บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: สัญญาเลขที่ 468002

ชื่อโครงการ: การเปลี่ยนโมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูไมซ์ให้มีโครงสร้างคล้ายคลึงอิมมิวโนกลอบูลินส์ของมนุษย์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซีส) และการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนูที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Email Address: tmwcc@mahidol.ac.th, tmwcc@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 15 สิงหาคม 2546 ถึง 14 สิงหาคม 2549

โรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซีส (leptospirosis) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียชื่อ *Leptospira* spp. ซึ่งโรคนี้ถูกจัดว่าเป็นโรคที่กลับมาเป็นปัญหาใหม่ (re-emerging infectious disease) ของประเทศไทยและประเทศอื่นๆที่อยู่ในภูมิภาคร้อนและชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรกลุ่มเสี่ยง เช่น ชาวนา เจ้าหน้าที่โรงงานฆ่าสัตว์ สัตวแพทย์ หรือผู้ที่มีกิจกรรมที่ทำให้ต้องสัมผัสกับสัตว์พาหะ สัตว์เป็นโรค หรือ ดิน หรือ น้ำ ที่มีเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira* spp.) ปนเปื้อน เมื่อติดเชื้อ ผู้ติดเชื้อส่วนหนึ่งอาจไม่มีอาการป่วยใดๆ หรือมีอาการเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ผู้ติดเชื้ออีกจำนวนหนึ่งมีอาการป่วยที่เฉียบพลัน (acute) และรุนแรง (severe) ซึ่งหากวินิจฉัยผิดพลาด หรือ รักษาไม่ทันท่วงทีและถูกต้องก็จะเสียชีวิตได้ในอัตราตายที่ค่อนข้างสูง การรักษาโรค leptospirosis ในระยะเฉียบพลันมักใช้ยาปฏิชีวนะและรักษาประคับประคองตามอาการ (supportive treatment) ผู้ป่วยบางรายอาจต้องได้รับการรักษาในหน่วยผู้ป่วยวิกฤติเพราะอาจเกิดอวัยวะวาย เช่น ไตวาย ตับวาย เกิดสมองอักเสบ และ/หรือมีเลือดออกจากอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ปอด รวมทั้งมีอาการอื่นๆอีกด้วย อย่างไรก็ดีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในระยะ acute ที่ผู้ป่วยมีเชื้อ *Leptospira* spp. อยู่ในกระแสโลหิต (leptospiremia) และอวัยวะต่างๆจำนวนมาก อาจมีผลข้างเคียงที่เรียกว่า "ปฏิกริยาจาริช-เฮิกซัยเมอร์ (Jarisch-Herxheimer reaction; JHR)" ซึ่งเป็นผลจากการที่ยาปฏิชีวนะทำให้เชื้อ *Leptospira* spp. แตกและปล่อยสารพิษต่างๆออกมาในร่างกายของผู้ป่วยพร้อมๆกันในปริมาณมากซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอยู่แล้วมีอาการป่วยมากขึ้นจนอาจเสียชีวิต ยิ่งกว่านั้นการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอาจไม่ได้ผลหากการรักษาล่าช้าในระยะที่เลยจากระยะเฉียบพลันไปแล้ว เพราะเชื้อ *Leptospira* spp. ไปหลบอยู่ตามอวัยวะต่างๆที่ยาปฏิชีวนะเข้าไปไม่ถึง เช่น ที่ไต สมอง ลูกตา เป็นต้น นอกจากนี้

ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจแพ้ยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะกลุ่มเพนิซิลลินซึ่งเป็น drug of choice และไม่สามารถใช้ยาดังกล่าวรักษาได้

