



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนโมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูไม่ซีให้มี
โครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์เพื่อใช้ในการ
รักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) และการพัฒนาวัคซีน
ป้องกันโรคฉี่หนูที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิด
จากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้

โดย ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา
(เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2546 - 2549)
และคณะ

14 สิงหาคม 2549



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนโมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูไมซ์ให้มี
โครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์เพื่อใช้ใน
การรักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) และการพัฒนาวัคซีน
ป้องกันโรคฉี่หนูที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิด
จากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้

โดย ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

(เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2546-2549)

และคณะ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปลี่ยนโมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูไมซีให้มี
โครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์เพื่อใช้ใน
การรักษาโรคมะเร็ง (เลปโตสไปโรซิส) และการพัฒนาวัคซีน
ป้องกันโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิด
จากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้

ผู้วิจัย : ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา
(เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2546-2549)

และคณะ

สังกัด : คณะสหเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ฝ่าย
สนับสนุนการวิจัยเชิงวิชาการ ประเภททุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย เมธีวิจัยอาวุโส สกว. รุ่นที่แปด
15 สิงหาคม พ.ศ. 2546 ถึง 14 สิงหาคม พ.ศ. 2549

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญเรื่อง	ii
สารบัญตาราง	xi
สารบัญภาพ	xiii
บทคัดย่อ	xxii
Abstract	xxv
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	xxviii
Executive Summary	xxxix
รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	1
โครงการเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา	
ระยะเวลาของโครงการ: 15 สิงหาคม 2546-14 สิงหาคม 2549	
เรื่อง: การเปลี่ยนโมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูเมาส์ให้มีโครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) และการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนูที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้	1
Humanized monoclonal antibodies for leptospirosis immunotherapeutics and development of a broad spectrum leptospirosis vaccine	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	2
ระเบียบวิธีวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัยและระเบียบวิธีวิจัย	3
งานวิจัยส่วนที่หนึ่ง: การผลิตอิมมูโนโกลบูลินส์โมโนโคลนาลแอนติบอดี (HuMAb) ต่อ <i>Leptospira</i> spp.	3
ขอบเขตและระเบียบวิธีวิจัยของการวิจัยส่วนที่หนึ่ง	4
Experiment Outline	4
รายละเอียดการดำเนินการและผลการวิจัยของส่วนที่หนึ่ง	8
ขั้นตอนที่หนึ่งของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	8
การผลิต murine hybridomas เฉพาะต่อ pathogenic <i>Leptospira</i>	8
1.1 การเพาะเลี้ยง <i>Leptospira</i> spp.	8
1.2 การ harvest เชื้อ <i>Leptospira</i> spp.	9

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1.3 การเตรียม <i>Leptospira</i> homogenates เพื่อวิเคราะห์หา proteomics ของเชื้อ และเพื่อใช้เป็นแอนติเจนใน immunoassays ต่างๆ	9
1.4 การผลิต murine hybridomas ซึ่ง secrete monoclonal antibodies เฉพาะ ต่อ <i>Leptospira</i> spp.	10
1.4.1 การ immunize หนู BALB/c mice	10
1.4.2 Cell hybridization ระหว่าง spleen cells ของหนูที่ immunized ไว้ด้วย <i>Leptospira</i> antigen และ myeloma cells เพื่อสร้าง hybridomas	10
1.5 Protection tests เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของ MAb ในการ neutralize <i>Leptospira</i> activities	13
1.5.1 Hemolysis inhibition test (<i>in vitro</i>)	13
วัสดุและขั้นตอนการทดสอบ	13
การเตรียมเชื้อ <i>Leptospira</i> spp.	13
การเตรียม washed red blood cells	13
การเตรียม reaction mixtures	13
การทดสอบ neutralizing activity ของ MAbLPF1 (hemolysis inhibition test)	14
1.5.2. <i>In vivo</i> neutralization test	14
การเลือก <i>Leptospira</i> serovar ซึ่งมี virulence สูงสุดใน hamsters	14
การ infect หนู hamsters ด้วย <i>Leptospira</i>	14
การทดสอบประสิทธิภาพของ MAbLPF1 ในการ neutralize <i>Leptospira</i> serovar bangkok ไม่ให้ก่อพยาธิสภาพในหนู hamsters	18
ขั้นตอนที่สองของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	24
การเพาะเลี้ยง hybridoma ซึ่ง secrete monoclonal antibodies เฉพาะต่อ pathogenic <i>Leptospira</i> และ control myeloma (P3x-63-Ag8.653) การสกัด total RNA การเตรียม mRNA และการทำ RT-PCR เพื่อเตรียม cDNA ที่จะใช้เป็น template สำหรับการเตรียม murine VH- and VL- amplicons	24
2.1 การสกัด total RNA จาก hybridoma LPF1 และ P3x-63-Ag 8.653 myeloma cells	24
2.2 การสกัดแยก mRNA	25
2.3 การเตรียม first strand cDNA	25
2.4 การ amplify VH และ VL DNA	28

สารบัญเรื่อง

หน้า

ขั้นตอนที่สามของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	34
การ clone VH และ VL gene segments เข้าสู่ vector, การ clone vector เข้าสู่ <i>E. coli</i> และการตรวจความถูกต้องของ VH- และ VL- amplicons	34
3.1 การ purify amplicons	34
3.2 การวัดปริมาณ DNA amplicons	34
3.3 การคำนวณ optimum concentration ของ DNA ที่จะ insert กับ vector pGEM [®] -T vector system	34
3.4 Ligation reaction	35
3.5 การ transform recombinant vector เข้าสู่ host cells	38
3.6 การ screen หา <i>E. coli</i> ซึ่ง carry recombinant plasmids	38
ขั้นตอนที่สี่ของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	42
การเชื่อม VH- และ VL- DNA segments เข้าด้วยกันและการสร้าง phage library ที่ display murine VH-linker VL (muScFv) อยู่บนผิวของ phages	42
4.1 การเชื่อม linkers เข้ากับ VH และ VL DNA segments เพื่อเพิ่มความยาวของ VH และ VL DNA segments	42
4.2 การต่อ EVH และ EVL เป็น single chain Fv ของ murine monoclonal antibody LPF1 (<i>muscFv</i>)	42
4.3 การ clone <i>muscFv</i> fragment เข้าสู่ phagemid	45
a. การ purify <i>muscFv</i> amplicons จากข้อ (4.2) เพื่อกำจัด impurity	45
b. การตัด <i>muscFv</i> ด้วย restriction enzyme	45
c. การ ligate <i>SfiI</i> , <i>NotI</i> digested <i>muscFv</i> กับ pCANTAB5E phagemid	45
4.4 การ transform <i>E. coli</i> ด้วย <i>muscFv</i> recombinant phagemid	45
การเตรียม competent <i>E. coli</i>	47
4.5 การนำ <i>muscFv</i> recombinant phagemid เข้าสู่ competent <i>E. coli</i>	47
ขั้นตอนที่ห้าของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	50
การเลือก transformed (recombinant) <i>E. coli</i> clones ซึ่ง harbour <i>muscFv</i> - phagemids	50
5.1 การ Rescue antibody phage library	50
5.2 Panning เพื่อการคัดเลือก phages ซึ่งมี muScFv เฉพาะต่อ <i>Leptospira</i> antigen อยู่บนผิว	50
5.2.1 การตกตะกอน phages	50

สารบัญเรื่อง

	หน้า
5.2.2 การเตรียม phages ก่อนทำ panning	50
5.2.3 การเตรียม immobilized <i>Leptospira</i> antigen	50
5.2.4 การทำ panning	51
5.2.5 การ transfect <i>E. coli</i> TG1 ด้วย antigen specific phages	51
5.3 การ screen หา high affinity phage clones	51
5.3.1 การทำ phage ELISA	53
ก. การเตรียม phage suspension	53
ข. Phage indirect ELISA	53
ขั้นตอนที่หกของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	56
การเตรียม murine single chain variable antibody fragments (muScFv)	56
6.1 การผลิต recombinant murine ScFv protein (muScFv)	56
6.2 การทำ Hemolysis inhibition test เพื่อทดสอบ neutralizing capacity ของ crude murine ScFv (muScFv)	56
ขั้นตอนที่เจ็ดของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	58
Murine VH- and VL- alignment with human VH and VL sequences in the database in order to select the most matched-human immunoglobulin frameworks	58
7.1 Amplification of high affinity <i>muscFv</i> จาก transfected <i>E. coli</i> TG1 clones	58
7.2 การตรวจสอบ diversity ของ <i>muscFv</i> โดย <i>MvaII</i> enzyme	58
7.3 DNA sequencing of <i>muscFv</i>	61
7.4 การเลือก human immunoglobulin frameworks (FRs) ที่ใกล้เคียงกับ muScFv immunoglobulin frameworks มากที่สุด	61
7.4.1 การ confirm species ของ VH/VL จาก transfected <i>E. coli</i> clone number 30	61
7.4.2 CDRs identification	67
7.4.3 การเลือก human immunoglobulin frameworks ที่มี homology กับ murine VH/VL มากที่สุด	71
ขั้นตอนที่แปดของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง: การสร้าง humanized scFv	72
8.1 การ design humanized VH	72
8.2 การ design humanized VL	72

สารบัญเรื่อง

	หน้า
8.3 การ amplify human VH frameworks	72
8.4 การสร้าง humanized VH segment	78
8.4.1 การสร้าง humanized VH DNA segments 4 segments	78
8.4.2 การเชื่อมต่อ DNA segments ทั้ง 4 segments ของ humanized VH	84
8.5 การสร้าง humanized VL segment	90
8.5.1 การสร้าง 4 segments ของ VL sequence	90
8.6 การสร้าง humanized scFv segment	100
ขั้นตอนที่เก้าของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:	103
การ clone humanized scFv fragment เข้าสู่ phagemid vector	103
9.1 การ clone humanized scFv fragment	103
9.2 การคัดเลือก transformed <i>E. coli</i> clones ซึ่ง carry huscFv-phagemids และการ express huScFv protein	103
9.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ humanized ScFv protein (huScFv) ฯ	106
9.4 การนำ huScFv-phagemid harboring <i>E. coli</i> clone D4 ซึ่งให้ % hemolysis inhibition สูงสุด ไป induce <i>in vivo</i> huScFv expression	108
9.4.1 HuScFv expression จาก selected transfected <i>E. coli</i> clone	108
9.4.2 การสกัด crude huScFv protein ออกจาก <i>E. coli</i> cells	108
9.4.3 การ purify huScFv protein ออกจาก crude preparation	109
9.5 การตรวจสอบ purity ของ huScFv	109
ขั้นตอนที่สิบของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง: Characterization of HuScFv	114
10.1 การทดสอบ antigenic specificity ของ huScFv protein	114
10.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ huScFv protein ในการ neutralize <i>Leptospira</i> mediated-hemolysis	116
10.3 การทดสอบ protective efficacy ของ huScFv เปรียบเทียบกับ original LPF1 MAbs	116
10.3.1 การหา Lethal dose 50 (LD50) ของ <i>Leptospira interrogans</i> , serogroup Pomona, serovar pomona ซึ่งเป็น human primary isolate ใน หนูแฮมสเตอร์	116
10.3.2 <i>In vivo</i> neutralizing activity of huScFv	116
สรุปผลของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง	121

สารบัญเรื่อง

	หน้า
งานวิจัยส่วนที่สอง :	122
การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ (Development of a broad spectrum leptospirosis vaccine)	122
Experimental Outline	122
รายละเอียดของงานวิจัยส่วนที่สองและผลการวิจัย	126
2.1 การเพาะเลี้ยง <i>Leptospira</i> spp.	126
2.2 การเตรียม <i>Leptospira</i> whole cell homogenates และการนำ homogenates ไปแยกด้วย two dimensional gel electrophoresis (2DE) เพื่อศึกษา proteomes	126
2.2.1 การเตรียม <i>Leptospira</i> whole cell homogenates	126
2.2.2 Two dimensional gel electrophoresis (2DE) of <i>Leptospira</i> whole cell homogenates	126
ก. First dimensional electrophoresis (isoelectric focusing; IEF)	126
ข. Second dimensional gel electrophoresis (SDS-PAGE)	127
2.3 แอนติบอดีและซีรัมที่ใช้ศึกษาหาโปรตีนที่ unique ต่อ pathogenic <i>Leptospira</i> spp./ <i>Leptospira</i> spp. immunome/ <i>in vivo</i> expressed antigens of <i>Leptospira</i> spp.	153
2.3.1 Murine monoclonal antibodies	153
2.3.2 Mouse immune serum	153
2.3.3 ซีรัมของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสทั้งระยะ acute และ convalescence	153
2.3.4 ซีรัมของผู้ป่วยมีไข้โรคอื่นๆ	153
2.3.5 ซีรัมของคนปกติใน leptospirosis endemic area	153
2.4 และ 2.5 2DE-Western blot analysis (2DE-immunoblotting) to identify proteins unique to pathogenic <i>Leptospira</i> spp. (proteins containing specific epitopes of MAbLPF1 และ MAbLPF2), immunome of pathogenic <i>Leptospira</i> spp. และ <i>in vivo</i> expressed antigens ของ <i>Leptospira</i> spp.	154
2.4.1 การศึกษา epitope ของ MAbLPF1 และ MAbLPF2 ซึ่งเป็น epitopes ที่พบใน pathogenic <i>Leptospira</i> spp. เท่านั้น	154

สารบัญเรื่อง

	หน้า
2.4.2 การศึกษา immunome ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp. โดย 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp. และ immune mouse serum	169
2.4.3 การศึกษาหา <i>in vivo</i> expressed antigens of pathogenic <i>Leptospira</i> spp.	169
2.6 Broad spectrum leptospirosis vaccine(s)	189
2.6.1 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ของแต่ละ gene ที่สำคัญของเชื้อ <i>Leptospira</i> เพื่อใช้เป็น DNA vaccine หรือผลิต recombinant <i>Leptospira</i> proteins เพื่อใช้เป็น protein vaccine	189
การสกัด Genomic DNA ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp.	189
การเพิ่มปริมาณ DNA ของแต่ละ gene ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp.	192
การ clone ชิ้นส่วน DNA เข้าใน pUC19 vector	199
การตัด pUC19 vector และ DNA amplicons ด้วย restriction enzymes	199
การ ligate ชิ้นส่วน amplicons เข้าสู่ pUC19 vector	199
การทำ Transformation	199
การตรวจสอบหา transformant ที่มี recombinant vector	199
2.6.2 การ construct DNA sequences เพื่อใช้เป็น DNA vaccine candidates	204
ก. การเลือก <i>Leptospira</i> gene candidates	204
ข. การออกแบบ primers เพื่อ amplify DNA vaccine candidate genes จากเชื้อ <i>Leptospira</i>	204
ค. การเตรียม <i>Leptospira</i> genomic DNA เพื่อใช้เป็น template	206
ง. การ amplify DNA gene segments	206
จ. การ clone DNA segments เข้าเก็บใน pGEM-T Easy Vector	206
จ.1 การเตรียมชิ้นส่วน DNA (amplicons) ให้บริสุทธิ์	206
จ.2 การ ligate ชิ้น DNA เข้าสู่ pGEM-T vector	206
จ.3 การนำ vector เข้าสู่ competent <i>E. coli</i>	216
จ.4 การ screen หา positive clones	216
2.6.3 การ subclone <i>Leptospira</i> vaccine candidate genes เข้าสู่ pcDNA3.1[+] vector	218
2.6.3.1 การตรวจสอบ positive <i>E. coli</i> clones	218

สารบัญเรื่อง

	หน้า
ผลการคัดเลือก positive clones	218
2.6.3.2 การเตรียม recombinant pcDNA 3.1(+) plasmid	223
ก. การเตรียม Recombinant <i>E. coli</i>	223
ข. การสกัด pcDNA plasmid	223
2.6.3.3 การทำ ex vivo transfection	226
ก. การเตรียม COS-7 cells	226
ข. การเตรียม plasmid DNA	226
ค. การทำ plasmid transfection เข้าสู่ COS-7 cells	226
ง. การตรวจสอบการผลิต recombinant protein จาก COS-7 cells	226
จ. การตรวจสอบผลการทำ transfection ด้วย RT-PCR	226
2.6.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ DNA vaccine	229
สรุปผลการวิจัยส่วนที่สอง	231
Selected References	232
Output ของโครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา	236
I. การตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติที่มี peer review	236
II. Manuscripts submitted for publication and manuscripts in preparation	239
III. จำนวนนักศึกษาที่จบการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาโดยใช้ทุนวิจัยจากโครงการเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ทั้งหมดหรือส่วนหนึ่ง	241
IV. จำนวนนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่กำลังศึกษาและอยู่ภายใต้การควบคุมการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ของ ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา (เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2546-2549)	243
V. ผู้ร่วมวิจัยได้เลื่อนตำแหน่งวิชาการหรือกำลังอยู่ระหว่างการขอเลื่อนตำแหน่งทางวิชาการ	244
VI. การจัดประชุมเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา จำนวน 3 ครั้ง	244
VII. เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา เป็น mentor ให้นักวิจัยหลังปริญญาเอกเฉพาะที่ได้รับทุนจาก สกว. ดังนี้	245
VIII. การเผยแพร่ผลการวิจัยสู่ประชาชน	245
IX. นักศึกษาหลักสูตร Ph. D. (Biomedical Sciences) หลักสูตรนานาชาติจำนวนห้าคน เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ RGJ Congress ครั้งที่ 6 และ 7 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์มบีช รีสอร์ท เมืองพัทยา และได้รับรางวัลการเสนอผลงานดีเด่นทั้ง 5 คนคือ	246

สารบัญเรื่อง

	หน้า
X. เป็นเจ้าภาพจัดประชุมวิชาการนานาชาติ 11 th Asian Conference on Diarrheal Diseases and Nutrition (11 th ASCODD) ที่โรงแรมรามารการ์เด็นท์ กรุงเทพฯ ระหว่าง 8-10 มีนาคม 2549	247
XI. การเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ	247
XII. งานอื่นๆของเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา	248
Time Frame ของงานวิจัยในส่วนที่หนึ่ง	250
Time Frame ของงานวิจัยในส่วนที่สอง	251
รายงานการเงิน	252

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1: ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ MAbLPF1 ในการยับยั้งการเกิด hemolysis โดยเชื้อ <i>Leptospira</i>	15
ตารางที่ 1.2: รอยโรคในอวัยวะต่างๆของหนู hamsters ซึ่งถูกฉีดด้วย <i>Leptospira</i> serovars ต่างๆ เข้าช่องท้อง	17
ตารางที่ 1.3: พยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆและจำนวน <i>Leptospira</i> ในเลือดของ hamsters ทั้งสามกลุ่มในวันที่ 10 และ 28 หลัง treatment เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 4 (กลุ่มควบคุมลบ)	19
ตารางที่ 1.4: แสดงผลการสกัด total RNA จาก LPF1 และ P3x-63-Ag 8.563	26
ตารางที่ 1.5: Mixture ในการสังเคราะห์ cDNA	29
ตารางที่ 1.6: แสดง sequences ของ primers ที่ใช้ amplify VH และ VL segments	31
ตารางที่ 1.7: PCR reaction condition สำหรับการ amplify VH และ VL genes	32
ตารางที่ 1.8: Representative results of VH and VL DNA purification	36
ตารางที่ 1.9: Ligation reaction mixtures	37
ตารางที่ 1.10: Primer sequences (Cheng <i>et al.</i> , 2003) สำหรับ amplify VH และ VL เพื่อเพิ่มความยาวของสาย VH และ VL DNA segments	43
ตารางที่ 1.11: แสดงค่า optical densities ของ phage indirect ELISA เปรียบเทียบระหว่าง <i>Leptospira</i> antigen- and BSA- coated- plates	54
ตารางที่ 1.12: แสดงประสิทธิภาพการยับยั้ง hemolysis ซึ่งเกิดจากเชื้อ <i>Leptospira</i> โดย crude recombinant murine ScFv (muScFv) จาก transfected <i>E. coli</i> clones ต่างๆและ <i>MvaII</i> digested patterns ของ <i>muscFv</i> carrying phage clones	57
ตารางที่ 1.13: แสดงลำดับ nucleotide sequences ของ primers เพื่อ amplify <i>muscFv</i> DNA ใน transfected <i>E. coli</i> clones	59
ตารางที่ 1.14: Peptides ของ CDRs ของ muScFv	70
ตารางที่ 1.15: แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR เพื่อการ amplify human VH และ human VL DNA segments	75
ตารางที่ 1.16: แสดง conditions ของ PCR ในการ amplify human VH และ human VL segments	76

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.17: แสดง numbers ของ selected <i>E. coli</i> clones ซึ่ง harbor <i>huscFv</i> -phagemid (<i>huscFv</i> phagemid transformed <i>E. coli</i> clones)	105
ตารางที่ 1.18: แสดงประสิทธิภาพของ crude preparation ของ humanized ScFv (<i>huScFv</i>) ในการ neutralize <i>Leptospira</i> mediated-hemolysis	107
ตารางที่ 1.19: แสดง % survival ของหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อ <i>Leptospira interrogans</i> , serogroup Pomana, serovar <i>pomona</i> จำนวนต่างๆ กันฉีดเข้าช่องท้อง	118
ตารางที่ 2.1: แสดง orthologous proteins ของโปรตีน spots no. 1-22 ของเชื้อ <i>L. borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> (รูปที่ 2.14b)	143
ตารางที่ 2.2: แสดง estimated <i>Mr</i> และ estimated <i>pI</i> ของ <i>in vivo</i> expressed antigens จากการทำ 2DE-immunoblotting ของเชื้อ <i>L. borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 30 µg แยกโดยใช้ Immobiline™ DryStrip pH 5.3–6.5 กับซีรัมผู้ป่วยโรค leptospirosis เปรียบเทียบกับซีรัมของผู้ป่วยโรคอื่น (รูปที่ 2.34-2.37)	179
ตารางที่ 2.3: แสดง Protein orthologs in database ของโปรตีนจาก gel plugs no. 1-13 ของรูปที่ 2.34-2.36	180
ตารางที่ 2.4: แสดงรายการ genes ของ <i>Leptospira</i> ที่ได้ออกแบบ primers มาเพิ่มปริมาณ DNA สำหรับการ clone เพื่อจะใช้เป็น DNA vaccine และ express เพื่อใช้เป็น peptide vaccine ต่อไป	190
ตารางที่ 2.5: Annealing temperatures ที่เหมาะสมสำหรับการ amplify <i>Leptospira</i> gene แต่ละ gene	193
ตารางที่ 2.6: แสดง restriction sites ที่เติมลงบน 5' และ 3' ของแต่ละ gene ใน PCR	200
ตารางที่ 2.7: ส่วนผสมของการเกิดปฏิกิริยาการตัด DNA amplicons และ pUC19	201
ตารางที่ 2.8: Selected gene candidates for broad spectrum leptospirosis DNA vaccine	205
ตารางที่ 2.9: แสดง optimum annealing temperature สำหรับ PCR เพื่อ amplify DNA sequence ของแต่ละ <i>Leptospira</i> gene	207
ตารางที่ 2.10: Selected <i>Leptospira</i> genes as vaccine candidates	219
ตารางที่ 2.11: แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา DNA ligation	220
ตารางที่ 2.12: ปริมาณ pcDNA plasmids ที่สกัดได้จากการเลี้ยง <i>E. coli</i> clones ในอาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งลิตร	224

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1: Western blot patterns of MAbLPF1, MAbLPF2 and MAbLPF3 to SDS-PAGE separated-whole cell homogenates ของ <i>Leptospira</i> spp., serovars (heterologous) <i>copenhageni</i> (A) and (homologous) <i>icterohaemorrhagiae</i> (B)	12
รูปที่ 1.2: Results of hemolysis test	16
รูปที่ 1.3: แสดงพยาธิสภาพของตับของหนู hamster ที่เกิดจาก Leptospirosis (hepatomegaly and hemorrhage) (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ negative control (ขวา)	20
รูปที่ 1.4: แสดงพยาธิสภาพของไตของหนู hamster (slight enlargement) ที่เกิดจาก Leptospirosis (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ negative control (ขวา)	21
รูปที่ 1.5: แสดงพยาธิสภาพของปอดของหนู hamster (hemorrhage) ที่เกิดจาก Leptospirosis (ขวา) เปรียบเทียบกับ negative control (ซ้าย)	22
รูปที่ 1.6: แสดงพยาธิสภาพ (splenomegaly) ของม้ามของหนู hamster ที่เกิดจาก Leptospirosis (บน) เปรียบเทียบกับ negative control (ล่าง)	23
รูปที่ 1.7: Integrity of total RNA of LPF1 และ P3x-63-Ag-8.563 separated in 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining	27
รูปที่ 1.8: cDNA ที่เตรียมได้จาก mRNA เห็นเป็น smear band ใน 1% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide	30
รูปที่ 1.9: แสดง VH และ VL DNA amplicons	33
รูปที่ 1.10: Plasmid profile ของ LPF1 VH ซึ่ง extracted จาก transformed <i>E. coli</i> แยกโดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide	39
รูปที่ 1.11: Plasmid profile ของ LPF1 VL ซึ่ง extracted จาก transformed <i>E. coli</i> แยกโดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide	40
รูปที่ 1.12: Plasmid profile ของ pGEM [®] -T vector ซึ่ง extract จาก transformed <i>E. coli</i> แยกโดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide	41
รูปที่ 1.13: EVH และ EVL amplicons at ~550 bp และ ~400 bp ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ VH และ VL amplicons	44
รูปที่ 1.14: แสดง muscFv DNA ก่อนและหลัง purified และภายหลังตัดด้วย <i>Sfi</i> I และ <i>Not</i> I	46
รูปที่ 1.15: SOBAG plates with transformed <i>E. coli</i> colonies	48

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.16: PCR amplicon ของ muscFv DNA จาก phagemid isolated from transformed <i>E. coli</i> TG1	49
รูปที่ 1.17: แสดง colonies ของ transfected <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่จะใช้ผลิต muScFv protein	52
รูปที่ 1.18: แสดงผลของ phage ELISA เพื่อตรวจหา muscFv-phagemid transfected <i>E. coli</i> clones	55
รูปที่ 1.19: แสดง DNA patterns ต่างๆเมื่อตัด muscFv amplicons จาก transfected <i>E. coli</i> clones ด้วย <i>Mva</i> I	60
รูปที่ 1.20: Nucleotide and deduced amino acid sequences of muscFv from transfected <i>E. coli</i> clone no. 30 (VH and VL sequences linked via polynucleotide linker)	62
รูปที่ 1.21: ผลการ blast ScFv ของ transfected <i>E. coli</i> clone no. 30 (VH amino acid sequence) กับ NCBI database	63
รูปที่ 1.22: Amino acid sequence alignment between VH of transfected <i>E. coli</i> clone no. 30 and the highest homology murine sequence from database	64
รูปที่ 1.23: Result of NCBI BLAST between amino acid sequence of VL of transfected <i>E. coli</i> clone no. 30 with murine VL in NCBI database	65
รูปที่ 1.24: Amino acid sequence alignment between VL of transfected <i>E. coli</i> clone no. 30 and the highest homology murine VL sequence from database	66
รูปที่ 1.25: CDR identification of murine ScFv VH segment	68
รูปที่ 1.26: CDR identification of murine ScFv VL segment	69
รูปที่ 1.27: เปรียบเทียบ amino acid sequences ของ murine VH, human VH และ humanized murine VH	73
รูปที่ 1.28: เปรียบเทียบ amino acid sequences of murine VL, human VL และ humanized-murine VL	74
รูปที่ 1.29: แสดง PCR amplicons ของ human VH และ human VL segments	77
รูปที่ 1.30: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized VH DNA segment เส้นที่ 1	79

