

# HUMANIZED ANTIBODIES THAT NEUTRALIZE PERTUSSIS TOXIN ACTIVITY

ANEK POOTONG

Ph. D. (BIOMEDICAL SCIENCES)

MAJOR IN MOLECULAR IMMUNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

DISSERTATION ADVISORS: WANPEN CHAICUMPA, D.V.M. (Hons.), Ph.D.,

PRAMUAN TAPCHAI SRI, Ph.D., PONGSRI TONGTAWE, Ph.D.,

MANAS CHONGSA-NGUAN, B.Sc., M.P.H., Ph.D.,

PONGRAMA RAMASOOTA, D.V.M., Ph.D.

## ABSTRACT

Whooping cough or pertussis, a human disease caused by infection of the respiratory tract by *Bordetella pertussis*, continues to be a public health problem. It causes significant morbidity and mortality in young infants and children throughout the world, even in well-immunized population. Although erythromycin is effective in eliminating *B. pertussis* from the nasopharynx of infected patients, it does not substantially alter the course of the disease unless it is initiated during the colonization stage of the bacterium. This is because the systemic manifestations of pertussis are mediated by pertussis toxin (PT), especially the S1 subunit (toxin active subunit of the PT). Thus, therapy directed at PT is beneficial.

It has been documented by previous studies that several murine monoclonal antibodies (MAbs) directed against PT components play important role in resuscitation from pertussis severe morbidity. However, anti-PT derived from a heterologous source, *e.g.* murine monoclonal antibody, is not suitable for use in the human because of the possibility of a human anti-murine antibody (HAMA) response. Therapeutic human antibodies to PT produced by recombinant DNA technology should abrogate the problem of HAMA.

Humanization is now a well established technique for reducing the immunogenicity of xenogeneic monoclonal antibodies with reconstituting the binding

affinity and specificity of the original MAb. The humanized-antibodies are prepared by grafting the xenogeneic complementarity-determining regions (CDRs) onto the most identical human immunoglobulin frameworks.

Therefore, in this study the PT-neutralizing capability of murine MAb specific to S1 subunit (MAbPT6-2G6) was studied *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. It was found that the MAb could inhibit the hemagglutination activity, CHO cell clustering activity and leukocytosis-promoting activity of PT holotoxin.

Using peptide phage display technique, it was found that mimotopes/proposed epitopes that bound specifically to MAbPT6-2G6 had amino acid sequences at positions 86-90 (STSSS), 165-169 (LTVRR), 193-197 (TEYSN) and 213-225 (TSRRSVASIVGTL) of the S1 subunit of PT. The amino acids 165-169 are in the enzymatic active site of S1 (Gi acceptor domain) while the sequence of amino acids 213-226 are juxtaposed to the S2 and S4 of B subunit of PT which cause agglutination of chicken erythrocytes and bind to the receptor. The findings implied that the neutralization of the PT by the MAbPT6-2G6 was mediated either by preventing the intracellular entry of the toxin by forming PT-antibody complexes that are unable to traverse the plasma membrane and/or stereologically hindering the host cell binding by the B pentamer.

The PT6-2G6-HuScFv coding DNA was constructed from the PT6-2G6 hybridoma cells using molecular cloning and antibody engineering technique. The *huscFv* was then cloned into a phagemid vector. Phage clones harboring the HuScFv specific to S1 were selected and used to transfect an *E. coli* for HuScFv expression. The PT6-2G6-HuScFv were expressed, purified and subjected to evaluation for their neutralizing activity against PT. It was found that the HuScFv could inhibit chicken erythrocyte agglutination in the similar manner to the original MAb. Therefore, humanized-murine PT6-2G6-ScFv has a high potential for use as a non-antimicrobial therapeutic alternative in order to effectively resuscitate the seriously affected patients from pertussis.