เชื่อกันว่าภูมิคุ้มกันโรค leptospirosis เกิดจากแอนติบอดีและเป็นภูมิคุ้มกันที่มีความเฉพาะมาก กล่าวคือผู้ติดเชื้อกลุ่มใดหรือซีโรวาร์ใด เมื่อหายป่วยแล้วก็จะมีภูมิคุ้มกันเฉพาะต่อเชื้อกลุ่มนั้นหรือซีโรวาร์นั้นและอาจติดเชื้อกลุ่มอื่นหรือซีโรวาร์อื่นได้ใหม่อีก วัคซีนป้องกันโรค leptospirosis ในปัจจุบันมีเฉพาะสำหรับใช้ในสัตว์ เช่น สุนัข วัว-ควาย แต่ป้องกันได้เฉพาะเชื้อที่ตรงหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ใช้เตรียมวัคซีนเท่านั้น วัคซีนสำหรับป้องกันโรคฉี่หนูสำหรับคนและสัตว์อื่นๆยังไม่มี รวมทั้งวัคซีนที่มีก็มักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนอีกด้วย

ดังนั้นโครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว. โครงการนี้จึงได้เสนอการผลิตฮิวแมนไนซ์แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาล (humanized-monoclonal antibody) ต่อเชื้อ *Leptospira* spp. เพื่อใช้รักษาโรค leptospirosis แทนยาปฏิชีวนะ โดยเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลของหนูไมซ์ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ให้มีโครงสร้างเหมือนโมเลกุลอิมมิวโนกลอบูลินส์ (แอนติบอดี) ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังได้เสนอการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค leptospirosis ที่มีความสามารถในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ต่างสายพันธุ์อีกด้วย

ผู้วิจัยได้ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจากหนูไมซ์ (murine hybridomas) ซึ่งหลั่งโมโนโคลนาลแอนติบอดี (murine monoclonal antibody) เฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ด้วยเทคนิคไฮบริโดมา (hybridoma technology) และได้ใช้ immunoglobulin genes ของ hybridoma ดังกล่าวเพื่อผลิต humanized-murine monoclonal antibody ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยว (single chain variable fagment; huScFv) โดยการใช้เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจิเนียริงในการตัด DNA sequences ที่ encode murine complementarity determining regions (CDRs) จาก murine immunoglobulin genes แล้วนำไปต่อกับ human genes ที่ encode immunoglobulin VH และ VL frameworks ซึ่ง huScFv ที่ผลิตได้สามารถใช้รักษาโรค leptospirosis ใน *Leptospira*-infected- hamsters ได้ดีกว่า original murine monoclonal antibody เมื่อใช้น้ำหนักเท่ากัน และสามารถป้องกัน *in vitro Leptospira*-mediated hemolysis ได้ดี ดังนั้น huScFv ที่ผลิตได้จึงมีศักยภาพมากสำหรับการรักษา leptospirosis ในคนที่แพ้ยาปฏิชีวนะและในผู้ป่วยที่มีอาการเฉียบพลันรุนแรงเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด Jarisch-Herxheimer reaction

ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค two dimensional electrophoresis (2DE)-based-proteomics และ 2DE-immunomics ร่วมกับ bioinformatics เพื่อศึกษาหาโปรตีนของเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. (proteomes), immunomes, โปรตีนที่มีเฉพาะใน pathogenic *Leptospira* spp. และ *in vivo* expressed *Leptospira* antigens และได้คัดเลือก genes ที่ encode virulence factors (*in vivo*