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.31: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VH</i> DNA segment เส้น ที่ 2	80
รูปที่ 1.32: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VH</i> DNA segment เส้น ที่ 3	81
รูปที่ 1.33: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VH</i> DNA segment เส้น ที่ 4	82
รูปที่ 1.34: PCR amplicons of humanized <i>VH</i> segments 1-4	83
รูปที่ 1.35: แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ humanized <i>VH</i> segments เส้นที่ 1, 2, 3 และ 4 ให้เป็น humanized <i>VH</i> segment	85
รูปที่ 1.36: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VH</i> segment ที่ 1 ต่อ กับ <i>VH</i> segment ที่ 2 (segment 1+2)	86
รูปที่ 1.37: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VH</i> segment เส้นที่ 3 ต่อกับ <i>VH</i> segment เส้นที่ 4 (segment 3+4)	87
รูปที่ 1.38: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VH</i> segment 1+2 ต่อ กับ <i>VH</i> segment ที่ 3+4 (humanized <i>VH</i> segment)	88
รูปที่ 1.39: แสดง PCR amplicons ของ human <i>VH</i> segments 1+2, 3+4 และ humanized <i>VH</i>	89
รูปที่ 1.40: แสดง PCR amplicon ของ humanized <i>VL</i> segment ที่ 1	91
รูปที่ 1.41: แสดง PCR amplicon ของ humanized <i>VL</i> segment ที่ 2 และ 3	92
รูปที่ 1.42: แสดง PCR amplicon ของ humanized <i>VL</i> segment เส้นที่ 4	93
รูปที่ 1.43: แสดง PCR amplicons ของ humanized <i>VL</i> segments 1-4 เปรียบเทียบ กัน	94
รูปที่ 1.44: แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ humanized <i>VL</i> segments ทั้ง 4 segments ให้ เป็น humanized <i>VL</i> segment	95
รูปที่ 1.45: แสดง gradient PCR amplicon ของ humanized <i>VL</i> segment 1+2	96
รูปที่ 1.46: แสดง gradient PCR amplicon ของ humanized <i>VL</i> segment 3+4	97
รูปที่ 1.47: แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized <i>VL</i> segment	98
รูปที่ 1.48: แสดง PCR amplicons ของ humanized <i>VL</i> segments 1+2, 3+4 และ humanized <i>VL</i>	99
รูปที่ 1.49: แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ humanized <i>VH</i> และ <i>VL</i> segments เข้าด้วยกัน โดย SOE-PCR ให้เป็น humanized-murine <i>scFv</i>	101

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.50: แสดง gradient SOE-PCR amplicons ของ humanized scFv segment	102
รูปที่ 1.51: แสดง huscFv-phagemid transformed <i>E. coli</i> clones or SOBAG plate	104
รูปที่ 1.52: Elution profiles (0-0.5 M NaCl) ของ crude huScFv จาก ion-exchange column chromatography	110
รูปที่ 1.53: SDS-PAGE and Silver stain fractions ของ crude huScFv จาก ion-exchange column chromatography	111
รูปที่ 1.54: SDS-PAGE patterns of various huScFv preparations stained by Silver stain	112
รูปที่ 1.55: แสดง location of huScFv ใน SDS-PAGE gel probed ด้วย anti-E-Tag-HRP	113
รูปที่ 1.56: แสดง antigenic specificity ของ huScFv protein ต่อแอนติเจนของ pathogenic <i>Leptospira</i> whole cell homogenate เปรียบเทียบกับ original monoclonal antibody LPF1 โดย Western blot analysis พบว่า ทั้งสอง preparations มีความเฉพาะต่อแอนติเจน ~36.5 kDa เหมือนกัน	115
รูปที่ 1.57: แสดงประสิทธิภาพของ murine MAbLPF1 (20 µg), murine ScFv (20 µg) และ huScFv (20 µg) ในการยับยั้ง <i>Leptospira</i> (1.5HD50 และ 3.0HD50) mediated-hemolysis	117
รูปที่ 1.58: แสดง LD50 ของเชื้อ <i>Leptospira interrogans</i> , serogroup Pomona, serovar pomona ในหนูแฮมสเตอร์	119
รูปที่ 1.59: แสดงผล <i>in vivo</i> protection test เมื่อรักษาหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับเชื้อ <i>Leptospira</i> ด้วย MAbLPF1 และ huScFv (100 µg antibody per dose ฉีดเข้าช่องท้องที่ 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง post-infection ด้วย 1000 LD50 ของ <i>Leptospira</i> spp.) เปรียบเทียบกับกลุ่ม positive และ negative controls ซึ่งได้รับเชื้อ <i>Leptospira</i> และ PBS ตามลำดับ	120
รูปที่ 2.1: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar canicola ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	128
รูปที่ 2.2: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar copenhageni ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	129

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.3: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>hardjo</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	130
รูปที่ 2.4: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>hebdomadis</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	131
รูปที่ 2.5: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	132
รูปที่ 2.6: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>pyrogenes</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	133
รูปที่ 2.7: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>andamana</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Silver stain	134
รูปที่ 2.8: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>copenhageni</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue	135
รูปที่ 2.9: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue	136
รูปที่ 2.10: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>poi</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue	137
รูปที่ 2.11: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>andamana</i> ซึ่งแยกโดย two dimensional-gel electrophoresis (2DE) และย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue	138
รูปที่ 2.12: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 240 µg แยกใน first dimension โดยใช้ IPG strip pH 5.3-6.5 และ second dimension โดยใช้ 12.5% polyacrylamide gel แล้วย้อมด้วย Silver stain	139

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.13: Proteome ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> แยกใน first dimension โดยใช้ IPG strip pH 5.3-6.5 และ second dimension โดยใช้ 12.5% polyacrylamide gel แล้วย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250	140
รูปที่ 2.14: 2DE-proteomic pattern ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>Leptospira borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 60 µg แยก IEF โดยใช้ IPG strip non-linear pH 3-10 และแยกใน SDS-PAGE 12.5% gel หลังจากนั้นย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue (รูป a) ส่วนในรูป b แสดง gel spots numbers 1-22 ที่นำไป generate peptide mass fingerprints โดย LC/MS แล้ว identify peptides (proteins) โดย bioinformatics	142
รูปที่ 2.15: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>canicola</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>canicola</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF1	155
รูปที่ 2.16: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>copenhageni</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>copenhageni</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF1	156
รูปที่ 2.17: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>hardjo</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>hardjo</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF1	157
รูปที่ 2.18: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF1	158
รูปที่ 2.19: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>pyrogenes</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>pyrogenes</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF1	159

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.20: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>andamana</i> (non-pathogenic) probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อเป็น negative control	160
รูปที่ 2.21: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>canicola</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>canicola</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF2	161
รูปที่ 2.22: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>copenhageni</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>copenhageni</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF2	162
รูปที่ 2.23: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>hardjo</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>hardjo</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF2	163
รูปที่ 2.24: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF2	164
รูปที่ 2.25: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>pyrogenes</i> probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อแสดงโปรตีนของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>pyrogenes</i> ที่มี epitope ของ MAbLPF2	165
รูปที่ 2.26: 2DE-immunoblotting ระหว่าง 2DE-separated-whole cell homogenate ของ <i>Leptospira biflexa</i> ., serovar <i>andamana</i> (non-pathogenic) probed ด้วย MAbLPF1 เพื่อเป็น negative control	166
รูปที่ 2.27: แสดงโปรตีนของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>L. interrogans</i> , serogroup Icterohaemorrhagiae, serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ปริมาณ 60 µg แยก IEF ใน IPG strip non-linear pH 3-10 และ SDS-PAGE ใน 12.5% polyacrylamide gel ที่ react กับ MAbLPF1 (รูป a) และ MAbLPF2 (รูป b)	167

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.28: แสดงโปรตีนใน whole cell homogenate ของเชื้อ <i>L. interrogans</i> , serogroup Icterohaemorrhagiae, serovar <i>copenhageni</i> ปริมาณ 60 µg แยก IEF ใน IPG strip non-linear pH 3-10 และ SDS-PAGE ใน 12.5% polyacrylamide gel ที่ react กับ MAbLPF1 (รูป a) และ MAbLPF2 (รูป b)	168
รูปที่ 2.29: Immunome ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่ง revealed โดย immune mouse serum	170
รูปที่ 2.30: <i>In vivo</i> expressed antigens ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่ง revealed โดย pooled convalescence sera ของผู้ป่วย leptospirosis (Pool 1)	171
รูปที่ 2.31: <i>In vivo</i> expressed antigens ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp. serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่ง revealed โดย pooled convalescence sera ของผู้ป่วย leptospirosis (Pool 2)	172
รูปที่ 2.32: <i>In vivo</i> expressed antigens ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่ง revealed โดย pooled convalescence sera ของผู้ป่วย leptospirosis (Pool 3)	173
รูปที่ 2.33: Components ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp., serovar <i>icterohaemorrhagiae</i> ซึ่ง revealed โดย normal human serum pool	174
รูปที่ 2.34: 2DE-immunomic patterns (<i>In vivo</i> expressed antigens) ของ whole cell homogenate ของ เชื้อ <i>L. borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 30 µg แยกโดยใช้ Immobiline™ DryStrip pH 5.3–6.5 และ 12.5 % polyacrylamide gel	175
รูปที่ 2.35: 2DE-immunomic pattern (<i>In vivo</i> expressed antigens) ของ whole cell homogenate ของ เชื้อ <i>L. borgpetersenii</i> serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 30 µg แยกโดยใช้ Immobiline™ DryStrip pH 5.3–6.5 และ 12.5 % polyacrylamide gel	176
รูปที่ 2.36: 2DE-immunomic pattern (<i>In vivo</i> expressed antigens) ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>L. borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 30 µg แยกโดยใช้ Immobiline™ DryStrip pH 5.3–6.5 และ 12.5% acrylamide gel	177

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.37:	2DE-immunomic pattern ของ whole cell homogenate ของเชื้อ <i>L. borgpetersenii</i> , serogroup Tarassovi, serovar <i>tarassovi</i> ปริมาณ 30 µg แยกโดยใช้ Immobiline™ DryStrip pH 5.3–6.5 และ 12.5% acrylamide gel	178
รูปที่ 2.38:	แสดง 16S RNA amplicon ที่ได้จากการใช้ genomic DNA ของ <i>Leptospira</i> ที่สกัด เป็น template	191
รูปที่ 2.39:	แสดง gradient PCR amplicon ของ <i>lipL32</i> (531 bp)	194
รูปที่ 2.40:	แสดง gradient PCR amplicon ของ <i>lipL41</i> (422 bp)	195
รูปที่ 2.41:	แสดง gradient PCR amplicon ของ <i>ompL1</i> (669 bp)	196
รูปที่ 2.42:	แสดง gradient PCR amplicon ของ <i>flaB1</i> (613 bp)	197
รูปที่ 2.43:	แสดง gradient PCR amplicon ของ <i>flaB2</i> (705 bp)	198
รูปที่ 2.44:	แสดง DNA fragments ที่ตัดจาก <i>flaB1</i> -pUC19 plasmid DNA ที่ตัดจาก <i>E. coli</i> clones ต่างๆ	202
รูปที่ 2.45:	แสดง DNA fragments ที่ตัดจาก <i>flaB2</i> -pUC19 plasmid DNA ที่ตัดจาก <i>E. coli</i> clones ต่างๆ	203
รูปที่ 2.46:	Gradient PCR amplicons ของ <i>flaB1</i>	208
รูปที่ 2.47:	Gradient PCR amplicons ของ <i>flaB2</i>	209
รูปที่ 2.48:	Gradient PCR amplicons ของ <i>ompL1</i>	210
รูปที่ 2.49:	Gradient PCR amplicons ของ <i>lipL32</i>	211
รูปที่ 2.50:	Gradient PCR amplicons ของ <i>tlyA</i>	212
รูปที่ 2.51:	Gradient PCR amplicons ของ <i>hlyA</i>	213
รูปที่ 2.52:	Gradient PCR amplicons ของ <i>hlyB</i>	214
รูปที่ 2.53:	Gradient PCR amplicons ของ <i>hlyA</i>	215
รูปที่ 2.54:	<i>Leptospira</i> DNA amplicons of eight vaccine candidate genes	217
รูปที่ 2.55:	แสดงแผนที่ของ pcDNA3.1[+]	221
รูปที่ 2.56:	Positive <i>E. coli</i> clones ที่มี genes ของ <i>Leptospira</i> ทั้งแปดยีน	222
รูปที่ 2.57:	Agarose gel electrophoresis ของ pcDNA plasmids ที่สกัดได้	225
รูปที่ 2.58:	Agarose gel electrophoresis of <i>Leptospira</i> genes by RT-PCR of cDNA extracted from transfected COS-7 cells	228
รูปที่ 2.59:	แสดงผลอัตราการอยู่รอด (% survival) ของ immunized mice และ controls	230

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: สัญญาเลขที่ 468002

ชื่อโครงการ: การเปลี่ยนโมโนโคลนาลแอนติบอดีของหนูโมซีให้มีโครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนกลอบูลินส์ของมนุษย์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) 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

โรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิส (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 อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในระยะ acute ที่ผู้ป่วยมีเชื้อ *Leptospira* spp. อยู่ในกระแสโลหิต (leptospiemia) และอวัยวะต่างๆจำนวนมาก อาจมีผลข้างเคียงที่เรียกว่า "ปฏิกิริยาจาริช-เฮกซ์เชอร์เมอร์ (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 วัคซีนสำหรับป้องกันโรคนี้หนูสำหรับคนและสัตว์อื่น ๆ ยังไม่มี รวมทั้งวัคซีนที่มีภูมิคุ้มกันให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนอีกด้วย

ดังนั้นโครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว. โครงการนี้จึงได้เสนอการผลิตอิมมูโนโมโนโคลนัลแอนติบอดี (humanized-mono-clonal antibody) ต่อเชื้อ *Leptospira* spp. เพื่อใช้รักษาโรค leptospirosis แทนยาปฏิชีวนะ โดยเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนัลของหนูไมซ์ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ให้มีโครงสร้างเหมือนโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินส์ (แอนติบอดี) ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังได้เสนอการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค leptospirosis ที่มีความสามารถในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. จำงายพันธุ์อีกด้วย

ผู้วิจัยได้ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจากหนูไมซ์ (murine hybridomas) ซึ่งหลั่งโมโนโคลนัลแอนติบอดี (murine monoclonal antibody) เฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ด้วยเทคนิคไฮบริโดมา (hybridoma technology) และได้ใช้ immunoglobulin genes ของ hybridoma ดังกล่าวเพื่อผลิต humanized-murine monoclonal antibody ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยว (single chain variable fragment; 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 โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อด้วยละสองโดส 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. Leptospirosis 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.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

โครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

เรื่อง: การเปลี่ยนโมโนโคลนัลแอนติบอดีของหนูโมซีให้มีโครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนกลอบูลินส์ของมนุษย์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) และการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนูที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิส (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 อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะในระยะ acute ที่ผู้ป่วยมีเชื้อ *Leptospira* spp. อยู่ในกระแสโลหิต (leptospiemia) และอวัยวะต่างๆจำนวนมาก อาจมีผลข้างเคียงที่เรียกว่า “ปฏิกิริยาจาริช-เฮกซ์เชอร์ (Jarisch-Herxheimer reaction; JHR)” ซึ่งเป็นผลจากการที่ยาปฏิชีวนะทำให้เชื้อ *Leptospira* spp. แตกและปล่อยสารพิษต่างๆออกมาในร่างกายของผู้ป่วยพร้อมๆกันในปริมาณมากซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอยู่แล้วมีอาการป่วยมากขึ้นจนอาจเสียชีวิต ยิ่งกว่านั้นการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอาจไม่ได้ผลหากการรักษาล่าช้าในระยะที่เลยจากระยะเฉียบพลันไปแล้ว เพราะเชื้อ *Leptospira* spp. ไปหลบอยู่ตามอวัยวะต่างๆที่ยาปฏิชีวนะเข้าไปไม่ถึง เช่น ที่ไต สมอง ลูกตา เป็นต้น นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจแพ้ยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะกลุ่มเพนิซิลลินซึ่งเป็น drug of choice และไม่สามารถใช้ยาดังกล่าวรักษาได้

เชื่อกันว่าภูมิคุ้มกันโรค leptospirosis เกิดจากแอนติบอดีและเป็นภูมิคุ้มกันที่มีความเฉพาะมาก กล่าวคือผู้ติดเชื้อกลุ่มใดหรือซีโรวาร์ใด เมื่อหายป่วยแล้วก็จะมีภูมิคุ้มกันเฉพาะต่อเชื้อกลุ่มนั้นหรือซีโรวาร์นั้นและอาจติดเชื้อกลุ่มอื่นหรือซีโรวาร์อื่นได้ใหม่อีก วัคซีนป้องกันโรค

leptospirosis ในปัจจุบันมีเฉพาะสำหรับใช้ในสัตว์ เช่น สุนัข วัว-ควาย แต่ป้องกันได้เฉพาะเชื้อที่ตรงหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ใช้เตรียมวัคซีนเท่านั้น วัคซีนสำหรับป้องกันโรคนี้สำหรับผู้คนและสัตว์อื่น ๆ ยังไม่มี รวมทั้งวัคซีนที่มีกักกักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนอีกด้วย

ดังนั้นโครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส สกว. โครงการนี้จึงได้เสนอการผลิตอิมมูโนโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (humanized-mono-clonal antibody) ต่อเชื้อ *Leptospira* spp. เพื่อใช้รักษาโรค leptospirosis แทนยาปฏิชีวนะ โดยเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอลของหนูไมซ์ที่มีความเฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ให้มีโครงสร้างเหมือนโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินส์ (แอนติบอดี) ของมนุษย์ นอกจากนี้ยังได้เสนอการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค leptospirosis ที่มีความสามารถในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ต่างสายพันธุ์อีกด้วย

ขอบเขตการวิจัย ระเบียบวิธีวิจัย และผลการวิจัย ของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง

[การผลิตอิมมูโนโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนอล (HuMAb) ต่อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค เพื่อใช้รักษาโรค leptospirosis แทนยาปฏิชีวนะ]

ขั้นตอนการวิจัย ระเบียบวิธีวิจัย และผลการวิจัย ประกอบด้วย การผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจากหนูไมซ์ (murine hybridomas) ซึ่งหลั่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี (murine monoclonal antibody) เฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ด้วยเทคนิคไฮบริโดมา (hybridoma technology) และได้ใช้ immunoglobulin genes ของ hybridoma ดังกล่าวเพื่อผลิต humanized-murine monoclonal antibody ในรูปแบบของแอนติบอดีสายเดี่ยว (single chain variable fragment; huScFv) โดยการใช้เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจีเนียริงในการตัด 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 ในคนที่แพ้ยาปฏิชีวนะและในผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บป้อนรุนแรงเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด Jarisch-Herxheimer reaction

ขอบเขตการวิจัย ระเบียบวิธีวิจัย และผลการวิจัย ของงานวิจัยส่วนที่สอง:

[การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรค leptospirosis ที่มีความสามารถในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ต่างสายพันธุ์]

ในงานวิจัยส่วนนี้ 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 โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละสอง โดส 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. ดังสายพันธุ์นี้ได้ และมีศักยภาพที่ควรพัฒนาเพื่อนำไปใช้ป้องกันโรค leptospirosis ต่อไป

Executive Summary

The Senior Researcher's Project Entitled "Humanized monoclonal antibodies for leptospirosis immunotherapeutics and development of a broad spectrum leptospirosis vaccine"

Background and Rationale:

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.

Scope of the Research, Research Methodology, and Results of the First Part (Production of humanized monoclonal antibodies for leptospirosis immunotherapeutics)

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.

Scope of the Research, Research Methodology, and Results of the Second Part (Development of a broad spectrum leptospirosis vaccine):

For this 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.

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

ระยะเวลาของโครงการ: 15 สิงหาคม 2546-14 สิงหาคม 2549

เรื่อง : การเปลี่ยนโมโนโคลนัลแอนติบอดีของหนูโมซีให้มีโครงสร้างคล้ายคลึงอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์ เพื่อใช้ในการรักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส) และการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนูที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ได้

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

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย :

โรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิสมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม pathogenic *Leptospira* spp. ซึ่งจัดว่าเป็นโรคที่กลับมาเป็นปัญหาใหม่ทั้งของประเทศไทยและประเทศที่อยู่ในภูมิภาคอื่นและอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรกลุ่มเสี่ยง เช่น ชาวนา เจ้าหน้าที่โรงงาน ฆ่าสัตว์ สัตวแพทย์ หรือผู้ที่มีการสัมผัสกับสัตว์ ดิน หรือน้ำ ที่มีเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. ปนเปื้อน เมื่อติดเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค ผู้ติดเชื้อส่วนหนึ่งอาจไม่มีอาการป่วยใดๆ หรือมีอาการเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ผู้ติดเชื้ออีกจำนวนหนึ่งมีอาการป่วยที่เฉียบพลันและรุนแรง ซึ่งหากรักษาไม่ทันท่วงทีและถูกต้องก็จะเสียชีวิตได้ในอัตราตายที่ค่อนข้างสูง การรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนูในระยะเฉียบพลันมักใช้ยาปฏิชีวนะและรักษาประคับประคองตามอาการ ผู้ป่วยบางรายอาจต้องได้รับการรักษาในหน่วยผู้ป่วยวิกฤติเพราะอาจเกิดไตวาย ตับวาย สมออักเสบ เลือดออกจากอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น ปอด และอาการอื่นๆ อย่างไรก็ตามการรักษาดูแลผู้ป่วยในระยะที่ผู้ป่วยมีเชื้อจำนวนมากอยู่ในกระแสโลหิตและอวัยวะต่างๆ อาจมีผลข้างเคียงที่เรียกว่า "ปฏิกิริยาจาริช-เฮิร์ชไมเออร์ (Jarisch-Herxheimer reaction; JHR)" ซึ่งเป็นผลจากการที่ยาปฏิชีวนะทำให้เชื้อเลปโตสไปราแตกและปล่อยสารพิษต่างๆ ออกมาในร่างกายของผู้ป่วยพร้อม ๆ กันในปริมาณมาก ยิ่งกว่านั้นการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะอาจไม่ได้ผลหากการรักษาล่าช้าในระยะที่เลยจากระยะเฉียบพลันไปแล้ว เพราะเชื้อเลปโตสไปราไปหลบอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ที่ยาปฏิชีวนะเข้าไปไม่ถึง เช่น ไขข้อ สมอ หลอดตา เป็นต้น นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจแพ้ยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะกลุ่มเพนิซิลลินและไม่สามารถใช้ยาดังกล่าวรักษาได้

เชื่อกันว่าภูมิคุ้มกันโรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิสเกิดจากแอนติบอดีและเป็นภูมิคุ้มกันที่มีความเฉพาะมาก กล่าวคือผู้ติดเชื้อกลุ่มใดหรือเชื้อโรวารใด เมื่อหายป่วยแล้วก็จะมีความจำเพาะกับกลุ่มนั้นหรือเชื้อโรวารนั้นและอาจติดเชื้อกลุ่มอื่นหรือเชื้อโรวารอื่นได้อีก วัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสในปัจจุบันมีเฉพาะสำหรับใช้ในสัตว์ เช่น สุนัข วัว-ควาย แต่ป้องกันได้เฉพาะเชื้อบางกลุ่มหรือบางเชื้อโรวารเท่านั้น วัคซีนสำหรับป้องกันโรคฉี่หนูสำหรับคนและสัตว์อื่น ๆ ยังไม่มีเลย รวมทั้งวัคซีนมักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์ที่ได้รับวัคซีนอีกด้วย

ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีในระดับโมเลกุลต่างๆ ที่นำมาใช้ในการวิจัยทางชีวเวชศาสตร์กันมาก เช่น การดัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้างโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินส์ที่เรียกว่า เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจิเนียริง (antibody engineering) และการศึกษาโปรตีนของจุลชีพต่างๆ ในระดับโมเลกุล โดยเทคนิคที่เรียกว่าโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) เป็นต้น เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจิเนียริงทำให้เราสามารถเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลเฉพาะต่อเชื้อโรคใดเชื้อโรคหนึ่งซึ่งแต่เดิมเป็นอิมมูโนโกลบูลินส์ของหนูไมซีให้เป็นโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์แต่ยังมีความเฉพาะต่อเอพิโทป (epitope) เดิมได้ เราเรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่า ฮิวแมนไนซ์แอนติบอดี โมเลกุลเหล่านี้มักไม่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด anti-isotype คือ human anti-murine antibody (HAMA) ในผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยแอนติบอดีเหล่านี้ ไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (side effects) ยิ่งไปกว่านั้นฮิวแมนไนซ์แอนติบอดีซึ่งมักเป็นแอนติบอดีสายเดี่ยว (single chain antibody fragment; ScFv) ยังสามารถแทรกเข้าไปทำงานในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ดีกว่า intact antibody molecules อีกด้วย

การใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์จะทำให้สามารถศึกษาโปรตีน (โปรตีโอมส์; proteomes) ของเชื้อเลปโตสไปราทั้งสายพันธุ์ที่ก่อโรคและสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคได้อย่างละเอียด รวมทั้งสามารถศึกษาหาโมเลกุลของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคที่เชื้อผลิตออกมาเฉพาะเมื่ออยู่ภายในร่างกายของโฮสต์และกระตุ้นให้โฮสต์สร้างภูมิคุ้มกันได้ (*in vivo* expressed antigens) ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้นอกจากจะเป็น targets ของ diagnostics แล้วยังเป็น vaccine candidates อีกด้วย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยนี้จึงได้เสนอการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* spp. ชนิดโมโนโคลนาลโดยเปลี่ยนโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินส์ของหนูไมซีให้เป็นฮิวแมนไนซ์แอนติบอดีเพื่อใช้รักษาโรคฉี่หนูแทนยาปฏิชีวนะ โดยคาดหวังว่าแอนติบอดีดังกล่าวจะจับและกำจัดเชื้อออกไปจากร่างกายผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็วและไม่กระตุ้นการสร้างแอนติกลอบูลินส์ (HAMA) นอกจากนี้ยังเสนองานวิจัยเพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนูที่มีความสามารถในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อเลปโตสไปโรซิสได้กว้างขวางหลายสายพันธุ์อีกด้วย ทั้งนี้โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น เทคนิคไฮบริโดมา เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจิเนียริง โปรตีโอมิกส์ และอิมมูโนมิกส์ เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเตรียมฮิวแมนไนซ์แอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่มีความเฉพาะต่อเชื้อโรคฉี่หนู (เลปโตสไปรา; *Leptospira* spp.) สำหรับใช้รักษาโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส; leptospirosis) โดยคาดหวังว่าเนื่องจากแอนติบอดีดังกล่าวจะมีโครงสร้างเป็นอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์เกือบทั้งหมดจึงน่าจะไม่ใช่สิ่งแปลกปลอมในร่างกายของผู้รับการรักษาด้วยแอนติบอดีเหล่านี้และไม่กระตุ้นให้มีการสร้าง anti-isotypic antibody รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยได้แทนยาปฏิชีวนะและไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ (JHR)

2. เพื่อศึกษาโปรตีนของเชื้อโรคฉี่หนูสายพันธุ์ก่อโรคที่เชื้อผลิตขึ้นขณะอยู่ในร่างกายผู้ป่วย สำหรับใช้ในการพัฒนาวัคซีนที่สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากการติดเชื้อเลปโตสไปราต่างสายพันธุ์

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีเฉพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา แล้วนำโมโนโคลนาลแอนติบอดีซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินส์ของหนูมาเปลี่ยนให้มีโครงสร้างของโมเลกุลเหมือนกับอิมมูโนโกลบูลินส์ของมนุษย์ (humanized-monoclonal antibody) โดยใช้เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจิเนียริง เพื่อให้โมเลกุลดังกล่าวไม่เป็นสิ่งแปลกปลอม ไม่กระตุ้นให้มนุษย์สร้าง anti-isotypic antibody ในร่างกายของผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยแอนติบอดีเหล่านี้ ทั้งนี้เพื่อใช้แทนยาปฏิชีวนะในผู้ป่วยและป้องกันการเกิด JHR

2. ใช้เทคนิคโปรตีนอิมมูโนมิกซ์และอิมมูโนมิกซ์เพื่อศึกษาหาโปรตีนต่างๆที่เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคผลิตออกมาขณะที่เชื้ออยู่ในร่างกายผู้ป่วย (*in vivo* expressed antigens) และใช้โปรตีนเหล่านี้หรือยีนที่ควบคุมการผลิตโปรตีนดังกล่าวเป็นส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส ที่เกิดจากการติดเชื้อต่างสายพันธุ์

ขอบเขตการวิจัยและระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยส่วนที่หนึ่ง : การผลิตอิมมูโนโมโนโคลนาลแอนติบอดี (HuMAb) ต่อ *Leptospira* spp.

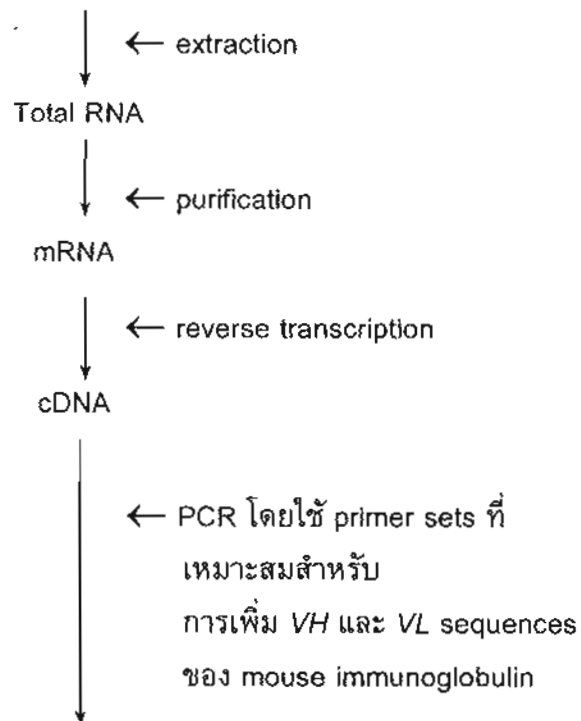
คณะผู้วิจัยได้ผลิต HuMAb ต่อเชื้อ *Leptospira* spp. จาก mouse hybridoma โดยใช้เทคนิคแอนติบอดีเอ็นจิเนียริง (antibody engineering) คือการปลูก DNA segments ซึ่ง encode ส่วน complementarity determining regions (CDRs) ของ mouse monoclonal antibodies จากบริเวณส่วน VH และ VL ลงบน DNA ของ human immunoglobulin frameworks โดยได้ conserve antigen binding characteristic เอาไว้เหมือนเดิม ซึ่ง HuMAb ที่ได้มีประสิทธิภาพและมีความเฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. เหมือน mouse monoclonal antibodies แต่ส่วนอื่นของโมเลกุลเป็นโปรตีนของมนุษย์ humanized antibody นี้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคนี้ในผู้ป่วยที่แพ้ยาปฏิชีวนะรวมทั้งป้องกันการเกิด Jarisch-Herxheimer reaction (JHR) ในผู้ป่วยด้วย

ขอบเขตและระเบียบวิธีวิจัยของการวิจัยส่วนที่หนึ่ง

Experiment Outline

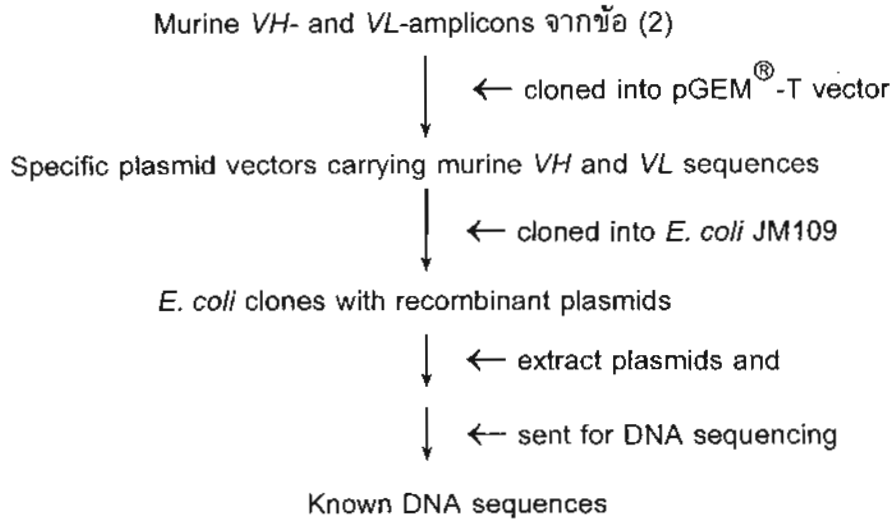
1. ผลิต murine hybridomas ซึ่ง secrete monoclonal antibodies เฉพาะต่อ pathogenic *Leptospira* spp. โดยใช้เทคนิคไฮบริโดมา (hybridoma technology) เมื่อได้ murine hybridomas แล้วนำไปเลี้ยงใน serum free-medium เพื่อนำ monoclonal antibodies ไปทดสอบประสิทธิภาพการ neutralize *Leptospira* infectivity ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* เพื่อเลือก protective clone
2. เลี้ยง protective hybridoma cells ใน serum free-medium จนถึงระยะ log-phase (active growth) นำไปสกัดเอา total RNA สำหรับเตรียม mRNA เพื่อใช้สร้าง cDNA แล้วใช้ cDNA เป็น template เพื่อ amplify VH และ VL gene coding sequences โดยวิธี PCR ดังแผนภูมิข้างล่างนี้

Log-phase growth of protective hybridoma cells

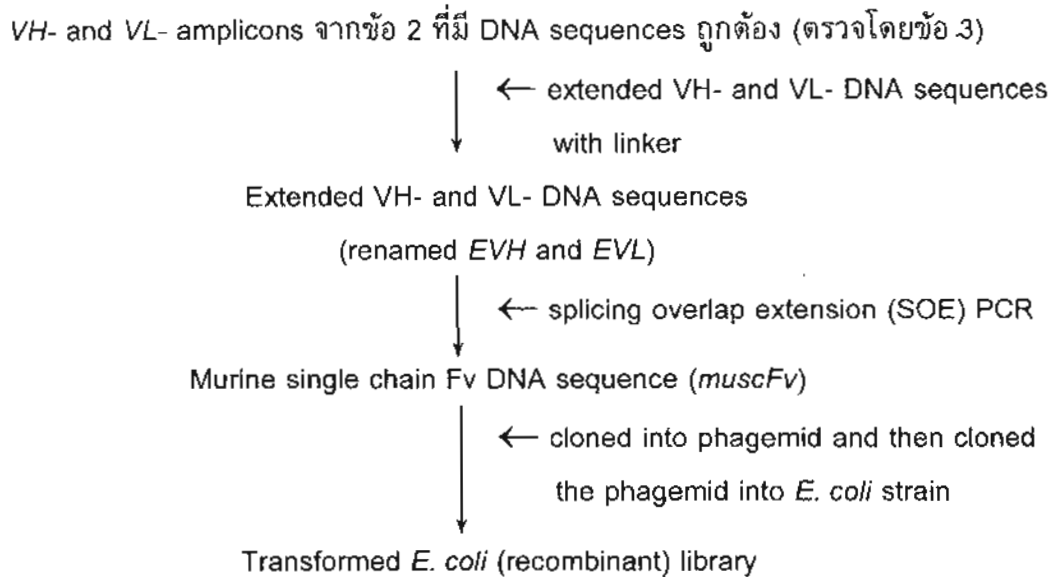


Murine VH- and VL-DNA amplicons

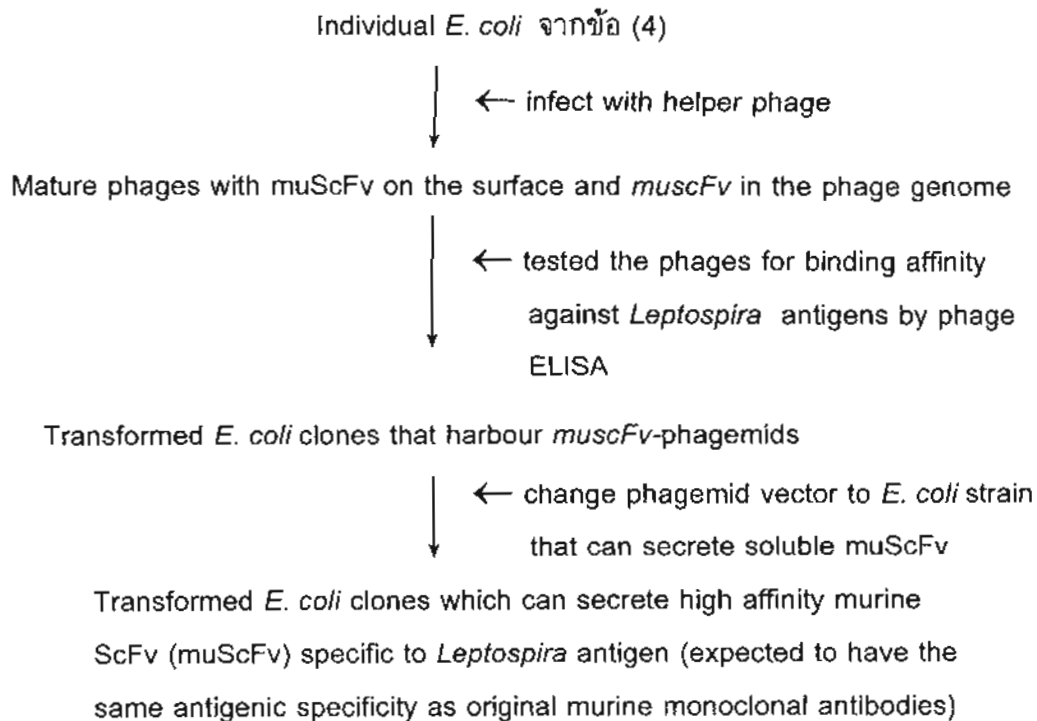
3. การ clone VH- และ VL- gene segments เข้าสู่ vector, การ clone vector เข้าสู่ *E. coli* และการตรวจความถูกต้องของ VH- and VL-amplicons



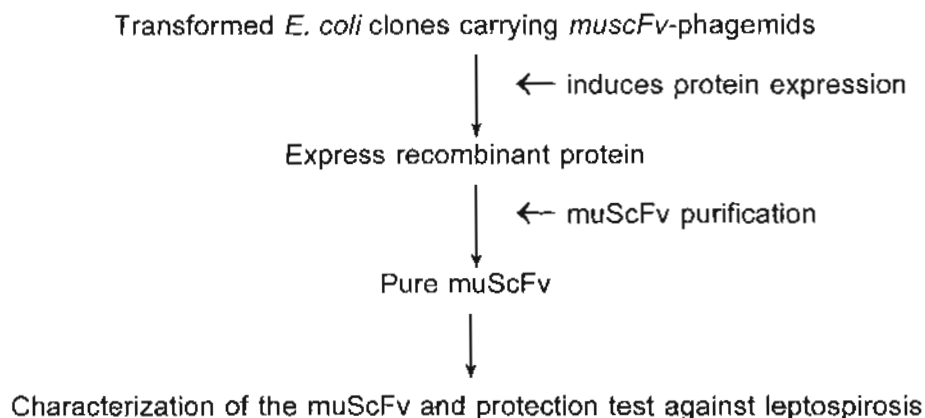
4. การเชื่อม VH- และ VL- segments เข้าด้วยกันและการสร้าง phage library



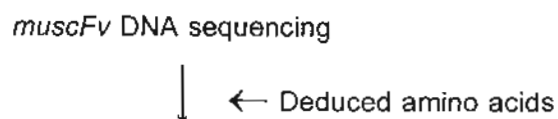
5. การเลือก transformed (recombinant) *E. coli* clones with murine *scFv* phagemids แล้วเปลี่ยน phagemids เข้าสู่ *E. coli* ที่สามารถ secrete soluble ScFv ได้



6. Production of muScFv



7. Murine VH- and VL- alignment for selecting human VH- and VL- sequences with the most matched-canonical structure (immunoglobulin frameworks) to the murine VH- and VL- sequences



Known VH and VL CDRs and immunoglobulin frameworks (canonical structure)

← aligned with known human V regions in
databases (Kabat/Cothia)

Selected human V region sequences

with the most matched-canonical structure to the mouse ScFv

8. Production of humanized-murine *scFv*

Selected human V region sequences

← overlap extension PCR to fuse human
canonical fragments with mouse
CDR1/2/3 of both VH and VL from the
muscFv

Humanized *scFv* fragments (*huscFv*)

9. Cloning of the *huscFv* and expression of HuScFv

huscFv sequence

← cloned into phagemid and appropriate
host cells, respectively, and induced
expression

Expressed HuScFv

10. Characterization of HuScFv

HuScFv

← affinity measurement by ELISA
← Western blotting for antigenic
specificity
← protection tests *in vitro* and *in vivo*
compared with *muScFv* and/or original
murine monoclonal antibody (MAb)

Known characteristic-HuScFv

**Humanized-murine monoclonal ScFv as therapeutic antibody
for human leptospirosis**

รายละเอียดการดำเนินการและผลการวิจัยของส่วนที่หนึ่ง

ขั้นตอนที่หนึ่งของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

การผลิต murine hybridomas เฉพาะต่อ pathogenic *Leptospira*

1.1 การเพาะเลี้ยง *Leptospira* spp.

ได้ทำการเพาะเลี้ยง *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรคและไม่ก่อโรคต่างๆ โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงชนิด EMJH ทั้งในรูปของอาหารชนิดเหลว (liquid medium) และอาหารชนิดครึ่งแข็งครึ่งเหลว (semi-solid medium) อาหารชนิดเหลวประกอบด้วย EMJH basal medium และ supplements ซึ่งประกอบด้วย bovine serum albumin (BSA; Fraction V, Sigma Chemical Co., USA), pyruvate, Tween-80, Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} และ vitamin B12 หลังจากนี้จึงฆ่าเชื้อโดยการ autoclave EMJH basal medium แล้วจึงเติม sterile supplements (กรองผ่าน 0.22 μm filter membrane) ลงไปใน basal medium ในอัตราส่วน medium: supplement = 10:1 ก่อนใช้ต้องทดสอบสถานะปลอดการปนเปื้อนโดยการ incubate medium ที่ 37°C เป็นเวลา 5-7 วัน จนแน่ใจว่าปลอดการปนเปื้อน (ไม่มีเชื้อใดๆ ขึ้นใน medium) จึงจะใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* spp. ส่วนอาหารชนิด semi-solid EMJH นั้นมีส่วนประกอบเหมือน liquid EMJH ทุกประการแต่ได้ผสม bacto agar (Difco, USA) ลงไป 0.2% ใน liquid EMJH medium ด้วย

แบ่งอาหารเลี้ยง *Leptospira* spp. ชนิดเหลวใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 16 × 15 มม. หลอดละ 10 มล. เพื่อใช้สำหรับเลี้ยงและ subculture เชื้อ *Leptospira* spp. ส่วน semi-solid medium แบ่งใส่หลอด หลอดละ 1 มล. เพื่อใช้เก็บ stock culture

การเพาะเลี้ยง *Leptospira* spp. เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C ใน incubator (Memmert, Germany) โดยตรวจสอบการเจริญเติบโตและการปนเปื้อนโดยใช้อินนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด dark-field ทุกๆสามวัน และก่อนทำการ subculture ครั้งต่อไปต้อง streak เชื้อจากหลอด culture ลงบน trypticase soy agar (TSA) แล้ว incubate ที่ 37°C, 24 ชั่วโมง เมื่อไม่มีสิ่งใดเจริญเติบโตบน TSA จึงจะถือว่าเป็น non-contaminated *Leptospira* spp. culture และใช้ sub-culture ต่อไปได้

Leptospira ใน liquid medium จะมีการเคลื่อนไหวอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ spirochetes นอกจากนี้ยังพบว่า doubling time ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ไม่เท่ากัน บางสายพันธุ์แบ่งตัวเร็วและบางสายพันธุ์แบ่งตัวช้า

1.2 การ harvest เชื้อ *Leptospira* spp.

เมื่อต้องการรวบรวมเชื้อ *Leptospira* เพื่อเตรียม whole cell homogenate ได้นำ culture ที่เลี้ยงไว้ใน liquid medium อายุ 7-10 วัน จากหลายๆหลอดแต่สายพันธุ์เดียวกันมารวมเข้าด้วยกัน นำไปปั่นที่ $10,000 \times g$, 4°C , 15 นาที นำ *Leptospira* pellet ที่ได้ไปปั่นล้างด้วย plain basal EMJH medium สามครั้ง ก่อนนำไปทำ whole cell homogenate ทันทีหรือเก็บไว้ที่ -70°C

1.3 การเตรียม *Leptospira* homogenates เพื่อวิเคราะห์หา proteomes ของเชื้อและเพื่อใช้เป็นแอนติเจนใน immunoassays ต่าง ๆ

เมื่อต้องการเตรียม homogenate สำหรับศึกษา proteomics ได้นำ *Leptospira* pellet (ที่รวบรวมได้จาก culture ใน liquid medium อายุ 7-10 วัน ปริมาตร ~ 500 ml) มาเติมด้วย lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 2% Pharmalyte 3-10, Amersham Biosciences) 500 μl และ protease inhibitors (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ปริมาตร 10 μl นำไป sonicate ที่ amplitude 25%, pulse on 6 วินาที pulse off 3 วินาที เป็นเวลารวมทั้งสิ้น 3 นาที จากนั้นแบ่งเป็น 50 μl aliquots เก็บไว้ที่ -70°C เมื่อจะใช้ นำ homogenate ไป clean ด้วย 2-D Clean-Up kit (Amersham Biosciences) เพื่อกำจัด detergents, salts, lipids, phenolics และ nucleic acids โปรตีนที่ได้นำมาใส่ใน rehydration buffer ที่มี IPG buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer 3-10 non-linear, 0.002% bromophenol blue) นำไป determine protein content ด้วย 2-D Quant kit (Amersham Biosciences) ก่อนนำไปแยกด้วย two dimensional gel electrophoresis (2DE)

ตัวอย่างผลการเตรียม homogenate จากเชื้อ *Leptospira* spp. serovar *copenhageni* (representative) 500 ml พบว่าจะได้โปรตีนสำหรับศึกษา proteomics หลังจาก Clean-up แล้วประมาณ 1.9-2 mg

ส่วนการเตรียม *Leptospira* homogenate เพื่อใช้เป็นแอนติเจนใน immunoassay ต่างๆ และเป็น immunogen ในการ immunize BALB/c mice นั้นได้นำเอา *Leptospira* whole cell pellet ไป resuspend ในน้ำกลั่นแล้วทำให้แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง หลังจากหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford แล้วแบ่งเก็บเป็น aliquots เล็กๆ ที่ -70°C จนกว่าจะใช้

1.4. การผลิต murine hybridomas ที่ secrete monoclonal antibodies เฉพาะต่อ *Leptospira* spp.

1.4.1 การ immunize หนู BALB/c mice

ได้นำ whole cell homogenate ของ *Leptospira* spp., serogroup Icterohaemorrhagiae, serovar *icterohaemorrhagiae* 5 µg (0.1 ml normal saline; NSS) ผสมกับ 0.1 ml Complete Freund's Adjuvant (CFA) แล้วฉีดเข้าช่องท้องหนู BALB/c อายุ 6-8 สัปดาห์ แต่ละตัวจำนวน 3 ตัว หนูทั้ง 3 ตัวที่ primed ไว้แล้วนี้ได้รับ booster doses อีก 2 ครั้งห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ โดยใช้แอนติเจนเดิมแต่เพิ่ม dose เป็น 20 µg ใน 0.1 ml NSS ซึ่งผสมกับ Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) แทน CFA หลังจาก second booster แล้ว 7 วันได้เจาะเลือดจาก plexus ที่ inner corner ของตาซ้ายของหนูแต่ละตัว แยกซีรัม (immune mouse sera) แล้วนำไปตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA ต่อ homologous *Leptospira* whole cell homogenate พบว่าหนูทั้ง 3 ตัวมี serum titer 1:6,400

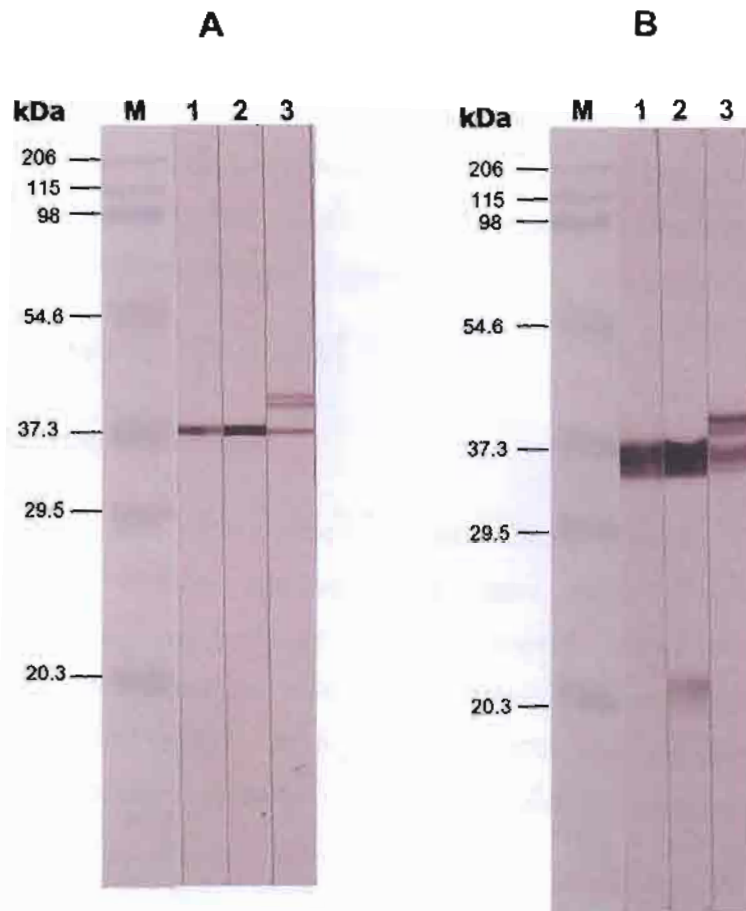
1.4.2 Cell hybridization ระหว่าง spleen cells ของหนูที่ immunized ไว้ด้วย *Leptospira* antigen และ myeloma cells เพื่อสร้าง hybridomas

ได้เตรียม single spleen cell suspension จาก immune mouse ตัวที่ 1 แล้วนำไป fuse กับ myeloma cells P3x-63-Ag8.653 ซึ่ง maintained ไว้แล้วใน 10% bovine serum (Starrate Co., Australis) supplemented RPMI-1640 medium เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ โดยเซลล์ทั้งสองชนิดมี viability มากกว่า 95% เมื่อตรวจด้วยวิธี trypan blue exclusion method ภายหลัง fused แล้ว 1 วันเพิ่ม bovine serum ใน medium เป็น 20% แล้วปล่อยให้ hybrid cells ที่เจริญเติบโตอยู่ใน culture wells แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเต็มพื้นที่ของ well แต่ละ well (เปลี่ยน culture medium 2-3 ครั้ง) เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่แล้วได้เก็บ culture supernatants ไปตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Leptospira* homogenate โดยวิธี indirect ELISA และตรวจ antigenic specificities โดยวิธี Western blot analysis และได้เลือกเซลล์จาก wells ที่ให้ Western blot patterns ที่น่าสนใจไปทำ monocloning โดยวิธี limiting dilution methods โดยใช้ normal BALB/c mouse splenocytes เป็น feeder cells

จากการทำ cell hybridization พบว่าได้ hybridomas 3 clones คือ LPF1, LPF2 และ LPF3 ซึ่ง LPF1 และ LPF2 ผลิต monoclonal antibodies ที่มีความเฉพาะต่อ pathogenic *Leptospira* และไม่ทำปฏิกิริยากับ non-pathogenic *Leptospira* และ bacteria อื่นๆ และไวรัสต่างๆที่อาจพบได้ในกระแสเลือดและ/หรือปัสสาวะของคน โดย MAbLPF1 และ MAbLPF2 มี immunoglobulins เป็น isotypes IgG1 kappa และ IgG2a kappa ตามลำดับ ส่วน LPF3 ผลิต monoclonal antibodies ซึ่ง react กับ whole cell homogenates ของ *Leptospira* ทุก serovar

ที่นำมาทดสอบ ทั้งที่เป็น pathogenic และ non-pathogenic strains โดยให้ reactive band ใน Western blot ที่ ~36.5-38 kDa (รูปที่ 1.1 ใน lanes A3 และ B3 ตามลำดับ) และเป็น IgG1 kappa isotype

รูปที่ 1.1 คือ Western blot patterns เพื่อแสดง antigenic specificities ของ MAbLPF1 (react ต่อ antigenic component ~36.5 kDa ใน lanes A1 และ B1), MAbLPF2 (react ต่อ component ~36.5 kDa ของ serovar *copenhageni* ใน lane A2 และ ~36.5 และ ~22 kDa ของ homologous serovar *icterohaemorrhagiae* ใน lane A2 และ B2 ตามลำดับ) และ MAbLPF3 ต่อ SDS-PAGE separated-whole cell homogenates ของ *Leptopira* spp., serovars *copenhageni* และ *icterohaemorrhagiae*



រូប 1.1 : Western blot patterns of MAbLPF1, MAbLPF2 and MAbLPF3 to SDS-PAGE separated-whole cell homogenates of *Leptospira* spp., serovars (heterologous) *copenhageni* (A) and (homologous) *icterohaemorrhagiae* (B)

រូប A

Lane M, standard marker

Lane 1, MAbLPF1

Lane 2, MAbLPF2

Lane 3, MAbLPF3

រូប B

Lane M, standard marker

Lane 1, MAbLPF1

Lane 2, MAbLPF2

Lane 3, MAbLPF3

Numbers at left of each block indicate molecular weights in kilodaltons

1.5 Protection tests เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของ MAb ในการ neutralize *Leptospira* activities

1.5.1 Hemolysis inhibition test (*in vitro*)

การทดสอบนี้ทำตามวิธีของ Hathaway and Marshall (1980) โดยมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของ MAb ในการยับยั้ง hemolytic activity ของ live *Leptospira* ที่มีต่อเม็ดเลือดแดงของคนหรือเม็ดเลือดแดงของแกะในหลอดทดลอง

วัสดุและขั้นตอนการทดสอบ มีดังต่อไปนี้

การเตรียมเชื้อ *Leptospira* spp.

นำ *Leptospira* spp. ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน liquid EMJH medium [ซึ่งได้แก่ serovars *icterohaemorrhagiae*, *bangkok*, *bataviae*, *copenhageni*, recent human isolate (H1), saprophytic (*andamana*), non-pathogenic serovar *patoc*] ไปปั่นล้างด้วย sterilized basal EMJH medium แล้ว resuspend last pellets ในน้ำเกลือปกติ (normal saline solution; NSS) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ 420 nm เพื่อเทียบความเข้มข้นกับ standard curve จากนั้นปรับความเข้มข้นเป็น 10^8 เซลล์/ml เพื่อใช้ใน hemolysis test ต่อไป

การเตรียม washed red blood cells

ทำการปั่นล้าง sheep/human red blood cells (rbc) ในน้ำเกลือปกติ 3 ครั้ง ที่ $2,500 \times g$, 5 นาที ครั้งสุดท้ายเติมน้ำเกลือปกติลงใน packed red blood cells ให้ได้ปริมาตรเท่าปริมาตรเริ่มต้น

การเตรียม reaction mixtures

1. ผสมเชื้อ *Leptospira* serovars ต่างๆแต่ละ serovar กับ rbc โดยใช้ปริมาตร 1:1 (v/v) (10^9 *Leptospira* ในน้ำเกลือปกติ 1 ml กับ rbc 1 ml)

2. Positive control ประกอบด้วย washed rbc 1 ml และน้ำกลั่น 1 ml (complete hemolysis)

3. Negative control (background hemolysis) ได้แก่ washed rbc 1 ml + น้ำเกลือปกติ 1 ml

4. นำ reaction mixtures ทั้ง (1), (2) และ (3) ไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นหลอด reaction mixtures ทุกหลอดที่ $4,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที นำ supernatant ในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยตัดค่า background

hemolysis (rbc + น้ำเกลือปกติจากข้อ 3) ออก ในการคำนวณ % hemolysis ถือว่า OD ที่ 540 nm ของ complete hemolysis (rbc + น้ำกลั่น) มีค่า hemolysis เป็น 100%

การทดสอบ neutralizing activity ของ MAbLPF1 (hemolysis inhibition test)

ได้นำ *Leptospira* spp. แต่ละ serovar (10^9 เซลล์) ไป incubate กับ MAbLPF1 น้ำหนัก 1 mg ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นล้างที่ $10,000 \times g$, 5 นาที นำ *Leptospira* pellet ไป resuspend ในน้ำเกลือปกติ (MAb-treated-*Leptospira*)

นำ MAb-treated-*Leptospira* แต่ละ serovar ไปทดสอบกับ washed rbc โดย set reaction mixture, positive control และ negative control ดังข้างต้น

ผลการทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.1

รูปที่ 1.2 แสดงผล hemolysis และ hemolysis inhibition tests

1.5.2. *In vivo* neutralization test

นอกจากการทำ hemolysis inhibition test ตามข้อ 1.5.1 แล้ว คณะผู้วิจัยได้นำ MAbLPF1 ไปทดสอบความสามารถในการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพเพราะ leptospirosis ในสัตว์ทดลอง (hamsters) ด้วย โดยมีวิธีและขั้นตอนดังนี้

การเลือก *Leptospira* serovar ซึ่งมี virulence สูงสุดใน hamsters

นำเชื้อ *Leptospira* serovars ต่างๆ ได้แก่ bangkok, bataviae, canicola, hardjo, patoc และ human isolates: H1, H2, H3, H5, และ H15 ไปปั่นเป็น pellets ที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C แล้ว resuspend ด้วยน้ำเกลือปกติ หลังจากนั้นปั่นล้างอีก 3 ครั้งด้วยน้ำเกลือปกติ ครั้งสุดท้าย resuspend pellets ด้วยน้ำเกลือปกติให้ได้ 10^8 เซลล์/300 μl

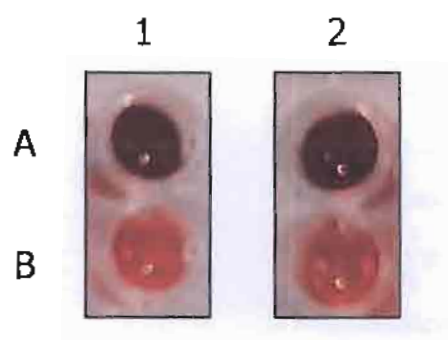
การ infect หนู hamsters ด้วย *Leptospira*

ใช้หนู hamsters อายุ 3-4 สัปดาห์ ซึ่งได้นำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองให้คุ้นเคยแล้วอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ฉีดเชื้อ *Leptospira* เข้าช่องท้อง (intraperitoneum) ตัวละ 10^8 cells ใน 300 μl หลังจากนั้น 7 วันได้ sacrificed หนู hamsters และนำไป post-mortem เพื่อตรวจหารอยโรค (พยาธิสภาพ) ที่ตับ ไต ปอด และม้าม พบรอยโรค (pathological lesion) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.1 : ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ MAbLPF1 ในการยับยั้งการเกิด hemolysis โดยเชื้อ *Leptospira*

Serovar	Sheep RBC + untreated- <i>Leptospira</i> (10^9)		Sheep RBC + MAbLPF1-treated- <i>Leptospira</i> (10^9)	
	O.D. 540 nm	% hemolysis	O.D. 540 nm	% hemolysis
<i>bangkok</i>	1.528	97.4	< 0	0
<i>bataviae</i>	1.546	98.5	< 0	0
<i>canicola</i>	0.436	27.7	< 0	0
<i>icterohemorrhagiae</i>	1.506	95.9	< 0	0
Human isolate (H1)	1.472	93.8	< 0	0
<i>andamana</i>	1.506	95.9	< 0	0
<i>patoc</i>	0.548	34.9	< 0	0
Complete hemolysis (positive control)	1.569	100	< 0	0

OD, optical density



รูปที่ 1.2 : Results of hemolysis test

A1, *Leptospira* spp. + sheep red blood cells

B1, MAbLPF1 treated-*Leptospira* spp. + sheep red blood cells

A2, 100% hemolysis of positive control

B2, background hemolysis of negative control

ตารางที่ 1.2 : รอยโรคในอวัยวะต่างๆของหนู hamsters ซึ่งถูกฉีดด้วย *Leptospira* serovars ต่างๆ เข้าช่องท้อง

<i>Leptospira</i> serovar	Gross lesions
<i>bangkok</i>	Lung hemorrhage Hepatomegaly Enlargement of kidney Splenomegaly Liver hemorrhage
<i>bataviae</i>	Splenomegaly Kidney enlargement
<i>canicola</i>	Splenomegaly Kidney enlargement
<i>hardjo</i>	Hepatomegaly Slight splenomegaly Lung hemorrhage Kidney enlargement
H1	Lung hemorrhage Hepatomegaly
H2	Slight hepatomegaly Kidney enlargement
H3	Hepatomegaly Lung hemorrhage
H5	Hepatomegaly Slight kidney enlargement
H15	No lesion
<i>patoc</i>	No lesion

จากตารางที่ 1.2 จะเห็นว่า *Leptospira* serovar *bangkok* ทำให้เกิดพยาธิสภาพใน hamster มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อ *Leptospira* serovar *bangkok* ในการทำ *in vivo* protection test โดย MAbLPF1

การทดสอบประสิทธิภาพของ MAbLPF1 ในการ neutralize *Leptospira* serovar *bangkok* ไม่ให้ก่อพยาธิสภาพในหนู hamsters

แบ่งหนู hamsters อายุ 3-4 สัปดาห์ออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้:-

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุมบวก ซึ่งถูกฉีดด้วย *Leptospira* serovar *bangkok* 10^8 cells ใน 300 μ l normal saline solution (NSS) เข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) แต่ละตัว

กลุ่มที่ 2: เป็นกลุ่มทดสอบซึ่งหนู hamster แต่ละตัวได้รับ *Leptospira* serovar *bangkok* 10^8 เซลล์ใน 300 μ l NSS ซึ่งผ่านการ incubate กับ MAbLPF1 (2.5 mg/kg body weight of hamster) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาแล้ว โดยฉีดแบบที่เรียกเข้าช่องท้อง

กลุ่มที่ 3: เป็นกลุ่มทดสอบซึ่งได้รับการฉีดเชื้อ *Leptospira* serovar *bangkok* เข้าช่องท้อง เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงได้รับการรักษาโดยการฉีด MAbLPF1 2.5 mg/kg body weight ของหนู hamster เข้าช่องท้อง

กลุ่มที่ 4: กลุ่มควบคุมลบซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือปกติ (300 μ l) เข้าช่องท้อง

หลังจากนั้น 10 วันและ 28 วัน ได้เจาะเลือดหนูแต่ละกลุ่ม (กลุ่มละ 2 ตัวในวันที่ 10 และกลุ่มละ 3 ตัวในวันที่ 28) หลังจากเจาะเลือดเพื่อเก็บ whole blood ใส่ใน anti-coagulant สำหรับนำไปตรวจหาปริมาณเชื้อในเลือดแล้วได้ sacrificed หนู hamsters เพื่อเก็บอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ไต สมอง ปอด และม้าม เพื่อตรวจหารอยโรค ส่วน whole blood นำไปตรวจหาปริมาณ (นับจำนวน) *Leptospira*

ผลการตรวจหารอยโรคในหนูทั้งสามกลุ่มในวันที่ 10 และ 28 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.3 และรูปที่ 1.3 ถึง 1.6

จากการทำ hemolysis inhibition tests และ *in vivo* neutralization tests ได้พบว่า MAbLPF1 สามารถ neutralize pathologic conditions (hemolysis, leptospiremia และ lesions ในอวัยวะต่างๆ) ที่เกิดจาก *Leptospira* ได้ จึงได้ใช้ MAbLPF1 ในขั้นตอนที่ 2 ของการวิจัยต่อไป

ตารางที่ 1.3 : พยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆและจำนวน *Leptospira* ในเลือดของ hamsters ทั้งสามกลุ่มในวันที่ 10 และ 28 หลัง treatment เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 4 (กลุ่มควบคุม)

วันที่ (post-treatment)	กลุ่มที่	Hamster No.	<i>Leptospira</i> numbers per high power field	Gross lesions
10	1	1	1-2	Both hamsters showed hepatomegaly
		2	5-10	
	2	1	1-2	No pathological condition
		2	5-10	Hepatomegaly
	3	1	1-2	Both hamsters developed hepatomegaly, slight kidney enlargement, and slight lung hemorrhage
		2	10-20	
28	1	1	10-20	All three hamsters revealed hepato-splenomegaly, kidney enlargement and blood congestion in brains; one of them also had lung hemorrhage
		2	> 20	
		3	จำนวนมากนับไม่ได้	
	2	1	5-10	Much milder lesions than those of group 1
		2	1-2	
		3	5-10	
	3	1	5-10	Both hamsters revealed slight hepato-splenomegaly, slight blood congestion in brains and little lung hemorrhage
		2	10-20	
		3	na	

na, not available

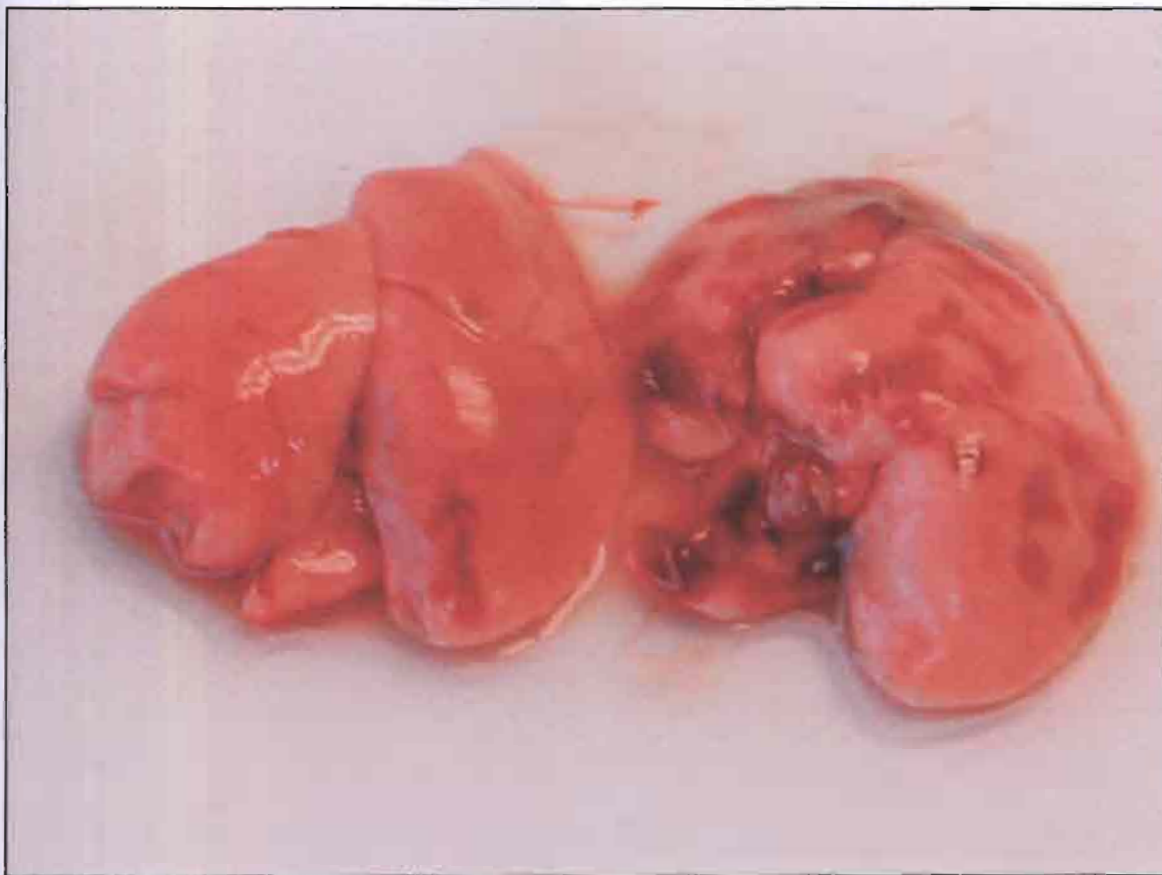
There was neither leptospire nor pathological lesion found in hamsters of group 4



รูปที่ 1.3 : แสดงพยาธิสภาพของตับของหนู hamster ที่เกิดจาก Leptospirosis (hepatomegaly and hemorrhage) (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ negative control (ขวา)



รูปที่ 1.4 : แสดงพยาธิสภาพของไตของหนู hamster (slight enlargement) ที่เกิดจาก Leptospirosis (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ negative control (ขวา)



รูปที่ 1.5 : แสดงพยาธิสภาพของปอดของหนู hamster (hemorrhage) ที่เกิดจาก Leptospirosis (ขวา) เปรียบเทียบกับ negative control (ซ้าย)



รูปที่ 1.6 : แสดงพยาธิสภาพ (splenomegaly) ของม้ามของหนู hamster ที่เกิดจาก Leptospirosis (บน) เปรียบเทียบกับ negative control (ล่าง)

ขั้นตอนที่สองของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

การเพาะเลี้ยง hybridoma ซึ่ง secrete monoclonal antibodies เฉพาะต่อ pathogenic *Leptospira* และ control myeloma (P3x-63-Ag8.653) การสกัด total RNA การเตรียม mRNA และการทำ RT-PCR เพื่อเตรียม cDNA ที่จะใช้เป็น template สำหรับการเตรียม murine VH- and VL- amplicons

ได้นำ hybridoma clone LPF1 มาเลี้ยงใน RPMI-1640 medium (Gibco Co., USA) ที่ supplemented ด้วย 10% fetal bovine serum (Starrate, Australia) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตได้ดีแล้วได้ย้ายไปเพาะเลี้ยงใน serum free-medium จนถึง late exponential phase (มีเซลล์ประมาณ 75% ใน tissue culture flask) แล้วจึงนำ culture ไปปั่นที่ $1,000 \times g$ ประมาณ 10 นาทีเพื่อเก็บแยกเซลล์นำไปสกัด total RNA ต่อไป ส่วน culture supernatant นำไปตรวจหา antibody titer ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้ pathogenic *Leptospira* homogenate เป็น antigen ในการ coat ELISA wells ได้พบว่า culture supernatant ของ clone LPF1 ทั้งที่เลี้ยงใน serum supplemented-medium และ serum free-medium นั้นมี titer ประมาณ 1:1,024 เท่ากันเมื่อเซลล์เจริญเติบโตถึง late exponential phase และมี cell viability ~ 91% เมื่อตรวจด้วย trypan blue exclusion method ซึ่ง MAb จาก clone LPF1 (MAbLPF1) ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติเจนของ pathogenic *Leptospira* โดย specific epitope อยู่ที่ protein ขนาด ~36.5 kDa (รูปที่ 1.1) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ non-pathogenic *Leptospira* และเชื้ออื่นๆ (ไม่ได้แสดงผล)

นอกจากนี้ยังได้เลี้ยง myeloma cells คือ P3x-63-Ag 8.653 ซึ่งเป็น parental myeloma cells ของ clone LPF1 จนถึง late exponential phase เช่นกัน เพื่อที่จะใช้เป็น negative control พบว่า myeloma cells ไม่ secrete antibody ต่อ *Leptospira* เมื่อตรวจ culture supernatant ด้วย indirect ELISA และเซลล์มี viability ประมาณ 80%

2.1 การสกัด total RNA จาก hybridoma LPF1 และ P3x-63-Ag 8.653 myeloma cells

นำ hybridoma cell pellet ($\sim 10.8 \times 10^6$ cells) และ P3x-63-Ag 8.653 myeloma cells ($\sim 2 \times 10^6$ cells) มาปั่นล้างด้วย sterile phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) สามครั้ง นำ pellet ครั้งสุดท้ายไป suspend ใน TRIZOL[®] (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 ml แล้วใช้ pipette resuspend ให้เป็น homogeneous suspension ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) เป็นเวลา 5 นาที ก่อนเติมคลอโรฟอร์มลงไปให้หมดที่มี cell pellet หลอดละ 200 μ l จากนั้นเขย่าอย่างแรง ตั้งไว้ประมาณ 2-3 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ $12,000 \times g$, 4°C เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บส่วนบนใสในหลอด Eppendorf หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนเอา total RNA ด้วยการเติม isopropanol เติบ 500 μ l ลงไปทั้งสองหลอด ผสมของในหลอดให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ก่อนปั่นที่ 10,000

$\times g$, 4°C เป็นเวลา 10 นาที ล้าง RNA pellet ในแต่ละหลอดด้วย 75% DEPC-treated ethanol 1 ml แล้วเก็บ RNA pellets ภายหลังปั่นที่ $7,500 \times g$, ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที นำ total RNA pellets ไปทำให้แห้งโดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปละลายใน DEPC-treated water ปริมาตร 50 μl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณหนึ่งชั่วโมงแล้วนำไปตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ (purity) โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm

ตารางที่ 1.4 แสดงผลการสกัด total RNA จาก LPF1 และ P3x-63 Ag 8.653

รูปที่ 1.7 แสดง integrity ของ total RNA ของ LPF1 และ P3x-63 Ag-8.653 ที่แยกใน 1% agarose gel electrophoresis ภายหลังย้อมด้วย ethidium bromide

2.2 การสกัดแยก mRNA

ได้สกัดแยก mRNA จาก total RNA โดยการใช้ oligotexTM column (Qiagen, USA) โดยนำ total RNA ไป hybridize กับ oligotex (dT) oligomer ซึ่งจับอยู่กับ solid phase matrix ใน column ในสภาวะที่เป็น high salt concentration ซึ่ง poly-A-tail mRNA จะจับกับ Oligo (dT) ดังนั้นเมื่อล้างเอา RNA อื่นๆออกจาก column หมดแล้วจึงสามารถ elute เอาเฉพาะ mRNA ออกมาเพื่อใช้เป็น template สำหรับเตรียม first strand cDNA ต่อไปได้

ในการเตรียม mRNA ได้นำ total RNA ประมาณ 750 μg ไปอุ่นที่ 60°C เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม OEB binding buffer และ oligo (dT) ลงไปใน column โดยใช้ปริมาตร 250 μl และ 15 μl ตามลำดับ ผสมทุกอย่างให้เข้ากันแล้วบ่มที่ 70°C เป็นเวลา 3 นาทีและที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำ column ไปปั่นที่ $12,000 \times g$, 2 นาที แล้วดูด supernatant ออกจากนั้นปั่นล้าง matrix ด้วย OW2 buffer (400 μl) สองครั้ง แล้ว elute mRNA ออกด้วย pre-heated 70°C OEB buffer จากนั้น collect eluate ภายหลังปั่น column ที่ $12,000 \times g$, 1 นาที ทำการ elute mRNA ออกจาก oligotex ซ้ำสองครั้ง รวม eluates ที่ได้ (mRNA) เก็บไว้ที่ -70°C เพื่อใช้เตรียม first strand cDNA ในขั้นตอนต่อไป

2.3 การเตรียม first strand cDNA

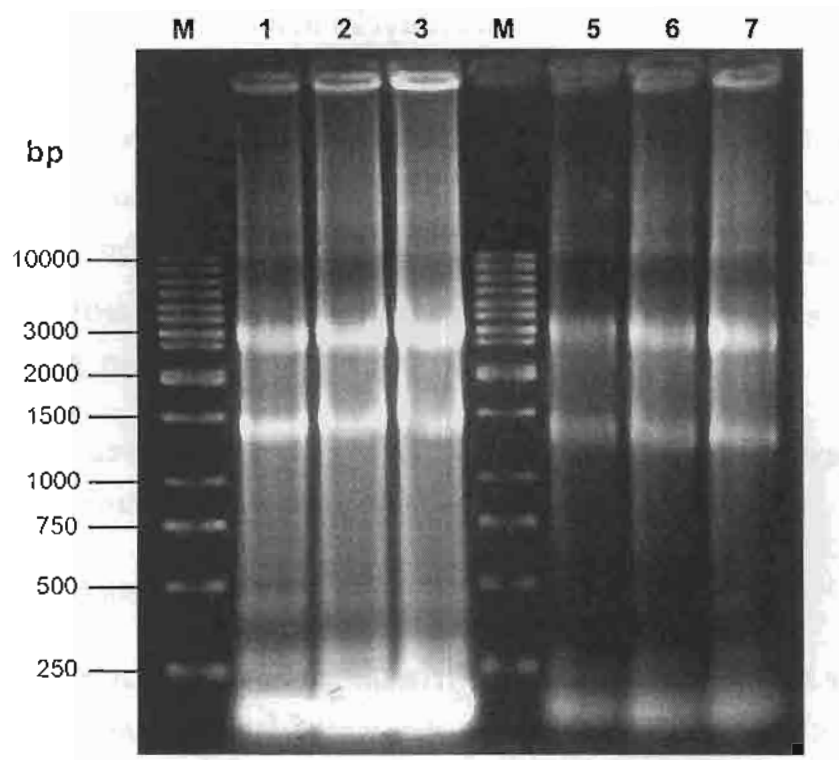
นำ mRNA จากข้อ 2.2 ไปเตรียม first strand cDNA ก่อนใช้ cDNA เป็น template สำหรับการเพิ่มขยายยีนของ VH และ VL

ในการเตรียม first strand cDNA ได้ใช้ชุด SuperscriptTM First Strand DNA Synthesis System สำหรับ RT-PCR ของ Invitrogen, USA ได้นำ oligo (dT) ไปจับกับ mRNA และเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ SuperscriptTM II Rnase H reverse transcriptase (RT) ซึ่งถูก engineer ให้ไม่มี Rnase H activity เพื่อไม่ให้ mRNA ถูก degrade ขณะสังเคราะห์ cDNA สายแรก

ตารางที่ 1.4 : แสดงผลการสกัด total RNA จาก LPF1 และ P3x-63-Ag 8.653

Cells	Number of cells	Total RNA (mg/ml)	Purity*
LPF1	10.8×10^6	4.8	1.63
P3x-63-Ag 8.653	2×10^6	0.7	1.94

* OD at 260 nm/OD at 280 nm



รูปที่ 1.7 : Integrity of total RNA of LPF1 และ P3x-63-Ag-8.563 separated in 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining

Lanes M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, LPF1 total RNA 9.6 µg

Lane 2, LPF1 total RNA 19.2 µg

Lane 3, LPF1 total RNA 28.8 µg

Lane 5, P3x-63-Ag-8.563 total RNA 1.4 µg

Lane 6, P3x-63-Ag-8.563 total RNA 2.8 µg

Lane 7, P3x-63-Ag-8.563 total RNA 4.2 µg

ตารางที่ 1.5 แสดงส่วนประกอบของ mixture ในการสังเคราะห์ cDNA

นำ mixture ไปบ่มที่ 65°C, 5 นาที แล้วจุ่มใน ice bath 1 นาที ก่อนเติม reagents ต่อไปนี้ : 10× RT buffer (2 µl), 25 mM MgCl₂ (4 µl), 0.1 M DTT (2 µl) และ RNase Out™ Recombinant RNase Inhibitor (1 µl) หลังจากผสมให้เข้ากันดีแล้วบ่มที่ 42°C, 2 นาที เติม Superscript™ RT 50 units ลงไปทุกหลอด แล้วบ่มที่ 42°C อีก 50 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70°C, 15 นาที แล้วนำหลอดไปใส่ ice bath ก่อนเติม RNase H 1 µl ทุกหลอดเพื่อทำลาย mRNA นำหลอดไปบ่มที่ 37°C, 20 นาที เสร็จแล้วเก็บ products (cDNA) เพื่อใช้เตรียม VH และ VL DNA ต่อไปด้วยวิธี PCR

รูปที่ 1.8 แสดงภาพ cDNA ที่สังเคราะห์จาก mRNA แยกโดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

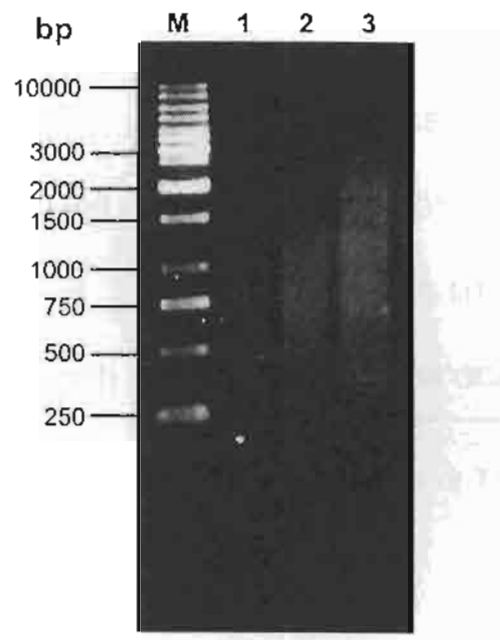
2.4 การ amplify VH และ VL DNA

เตรียม VH และ VL DNA segments โดยการทำให้ PCR แยกกันโดยใช้ cDNA ของ VH และ VL จากข้อ 2.3 เป็น templates และใช้ degenerate primers (ตารางที่ 1.6) ส่วน PCR reaction mixture (50 µl) ประกอบด้วย cDNA (2 µl), sterile distilled water (33 µl), 10× PCR buffer (5 µl), 10 mg/ml acetylated BSA (1 µl), 100 mM dNTPs mix (4 µl), 10 pmol/µl each primer (2 µl each) และ 2 units/µl DyNazyme™ DNA polymerase (1 µl) ตารางที่ 1.7 แสดง PCR condition

เมื่อจบปฏิกิริยาแล้วนำ amplicons ไป analyze ใน 1% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 kb DNA ladder (Fermentas) เป็น marker รูปที่ 1.9 แสดง amplicons ของ VH และ VL จาก clone LPF1 ส่วน clone P3x-63-Ag 8.653 ไม่มี amplicons (ไม่ได้แสดงรูป)

ตารางที่ 1.5 : Mixture ในการสังเคราะห์ cDNA

	Sample volume (μ l)	Control volume (μ l)
mRNA (LPF1)	7	-
mRNA (P3x-63-Ag 8.653)	-	1
10 nM dNTP mix	1	1
Oligo (dT) 12-18 (0.5 μ g/ μ l)	1	1
DEPC-treated water	1	7



รูปที่ 1.8 : cDNA ที่เตรียมได้จาก mRNA เห็นเป็น smear band ใน 1% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, LPF1 cDNA products (2 μ l)

Lane 2, LPF1 cDNA products (4 μ l)

Lane 3, LPF1 cDNA products (6 μ l)

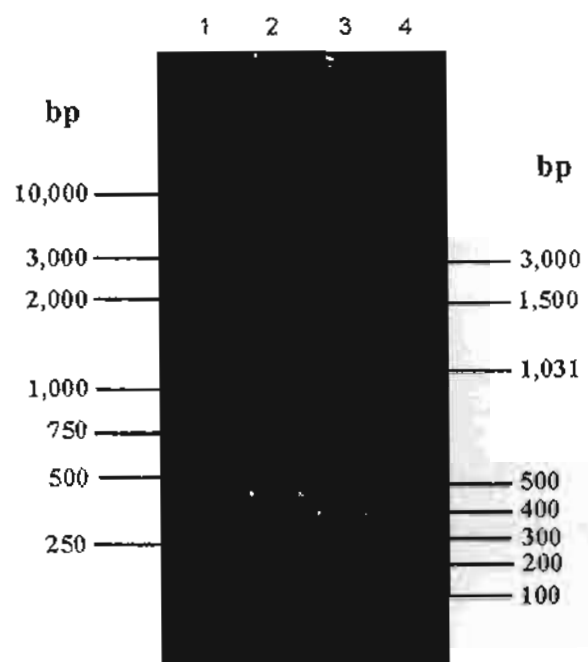
ตารางที่ 1.6 : แสดง sequences ของ primers ที่ใช้ amplify *VH* และ *VL* segments

Gene segment	Name of primer	Sequence
<i>VH</i>	<i>VH</i> (forward)	ATG GRA TGS AGC TGK GTM ATS CTC TT
	<i>Cγ</i> (backward)	GGG GCC AGT GGA TAG AC
<i>VL</i>	<i>VL</i> (forward)	GAY ATT GTG MTS ACC CAA ACT CCA
	<i>Cκ</i> (backward)	GTT GGT GCA GCA TCA GC

ใน degenerate primers, R = A or G; S = C or G; K = G or T; M = A or C; Y = C or T;
W = A or T

ตารางที่ 1.7 : PCR reaction condition สำหรับการ amplify VH และ VL genes

<i>VH</i>	<i>VL</i>
94°C, 5 min	94°C, 5 min
94°C, 1 min	94°C, 1 min
55°C, 1 min	60°C, 1 min
72°C, 2 min	72°C, 2 min
30 cycles	30 cycles
72°C, 10 min	72°C, 10 min



รูปที่ 1.9: แสดง VH และ VL DNA amplicons

Lane 1, 1 kb DNA ladder

Lanes 2 and 3, *VH* and *VL* amplicons, respectively

Lane 4, 100 bp DNA ladder

ขั้นตอนที่สามของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

การ clone VH และ VL gene segments เข้าสู่ vector, การ clone vector เข้าสู่ *E. coli* และการตรวจความถูกต้องของ VH- และ VL- amplicons

ในขั้นตอนนี้คณะผู้วิจัยนำทั้ง VH และ VL DNA amplicons ไป insert เข้าใน pGEM[®]-T vector แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* strain JM109 competent cells (Promega, USA) โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.1 การ purify amplicons

ภายหลังจากทำ RT-PCR แล้วได้นำ amplicons ทั้งของ VH และ VL ไป purify โดยใช้ UltraClean[™] PCR Clean-up kit เพื่อกำจัด reaction components ต่างๆ เช่น primers, enzyme, salts และ dNTPs

นำ PCR amplicons ไปผสมกับ buffered salt solution (Spin Bind) 5 volumes แล้ว load ลงใน spin filter unit แล้วปั่นที่ $10,000 \times g$, 1 นาที หลังจากนั้นดูดเอา fluid ออกให้หมดแล้วปั่นล้าง DNA ที่จับกับ matrix ด้วย SpinClean buffer ประมาณ 300 μ l เมื่อ discard wash fluid หมดแล้ว elute เอา DNA ออกด้วย distilled water ~ 50 μ l

3.2 การวัดปริมาณ DNA amplicons

นำ purified DNA amplicons (diluted 1:200 ในน้ำกลั่น) ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank

ตารางที่ 1.8 แสดงผลการเตรียม VH และ VL DNA amplicons

3.3 การคำนวณ optimum concentration ของ DNA ที่จะ insert กับ vector pGEM[®]-T vector system

เพื่อให้การ insert DNA เข้าไปใน vector และการ transform recombinant vector เข้า *E. coli* competent cells ได้ผลดีที่สุด ผู้วิจัยได้คำนวณ optimum concentration ของ DNA ที่จะ insert เข้าใน vector pGEM[®]-T vector system โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{ng of DNA insert} = \frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of PCR product}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert : vector ratio}$$

สำหรับ pGEM[®]-T vector system นั้นผู้ผลิตแนะนำให้ใช้อัตราส่วนของ DNA insert : vector = 3:1 ความเข้มข้นของ PCR products และขนาดได้คำนวณไว้แล้วโดยเปรียบเทียบกับ standard DNA ส่วน pGEM[®]-T vector มีขนาด 3000 bp

ในการ insert ผู้วิจัยใช้ vector 50 ng และ DNA ที่จะ insert 17.5 ng

3.4 Ligation reaction

ผู้วิจัยได้ใช้ pGEM[®]-T และ pGEM[®]-T Easy Vector protocols ในการ ligate PCR amplicons เข้าไปใน pGEM[®]-T vector โดยได้ set up ligation reaction ดังตารางที่ 1.9 โดยได้นำ reaction mixtures ไปบ่มที่ 4°C ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่น แล้วนำไป transform เข้า *E. coli* competent cells

ตารางที่ 1.8 : Representative results of VH and VL DNA purification

Sample	OD at 260 nm	OD at 280 nm	Purity*	Concentration (ng/μl)
VH amplicon	0.007	0.004	1.74	70
VL amplicon	0.002	0.001	2.0	10

*OD at 260 nm/OD at 280 nm

ตารางที่ 1.9 : Ligation reaction mixtures

Reagent	DNA (VH or VL amplicon) (μ l)	Positive control* (μ l)	Background control (μ l)
2x Rapid ligation buffer	5	5	5
PGEM [®] -T vector (50 ng)	1	1	1
Control insert DNA	-	2	-
PCR product (17.5 ng)		-	-
T4 DNA ligase (3 units/ μ l)	1	1	1
Distilled water to final of	10	10	10

*Provided in the kit

3.5 การ transform recombinant vector เข้าสู่ host cells

Competent *E. coli* ที่ใช้คือ strain JM109 การ transform ได้ทำตามคำแนะนำของผู้ผลิต ligation mixture จากข้อ 3.4 ปริมาตร 2 μ l ผสมกับ *E. coli* JM109 ใน Falcon tube ขนาด 15 ml ซึ่ง pre-chilled ไว้ใน ice bath เมื่อผสม *E. coli* กับ recombinant vector แล้วได้เก็บ mixture ไว้ใน ice bath ประมาณ 20 นาที เพื่อให้ vector จับกับ host cells หลังจากนั้นนำ mixture มาทำให้เกิด heat shock โดย warm ที่ 42°C ประมาณ 50 วินาที แล้วนำกลับไปจุ่มใน ice bath อีก 2 นาที จากนั้นเติม SOC medium ลงไป 950 μ l บ่มพร้อมเขย่าที่ 37°C ประมาณ 90 นาที ก่อนนำไป plate ลงบน LB/ampicillin (100 μ g/ml)/100 mM IPTG/5% X-Gal plate แล้วบ่ม plate ที่ 37°C ข้ามคืน

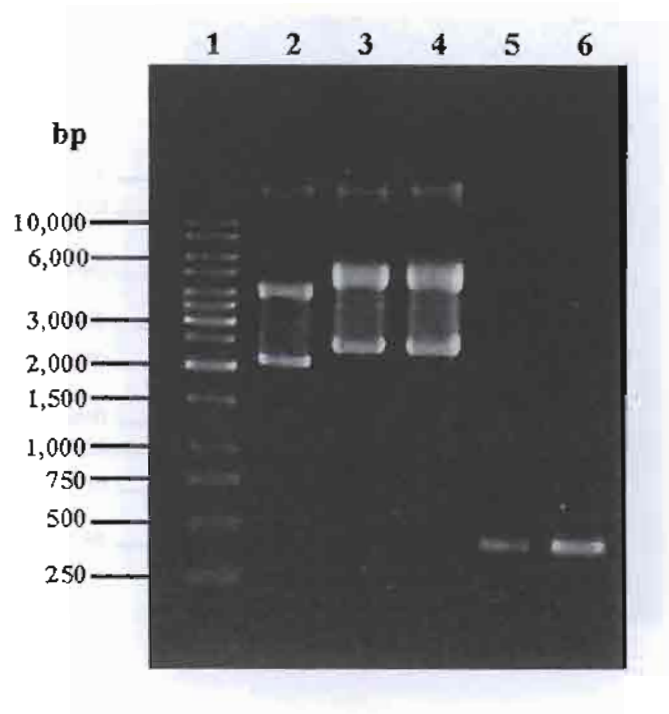
ภายหลัง incubate ได้เลือก pick bacterial colonies ทั้งสีฟ้าและสีขาว แต่ละ colonies ใส่ลงใน LB-ampicillin (100 μ g/ml) 3 ml บ่ม ที่ 37°C พร้อมเขย่าข้ามคืน จากนั้นนำไป screen หา transformed *E. coli*

3.6 การ screen หา *E. coli* ซึ่ง carry recombinant plasmids

นำ *E. coli* culture มาปั่นเพื่อเก็บเซลล์สำหรับนำไปตรวจหา plasmid โดยการสกัด plasmid จาก *E. coli* ใช้ standard protocol ดังนี้

นำ *E. coli* pellet มา suspend ใน solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) ปริมาตร 200 μ l เติม RNase 1 μ l ก่อนผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex 30 วินาที จากนั้นเติม solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 300 μ l เก็บของผสมไว้ใน ice bath 3-4 นาที เติม solution III (3 M potassium acetate, pH 5.2) ลงไป 300 μ l จากนั้นนำ reaction mixture ไปปั่นที่ 12,000 $\times$ g, 4 นาที เก็บ supernatant มา extract ด้วย phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) แล้ว precipitate plasmid ออกจาก top phase ด้วย 0.6 volume isopropanol ล้าง plasmid ด้วย 70% ethanol 200 μ l นำ plasmid ที่ได้มาทำให้แห้งโดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนเติมน้ำกลั่นลง ไป 30 μ l นำไปตรวจ integrity โดยการแยกใน 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจดู DNA band(s) ได้ U-V light รูปที่ 1.10, 1.11 และ 1.12 แสดง plasmid profiles ของ LPF1 VH transformed *E. coli*, LPF1 VL transformed *E. coli* และ pGEM-T vector transformed *E. coli* ตามลำดับ

ได้ extract plasmid จาก positive *E. coli* (white colonies) เพื่อนำไปทำ DNA sequencing พบว่าบาง clones เท่านั้นที่ให้ DNA sequence homology กับ mouse immunoglobulin VH และ VL DNA segments ซึ่ง deposit ไว้ใน GenBank แสดงว่า amplicons ในข้อ 3.1 เป็น VH และ VL DNA segments ของ mouse hybridoma clone LPF1 จริง



รูปที่ 1.10 : Plasmid profile ของ LPF1 VH ซึ่ง extracted จาก transformed *E. coli* แยกโดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 1 kb DNA ladder

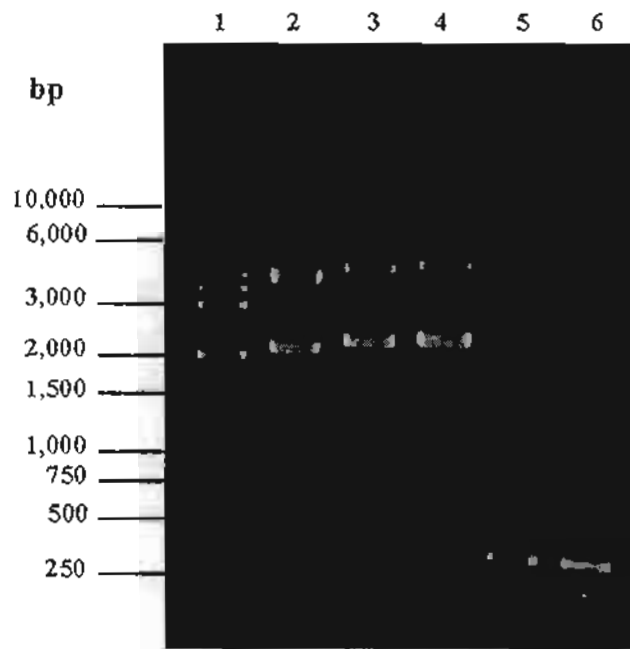
Lane 2, pGEM-T-plasmid

Lane 3, pGEM-T-VH plasmid extracted จาก *E. coli* clone 1

Lane 4, pGEM-T-VH plasmid extracted จาก *E. coli* clone 2

Lane 5, VH amplicon amplified from *E. coli* clone 1

Lane 6, VH amplicon amplified from *E. coli* clone 2



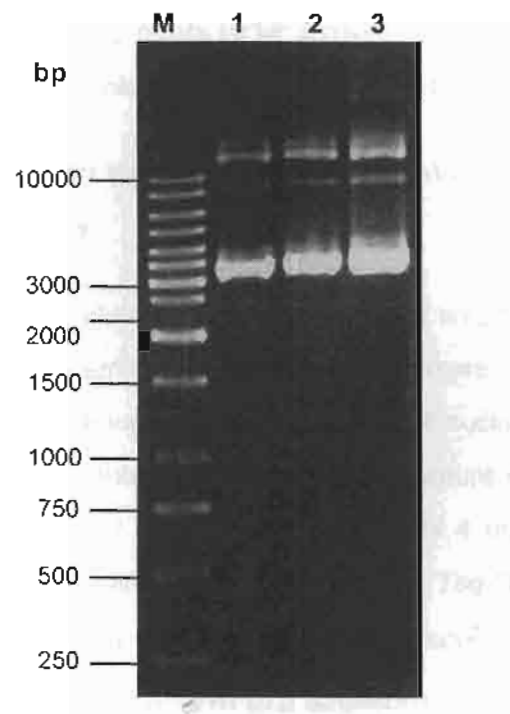
รูปที่ 1.11 : Plasmid profile ของ LPF1 VL ซึ่ง extracted จาก transformed *E. coli* แยกโดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 1 kb DNA ladder

Lane 2, pGEM-T-plasmid

Lanes 3 and 4, pGEM-T-VL plasmid จาก *E. coli* clone 1 และ clone 2

Lanes 5 and 6, VL amplicons จาก *E. coli* clones 1 และ 2 ตามลำดับ



รูปที่ 1.12 : Plasmid profile ของ pGEM[®]-T vector ที่ extract จาก transformed *E. coli* แยก โดย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lanes 1-3, pGEM[®]-T vector plasmid profile

ขั้นตอนที่สี่ของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง :

การเชื่อม VH- และ VL- DNA segments เข้าด้วยกันและการสร้าง phage library ที่ display murine VH-linker VL (muScFv) อยู่บนผิวของ phages

4.1 การเชื่อม linkers เข้ากับ VH และ VL DNA segments เพื่อเพิ่มความยาวของ VH และ VL DNA segments

นำ PCR amplicons ทั้ง VH และ VL (จากข้อ 3.1) มา amplify เพิ่มเติมโดยใช้ชุด primers VH back และ VH for สำหรับ amplify VH DNA และใช้ primers VL back และ VL for สำหรับ amplify VL DNA ตามลำดับ (Cheng *et al.*, 2003) ลำดับของ nucleotides ของ primers ไว้แสดงไว้ในตารางที่ 1.10 ซึ่ง reaction mixtures ประกอบด้วย ultrapure distilled water 34.2 μ l 10 $\times$ buffer 5 μ l, 10 mg/ml acetylated BSA 0.5 μ l, dNTPs mix 4 μ l, primers 2 μ l (each), DNA template (purified VH และ VL DNA จากข้อ 3.1) 1 μ l และ Taq DNA polymerase (2 units/ μ l) 1.3 μ l โดย PCR condition ที่ใช้คือ 94°C, 5 นาที, 94°C, 1 นาที, 55°C, 1 นาที, 72°C, 2 นาที, 30 cycles และสุดท้ายที่ 72°C, 10 นาที เก็บ amplicons ไปตรวจดูด้วย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมดู DNA bands ด้วย ethidium bromide ภายใต้ U-V light

Figure 1.13 แสดง extended VH (~550 bp) and extended VL (~400 bp) ซึ่งต่อกับ linkers เรียบร้อยแล้วให้ชื่อว่า EVH และ EVL ตามลำดับ

4.2 การต่อ EVH และ EVL เป็น single chain Fv ของ murine monoclonal antibody LPF1 (*muscfv*)

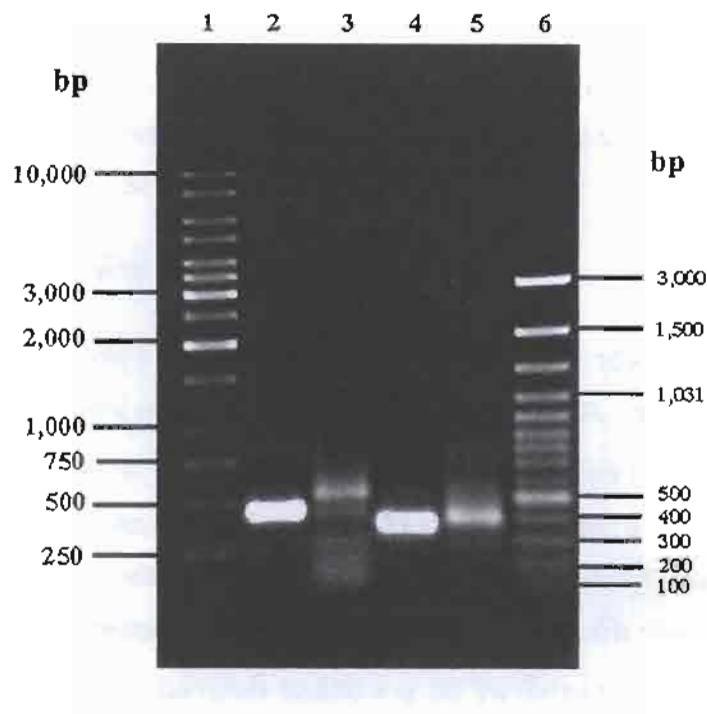
นำ EVH และ EVL ไป purify ด้วย SuperClean™ Column เช่นเดียวกับข้อ 3.1 แล้วนำไปเชื่อมต่อกันด้วย splicing overlap extension (SOE) PCR โดยใช้ outer primers ของ VH และ VL อย่างละ 1 คู่ (ตารางที่ 1.10) ได้แก่ forward primer ซึ่งมี *Sfi*I restriction site และ backward primer ซึ่งมี *Not*I restriction site (Qiagen, USA) และใช้ PCR mixture ดังนี้ ultrapure distilled water 35.5 μ l, 10 $\times$ Pfx buffer 5 μ l, 10 mM dNTPs mix 3 μ l, MgSO₄ 1 μ l, primers 1.5 μ l (each), templates (EVH และ EVL ที่ purified แล้วและทราบความเข้มข้นโดย U-V spectrometry) อย่างละ 50 ng และ Pfx polymerase 0.5 μ l ส่วน PCR condition คือ 92°C, 1 นาที, 60°C, 1 นาที, 72°C, 3 นาที, 30 cycles, และ 72°C, 10 นาที นำ amplicons ไปตรวจด้วย 1% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide พบว่าได้ DNA segment (murine scFv; *muscfv*) ที่ 718 bp เมื่อเทียบกับ standard markers จากการคำนวณด้วย program Quality One ของ Gel Documentation System 2000 (Bio-Rad, USA)

ตารางที่ 1.10 : Primer sequences (Cheng *et al.*, 2003) สำหรับ amplify VH และ VL เพื่อเพิ่มความยาวของสาย VH และ VL DNA segments

DNA segment	Primer	Sequence
VH	VH back	5' GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAG GT CCA GCT GCA GCA GTC 3'
	VH for	5' AGG ATT CGC GGC CGC TGA CGA GAC GGT GAC TGA GGT 3'
VL	VL back	5' AGC CGG CCG AYA TTG TGM TSA CCC AAA CTC CA 3'
	VL for	5' GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC CCG TTT G ATT TCC AGC CTG G 3'

back, backward

for, forward



รูปที่ 1.13 : *EVH* และ *EVL* amplicons at ~550 bp และ ~400 bp ตามลำดับเปรียบเทียบกับ *VH* และ *VL* amplicons

Lane 1, 1 kb DNA ladder

Lane 2, *VH* amplicon

Lane 3, *EVH* amplicon

Lane 4, *VL* amplicon

Lane 5, *EVL* amplicon

Lane 6, 100 bp DNA ladder

4.3 การ clone *muscFv* fragment เข้าสู่ phagemid

a. การ purify *muscFv* amplicons จากข้อ (4.2) เพื่อกำจัด impurity

ได้ใช้ SuperClean™ Column เช่นเดียวกับข้อ 3.1 เพื่อ clean *scFv* amplicon หลังจาก purify แล้วนำไปตรวจหาปริมาณและความบริสุทธิ์โดยดูดกลืนแสง U-V ที่ 260 nm และ 280 nm พบว่า DNA มีความบริสุทธิ์ 1.57 และมีความเข้มข้น 137.5 µg/ml

b. การตัด *muscFv* ด้วย restriction enzyme

นำ *muscFv* มาย่อยด้วย *Sfi*I โดยมี reaction mixture ดังนี้: 10× NEB buffer (Biolab, New England) 7 µl, 1 mg/ml acetylated BSA 5 µl, purified *muscFv* 36 µl, *Sfi*I (20 units/µl) 2 µl, overlaid ด้วย mineral oil แล้ว incubate ที่ 50°C, 6 ชั่วโมง ต่อกันนั้นทำ *Not*I digestion โดยเตรียมส่วนผสมดังนี้: ultrapure distilled water 31 µl, 10 × buffer 5 µl, BSA (1 mg/ml) 5 µl, 1 M NaCl ปริมาตร 5 µl และ *Not*I (10 units/µl; Promega) 4 µl นำของผสมไปเติมใน *Sfi*I digested *scFv* โดยแทง pipette tip ผ่านชั้น mineral oil ลงไปผสมกัน ปั่นที่ 10,000 × g, 30 วินาทีแล้วเก็บที่ 37°C, 4 ชั่วโมง แล้วปั่นที่ 10,000 × g, 30 วินาทีก่อนนำ mixture ได้ mineral oil ไป purify โดยใช้ SuperClean™ Column

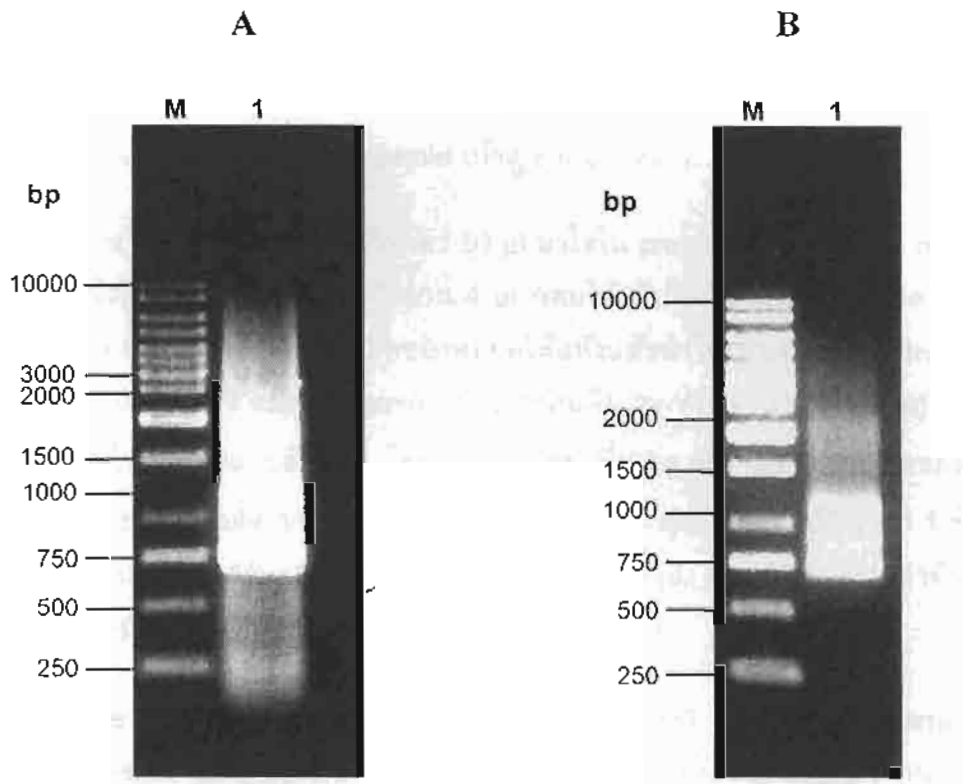
รูปที่ 1.14 แสดง *muscFv* ก่อนและหลัง purified และภายหลังตัดด้วย *Sfi*I และ *Not*I พบว่า ได้ purity 1.4 และมีปริมาณ *muscFv* DNA 35 ng/µl (total 60 µl = 2,100 ng)

c. การ ligate *Sfi*I, *Not*I digested *muscFv* กับ pCANTAB5E phagemid

ทำตาม instruction manual ของ Amersham Biosciences ชุด Expression Module/Recombinant Phage Antibody System ส่วนผสมในการ ligate ประกอบด้วย 10× OPA buffer 5 µl, *muscFv* DNA 2 µl, pCANTAB5E (50 ng/µl) 3 µl, 10 mM ATP 5 µl, T4 DNA ligase (10 units/µl) 1 µl, sterile ultrapure distilled water 34 µl นำ mixture ไป incubate ที่ 16°C, 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น heat-inactivate enzyme ที่ 70°C, 10 นาที แล้วนำมา chilled ใน ice bath ก่อนเก็บไว้ที่ -20°C หรือใช้ phagemid นี้ในการ transform *E. coli* competent cells ต่อไป

4.4 การ transform *E. coli* ด้วย *muscFv* recombinant phagemid

ใช้วิธี electroporation เพื่อ transform recombinant phagemids เข้า competent *E. coli*



รูปที่ 1.14: แสดง muscFv DNA ก่อนและหลัง purified และภายหลังตัดด้วย *Sfi*I และ *Not*I

รูป A

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, LPF1 scFv amplicon before the purification

รูป B

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, LPF1 scFv amplicon after the purification

การเตรียม competent *E. coli*

นำ *E. coli* strain TG1 (lyophilized form; Amersham Biosciences) มา culture ใน 2x-YT medium 1 ml บ่มที่ 37°C พร้อมเขย่า (200 rpm) ข้ามคืน นำ culture มา streak ลงบน LB agar plate ให้ได้ single colonies นำ single colonies ไปเตรียม competent cells ตาม protocol ของ ชุด Expression

4.5 การนำ *muscFv* recombinant phagemid เข้าสู่ competent *E. coli*

นำ competent *E. coli* TG1 cells ปริมาตร 50 µl มาใส่ใน pre-chilled cuvette (1 mm gap) (Eppendorf) แล้วจึงใส่ ligation product จำนวน 4 µl ผสมให้เข้ากันกับ competent cells ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีใน ice bath เช็ดด้านนอกของหลอดให้แห้งแล้วนำไปเข้าเครื่อง electroporator ซึ่ง set ไว้ที่ 2,500 volts แล้ว start program หลังจากนั้นเติม 2x-YT-G (2% glucose) ที่อุณหภูมิ 37°C ลงไปใน cuvette แล้ว mix โดยการ pipette ขึ้น-ลง เมื่อ mix ดีแล้วดูดของเหลวทั้งหมดใส่ใน sterile Falcon tube ขนาด 15 ml นำไปเขย่าที่ 250 rpm, 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไป plate ลงบน SOBAG plates 3 plates (200 µl, 100 µl, และ 10 µl ตามลำดับ) บ่ม plates ที่ 37°C ข้ามคืน ส่วนที่เหลือนำไปทำ phage rescue ต่อไป

พบว่า single colonies ขึ้นบน SOBAG plates (รูปที่ 1.15) แสดงว่ามี phagemids ซึ่ง carry ampicillin resistant gene อยู่ใน *E. coli* cells จริง และน่าจะแสดงว่ามี *muscFv* DNA อยู่ใน *E. coli* ด้วย ซึ่งได้ทำการยืนยันโดยสัณเคราะห์ *E. coli* colonies โดยวิธี PCR เพื่อ amplify *muscFv* ของ LPF1 จาก phagemid พบว่า phagemids เหล่านี้มี amplicons ของ *muscFv* จริง (รูปที่ 1.16) แสดงว่าได้ผลิต phage library (transformed *E. coli* colonies ซึ่ง harbour *muscFv*-phagemids) แล้ว



Transformed cells (200 µl)

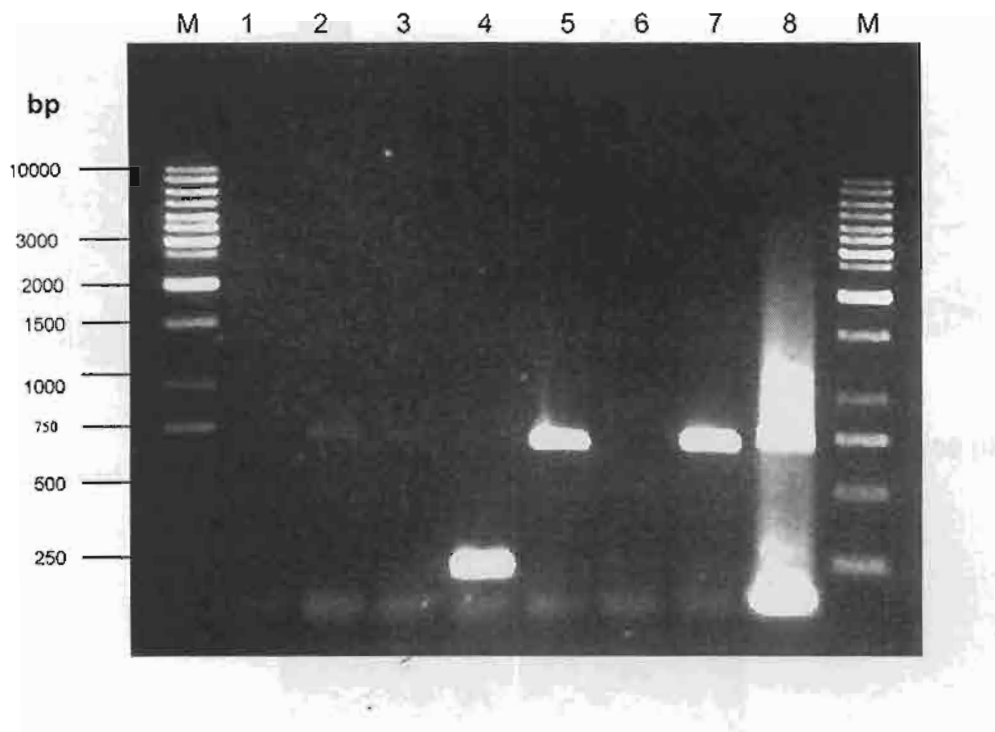


Transformed cells (100 µl)



Transformed cells (10 µl)

រូប 1.15 : SOBAG plates with transformed *E. coli* colonies



รูปที่ 1.16 : PCR amplicon ของ muscFv DNA จาก phagemid isolated from transformed *E. coli* TG1

Lanes M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, Negative control (TG1 *E. coli* cells)

Lanes 2, 3, 5 and 7, Positive LPF1 scFv phagemid

Lanes 4 and 6, Negative LPF1 scFv phagemid

Lane 8, Positive control (LPF1 scFv amplicon)

ขั้นตอนที่ห้าของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง :

การเลือก transformed (recombinant) *E. coli* clones ซึ่ง harbour *muscFv* - phagemids

5.1 การ Rescue antibody phage library

หลังจากได้ทำการนำ pCANTAB5E ที่มี inserted *muscFv* เข้าสู่ *E. coli* TG1 แล้วได้แบ่งเอามา 900 μ l นำมาผสมกับ 2x-YT medium 9.1 ml นำ mixture ไปเขย่าที่ 37°C, 250 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม 20 mg/ml ampicillin 50 μ l ตามด้วยการเติม helper phage M13K07 จำนวน 4×10^{10} pfu นำ mixture ไป incubate ที่ 37°C, 250 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วปั่นที่ 1,000 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไปแล้วเติม 2x-YT-AK (100 μ g/ml ampicillin, 50 μ g/ml kanamycin) ลงไป 10 ml แล้วบ่มที่ 37°C, 250 rpm ข้ามคืน

วันรุ่งขึ้นปั่นของผสมที่ 1,000 x g เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant ซึ่งมี complete phages อยู่ นำไปทำ panning กับแอนติเจนของ *Leptospira* ในขั้นตอนต่อไป

5.2 Panning เพื่อการคัดเลือก phages ซึ่งมี muScFv เฉพาะต่อ *Leptospira* antigen อยู่บนผิว

5.2.1 การตกตะกอน phages

นำ preparation จากข้อ 5.1 ซึ่งมี mature phages อยู่มาตกตะกอนโดยเติม polyethyleneglycol (PEG) ใน NSS ปริมาตร 2 ml ลงไปใน phage preparation 10 ml ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ที่ 4°C, 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 10,000 x g, 20 นาทีที่ 4°C แล้วดูด supernatant ทิ้งไปแล้วซับของเหลวที่เหลือในหลอดจนเห็นตะกอนขาวจางของ phages

5.2.2 การเตรียม phages ก่อนทำ panning

เติม 2x-YT medium 16 ml ลงในตะกอน phages จากข้อ 5.2.1 จากนั้นเติม blocking buffer (10% bovine serum albumin, BSA; 1x PBS; 0.01% NaN₃) 14 ml และ Triton X-100 ปริมาตร 30 μ l ลงไปใน phage preparation ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ก่อนนำไปใช้ในข้อ 5.2.4

5.2.3 การเตรียม immobilized *Leptospira* antigen

นำ pathogenic *Leptospira* homogenate (10 μ g/ml of coating buffer, i.e. 0.05 M NaCO₃, pH 9.6) ปริมาตร 3 ml ไปใส่ใน tissue culture flask ขนาดพื้นที่ 25 cm² พยายามเกลี่ย

โดยเอียง flask ไปมาให้ antigen coat บน surface ของ flask ให้ทั่ว นำ flask ไป incubate ที่ 37°C, 24 ชั่วโมง ล้าง flask ด้วย PBS, pH 7.4 สามครั้ง แล้วเติม blocking buffer (10% BSA, ใน PBS, pH 7.4) จนเต็ม flask นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเท blocking buffer ทิ้งแล้วล้าง flask ด้วย PBS, pH 7.4 สามครั้ง

5.2.4 การทำ panning

นำ phage suspension ปริมาตร 20 ml จากข้อ 5.2.2 มาเติมลงใน antigen coated-flask ที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.2.3 นำ flask ไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเทของเหลวที่มี unbound phages ออกให้หมด ล้าง flask ด้วย PBS, 20 ครั้งและล้างด้วย PBS-Tween-20 (PBS-T) อีก 30 ครั้งเพื่อกำจัด unbound phages ออกให้หมด

5.2.5 การ transfect *E. coli* TG1 ด้วย antigen specific phages

เตรียม log phase *E. coli* TG1 โดยการ pick single colonies จาก LB agar plate ใส่ลงใน 10 ml 2x-YT medium นำไป incubate พร้อมเขย่าที่ 37°C จน absorbance ที่ 600 nm ได้ประมาณ 0.3-0.5 เติม log phase *E. coli* ที่เตรียมไว้ลงใน flask ซึ่งมี phages จับอยู่ จากข้อ 5.2.4 นำ flask ไปเขย่าที่ 250 rpm, 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แบ่ง preparation มา 100 µl นำมา streak ลงบน SOBAG plate เพื่อดูว่า phages infect *E. coli* หรือไม่ โดยนำ plate ไป incubate ที่ 37°C ข้ามคืนเพื่อดู plaques จากนั้นทำ panning ซ้ำอีกจนครบ 5 รอบ (จากข้อ 5.2.1 ถึง 5.2.5)

รูปที่ 1.17 แสดง colonies ของ transfected *E. coli* TG1

5.3 การ screen หา high affinity phage clones

หลังจากทำ panning ครบ 5 รอบและได้ transfect antigen specific phages เข้า TG1 *E. coli* ในรอบที่ 5 ของ panning แล้ว ทำการเก็บ stock transfected *E. coli* โดยเติม sterile glycerol ลงไปใน *E. coli* culture ให้ได้ความเข้มข้น 30% แล้วเก็บไว้ที่ -70°C โดยแบ่ง *E. coli* ส่วนหนึ่งนำมา spread บน SOBAG plate เพื่อ screen หา transfected *E. coli* colonies ที่ harbour *musFv*-phages ที่มี high affinity *muScFv* บนผิวต่อไปโดยวิธีทำ phage ELISA กับ *Leptospira* antigen



รูปที่ 1.17 : แสดง colonies ของ transfected *E. coli* สายพันธุ์ที่จะใช้ผลิต muScFv protein

5.3.1 การทำ phage ELISA

ก. การเตรียม phage suspension

นำ transfected *E. coli* แต่ละ colony บน SOBAG plates (รูปที่ 1.17) มาใส่ในแต่ละหลอด ซึ่งมี 2x-YT-AG (100 µg/ml ampicillin, 2% glucose) นำหลอดไป incubate ที่ 37°C, พร้อมเขย่าที่ 250 rpm ข้ามคืน จากนั้นดูด culture 40 µl ใส่ลงใน 2x-YT-AG 400 µl ซึ่งมี M13KC7 2.5×10^{10} pfu ผสมอยู่ เขย่าที่ 37°C, 150 rpm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 1,500 × g, 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูด supernatant ออกแล้ว resuspend pellet ด้วย 2x-YT-AK 400 µl นำไปเขย่าที่ 37°C, 250 rpm ข้ามคืน นำไปปั่นที่ 1,500 × g, 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บ supernatant ไปทำ phage ELISA

ข. Phage indirect ELISA

ทำการ coat Maxisorb ELISA plates ด้วย pathogenic *Leptospira* homogenate (10 µg/ml coating buffer) หลุมละ 100 µl นำ plates ไป incubate ที่ 37°C จนกระทั่ง plates แห้ง แล้วล้างทุกหลุมด้วย PBS-T สามครั้ง หลังจากนั้น block ทุกหลุมด้วยการเติม blocking solution (2% BSA ใน PBS, pH 7.4) ลงไปหลุมละ 200 µl บ่มที่ 37°C ใน humid chamber เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเอา blocking solution ออกให้หมดด้วย PBS-T

เติม phage suspension จาก transfected *E. coli* แต่ละ colonies จากข้อ ก. ลงใน antigen coated wells แต่ละ wells หลุมละ 90 µl แล้วเติม blocking solution อีก 10 µl ทุกหลุม ส่วนหลุมสุดท้าย (หลุมที่ 96) เติม 2x-YT medium 100 µl เท่านั้น (ไม่มี phages เพื่อใช้เป็น blank) นำ plates ไปบ่มที่ 37°C ใน humid chamber เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเอา unbound phages ออกด้วย PBS-T แล้วเติม 1:5,000 anti-M13-horseradish-peroxidase conjugate ลงไปหลุมละ 100 µl นำ plates ไปบ่มเช่นเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างทุกหลุมด้วย PBS-T ก่อนเติม ABTS substrate ลงไปหลุมละ 100 µl เก็บ plates ในที่มืด 1 ชั่วโมงแล้วเติม stop solution (0.1 M citric acid, 0.01% NaNO₃) ลงไปหลุมละ 50 µl นำ content ในแต่ละหลุมไปอ่านหาค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 nm โดยใช้หลุมที่เติมเฉพาะ 2x-YT (หลุมที่ 96) เป็น blank หลุมที่ให้ผลบวกคือหลุมที่มีค่า OD เท่ากับ/หรือมากกว่า 0.2

ตารางที่ 1.11 และรูปที่ 1.18 แสดงผลของ phage ELISA

จากนั้นตรวจ cross-reactivity ของ positive phages โดยใช้ BSA (10 µg/ml; 100 µl/well) แทน *Leptospira* homogenate ใน phage ELISA แล้วเลือกเฉพาะ *E. coli* clones ที่ carry muScFv displaying phages ที่จับกับ *Leptospira* antigens แต่ไม่จับกับ BSA ไว้เป็น muScFv-phagemid transfected-*E. coli* clones

ตารางที่ 1.11 : แสดงค่า optical densities ของ phage indirect ELISA เปรียบเทียบระหว่าง *Leptospira* antigen- and BSA- coated- plates

Transfected <i>E. coli</i> (Phage) clone no.	Optical density at 405 nm	
	<i>Leptospira</i> antigen	BSA
1	0.264	0.084
2	0.228	0.112
3	0.194	0.112
4	0.297	0.122
5	0.202	0.109
6	0.258	0.155
7	0.395	0.104
8	0.199	0.073
9	0.305	0.079
10	0.292	0.093
11	0.313	0.080
12	0.233	0.112
13	0.353	0.112
14	0.341	0.088
15	0.209	0.079
16	0.200	0.113
17	0.257	0.154
18	0.206	0.146
19	0.276	0.174
20	0.275	0.150
21	0.562	0.191
22	0.501	0.185
23	0.367	0.182
24	0.474	0.163
25	0.540	0.183
26	0.396	0.184
27	0.382	0.191
28	0.387	0.194
29	0.433	0.188
30	0.397	0.182

OD $\geq$ 0.2 is positive



รูปที่ 1.18 : แสดงผลของ phage ELISA เพื่อตรวจหา *muscFv*-phagemid transfected *E. coli* clones

ขั้นตอนที่หกของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

การเตรียม murine single chain variable antibody fragments (muScFv)

6.1 การผลิต recombinant murine ScFv protein (muScFv)

ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้นำ *muscfv*-phagemids จาก transfected *E. coli* colonies ที่เลือกไว้จากการทำ phage ELISA ต่อ *Leptospira* whole cell homogenate (ข้อ 5.3) มา infect log phase *E. coli* strain ที่เหมาะสมต่อการ induce protein expression โดยนำ phage suspension 3 μ l เติมลงใน *E. coli* suspension 1 μ l นำไป incubate พร้อมเขย่าที่ 37°C, 200 rpm เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำเชื้อ *E. coli* มา streak บน SOBAG-N plate เพื่อให้ได้ isolate colonies นำ plate ไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

จากนั้นนำ isolated colonies ไป inoculate ใน 2x-YT medium (supplement with 100 μ g/ml ampicillin) 5 ml นำไปเขย่าที่ 200-250 rpm, 37°C overnight เพื่อเตรียมเป็น starter culture นำ starter culture ที่ได้ไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 2x-YT 40 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 250 rpm, 37°C จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm = 0.5 จากนั้นเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM ทำการเขย่าเชื้อต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่นเก็บเซลล์ *E. coli* ที่ 5,000 $\times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C

นำ cell pellet มา resuspend ด้วย 0.01 M PBS, pH 7.4 จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง French press ที่ความดัน 12,000 psi ปั่นแยกกากเซลล์ออกที่ 10,000 $\times g$, 4°C, 20 นาที นำ supernatant ไปกรองผ่าน 0.22 μ m membrane ส่วนใสที่ได้เรียกว่า crude recombinant murine ScFv ต่อ *Leptospira* antigen

6.2 การทำ Hemolysis inhibition test เพื่อทดสอบ neutralizing capacity ของ crude murine ScFv (muScFv)

ผู้วิจัยได้นำ protein solution ที่มี crude recombinant murine ScFv (muScFv) ไปทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง RBC hemolysis จากเชื้อ pathogenic *Leptospira interrogans*, serogroup Pomona, serovar *pomona* ซึ่งเป็น isolate ใหม่จากผู้ป่วย (โปรตูดิวส์และขั้นตอนการทดสอบข้อ 1.5.1)

ผลการทดสอบสรุปในตารางที่ 1.12

ตารางที่ 1.12: แสดงประสิทธิภาพการยับยั้ง hemolysis ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Leptospira* โดย crude recombinant murine ScFv (muScFv) จาก transfected *E. coli* clones ต่างๆ และ *MvaII* digested patterns ของ *muscFv* carrying phage clones

Transfected <i>E. coli</i> clone no.	OD phage ELISA	<i>MvaII</i> pattern**	% Hemolysis inhibition
1	0.264	3	15.70
2	0.228	3	6.52
3	0.194	3	26.34
4	0.297	3	18.07
5	0.202	2	27.11
*6	0.258	1	29.33
7	0.395	3	24.89
8	0.199	2	14.52
9	0.305	3	15.85
10	0.292	2	13.48
15	0.209	3	28.30
*16	0.200	3	29.04
*17	0.257	5	34.07
20	0.275	4	12.59
*30	0.397	1	16.44
19	0.276	1	12.44

หมายเหตุ ใช้ protein lysate ของ *E. coli* และ crude recombinant murine ScFv (muScFv) against diphtheria เป็น negative controls พบว่า controls ทั้งสองไม่สามารถ inhibit RBC hemolysis ที่เกิดจาก *Leptospira* ได้ (ไม่ได้แสดงผล)

* selected transfected *E. coli* clones ที่นำไปใช้ในการวิจัยขั้นต่อไปสำหรับเตรียม humanized-murine single chain antibody fragments (huScFv)

** โปรดดูคำอธิบายการทดลองในข้อ 7.2 และรูปที่ 1.19

ขั้นตอนที่เจ็ดของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

Murine VH- and VL- alignment with human VH and VL sequences in the database in order to select the most matched-human immunoglobulin frameworks

7.1 Amplification of high affinity *muscFv* จาก transfected *E. coli* TG1 clones

คัดเลือก transfected *E. coli* clones ที่ให้ผลบวก phage ELISA และ OD มากกว่า 0.2 (ตารางที่ 1.11) มาตรวจสอบว่า phagemid ที่อยู่ใน clones เป็น scFv ของ murine MAbLFP1 จริงโดยการทำให้ PCR เพื่อ amplify *muscFv* โดยใช้ primers ที่มีความเฉพาะต่อ upstream และ downstream ของ *muscFv* (ตารางที่ 1.13) ซึ่ง expected amplicon size คือ ~900 bp

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วย ultrapure distilled water (UDW) 18.5 μ l, 10 x PCR buffer 2.5 μ l, 10 mM dNTPs mix 1.0 μ l, (10 pmol/ μ l) primer R1 ปริมาตร 1.0 μ l, R2 ปริมาตร 1.0 μ l, plasmid 0.5 μ l, *Taq* polymerase (2 units/ μ l) 0.5 μ l โดยมี condition ดังนี้ 94°C, 5 นาที, 94°C, 1 นาที, 55°C, 2 นาที, 72°C, 2 นาที จำนวน 30 รอบ รอบสุดท้ายเพิ่ม 72°C อีก 10 นาที นำ PCR amplicons มาตรวจดูด้วย 1% agarose gel electrophoresis และ ethidium bromide staining พบว่ามี *muscFv* อยู่จริง

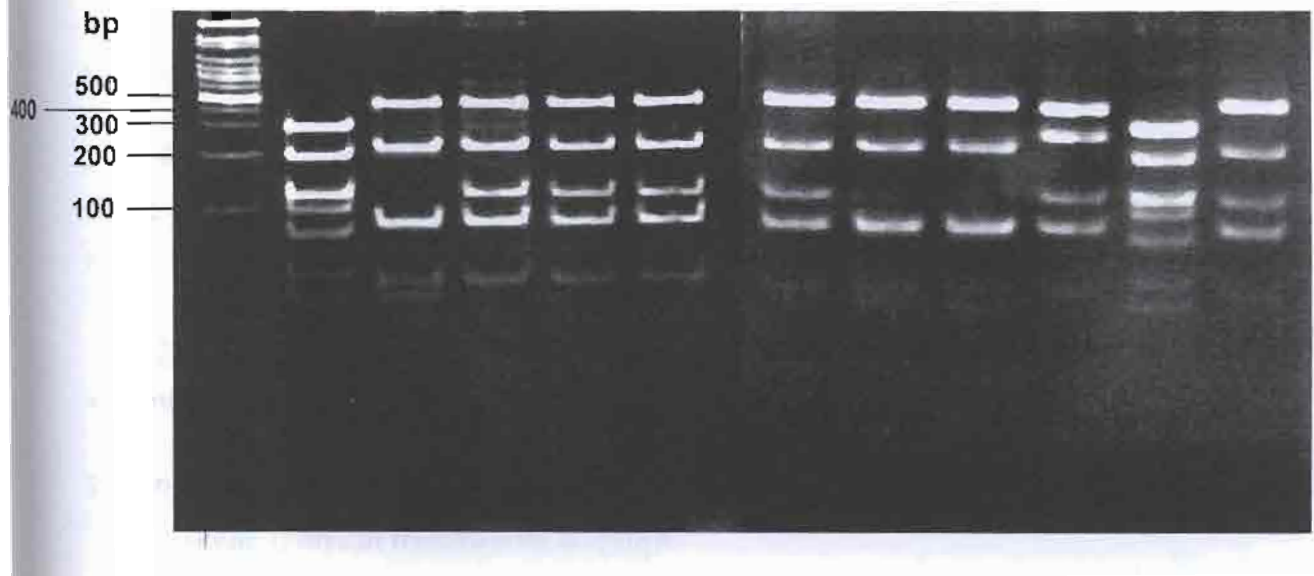
7.2 การตรวจสอบ diversity ของ *muscFv* โดย *MvaII* enzyme

เนื่องจาก primers ที่ใช้ในการ amplify murine VH/VL เป็น degenerate primers ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจสอบ diversity ของ *muscFv* ใน *E. coli* clones ที่เลือกไว้เพื่อไม่ให้ clones ซ้ำซ้อนในการวิจัยขั้นต่อไป

การตรวจสอบ diversity ของ murine scFv ทำได้โดยดู patterns ของ digested *muscFv* DNA segments ซึ่งตัดโดย *MvaII* enzyme ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย PCR product จากข้อ 7.1 10 μ l, 10x buffer 5 μ l, UDW 34 μ l และ *MvaII* (10 unit/ μ l) 1 μ l นำส่วนผสมไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดู patterns ของ digested DNA โดยนำไป run ใน polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide (12%) รูปที่ 1.19 และ ตารางที่ 1.12 แสดง DNA patterns ต่างๆเมื่อตัด *muscFv* จาก transfected clones ด้วย *MvaII*

ตารางที่ 1.13 : แสดงลำดับ nucleotide sequences ของ primers เพื่อ amplify *muscFv* ใน transfected *E. coli* clones

Primer	ลำดับเบส (5' → 3')
R1 (Forward)	CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
R2 (Reverse)	CGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC



รูปที่ 1.19 แสดง DNA patterns ต่างๆเมื่อตัด *muscFv* amplicons จาก transfected *E. coli* clones ด้วย *Mva*I

7.3 DNA sequencing of *muscFv*

ผู้วิจัยเลือก transfected *E. coli* clone numbers 6, 16, 17 และ 30 ซึ่งมี *Mva*II patterns ต่างกัน (3 แบบ) และให้ผลการ neutralize hemolysis ที่เกิดจากเชื้อ pathogenic *Leptospira* serovar pomona ดีที่สุด (ตารางที่ 1.12) ในการศึกษาต่อไป

นำ murine *scFv* จาก tranfected *E. coli* clones No. 6, 16, 17 และ 30 ไปทำ DNA sequencing เพื่อเตรียมทำ humanized ScFv (huScFv) ผู้วิจัยเลือกศึกษา clone number 30 ก่อน

รูปที่ 1.20 แสดง nucleotides และ amino acid sequences ของ murine anti-*Leptospira* จาก transfected *E. coli* clone number 30 (VH-linker-VL)

7.4 การเลือก human immunoglobulin frameworks (FRs) ที่ใกล้เคียงกับ *muScFv* immunoglobulin frameworks มากที่สุด

7.4.1 การ confirm species ของ VH/VL จาก transfected *E. coli* clone number 30

ผู้วิจัยได้นำ amino acid sequence ของ *muScFv* จาก transfected *E. coli* clone number 30 ไปตรวจสอบความเหมือนของ ScFv amino acid sequence กับ murine immunoglobulin framework ใน database เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของ sequence ว่ามี origin มาจาก murine species โดยนำ amino acid sequence ไป blast กับ database ของ NCBI Ig database และ NCBI blast program ได้ผลการ blast คือ heavy chain เอง *muScFv* มีความเหมือน 85% กับโปรตีนของ immunoglobulin heavy chain variable region (*Mus musculus*) ใน database (รูปที่ 1.21 และ 1.22) และ light chain มีความเหมือน 88% ระหว่างโปรตีนของ *muScFv* และ immunoglobulin kappa light chain ของ *Mus musculus* (รูปที่ 1.23 และ 1.24) แสดงว่า *scFv* ใน transfected *E. coli* clone no. 30 เป็น murine immunoglobulin จริง

```

ATGGCCAGGTGAAGCTGACAGTAAAGGAACTGAAGTGGTAAAGCTGGGCTTCAGTGAAGTTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTCACAAGTT
M A Q V K L Q Q * G T E V V K P G A S V K L S C K A S G Y I F T S Y
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ATGATATAGACTGGGTGAGGCGACGCTGACAGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTCTCGAGAGGGGAGTACTGAATACAATGAGAAGTTCAA
D I D W V R Q T P E Q G L E W I G W I F P G E G S T E Y N E K F K
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GGCAGGGCCACACTGAGTGTAGACAAGTCTCCAGCACAGCTATATGGAGCTCACTAGGCTGACATCTGGGACTCTGTGTCTATTCTGTGCTAGA
G R A T L S V D K S S S T A Y M E L T R L T S E D S A V Y F C A R
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GGGACTACTATAGGCGCTACTTTGACTTTGTGGGGCCAGGACCCAGGTACCGTCTCCTCATGTGGAGGCGGTTTCAGGGGAGGTGGCTCTGGGGGTG
G D Y Y R R Y F D L W G Q G T T V T V S S C G G S G G G G G G
410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CGGATCTGACATTGACCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGATCTCCAGGGGAGGGTCCACCATGACCTCAGTCCAGTCCAGTCAAGTATACGTTA
G S D I E L T Q S P A I N S A S P G E R V T M T C S A S S I R Y
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CATATATTGTTACCAACAGAGCCTTGATCTCTCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCACAGTGGCTCTGGAGTCCCTTTTCGCTTCAGTGCAGT
I Y W Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N V A P G V P F R F S G S
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GGTCTGGGACCTCTATTCTCTCAATCAACCGAATGAGGCTGAGGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGGAGTGGAGTGGTTATCCGTACACGTTTCG
G S G T S Y S L T I N R N E A E D A A T Y Y C Q E W S G Y P Y T F G
710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GAGGGGGACCAAGCTGAGCTGAACGGGGCGGCGAGTGGCGGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGGTGCCGCA
G G T K L E L K R A A A G A P V P Y P D P L E P R A A

```

Figure 1.20 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *muscFv* from transfected *E. coli* clone no. 30 (VH and VL sequences linked via polynucleotide linker)

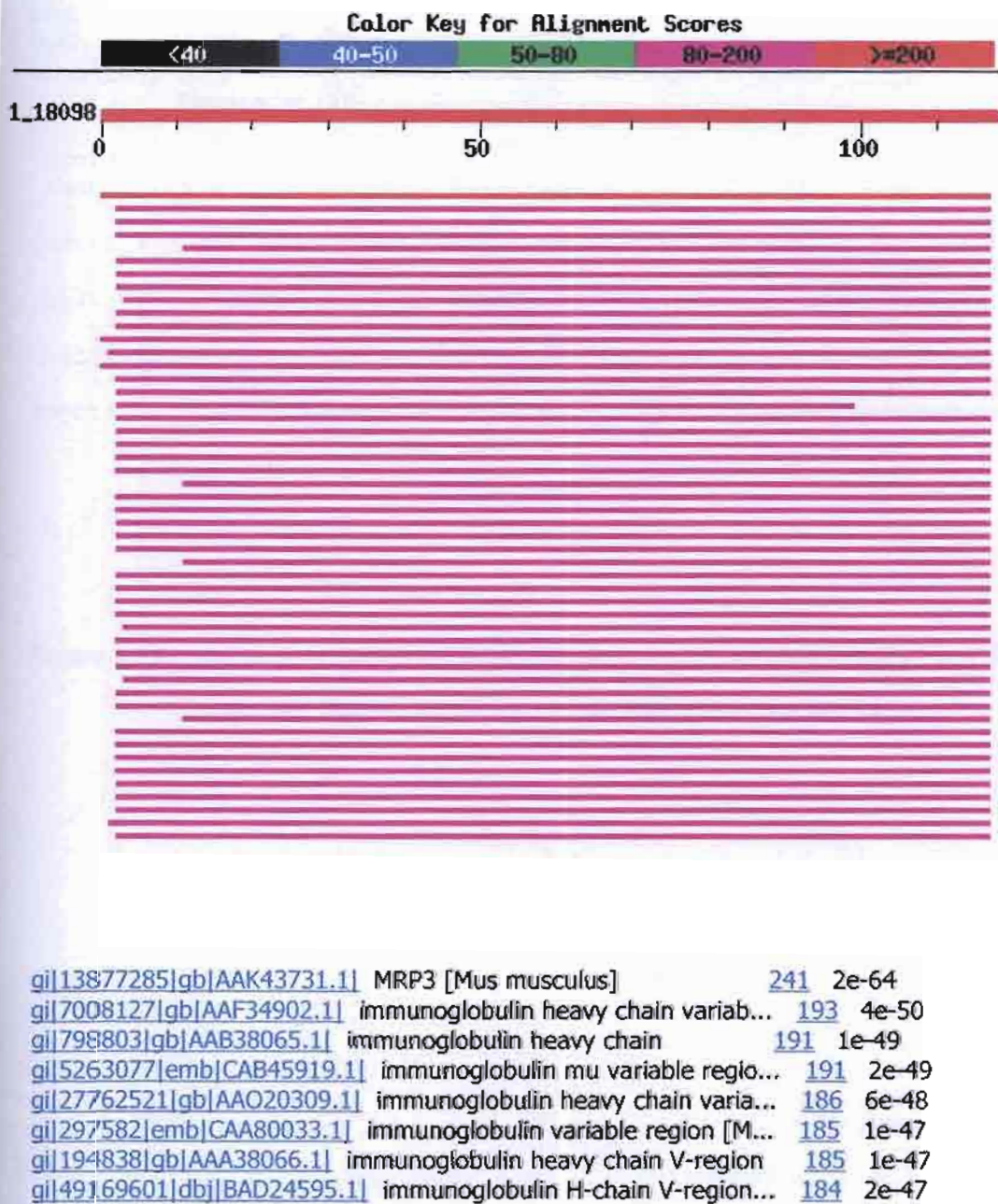


Figure 1.21 ผลการ blast ScFv ของ transfected *E. coli* clone no. 30 (VH amino acid sequence) กับ NCBI database

```

┌ >gi17008127|qb|AAF34902.1| immunoglobulin heavy chain variable domain [Mus
musculus]
      Length = 120

Score = 193 bits (491), Expect = 4e-50
Identities = 92/117 (78%), Positives = 102/117 (87%), Gaps = 1/117 (0%)

Query: 3   QVKLQQXGTEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYDIDWVRQTPEQGLEWIGWIFPGEGSTEY 62
          QV LQQ GTE+VKPGASVKLSCKASGY FT+YD++WVRQ PEQGLEWIGWIFPG+GST Y
Sbjct: 1   QVHLQQSGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDMNWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTRY 60

Query: 63   NEKFKGRATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFCARGDYRRY-FDLWGQGTTVT 118
          NEKFKG+ATL+ DKSSSTAYM+L RLTSSEDSAVYFCAR ++ Y F WGQGT VT
Sbjct: 61   NEKFKGKATLTDDKSSSTAYMQLNRLTSEDSAVYFCARRGFHGSYSFAYWGQGTTLVT 117

```

Figure 1.22 Amino acid sequence alignment between VH of transfected *E. coli* clone no. 30 and the highest homology murine sequence from database

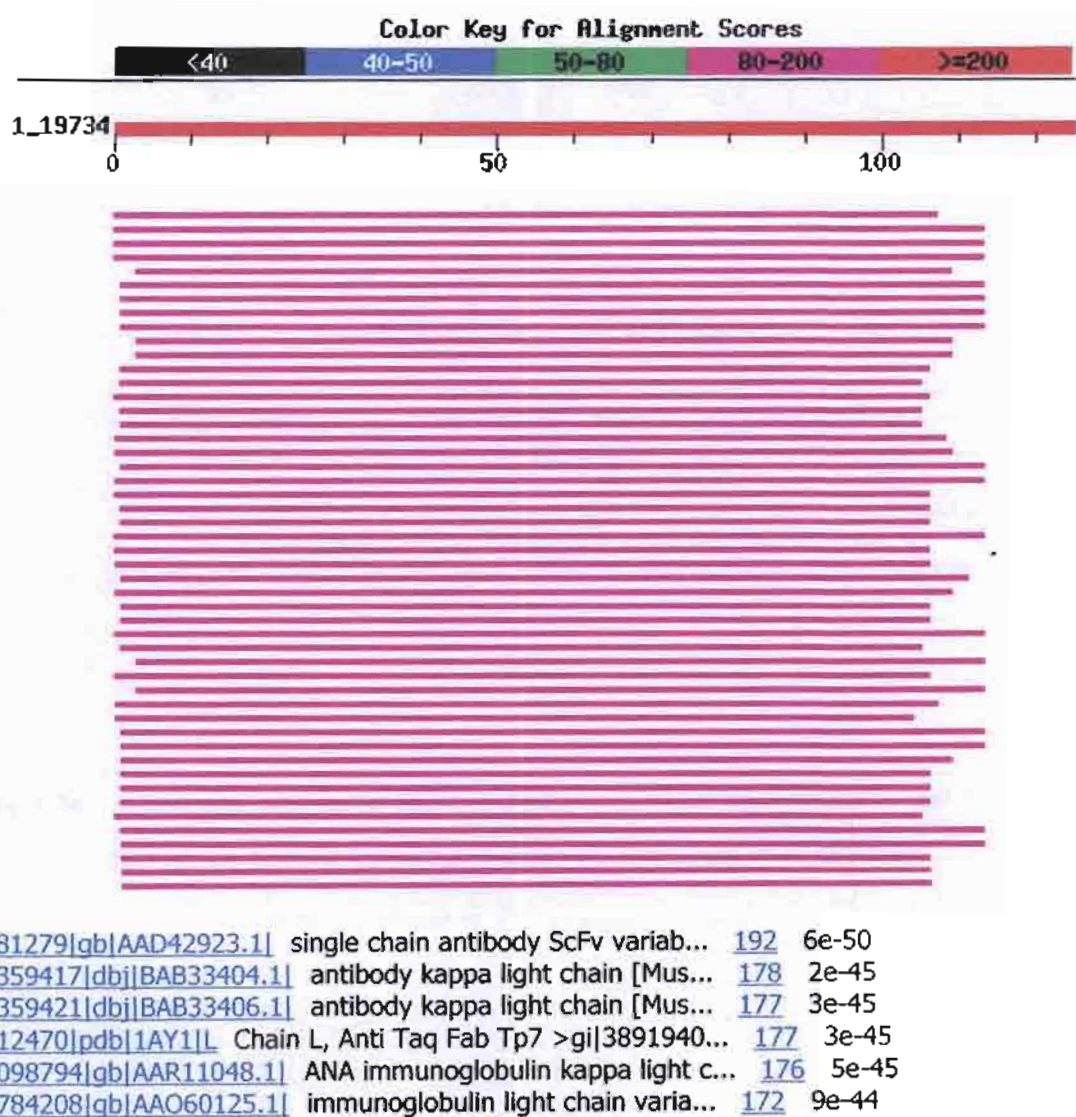


Figure 1.23 Result of NCBI BLAST between amino acid sequence of VL of transfected *E. coli* clone no. 30 with murine VL in NCBI database

```

┌ >gi|13359417|dbj|BAB33404.1| antibody kappa light chain [Mus musculus]
  Length = 213

Score = 178 bits (451), Expect = 2e-45
Identities = 84/114 (73%), Positives = 94/114 (82%)

Query: 1   DIELTQSPAIMASASPGERVTMTCSASSSIRYIYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNVAPGVPR 60
          ++++TQSPAIMASAPGE+VTMTCSASSS+ Y+YWYQQKPGSSPRLLIYDTSN+A GVP R
Sbjct: 1   ELQMTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAGVPVR 60

Query: 61  FXXXXXXXXXXLTINRMEAEDAATYYCQEWSGYPYTFGGGTKLELKRAAAGAPV 114
          F                LTI+RMEAEDAATYYCQ+WS YP TFG GTKLELKRA A   V
Sbjct: 61  FSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQWSSYPLTFGAGTKLELKRADAAPTV 114

```

Figure 1.24 Amino acid sequence alignment between VL of transfected *E. coli* clone no. 30 and the highest homology murine VL sequence from database

7.4.2 CDRs identification

ผู้วิจัยได้นำ amino acid sequences ของ murine VH/VL ของ clone no. 30 ไป identify ส่วนที่เป็น complementarity determining regions (CDRs) ของ VH และ VL โดยใช้โปรแกรมต่าง ๆ ดังนี้

1. NCBI Ig Blast program
2. IMTG (IMTG/ V-QUEST) program
3. Amino acid sequence-based identification

ผลการ identify CDRs ของทั้ง 3 วิธี ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1.25 และ 1.26 ผู้วิจัยได้เลือก CDRs ของ muScFv amino acid sequences ดังตารางที่ 1.14

	FR1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR 3	CDR3	FR4
➤ <i>Ig BLAST</i>							
MAQVKLQQXGTEVVVKPGASVKLSCKASGYFT	SYDID	WVRQTPEQGLEWIG	WIFPGEGSTEYNEKFKG	RATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSVYFCAR	GDIYRRYF	DLWGQGTIVT	
➤ <i>IMGT</i>							
MAQVKLQQXGTEVVVKPGASVKLSCKAS	GYFTSYD	IDWVRQTPEQGLEWIG	WIFPGEGST	EYNEKFKGRATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFC	ARGDIYRRYFDL	WGQGTIVT	
➤ <i>Structural</i>							
MAQVKLQQXGTEVVVKPGASVKLSCKAS	GYFTSYDID	WVRQTPEQGLEWIG	WIFPGEGSTEYNEKFKG	RATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFCAR	GDIYRRYFDL	WGQGTIVT	

Figure 1.25 CDR identification of murine ScFv VH segment

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
➤ Ig BLAST							
DIELTQSPAIMSASPGERVTMC	SASSSIRYIY	WYQOKPGSSPRLLIY	DTSNVAPGVP	FRFSGSGSGTSYSLTINRMEAEADAITYYC	QEMSGYPYT	EGGGTKLELKRAAA	
➤ IMGT							
DIELTQSPAIMSASPGERVT	MTCGASSSIRY	IYWYQOKPGSSPRLLIY	DTS	NVAPGVPRFSGSGSGTSYSLTINRMEAEADAITYYC	QEMSGYPYT	EGGGTKLELKRAAA	
➤ Structure							
DIELTQSPAIMSASPGERVTMC	SASSSIRYIY	WYQOKPGSSPRLLIY	DTSNVAPGVP	FRFSGSGSGTSYSLTINRMEAEADAITYYC	QEMSGYPYT	EGGGTKLELKRAAA	

Figure 1.26 CDR identification of murine ScFv VL segment

ตารางที่ 1.14 Peptides ของ CDRs ของ muScFv

	CDR1	CDR2	CDR3
VH	SYDID	WIFPGEGST	GDYYRRYFDL
VL	SASSIRYI	DTSNVAP	QEWSGYPYT

7.4.3 การเลือก human immunoglobulin frameworks ที่มี homology กับ murine VH/VL มากที่สุด

ผู้วิจัยได้นำ amino acid sequences ของ murine VH/VL ไป blast กับ database เพื่อทำการเลือก human VH/VL sequences ที่มีลำดับ amino acids ใกล้เคียงกับของ murine มากที่สุด โดยใช้โปรแกรม IMGT โดยได้ผลการ blast ดังนี้

Amino acids ของ murine VH ให้ 66.3% identity กับ human germline IGHV18, accession number M99637 จำเพาะในส่วน frameworks ที่ 1 (FR1), 2 (FR2), 3 (FR3), CDR ที่ 1, 2, 3 และส่วน framework ที่ 4 (FR4) มี identity สูงสุดกับ IGHJ6, accession number X86356

Amino acid ของ murine VL ให้ 63.3% identity กับ human Ig germline kappa_chain gene Vk3, group IGKV, subgroup κV3, accession number L37729 ซึ่งจำเพาะในส่วน frameworks ที่ 1, 2, 3 และ CDR ที่ 1, 2, 3 ส่วน framework ที่ 4 ให้ผลการ blast ใกล้เคียงกับ human IGKJ4, accession number AF103571

ขั้นตอนที่แปดของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

การสร้าง humanized scFv

8.1 การ design humanized VH

เนื่องจาก amino acid sequences ของ murine VH กับ human VH มีความเหมือนไม่มาก (66.3% homology) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้เทคนิค CDR-grafting คือการตัด DNA sequences ที่ encode CDRs ของ murine scFv ไปต่อกับ human VH frameworks

รูปที่ 1.27 เปรียบเทียบ amino acid sequences ของ murine VH, human VH และ humanized-murine VH ที่จะผลิต

8.2 การ design humanized VL

VL amino acid sequence ของ murine recombinant scFv มีความเหมือนกับของมนุษย์ (human VL) เพียง 63.3% ผู้วิจัยใช้เทคนิค CDR-grafting ในการตัด CDRs ของ murine scFv ไปต่อกับ human VL frameworks เช่นเดียวกันกับการสร้าง humanized VH

รูปที่ 1.28 เปรียบเทียบ amino acid sequences ของ murine VL, human VL และ humanized-murine VL ที่จะผลิต

8.3 การ amplify human VH frameworks

ผู้วิจัยได้ amplify human VH และ human VL sequences ที่มี amino acid sequences คล้ายคลึงกับ murine VH/VL sequences ของ hybridoma clone LPF1 มากที่สุด

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย UDW 17.25 μ l, 10 x Pfx buffer 2.5 μ l, 10 mM MgSO₄ 0.5 μ l, forward primer 1.0 μ l, reverse primer 1.0 μ l, 10 mM dNTPs 1.5 μ l, cDNA template 1.0 μ l และ Pfx polymerase 0.25 μ l (ตารางที่ 1.15) ส่วน PCR condition คือ 94°C, 5 นาที, 94°C, 1 นาที, 53°C, 1.5 นาที, 72°C, 2 นาที, 30 cycles และ 72°C, 10 นาที (ตารางที่ 1.16)

นำ PCR amplicons ไปตรวจด้วย 1% agarose gel electrophoresis และ ethidium bromide staining พบว่าได้ DNA segment ของ human VH และ human VL ที่ 300 bp และ 270 bp ตามลำดับ (รูปที่ 1.29) จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการ purify DNA segments ดังกล่าวด้วยวิธี ethanol precipitation เพื่อเตรียม DNA เป็น template ในการสร้าง humanized-murineVH และ humanized-murineVL ต่อไป

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
>scFv No.71						
MAQVKLQQXGTEVVKPGASVKLSCKASGYIFT	SYDID	WVRQTPEQGLEWIG	WIFPGEGSTE	YNEKFKGRATLSYDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFCAR	GDYYRREYFDL	WGQSTTVT
>Human (IGHV1-8/IGHJ4)						
----Q-V-S-A--K-----VS-----	SYDIN	----ATG-----M-	WMNPNSGNTG	-AQ-Q--V-MTRNT-I-----SS-R---T---Y----		--K-----
>Humanized						
----Q-V-S-A--K-----VS-----	SYDID	----ATG-----M-	WIFPGEGSTE	-AQ-Q--V-MTRNT-I-----SS-R---T---Y----	GDYYRREYFDL	--K-----

Figure 1.27 เปรียบเทียบ amino acid sequences ของ murine VH, human VH และ humanized-murine VH

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
>scFvNo.71							
DIELTQSPAINASASPGERVWTC	SASSIR--YI	YWYQQKPGSSPELLIY	DTSNVAP	GVVFRFSGSGSGTSYSTINRMEADAATYYC	QEWSGYPY	TFGGGTKLEIKR	
>Human (IGKV3-20/IGKJ4)							
E-V-----TL-L-----A-LS-	RASQSVSSS-L	A-----QA-----	GASSRAT	-I-A-----DFT---SRL-P--F-V---		-----V----	
>Humanized							
E-V-----TL-L-----A-LS-	SASSIR--YI	A-----QA-----	DTSNVAP	-I-A-----DFT---SRL-P--F-V---	QEWSGYPY	-----V----	

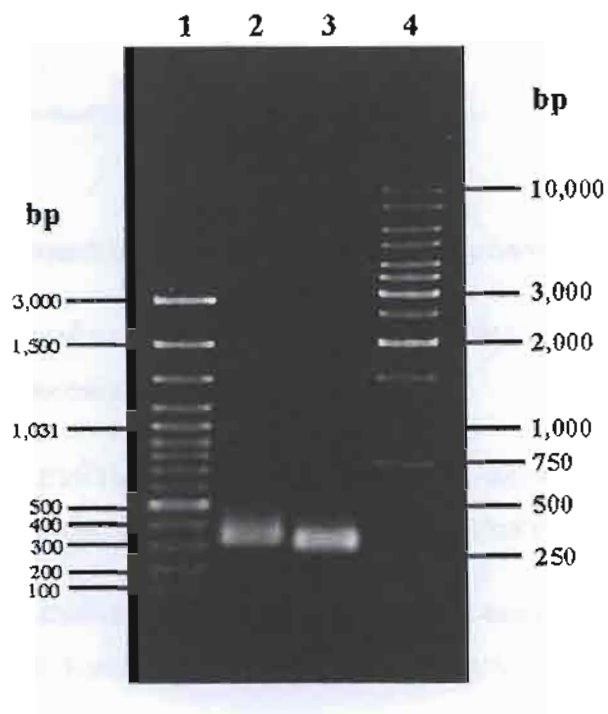
Figure 1.28 เปรียบเทียบ amino acid sequences of murine VL, human VL และ humanized-murine VL

ตารางที่ 1.15 แสดงส่วนผสมในปฏิกิริยา PCR เพื่อการ amplify human *VH* และ human *VL* segments

Reagent	μ l
UDW	17.25
10X <i>Pfx</i> buffer	2.5
10 mM MgSO ₄	0.5
10 mM dNTPs	1.5
Forward primer (10 pg/ μ l)	1.0
Reverse primer (10 pg/ μ l)	1.0
Human cDNA template	1.0
<i>Pfx</i> polymerase	0.25
Total	25

ตารางที่ 1.16 แสดง conditions ของ PCR ในการ amplify human *VH* และ human *VL* segments

Human <i>VH</i>	Human <i>VL</i>
94°C, 5 min	94°C, 5 min
94°C, 1 min	94°C, 1 min
50°C, 1.5 min	53°C, 1.5 min
72°C, 2 min	72°C, 2 min
30 cycles	30 cycles
72°C, 10 min	72°C, 10 min



รูปที่ 1.29 แสดง PCR amplicons ของ human *VH* และ human *VL* segments

Lane 1, 100 bp DNA ladder

Lanes 2 and 3, human *VH* and *VL* amplicons, respectively

Lane 4, 1 kb DNA ladder

8.4 การสร้าง humanized *VH* segment

ผู้วิจัยได้ใช้วิธี primer induced mutagenesis เพื่อทำการต่อ murine *CDRs* ทั้ง 3 segments คือ *CDR1*, *CDR2* และ *CDR3* กับ human *VH* DNA canonical frameworks (*FR1*, *FR2*, *FR3* และ *FR4*) จาก N-terminus → C terminus ตามลำดับ จึงได้สร้าง DNA 4 segments ดังนี้

8.4.1 การสร้าง humanized *VH* DNA segments 4 segments

Segment ที่ 1: ประกอบด้วย *sfiI* restriction site สำหรับ DNA cloning, human *FR1* และ murine *CDR1* บางส่วน (N-terminal portion)

Segment ที่ 2: ประกอบด้วย murine *CDR1* บางส่วน (C-terminal portion) ซึ่ง overlap กับ *CDR1* ใน segment ที่ 1, human *FR2*, และ murine *CDR2* บางส่วน (N-terminal portion)

Segment ที่ 3: ประกอบด้วย murine *CDR2* บางส่วน (C-terminal portion) ซึ่ง overlap กับ *CDR2* ใน segment ที่ 2, human *FR3*, และ murine *CDR3* บางส่วน (N-terminal portion)

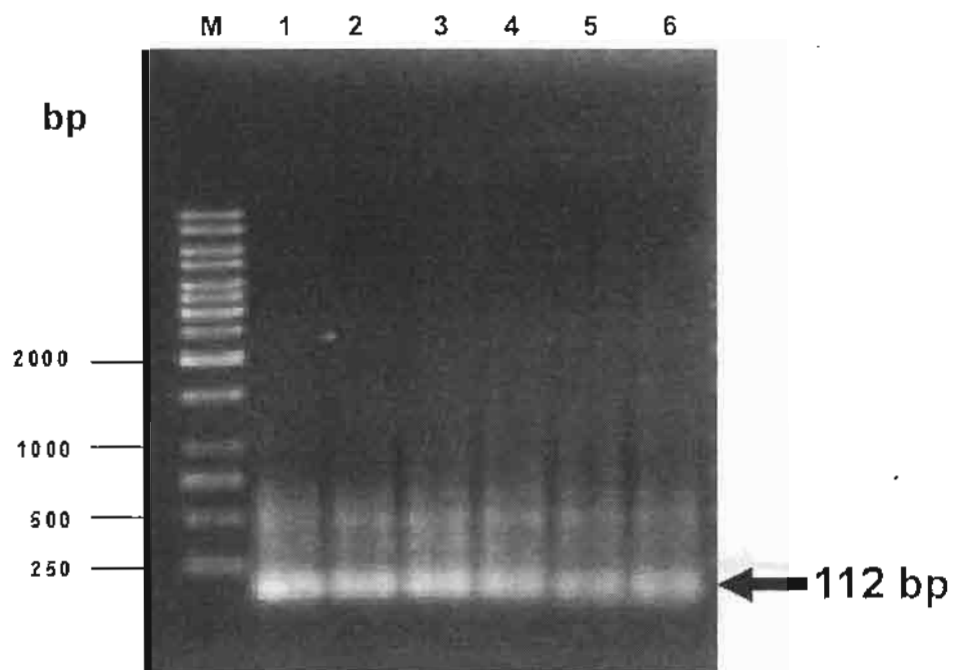
Segment ที่ 4: ประกอบด้วย *CDR3* (C-terminal portion) ซึ่ง overlap กับ *CDR3* ของเส้นที่ 3, human *FR4* และ nucleotide linker (gly_4ser)₄ บางส่วน

ผู้วิจัยได้ออกแบบ primers เพื่อการสร้าง DNA segments ทั้ง 4 segments และใช้ PCR ซึ่งมี PCR mixture ดังต่อไปนี้ในการเพิ่มจำนวน DNA segments ทั้ง 4 สาย

Ultrapure distilled water (UDW) 18.75 μl , 10 x buffer 2.5 μl , 10 mM dNTPs 1.0 μl , forward primer 1.0 μl , reverse primers 1.0 μl , *VH* template 1.0 μl และ *Taq* polymerase 0.25 μl นำ PCR mixture ไปทำการเพิ่ม DNA โดยวิธี gradient PCR เพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมของแต่ละ DNA segment โดยผันแปรอุณหภูมิจาก 52°C ถึง 61°C ตรวจ DNA amplicon ที่ได้ด้วยการ run ใน 1% agarose gel electrophoresis และดู DNA band ภายใต้ UV light หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide

รูปที่ 1.30-1.33 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segments ที่ 1-4 ตามลำดับ

รูปที่ 1.34 แสดง humanized *VH* segments 1-4 เปรียบเทียบกัน



รูปที่ 1.30 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment เส้นที่ 1

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

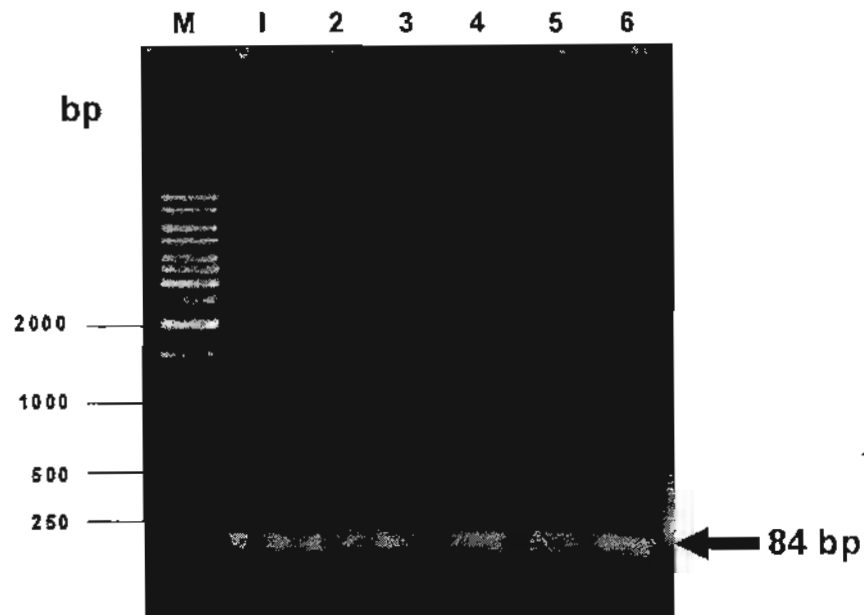
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.31 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment เส้นที่ 2

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

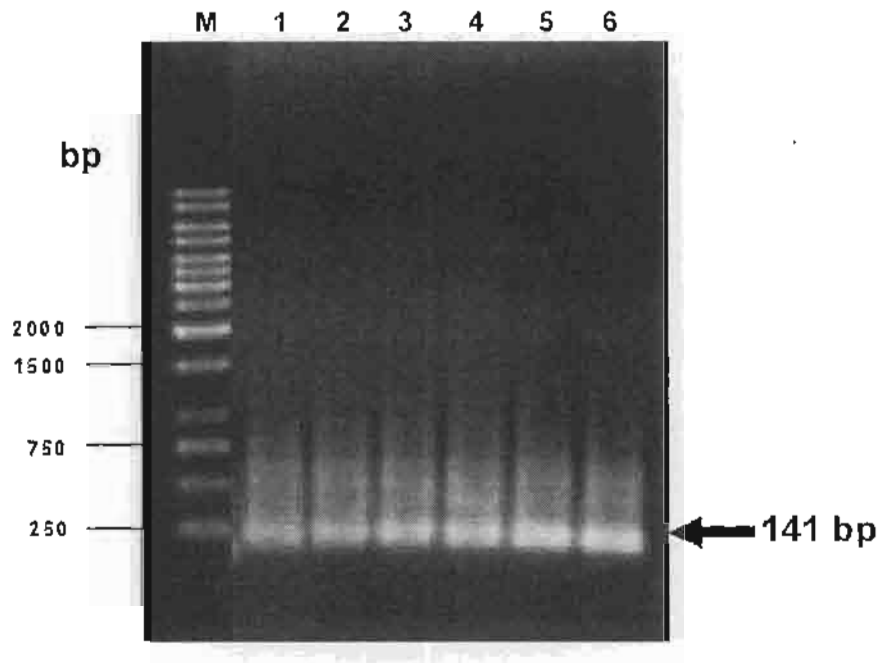
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.32 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment เส้นที่ 3

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

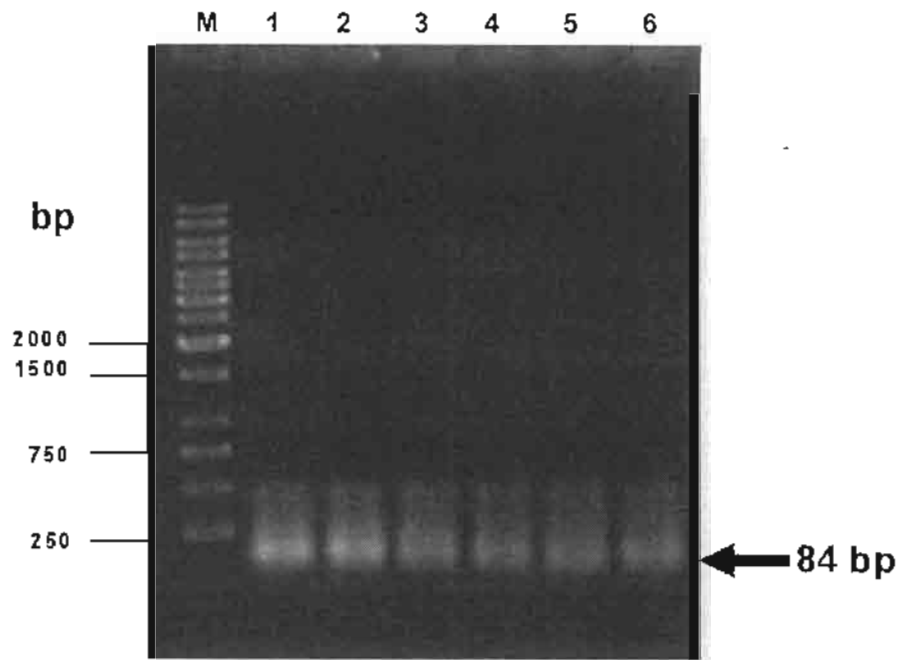
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.33 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment เส้นที่ 4

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

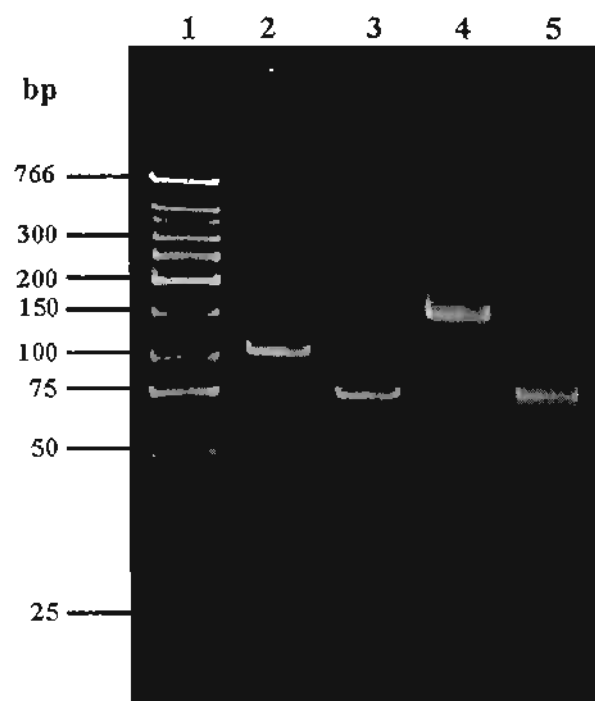
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.34 PCR amplicons of humanized *VH* segments 1-4

Lane 1, low molecular weight DNA marker

Lanes 2-5, amplicons of humanized *VH* segments 1-4, respectively

8.4.2 การเชื่อมต่อ DNA segments ทั้ง 4 segments ของ humanized *VH*

นำ DNA segments ทั้ง 4 segments มาต่อกันจาก N → C termini คือ segment ที่ 1 ต่อกับ segment ที่ 2 และ segment ที่ 3 ต่อกับ segment ที่ 4 จากนั้นนำ segment ที่ 1+2 ไปต่อกับ segment ที่ 3+4 ได้เป็น humanized *VH* segment ซึ่ง frameworks ทั้ง 4 ส่วนเป็น human immunoglobulin frameworks และ CDRs ทั้ง 3 ส่วนเป็น CDRs ของ murine monoclonal antibody LPF1 โดยใช้เทคนิค SOE-PCR

รูปที่ 1.35 แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ DNA segments ทั้ง 4 segments เพื่อสร้าง humanized *VH*

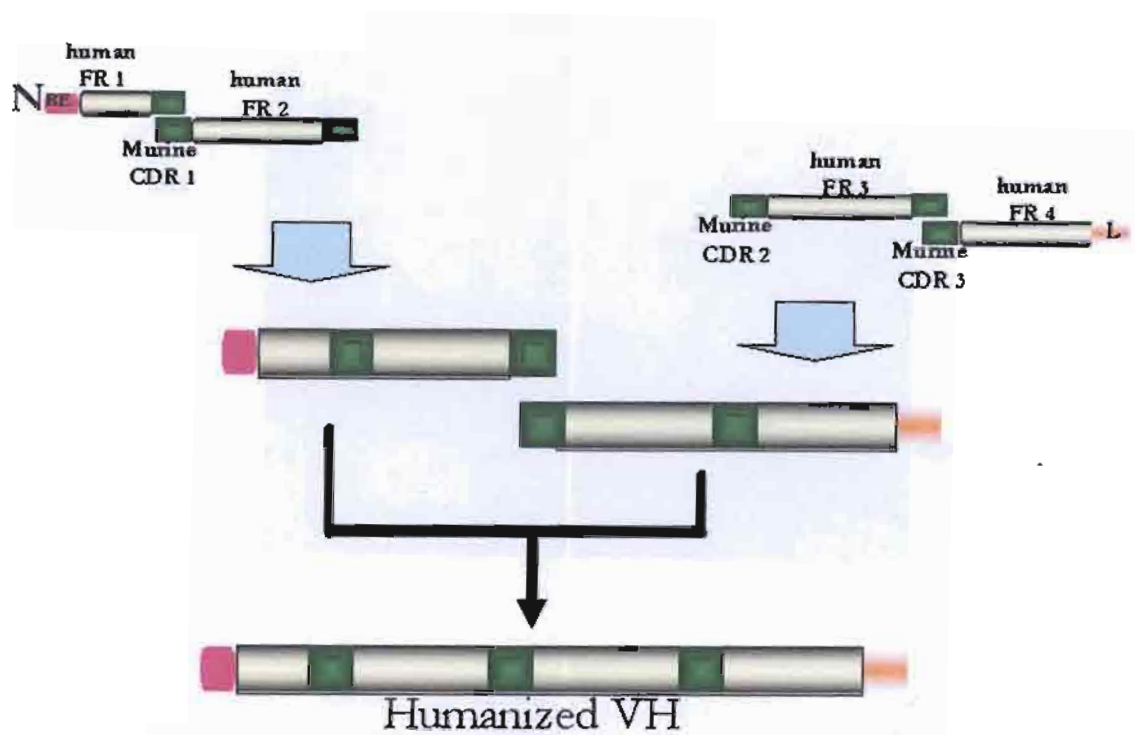
ส่วนผสมของ SOE-PCR ประกอบด้วย UDW 17.25 μ l, 10x buffer 2.5 μ l, forward primer 1.0 μ l, reverse primer 1.0 μ l, DNA template 1.0 μ l (each), 10 mM dNTPs 1.0 μ l, และ *Taq* polymerase 0.25 μ l นำของผสมไปทำ SOE-PCR แบบ gradient ดังข้อ 8.4.1

