HUMANIZED-MONOCLONAL ANTIBODY THAT NEUTRALIZES HETEROLOGOUS *LEPTOSPIRA* INFECTION

SANTI MANEEWATCHARARANGSRI

Ph.D. (BIOMEDICAL SCIENCES)
MAJOR IN MOLECULAR IMMUNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

DISSERTATION ADVISORS: PRAMUAN TAPCHAISRI, Ph. D., WANPEN CHAICUMPA, D.V. M. (Hons.), Ph. D., PONGSRI TONGTAWE, Ph. D., PATCHARIN SAENGJARUK, Ph. D., URAI CHAISRI, Ph. D.

ABSTRACT

Leptospira is the causative agent of leptospirosis, a reemerging zoonotic disease of worldwide prevalence. Patients with leptospirosis are commonly treated with antibiotics. Jarisch-Herxheimer reactions (JHR) caused by toxic bacterial substances massively released as a result of the antibiotic mediated-bacterial lysis occurs in some patients which may aggravate the existing severe clinical manifestations. Recently, a murine hybridoma clone LPF1 secreting specific monoclonal antibodies (MAb) against pathogenic strains of *Leptospira* was established. The MAb was tested and found to inhibit red blood cell hemolysis and protect hamsters against challenge with heterologous leptospires. The main objective of this research was to construct humanized-monoclonal antibody in the form of single-chain variable fragment (scFv) with LPF1 antigen binding sites using antibody engineering technique. cDNA was synthesized from the mRNA of protective murine hybridoma clone LPF1. The *VH* and *VL* gene coding sequences were PCR amplified using the cDNA as template. The *VH* and *VL* were linked together *via* a polyneucleotide linker by splice overlapped extension PCR to form a single chain variable murine DNA fragment (*muscFv*). The complementarity determining regions of the *muscFv* were grafted onto the best matching human *VH* and *VL* immunoglobulin frameworks to produce humanized-murine single chain (*huscFv*). The *huscFv* DNA sequence was cloned into a phagemid vector and the recombinant phagemid was then used to transfect a competent *E. coli* for the production of recombinant human single chain antibody

(huscFv). The muscFv and huscFv preparation was tested for its neutralizing activity against heterologous *Leptospira* infection.

It was found that the muscFv and huscFv still retained the antigenic specificity as compared with the original MAbLPF1 by Western blot analysis. The humanized antibody possessed neutralizing activities against both heterologous *Leptospira*-mediated-human red blood cell lysis *in vitro* and heterologous *Leptospira* infection *in vivo* as the murine scFv counterpart and original MAbLPF1, on the same weight basis. The preparation has high therapeutic potential as an alternative to antibiotics for human leptospirosis, especially for drug hypersensitive patients.

KEY WORDS: HUMANIZED-ANTIBODY/ JARISCH-HERXHEIMER REACTION (JHR)/ *LEPTOSPIRA*/ SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENT (SCFV)/ THERAPEUTIC ANTIBODY

290 P.

โมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับของมนุษย์สามารถยับยั้งการติดเชื้อเลปโตสไปร่าหลายสายพันธุ์

ทนพ. สันติ มณีวัชระรังษี

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)

สาขาวิชาหลักวิทยาภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

คณะกรรมการควบคุมสารนิพนธ์: รศ.ดร. ประมวญ เทพชัยศรี, ศ.ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา, ผศ.ดร. ผ่องศรี ทองทวี, ผศ.ดร. พัชรินทร์ แสงจารึก, ผศ.ดร. อุไร ไชยศรี

บทคัดย่อ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนซึ่งพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศแถบร้อน โรคดังกล่าวเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเลปโตสไปร่า ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมักได้รับการรักษาด้วยการได้รับยาปฏิชีวนะซึ่งการรักษาในผู้ป่วยบางรายอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาจาริสเฮิร์กไซเมอร์ ซึ่งเกิดจากการที่แบคทีเรียถูกทำลายให้แตกเนื่องจากยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดการแพ้อย่างรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้น การรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การใช้แอนติซีรัม อาจเป็นประโยชน์มากโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ยาปฏิชีวนะ

โมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูชนิด LPF1 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนหลายชนิดของเชื้อเลปโตสไปร่าที่สามารถก่อโรคได้ถูกผลิตในห้องปฏิบัติการ พบว่าโมโนโคลนาลดังกล่าวสามารถยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงเนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าและให้ผลรักษาหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปร่าได้ วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อสร้างฮิวแมนไนซ์แอนติบอดีชนิด huscFv ด้วยเทคนิคแอนติบอดีแอนจิเนียริง

cDNA ที่ถูกสร้างขึ้นจากสาย mRNA แม่แบบที่สกัดมาจากเซลล์ไฮบริโดมาชนิด LPF1 ถูกนำมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณยีนที่กำหนดการสร้างแอนติบอดีในส่วน heavy (*VH*) และ light (*VL*) ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (PCR)

สายดีเอนเอชนิด *VH* และ *VL* ได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกันด้วยสายชื่อมดีเอ็นเอในปฏิกิริยาการเพิ่มสารพันธุกรรมในหลอดทดลองแบบพิเศษ (splice overlapped extension PCR) เพื่อผลิตเป็นสายดีเอ็นเอชนิด *muscFv* สายดีเอ็นเอที่กำหนดการสร้างโปรตีนแอนติบอดีในส่วนที่ใช้ในการจับกับแอนติเจน (*CDRs*) ถูกปลูกถ่ายลงบนสายดีเอ็นเอของมนุษย์ที่มีความคล้ายคลึงกับของหนูมากที่สุด

เพื่อสร้างดีเอ็นเอชนิด *huscFv* ที่มีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างแอนติบอดีของมนุษย์มากที่สุด สายดีเอ็นเอชนิด *huscFv* ที่ผลิตได้ถูกนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ชนิด phagemid และถูกนำเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้านเพื่อทำการผลิตโปรตีนจำลองชนิด muscFv และ huscFv

โปรตีนบริสุทธิ์ชนิด muscFv และ huscFv ที่ผลิตได้ยังคงความสามารถในการจับกับแอนติเจนได้เช่นเดียวกับแอนติบอดีแม่แบบชนิด LPF1 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Western blot พบว่าแอนติบอดีชนิด huscFv ให้ผลในการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงที่เดจากเชื้อเลปโตสไปร่าสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ในหลอดทดลองเมื่อเปรียบเทียบด้วยน้ำหนักของแอนติบอดีที่เท่ากัน และให้ผลในการรักษาในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อเลปโตสไปร่าสายพันธุ์ที่แตกต่างและรุนแรงได้เช่นเดียวกับแอนติบอดีชนิด muscFv และแอนติบอดีต้นแบบชนิด LPF1 ในการทดลองนี้ แอนติบอดีที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพในการรักษาและเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสโดยเฉพาะผู้ป่วยที่แพ้ยาปฏิชีวนะ

290 หน้า