaccine immunogens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (2012) 1164–1169.
- [15] D. Lingwood, P.M. McTamney, H.M. Yassine, J.R.R. Whittle, X. Guo, J.C. Boyington, C.J. Wei, G.J. Nabel, Structural and genetic basis for development of broadly neutralizing influenza antibodies, *Nature* 489 (2012) 566–571.
- [16] P. Prabakaran, Z. Zhu, W. Chen, R. Gong, Y. Feng, E. Streaker, et al., Origin, diversity, and maturation of human antiviral antibodies analysed by high-throughput sequencing, *Front. Microbiol.* 3 (2012) 1–7.
- [17] H. Bedouelle, L. Belkadi, P. England, J.I. Guijarro, O. Lisova, A. Urvoas, et al., Diversity and junction residues as hotspots of binding energy in an antibody neutralizing dengue virus, *FEBS J.* 273 (2006) 34–46.
- [18] X. Brochet, M.P. Lefranc, V. Giudicelli, IMGT/V-QUEST the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V–J and V–D–J sequence analysis, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W503–W508. Web Server Issue.
- [19] V. Giudicelli, P. Duroux, C. Ginestoux, G. Folch, J. Jabado-Michalud, D. Chaume, et al., IMGT/IGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) D781–D784.
- [20] J. Sui, W.C. Hwang, S. Perez, G. Wei, D. Aird, L. Chen, et al., Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (3) (2009) 265–273.