**KEY WORDS:** PERTUSSIS/ WHOOPING COUGH/ HUMANIZED ANTIBODY/  
MIMOTOPE / THERAPITIC ANTIBODY/ PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

## การสร้างแอนติบอดีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับแอนติบอดีของมนุษย์ซึ่งมีความสามารถ ในการยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษเปอทัสซิส

นายเอนก ภูทอง

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)

สาขาวิชาหลักวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

คณะกรรมการควบคุมสารนิพนธ์: ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา, รศ. ดร. ประมวล เทพชัยศรี,

ผศ. ดร. ผ่องศรี ทองทวี, รศ. ดร. มนัส จงสงวน, ผศ. ดร. พงษ์ราม งามสูตร

### บทคัดย่อ

โรคไอกรนหรือโรคเปอทัสซิสเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียบอดีเทลลา เปอทัสซิส (*Bordetella pertussis*) ที่ระบบทางเดินหายใจ ทำให้มีการอักเสบของเยื่อปอดทางเดินหายใจ ไอกรนเป็นโรคที่ติดต่อกันได้ง่ายจากการไอ จาม รดกันโดยตรง ผู้สัมผัสโรคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันจะติดเชื้อและเกิดโรคเกือบทุกราย โรคไอกรนพบได้บ่อยในเด็ก โดยในเด็กอายุต่ำกว่า 1 ปี อาการจะรุนแรงมากและมีอัตราการตายสูง แม้การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะจะให้ผลดีในการฆ่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในระยะแรกๆของการติดเชื้อที่ทางเดินหายใจ แต่จะไม่สามารถบรรเทาอาการของโรคในผู้ป่วยที่มีการไอเป็นชุดๆแล้ว เพราะอาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากพิษที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียและสารพิษเข้าสู่กระแสเลือดไปแล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษเปอทัสซิส [pertussis toxin (PT)] ดังนั้นการรักษาที่เน้นการกำจัดหรือยับยั้งฤทธิ์ของพิษน่าจะเป็นประโยชน์มากกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ

จากการศึกษากลไกของภูมิคุ้มกันต่อโรคไอกรน พบว่าแอนติบอดีมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อและบรรเทาความรุนแรงของโรคไอกรนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติบอดีต่อส่วน A subunit (S1) ของสารพิษเปอทัสซิส หากแต่แอนติบอดีดังกล่าวมักได้มาจากสัตว์ฟันแทะประเภทหนูไมซ์ (murine antibodies) จึงไม่เหมาะสมกับการใช้ในมนุษย์ เพราะจะทำให้เกิดแอนติบอดีต่อไอโซไทป์ของอิมมูโนโกลบูลินส์ของหนูไมซ์ในคนได้คือเกิดอิวแมนแอนติมิวรีนแอนติบอดี (human anti-murine antibody; HAMA) แอนติบอดีจากมนุษย์ (human derived antibody) หรือที่คล้ายคลึงกับของมนุษย์ (humanized-antibody) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เพื่อการรักษาโรคไอกรนอย่างยิ่ง แต่การใช้

แอนติบอดีที่มาจากมนุษย์ยังมีความยุ่งยากทั้งทางปฏิบัติและจริยธรรม ดังนั้น การใช้แอนติบอดีที่ทำให้คล้ายคลึงอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์ จึงเหมาะสมสำหรับใช้เพื่อจุดประสงค์ดังกล่าว

ปัจจุบันแอนติบอดีจากสัตว์ที่เปลี่ยนให้มิโครสร้างคล้ายคลึงกับแอนติบอดีของมนุษย์ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาโรค โดยลดหรือลบความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแอนติบอดีจากสัตว์ ทั้งนี้โดยปลูกยีนขึ้นที่ควบคุมการสร้างกรดอะมิโนที่เป็นส่วนของแอนติบอดีจับกับเอพิโทปบนแอนติเจนหรือที่เรียกว่าส่วนคอมพลีเมนทาริตี ดีเทอร์มินันท์ รีเจียน (Complementarity-determining regions; CDRs) ของแอนติบอดีของสัตว์ที่จับเฉพาะกับแอนติเจน เป้าหมายลงบนโครงของอิมมูโนโกลบูลินของมนุษย์ด้วยเทคนิคการตัดต่อพันธุกรรม (genetic engineering) แอนติบอดีชนิดนี้ถูกเรียกว่า “ฮิวแมนไนซ์แอนติบอดี” ซึ่งจะไม่กระตุ้นให้เกิด HAMA

ดังนั้นงานวิจัยในสารนิพนธ์เล่มนี้ จึงทำการศึกษาความสามารถของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลจากหนู (murine monoclonal antibody; MAb) ที่จับจำเพาะกับสารพิษเปปไทด์สตีส์ส่วนเอ (A subunit) ของ PT ชื่อ PT6-2G6 ในการยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษเปปไทด์สตีส์ทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) นอกสัตว์ทดลอง (*Ex vivo*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และศึกษาเพื่อหาชิ้นส่วนของโปรตีนบนส่วน S1 ของสารพิษเปปไทด์สตีส์ที่จำเพาะของแอนติบอดี (specific mimotope) ดังกล่าวด้วยเทคนิคเปปไทด์ฟาจดิสเพลย์ (peptide phage display) อีกทั้งทำการสร้างชิ้นส่วนของแอนติบอดีที่มีความคล้ายคลึงกับของมนุษย์ (humanized-murine single chain variable fragment; HuScFv) โดยใช้ชิ้นส่วน CDR จากเซลล์ PT6-2G6 และผลิตโปรตีนดังกล่าวในแบคทีเรีย จากนั้นนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์และทดสอบความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษเปปไทด์สตีส์

จากการศึกษาความสามารถของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาล PT6-2G6 ในการยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษเปปไทด์สตีส์ พบว่าแอนติบอดีสามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษเปปไทด์สตีส์ในการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของไก่ (hemagglutination activity) ตลอดจนฤทธิ์การทำให้เซลล์ CHO เกาะกลุ่ม (CHO cell clustering activity) และในการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวในหนูทดลอง (leukocytosis-promotion activity) ได้

จากนั้นจึงทำการศึกษาเพื่อหา specific mimotope ของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลดังกล่าวด้วยเทคนิคเปปไทด์ฟาจดิสเพลย์ พบว่า ชิ้นส่วนของโปรตีนที่แสดงออกบนเปลือกหุ้มของฟาจที่จับกับแอนติบอดี มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับชิ้นส่วนของโปรตีนบน S1 subunit ตรงตำแหน่งที่ 86-90 (STSSS) ตำแหน่งที่ 165-169 (LTVRR) ตำแหน่งที่ 193-197 (TEYSN) และ ตำแหน่งที่ 213-225 (TSRRSVASIVGTL) โดยกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ 165-169 เป็นตำแหน่งออกฤทธิ์ของสารพิษเปปไทด์สตีส์ที่ชื่อว่า จีไอ แอคเซ็ปเตอร์ โดเมน (Gi acceptor domain) ในขณะที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 213-225 อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับส่วนบีของพิษ ในส่วน S2 และ S4 subunits ซึ่งเป็น

ส่วนที่ทำให้เม็ดเลือดแดงของไก่จับกลุ่มกัน โดยจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลจาก PT6-2G6 สามารถลดฤทธิ์ของสารพิษ เปอทัสซิสได้ด้วยการจับกับกรดอะมิโนตำแหน่ง 213-225 บน S1 subunit ไปบดบัง (ขัดขวาง) ไม่ให้ส่วนบีจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ได้ อีกทั้งแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพลกซ์ที่เกิดขึ้นนั้นมีขนาดใหญ่และชอบน้ำ (hydrophilic) เป็นผลให้ พิษเปอทัสซิสไม่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ได้

จากนั้นจึงสร้างสายดีเอ็นเอที่ควบคุมการผลิตแอนติบอดีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับแอนติบอดีของมนุษย์ [humanized-murine single antibody fragment (*huscFv*)] จากเซลล์ PT6-2G6 ด้วยเทคนิคการโคลนยีนและพันธุวิศวกรรมของยีนแอนติบอดีและนำดีเอ็นเอของ *huscFv* ใต้ลงในพลาสมิดเวกเตอร์ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกฟาจที่มีโปรตีน HuScFv ที่จำเพาะต่อสารพิษเปอทัสซิสบนผิวฟาจ แล้วนำฟาจที่เลือกได้ไปทรานส์เฟกต์เชื้ออีโคไลเพื่อเตรียมโปรตีน HuScFv และทำโปรตีน HuScFv ให้บริสุทธิ์ เมื่อนำโปรตีน HuScFv ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งฤทธิ์ของสารพิษเปอทัสซิส พบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งฤทธิ์การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของไก่ได้เช่นเดียว แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลต้นแบบ ดังนั้น แอนติบอดีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับแอนติบอดีของมนุษย์นี้ จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคไอกรนที่มีอาการรุนแรงได้

ชำนาญกานท์สมุด