expressed antigens) ต่างๆที่เป็น immunogenic proteins ของ pathogenic *Leptospira* spp. เพื่อใช้เป็น candidates สำหรับเตรียม broad spectrum leptospirosis vaccine ทั้งหมดแปด genes คือ *flaA, flaB1, ompL1, lipL32, hlyA, hlyB, tlyA* และ *hlpA* โดยได้ amplify genes ที่คัดเลือกทั้งแปด genes จาก genomic DNA ของ *Leptospira interrogans*, serogroup Icterohaemorrhagiae, serovar *copenhageni* จากนั้นได้ clone genes ทั้งแปด genes เข้าสู่ mammalian expression vector หลังจากได้ทดสอบการ express ของ genes ทั้งแปด genes ใน mammalian cells แล้ว ได้ใช้ recombinant plasmids ที่ carry *Leptospira* spp. genes เหล่านี้ในการ immunize หนู hamsters โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละสองโดส เว้นระยะเวลาระหว่างแต่ละโดส 14 วัน และใช้ empty plasmid และ phosphate buffered saline (PBS) เป็นวัคซีนหลอก (placebos) จากนั้นได้ challenged หนู hamsters ด้วย *Leptospira interrogans*, serogroup Pomona, serovar *Pomona* ซึ่งเป็น human clinical primary isolate (heterologous challenge) พบว่า 80% ของหนู hamsters ที่ได้รับ leptospirosis DNA vaccine ไม่ตายเมื่อได้รับเชื้อ *Leptospira* spp. จำนวนมากถึง 10 LD50 ส่วนหนู hamsters ที่ได้รับ empty plasmid DNA มีชีวิตรอด 46.6% เมื่อได้รับเชื้อ *Leptospira* spp. ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจาก innate immune response ต่อ foreign DNA ส่วนหนู hamsters ที่ได้รับเพียง PBS ตายทั้งหมดเมื่อได้รับเชื้อ *Leptospira* spp. ผลจากการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า DNA vaccine ที่สร้างจาก genes ทั้งแปด genes สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ต่างสายพันธุ์ได้ และมีศักยภาพที่ควรพัฒนาเพื่อนำไปใช้ป้องกันโรค leptospirosis ต่อไป

Abstract

Project Code: 468002

Project Title : Humanized monoclonal antibodies for leptospirosis immunotherapeutics and development of a broad spectrum leptospirosis vaccine

Investigators: Professor Dr. Wanpen Chaicumpa *et al.*

Affiliation : Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University

Email Address : tmwcc@mahidol.ac.th, tmwcc@yahoo.com

Project Period: 15 August 2003 to 14 August 2006

Human leptospirosis is a re-emerging zoonotic disease caused by bacteria of the family leptospiraceae, order Spirochaetales, genus *Leptospira.* Human gets infection through abraded skin, macerated skin or mucous membranes (e.g. oral, conjunctival), either directly by contact with infected/reservoir animals or their contaminated specimens, or indirectly by exposure to damp soil, mud, vegetation or fresh water seeded with the animal's urine or carcass. Human-to-human transmission is relatively rare. Human leptospirosis used to be recognized as an occupational disease with high incidence among veterinarians, abattoir workers, sewer workers and farmers. However, a number of cases were found among travelers to the disease endemic areas and individuals after various re-creational activities such as canoeing, swimming, hiking, and rafting.

Most *Leptospira* infections in humans are subclinical which can be retrospectively recognized by the presence of serum antibodies to the bacteria. A portion of infected individuals succumb different degrees of morbidity ranging from mild, flu-like symptoms, indistinguishable from other febrile illnesses, to acute and severe disease which often leads to rapid fatality of high rate. Human leptospirosis is usually manifested in two common forms, *i.e.* anicteric and icteric or Weil's disease. Anicteric leptospirosis is usually biphasic; the initial septicemic phase starts as early as one day or as late as one month post-*Leptospira*-exposure and is characterized by generalized leptospiremia. Symptoms including high fever, chill, cough, sudden onset of intense headache, muscular pain especially calf muscles, abdominal pain, conjunctival suffusion, blurred vision, and photophobia are common. An immune phase follows the septicemic phase about a week later and is characterized by appearance of specific antibodies and disappearance of leptospiremia although the bacteria still can be found in many tissues. Kidney, brain and

aqueous humor are immunological privilege sites for the *Leptospira* during the immune phase when the bacteria are excreted with the urine. Leptospiruria may last for several months. Icteric leptospirosis is a form of severe ailment with high mortality that occurs to a fraction of clinically infected individuals. In this form of the disease, several vital organs are affected leading not only to the previously mentioned clinical manifestations, but may also include vasculitis, jaundice, hemorrhage, myocarditis, aseptic meningitis, vascular collapse and/or hepatic and renal failure.

Acute leptospirosis responds well to antibiotic (penicillin and its derivatives) therapy especially when started early in the course of the illness. Ampicillin, amoxicillin, and doxycycline have been commonly used for mild anicteric form of the disease. Patients with severe anicteric and icteric leptospirosis are usually treated with intravenous penicillin, ampicillin, erythromycin or amoxicillin. Jarisch-Herxheimer reactions (JHR) due to bacterial toxic substances massively released from the antibiotic mediated-bacterial lysis occur in a fraction of the treated patients which may aggravate the clinical manifestations.

Immunity to leptospirosis is believed to be serogroup/serovar specific. Immunity acquired after an infection, either clinical or subclinical, is protective only to the serogroup or serovar matched with the previously infecting or antigenically related serogroup or serovar. Currently, vaccines are available only for prevention of canine and bovine leptospirosis of which the so-elicited immunity is limited to the infection caused by serogroups or serovars homologous to those in the vaccines. No vaccine is available for human or other veterinary use.

Thus the aims of this research were: (1) to produce a humanized-murine monoclonal antibody for treatment of acute leptospirosis as an alternative of antibiotics in order to avoid Jarisch-Herxheimer reaction and drug hypersensitivity in patients allergic to the antibiotics, and (2) to invent a prototype of a broad spectrum leptospirosis vaccine.

A murine hybridoma clone which secretes monoclonal antibody (MAb) specific to pathogenic *Leptospira* spp. was established by using conventional hybridoma technology. Genomic DNA of the hybridoma cells was used as a source of immunoglobulin genes for production of a humanized-murine monoclonal antibody specific to pathogenic *Leptospira* spp. in the form of single chain variable antibody fragment (huScFv). The gene sequences encoding complementarity determining regions (CDRs) of the murine VH and VL chains were molecularly grafted onto the respective immunoglobulin frameworks (FRs) of the most matched-human VH and VL chains. The humanized-murine single chain variable

fragments (huScFv) conferred neutralizing activity against both heterologous *Leptospira*-mediated-human red blood cell lysis *in vitro* and heterologous *Leptospira* infection *in vivo*. The preparation has high therapeutic potential as an alternative of antibiotics for human leptospirosis.

For the second part of research, we used two dimensional electrophoresis (2DE)-based-proteomics, 2DE-immunomics and bioinformatics to study proteomes, immunomes, proteins unique to pathogenic *Leptospira* spp. and *in vivo* expressed antigens of the bacteria. Information so-gained together with the data on the complete genomes of pathogenic *Leptospira* spp. deposited in the database were used to select a total of eight *Leptospira* genes as DNA vaccine candidates. These are: *flaA, flaB1, ompL1, lipL32, hlyA, hlyB, tlyA* and *hlpA*. Genomic DNA of *Leptospira interrogans,* serogroup Icterohaemorrhagiae, serovar *copenhageni* was used as a template to amplify the selected genes by PCR. The amplicons were individually cloned into a mammalian expression vector. Gene expression in mammalian cells was determined by transfecting COS-7 cells in an *in vitro* culture with individual recombinant plasmids. The recombinant plasmids were combined and used to intramuscularly immunize a group of four week old hamsters. A booster dose was given 14 days later. Hamsters of two control groups received injections of empty plasmids and phosphate buffered saline as placebos. All treated mice were then challenged with 10 LD50 of heterologous *Leptospira interrogans*, serogroup Pomona, serovar *pomona* which is a human clinical primary isolate (heterologous challenge). It was found that all hamsters injected with PBS died from the lethal *Leptospira* challenge. The *Leptospira* plasmid DNA vaccine conferred 80% protection to the immunized hamsters. The animals immunized with empty plasmids showed 46.6% survival which could be due to the innate immune response to the foreign DNA.

Our results indicate a good protective efficacy of the DNA vaccine against leptospirosis. This prototype DNA vaccine or its protein counterpart should be evaluated further in leptospirosis susceptible animals before trials on safety, tolerability, immunogenicity and protective efficacy are attempted in humans.