Thesis Title Production and Characterization of Phage-displayed Fab Developed from Hybridoma Cell Lines Producing Monoclonal Antibody Against Heparin

Author Mr. Somphot Saoin

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Member

Assist. Prof. Dr. Siriwan Ongchai Member

ABSTRACT

Phage display technology is a powerful technique to generate antibody on bacteriophage against various molecules such as polypeptide, protein and poor immunogenic polysaccharide. Currently, production of monoclonal antibody by traditional hybridoma technology is costly and cumbersome; therefore, recombinant Fab antibody generated by the phage display technology can be a suitable alternative. In this study, the objective is to produce phage displaying Fab fragment developed from hybridoma cell lines producing monoclonal antibody against heparin using phage display technology. The total RNA was extracted from 1B1 hybridoma cell

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

lines. RT-PCR was used to amplify cDNA coding for Fd fragment of heavy chain and κ light chain. After appropriate restriction digests, these cDNA fragments were successively inserted into phagemid vector pComb3H-SS. The ligated product, pComb3H+Fd+κ, was transformed into *Escherichia coli* TG-1. The Fab gene was expressed as fusion proteins with a phage coat protein in the pComb3 phage display system. Phage displaying Fab fragments or "1B1 phage antibody" can react with protamine sulfate that was immobilized on the plate in an indirect ELISA as well as original 1B1 mAb compared the VCSM13 could not catch to immobilized antigen.

To further elucidate the nature of the 1B1 phage antibody epitope, the reactivity with other polysulfated polysaccharides was evaluated using competitive ELISA. It was found that 1B1 phage antibody has a strong binding to pentosan polysulfate, heparin and dextran sulfate determining by concentration at 50% inhibition (IC_{50}). The negatively-charged sulfate groups and iduronic acid residue within polysulfated polysaccharide chains might be involved in antibody-antigen interaction.

In conclusion, the Fab antibody fragment was successfully expressed on the surface of VCSM13 bacteriophage using molecular engineering and phage display technique. The novel phage antibody reacts toward natural occurring heparin, semi-synthetic substances, pentosan polysulfate and dermatan sulfate. This recombinant antibody may provide a good alternative to the use of protamine as a heparin-blocking agent.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตและการทดสอบคุณสมบัติของฟาจที่มีการแสดงออกของเอฟเอบีที่พัฒนามาจากเซลล์ลูกผสมที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเฮปปาริน

ผู้เขียน นายสมโภช เสาร์อิน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	กรรมการ
ผศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	กรรมการ

บทคัดย่อ

ฟาจดิสเพลย์เทคโนโลยี เป็นการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาประยุกต์ใช้สร้างแอนติบอดีให้มีการแสดงออกบริเวณพื้นผิวของแบคเทอริโอฟาจ ปัจจุบันวิธีการนี้ได้นำมาใช้ในการผลิตแอนติบอดีที่สามารถจับได้ทั้ง เปปไทด์ โปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถผลิตได้โดยเทคนิคเซลล์ลูกผสม ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตสูงรวมทั้งกระบวนการทำที่ยุ่งยาก ดังนั้น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยฟาจดิสเพลย์จึงเป็นหนทางเลือกหนึ่งในการที่จะใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะผลิตฟาจให้มีการแสดงออกของเอฟเอบีโดยพัฒนามาจากเซลล์ลูกผสม 1B1 ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเฮป-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปาริน ขั้นตอนการวิจัยเริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเซลล์ลูกผสม 1B1 ภายหลังการได้ซึ่งอาร์-เอ็นเอรวมทำการเพิ่มจำนวนยีนที่กำหนดการสร้าง Fd heavy chain และ κ light chain ของแอนติบอดีโดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้เป็นแม่แบบ จากนั้นทำการตัดปลายของยีนดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม เพื่อที่จะเชื่อมต่อเข้ากับฟาจมิดเวคเตอร์ที่ชื่อ pCom3H-SS ภายหลังการเชื่อมต่อเข้าสู่ฟาจมิดเวคเตอร์นำผลผลิตที่ได้นำเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธ์ TG-1 เพื่อเป็นเจ้าบ้านของแบคเทอริโอฟาจสายพันธ์ VCSM13 ซึ่งการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างบริเวณที่จับกับแอนติเจน (antigen binding fragment, Fab) ในการศึกษานี้ใช้ระบบของ pComb3H โดยให้เชื่อมต่อกับยีนโปรตีน III (gpIII) บนผิวของแบคเทอริโอฟาจ ซึ่งภายหลังการผลิตพบว่าฟาจที่ผลิตได้มีความสามารถจับได้กับ protamine sulfate เมื่อทำการเคลือบหลุมทดลองด้วยสารดังกล่าวในการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับแอนติบอดีดั้งเดิม ส่วนฟาจ VCSM13 ไม่สามารถจับกับ protamine sulfate ได้

ในการประเมินบริเวณที่ถูกจับ (epitope) ของ 1B1 ฟาจแอนติบอดีสามารถตรวจสอบด้วยวิธี competitive ELISA โดยใช้โพลีซัลเฟตโพลีเซคคาไรด์หลายๆ ชนิด จากการทดสอบพบว่าฟาจแอนติบอดีสามารถจับได้ดีกับ pentosan polysulfate, heparin และ dextran sulfate โดยเปรียบเทียบจากค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการจับของแอนติบอดีต่อแอนติเจนได้ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีตัวยับยั้ง ซึ่งกล่าวได้ว่าปริมาณประจุลบของซัลเฟตและโมเลกุลของน้ำตาล iduronic acid ในสายของโพลีแซคคาไรด์น่าจะมีความเกี่ยวข้องในการจับของแอนติเจนและแอนติบอดีนี้

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สามารถทำการฝากยีนที่กำหนดการสร้างบริเวณที่ใช้จับกับแอนติเจนจากเซลล์ลูกผสม 1B1 และได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่แสดงออกบนผิวของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคเทอริโอฟาจในรูป Fab บนผิวของ VCSM13 ได้ ซึ่งฟาจแอนติบอดีดังกล่าวสามารถจับกับสารที่เกิดขึ้นในร่างกายตามธรรมชาติซึ่งได้แก่ heparin และสารกึ่งสังเคราะห์ได้แก่ pentosan polysulfate และ dextran sulfate โดยประโยชน์ของแอนติบอดีที่ผลิตได้นี้อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นโปรตีนที่สามารถไปยับยั้งฤทธิ์ของ heparin ในทางคลีนิคเช่นเดียวกับ protamine sulfate ที่ใช้ในปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved