ทาริกา ศรีตระกาล : การระบุตำแหน่งอิพิโทปและสัมพรรคภาพการจับของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่ออะโปไลโพโปรตีนบี-100 ของมนุษย์ (IDENTIFICATION OF EPITOPES AND BINDING AFFINITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN APOLIPOPROTEIN B-100). อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.พนิดา ขันแก้วหล้า, 109 หน้า.

คำสำคัญ: ตำแหน่งจับ (binding site) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ แอล ดี แอล (mAb-LDL) อะโปไลโพโปรตีนบี-100 สัมพรรคภาพการจับ

ไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ ในระดับสูงเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของภาวะหลอดเลือดแข็ง มอนอโคลนอลแอนติบอดีต่อไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ ได้รับการรายงานว่าสามารถลดขนาดของคราบพลัคในผนังหลอดเลือด ซึ่งอาจนำไปใช้สำหรับการพัฒนายารักษาโรคได้ มอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ ไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำของมนุษย์ถูกผลิตขึ้นและพบว่าจับแบบจำเพาะกับอะโปไลโพโปรตีนบี-100 ในการศึกษานี้ มอนอโคลนอลแอนติบอดีสามโคลน คือ hLDL-E8 (IgG_1) hLDL-2D8 (IgG_{2b}) และ hLDL-F5 (IgG_1) ได้ถูกแสดงคุณลักษณะเฉพาะสำหรับบริเวณ ซึ่งกำหนดส่วนจำเพาะต่อแอนติเจน (CDRs) อิพิโทปสำหรับจับ และสัมพรรคภาพในการจับ การทดลอง RT-PCR ระบุว่าบริเวณที่แปรผันได้ของแอนติบอดีเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนสายน้ำหนักต่ำแคปปา และสายหนักแกมมา การหาลำดับดีเอ็นเอแสดงว่าบริเวณที่แปรผันมียีนที่แปรผันได้ในเฟรมที่เหมาะสม ลำดับโปรตีนถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม IMGT เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CDR โดยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันที่ยอมรับได้มากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โครงสร้างส่วนแปรผัน (Fv) ของมอนอโคลนอลแอนติบอดี ถูกสร้างขึ้นโดย SWISS-MODEL โดยมีคาคะแนน QSQE ที่ยอมรับได้สูงกว่า 0.7 มุมไดฮีดรัลได้รับการวิเคราะห์โดยแผนภาพรามจันทรัน และพบว่า 99% ของกรดอะมิโนอยู่ในบริเวณที่ยอมรับได้ อะโปไลโพโปรตีนบี-100 ถูกย่อยด้วยทรอมบินเพื่อสร้างชิ้นส่วนย่อยของอะโปไลโพโปรตีนบี-100 ที่แตกต่างกัน 4 ชิ้น ได้แก่ T1 T2 T3 และ T4 จากการทำ Western blot บ่งชี้ว่า hLDL-E8 และ hLDL-F5 จับอย่างจำเพาะกับ T3 ที่กรดอะมิโน 1297-3249 ในขณะที่ hLDL-2D8 จับกับปลาย N ของ T4 ที่กรดอะมิโน 1-1297 ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับการสอบวิเคราะห์การจับอิพิโทปโดยใช้การสอบวิเคราะห์เอนไซม์-ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (ELISA) แบบยับยั้ง พบว่า hLDL-E8 จับที่อิพิโทปที่ต่างกันจาก hLDL-2D8 และมีการทับซ้อนกันบางส่วนกับ hLDL-F5 จากนั้นฐานข้อมูล IEDB ถูกใช้เพื่อทำนายบริเวณการจับหรืออิพิโทปเชิงเส้นของมอนอโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำของมนุษย์

ตามการคาดการณ์ เปปไทด์ 53 ชิ้นของชิ้นส่วน T4 และ 70 เปปไทด์ของชิ้นส่วน T3 ถูกเลือกมาเพื่อทำการคัดกรองเสมือนจริง GOLD และ Autodock Vina ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเชิงคำนวณเกี่ยวกับการจำลองการจับกันระดับโมเลกุล เพื่อทำนายอิพิโทปที่จับของ Fv ของแอนติบอดีต่อไลโพโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำของมนุษย์ และอะโปไลโพโปรตีนบี-100 มอนอโคลนอลแอนติบอดี hLDL-E8 และ hLDL-F5 แสดงการจับสูงสุดกับลำดับกรดอะมิโน ^{1574}EYQADYE^{1580} และ ^{2157}YIKDSYD^{2163} ของอะโปไลโพโปรตีนบี-100 แบบเต็มความยาว ในขณะที่ มอนอโคลนอลแอนติบอดี hLDL-2D8 มีคะแนน GOLD สูงที่สุดเมื่อจับกับลำดับกรดอะมิโน ^{645}DPNNYLPKES^{654} ของ อะโปไลโพโปรตีนบี-100 ตำแหน่งการจับอิพิโทปที่คาดการณ์ไว้ของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับเปปไทด์อะโปไลโพโปรตีนบี-100 ได้ทำการยืนยันโดยการทดลองด้วยวิธี ELISA ผลลัพธ์บ่งชี้ว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดี hLDL-E8 จับกับอะโปไลโพโปรตีนบี-100 ที่ลำดับกรดอะมิโนในช่วง 2050 ถึง 2166 โดยมีค่า OD 0.24343 ถึง 0.31347 hLDL-2D8 จับกับโอลิโกเปปไทด์ที่กรดอะมิโนเรซิดิว 712 ถึง 722 ในขณะที่ใช้ hLDL-F5 ไม่มีการสังเกตสัญญาณที่มีปฏิสัมพันธ์กับโอลิโกเปปไทด์ใด ซึ่งอาจเกิดจากการทำนายผิดหรือสัมพรรคภาพการจับของแอนติบอดีต่ำ สุดท้าย สัมพรรคภาพการจับของมอนอโคลนอลแอนติบอดีกับไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ ได้ถูกตรวจวัดโดยเทคนิค ELISA และคำนวณจากสมการของ Beatty ถูกใช้เพื่อวัดหาค่าคงที่สัมพรรคภาพ ผลลัพธ์ชี้ให้เห็นว่า มอนอโคลนอลแอนติบอดี hLDL-2D8 hLDL-E8 และ hLDL-F5 มีค่าคงที่สัมพรรคภาพเฉลี่ยอยู่ที่ $1.51\pm0.69 \times 10^{9}$ Mol^{-1} $7.25\pm3.56 \times 10^{8}$ Mol^{-1} และ $4.39\pm2.63 \times 10^{6}$ Mol^{-1} ตามลำดับ นอกจากนี้ คุณลักษณะของความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ OD-50 บนเส้นกราฟการตอบสนองต่อปริมาณของแอนติบอดี เผยให้เห็นว่ามอนอโคลนอลแอนติบอดี hLDL-F5 มีแนวโน้มที่จะจดจำสองอิพิโทปบนอะโปไลโพโปรตีนบี-100 ในขณะที่ hLDL-2D8 และ hLDL-E8 จดจำอิพิโทปเดียวบนอะโปไลโพโปรตีนบี-100 การค้นพบเหล่านี้ได้ให้การสนับสนุนที่จะเป็นประโยชน์สำหรับการใช้งานมอนอโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้ต่อไปสำหรับการวิจัยในห้องปฏิบัติการและทางคลินิก

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา ฑาริกา ศรีตระกาล

ปีการศึกษา 2566 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

TARIGA SRITRAKARN : IDENTIFICATION OF EPITOPES AND BINDING AFFINITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN APOLIPOPROTEIN B-100. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PANIDA KHUNKAEWLA, Ph.D. 109 PP.

Keywords: Binding epitope, Monoclonal antibody, Apolipoprotein B-100, Binding affinity

A high level of low-density lipoprotein (LDL) is known as one of the major causes of atherosclerosis. Some monoclonal antibodies (mAbs) to LDL were reported to reduce atherosclerotic plaque size, which may be applicable for therapeutic drug development. In-house mAbs that are specific to human LDL were produced and found to specifically bind to apolipoprotein B-100. In this study, three mAb clones hLDL-E8 (IgG_1), hLDL-2D8 (IgG_{2b}) and hLDL-F5 (IgG_1) were characterized for their complementarity determining regions or CDRs, binding epitopes and binding affinity. RT-PCR experiment indicated that the variable regions of these antibodies are composed of kappa light chains and gamma heavy chains. DNA sequencing revealed that variable regions have a proper in-frame variable gene. The protein sequence was analyzed by IMGT for CDR identification with an acceptable percentage identity more than 50% compared to databases. The variable fragment (Fv) structures of the mAbs were constructed by SWISS-MODEL with an acceptable QSQE score value above 0.7. The backbone dihedral angle was analyzed by Ramachandran plot and it was found that 99% of the amino acid residues are in acceptable regions. ApoB protein was digested with thrombin to generate 4 different apoB-100 fragments including T1, T2, T3 and T4. Western blot indicated that hLDL-E8 and hLDL-F5 specifically bind to T3 which includes amino acid residues 1297-3249, while hLDL-2D8 binds to the N-terminus of T4 which includes amino acid residues 1-1297. These results are consistent with epitope binding assay using an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which hLDL-E8 binds at different epitopes from hLDL-2D8 and has some overlap with hLDL-F5. The IEDB database was used to predict a binding region or linear epitope of the hLDL-specific mAbs. According to the prediction, 53 peptides of T4 fragment and 70 peptides of T3 fragment were chosen for virtual screening.

GOLD and Autodock Vina were used for computational studies on molecular docking to predict the binding epitope of hLDL-mAbs Fv and apoB-100 peptides. The mAbs hLDL-E8 and hLDL-F5 showed highest binding to the amino acid sequences ^{1574}EYQADYE^{1580} and ^{2157}YIKDSYD^{2163} of full-length apoB-100, while mAb hLDL-2D8 had the highest GOLD score with the sequence ^{645}DPNNYLPKES^{654} of apoB-100. The predicted epitope binding sites of the mAbs to apoB-100 peptides was experimentally confirmed by ELISA. The results indicated that mAb hLDL-E8 binds to apoB-100 at amino acid residues in the range of 2050 to 2166 with OD values 0.24343 to 0.31347. The mAb hLDL-2D8 bound to a peptide including amino acid residues 712 to 722. No interacting signal to any peptide was observed for mAb hLDL-F5, which may be caused by either misprediction or low binding affinity of the antibody. Finally, the binding affinity of monoclonal antibodies to apoB-100 was determined by the ELISA technique, and Beatty's equation was used to determine the affinity constant. The results suggested that mAbs hLDL-2D8, hLDL-E8 and hLDL-F5 have an average affinity constant value of $1.51\pm0.69 \times 10^{9}$ Mol^{-1}, $7.25\pm3.56 \times 10^{8}$ Mol^{-1} and $4.39\pm2.63 \times 10^{6}$ Mol^{-1}, respectively. In addition, the antibody concentration at OD-50 on the dose-response curve revealed that mAbs hLDL-F5 tend to recognize two epitopes of apoB-100, while hLDL-2D8 and hLDL-E8 recognized a single epitope of apoB-100. These findings contribute valuable information for further use of these mAbs for laboratory and clinical research.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Chemistry
Academic Year 2023

Student's Signature Tariga Sritrakarn.
Advisor's Signature