รูปที่ 1.36 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* DNA segment เส้นที่ 1 ต่อกับเส้นที่ 2 (segment 1+2)

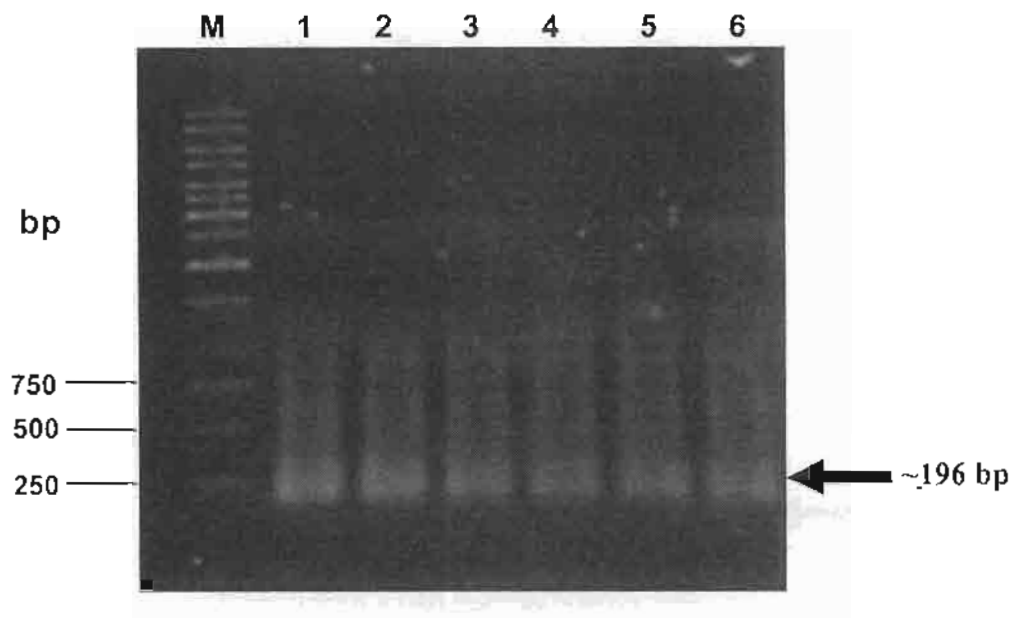
รูปที่ 1.37 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* DNA segment เส้นที่ 3 ต่อกับเส้นที่ 4 (segment 3+4)

รูปที่ 1.38 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH*

รูปที่ 1.39 แสดง amplicons ของ humanized *VH* segments 1+2, 3+4 และ humanized *VH*



รูปที่ 1.35 แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ humanized VH segments เส้นที่ 1, 2, 3 และ 4 ให้เป็น humanized VH segment



รูปที่ 1.36 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment ที่ 1 ต่อกับ *VH* segment ที่ 2 (segment 1+2)

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

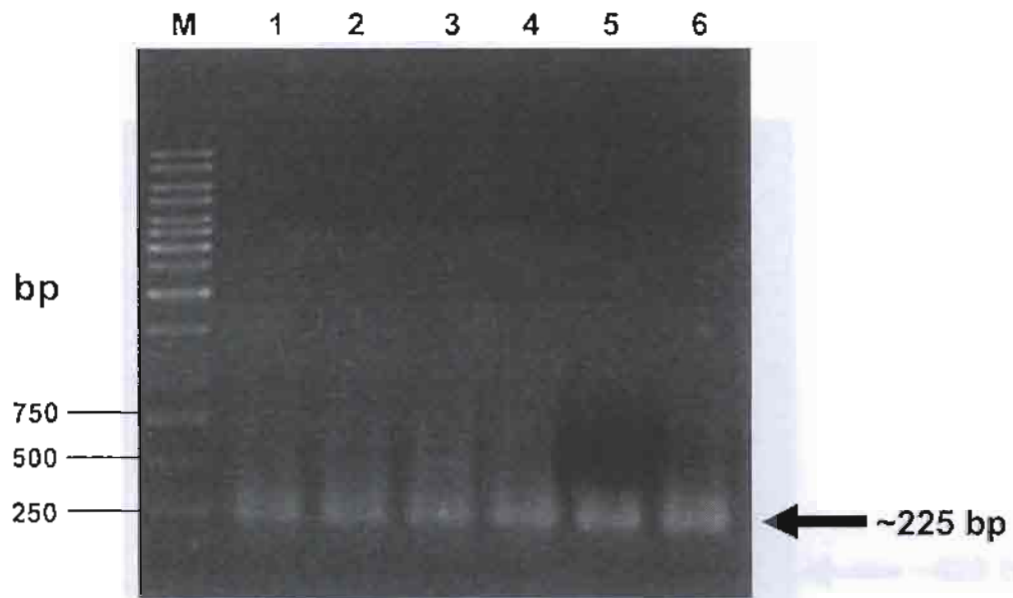
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.37 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment เส้นที่ 3 ต่อกับ *VH* segment เส้นที่ 4 (segment 3+4)

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

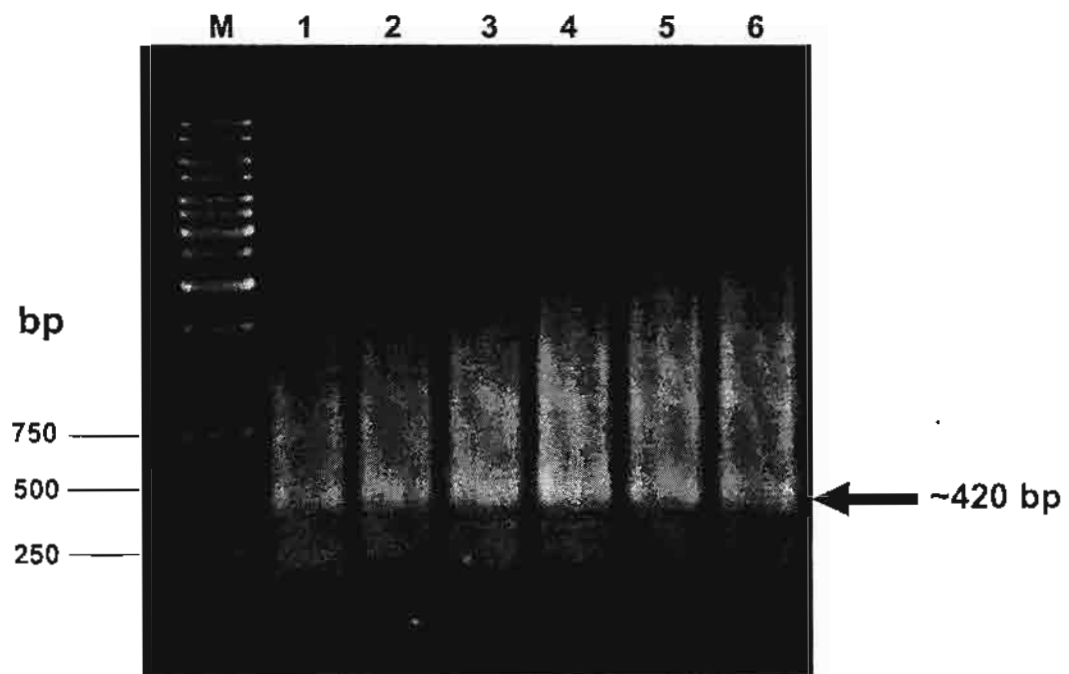
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.38 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized *VH* segment 1+2 ต่อกับ *VH* segment ที่ 3+4 (humanized *VH* segment)

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

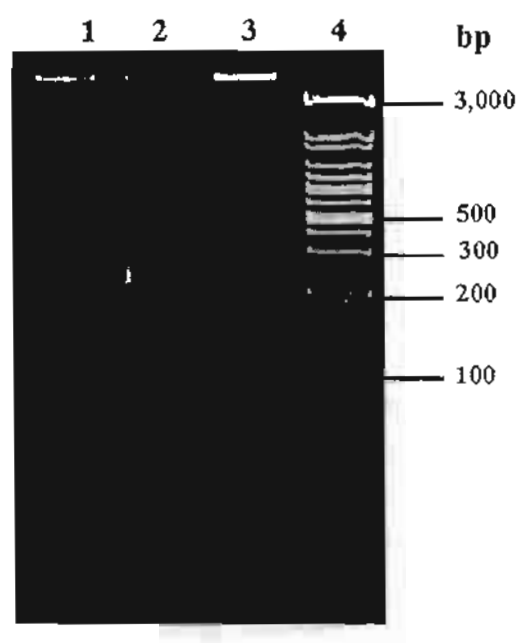
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.39 แสดง PCR amplicons ของ human *VH* segments 1+2, 3+4 และ humanized *VH*

Lane 1, amplicon of humanized *VH* segments 1+2

Lane 2, amplicon of humanized *VH* segments 3+4

Lane 3, humanized *VH* amplicon

Lane 4, 100 bp DNA ladder

8.5 การสร้าง humanized VL segment

ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคเดียวกับการสร้าง humanized VH segment โดยมีรายละเอียดวิธีการสร้างดังนี้

8.5.1 การสร้าง 4 segments ของ VL sequence

Segment ที่ 1: ประกอบด้วย nucleotide linker บางส่วน (N-terminus), human *FR1* และ murine *CDR1* บางส่วน (N-terminus)

Segment ที่ 2: ประกอบด้วย murine *CDR1* บางส่วน (C-terminus) ซึ่ง overlap กับ *CDR1* ใน DNA segment ที่ 1, human *FR2*, และ murine *CDR2* บางส่วน (N-terminus)

Segment ที่ 3: ประกอบด้วย murine *CDR2* บางส่วน (C-terminus) ซึ่ง overlap กับ *CDR2* ใน segment ที่ 2, human *FR3*, และ murine *CDR3* บางส่วน (N-terminus)

Segment ที่ 4: ประกอบด้วย murine *CDR3* บางส่วน (C-terminus), human *FR4* และ endonuclease restriction site (*NotI*)

ผู้วิจัยได้ใช้ PCR ในการสร้าง DNA ทั้ง 4 segments โดยมีส่วนผสมของ PCR และ PCR condition คล้ายกับในข้อ 8.4 เพียงแต่เปลี่ยน DNA templates ให้เหมาะสมเท่านั้น

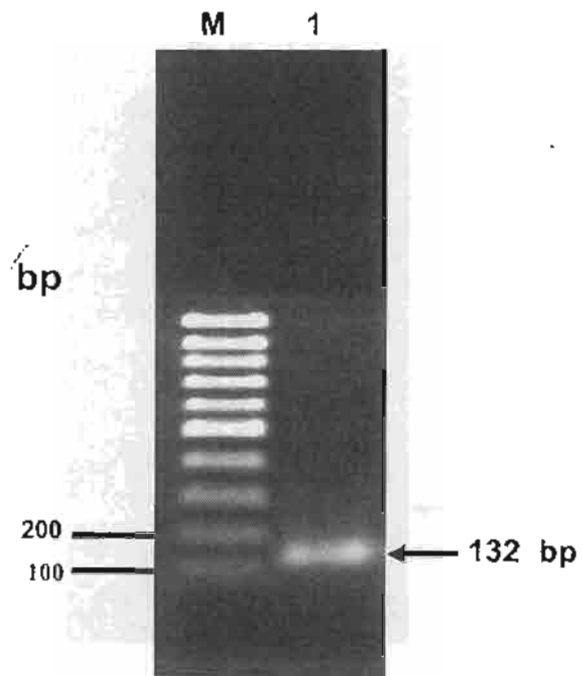
รูปที่ 1.40-1.42 แสดง PCR amplicons ของ VL segments ที่ 1-4 ตามลำดับ

รูปที่ 1.43 แสดง PCR amplicons ของ humanized VL segments 1-4 เปรียบเทียบกัน

ผู้วิจัยได้นำ VL segments ทั้ง 4 segments มาเชื่อมต่อกันโดยเทคนิค SOE-PCR โดยมีรายละเอียดตามรูปที่ 1.44 ส่วนผสมของ SOE-PCR และ condition คล้ายคลึงกับรายละเอียดในข้อ 8.4.2 เพียงแต่เปลี่ยนเป็นไปใช้ DNA segments ของ VL เป็น templates เท่านั้น

รูปที่ 1.45-1.47 แสดง gradients DNA amplicons ของ VL segment 1+2, VL segment 3+4 และ humanized VL segment ตามลำดับ

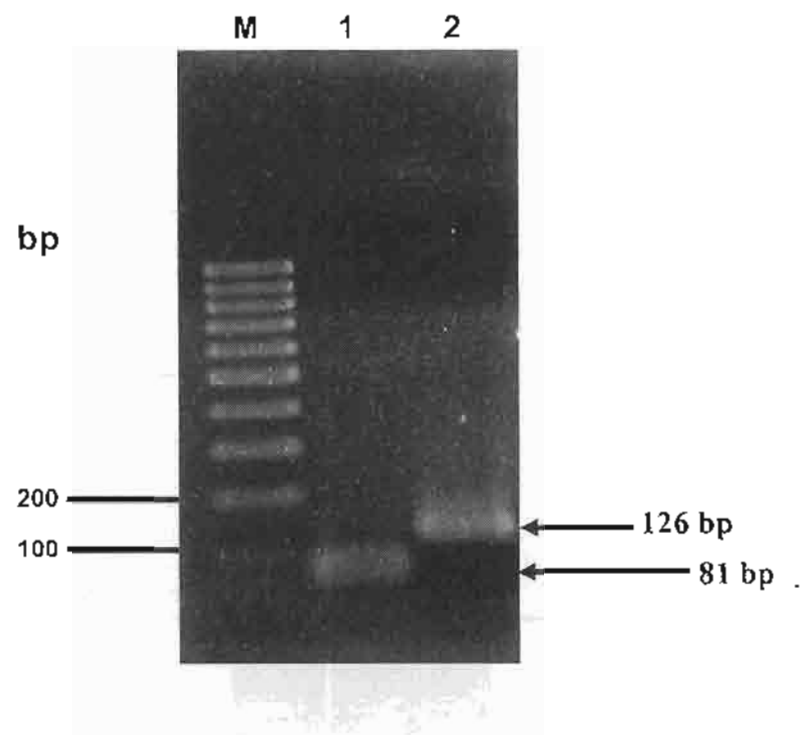
รูปที่ 1.48 แสดง PCR amplicons ของ humanized VL segments 1+2, 3+4 และ humanized VL amplicon



รูปที่ 1.40 แสดง PCR amplicon ของ humanized VL segment ที่ 1

Lane M, 100 bp DNA ladder

Lane 1, humanized VL amplicon เส้นที่ 1

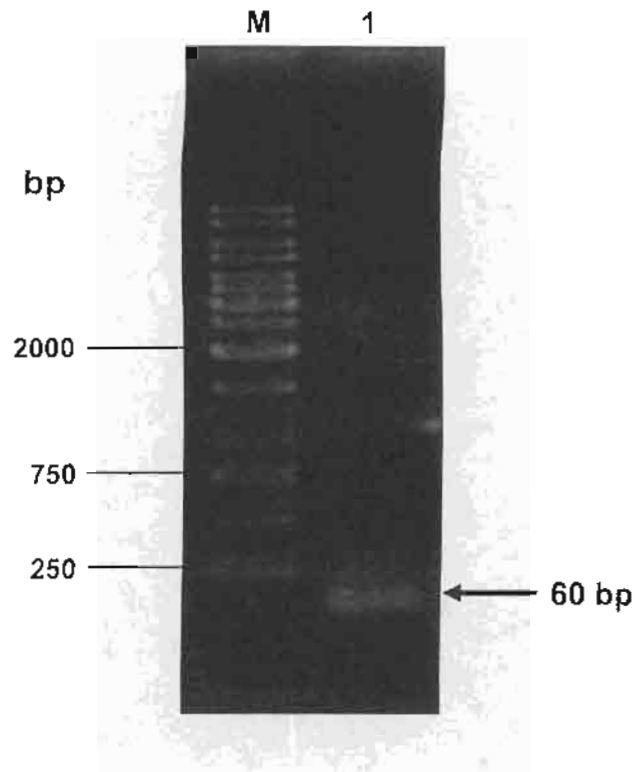


รูปที่ 1.41 แสดง PCR amplicon ของ humanized VL segment ที่ 2 และ 3

Lane M, 100 bp DNA ladder

Lane 1, humanized VL amplicon เส้นที่ 2

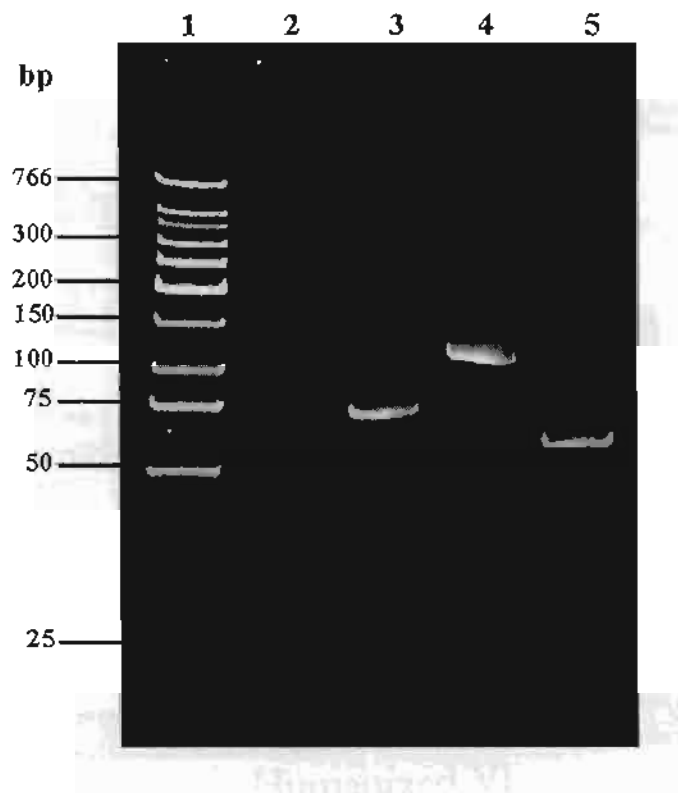
Lane 2, humanized VL amplicon เส้นที่ 3



รูปที่ 1.42 แสดง PCR amplicon ของ humanized VL segment เส้นที่ 4

Lane M, 1 kb DNA ladder

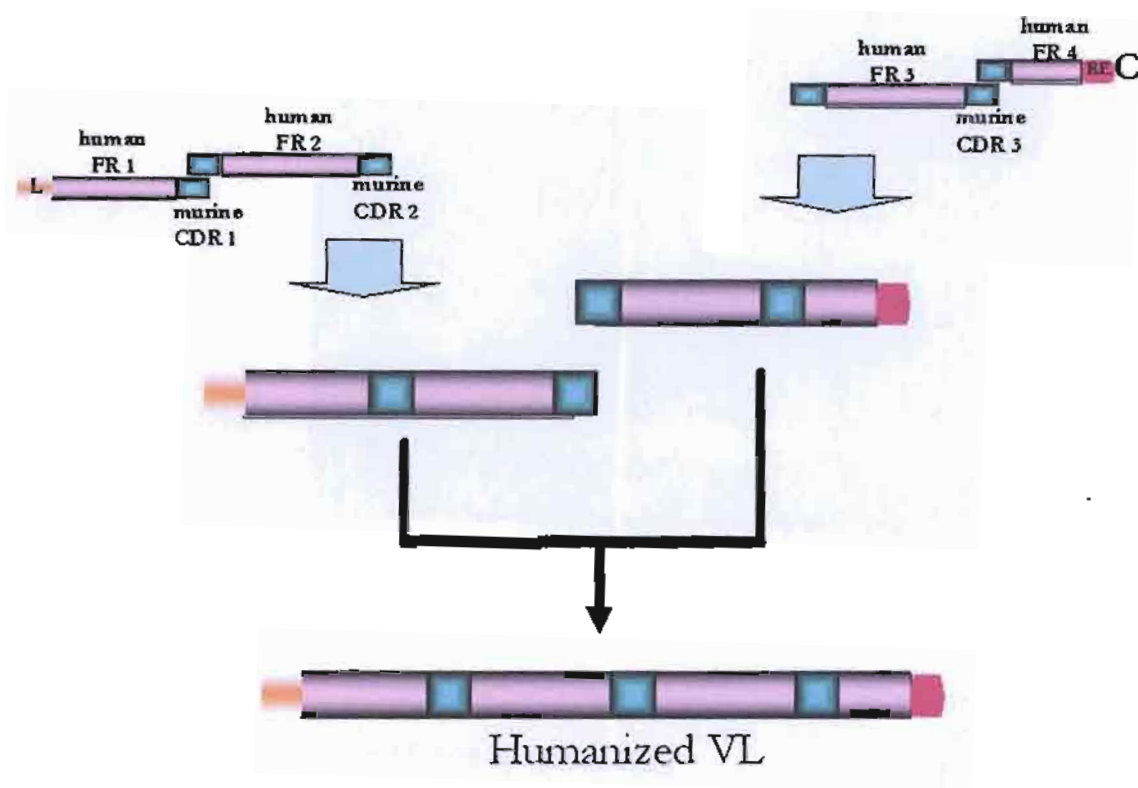
Lane 1, humanized VL amplicon เส้นที่ 4



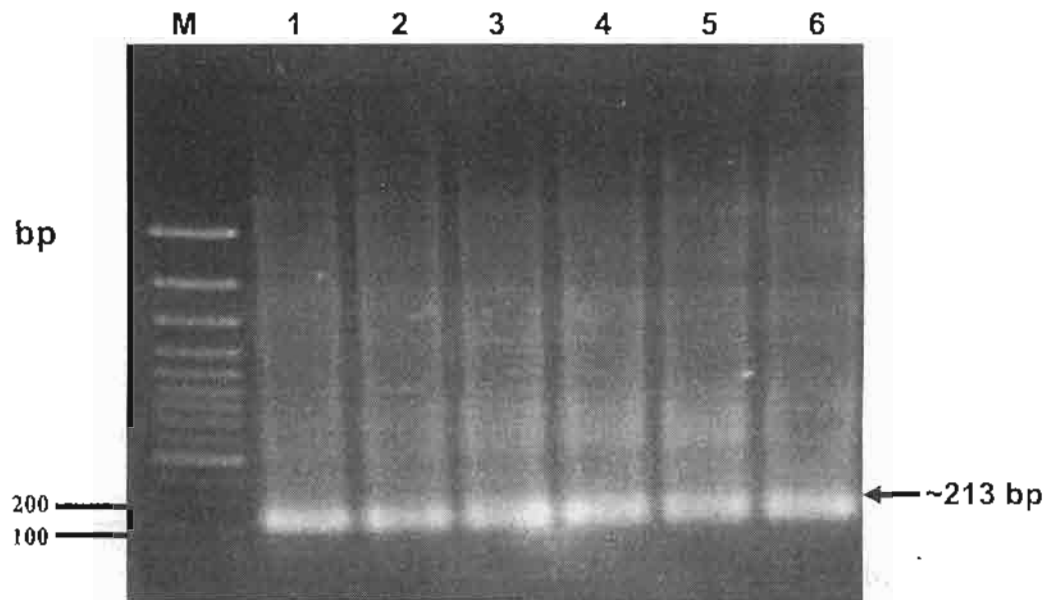
รูปที่ 1.43 แสดง PCR amplicons ของ humanized VL segments 1-4 เปรียบเทียบกัน

Lane 1, low molecular weight DNA marker

Lanes 2-5, amplicons ของ humanized VL เส้นที่ 1-4 ตามลำดับ



รูปที่ 1.44 แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ humanized VL segments ทั้ง 4 segments ให้เป็น humanized VL segment



รูปที่ 1.45 แสดง gradient PCR amplicon ของ humanized VL segment 1+2

Lane M, 100 bp DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

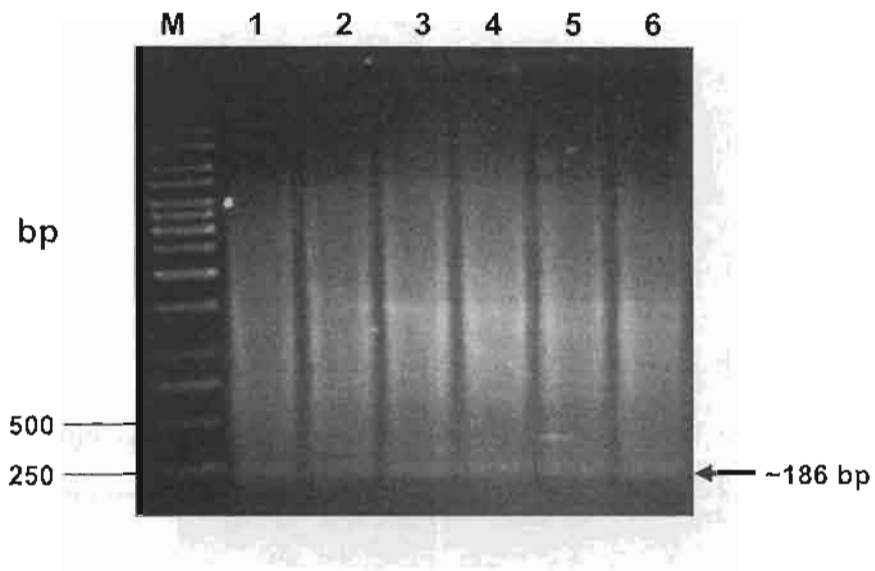
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.46 แสดง gradient PCR amplicon ของ humanized VL segment 3+4

Lane M, DNA 1 kb ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

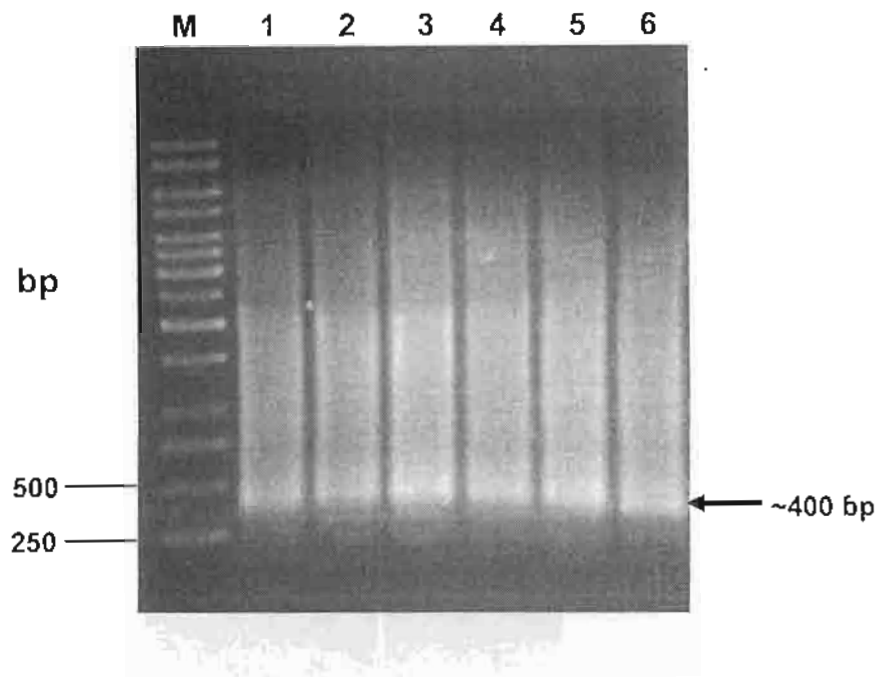
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.47 แสดง gradient PCR amplicons ของ humanized VL segment

Lane M, DNA 1 kb ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

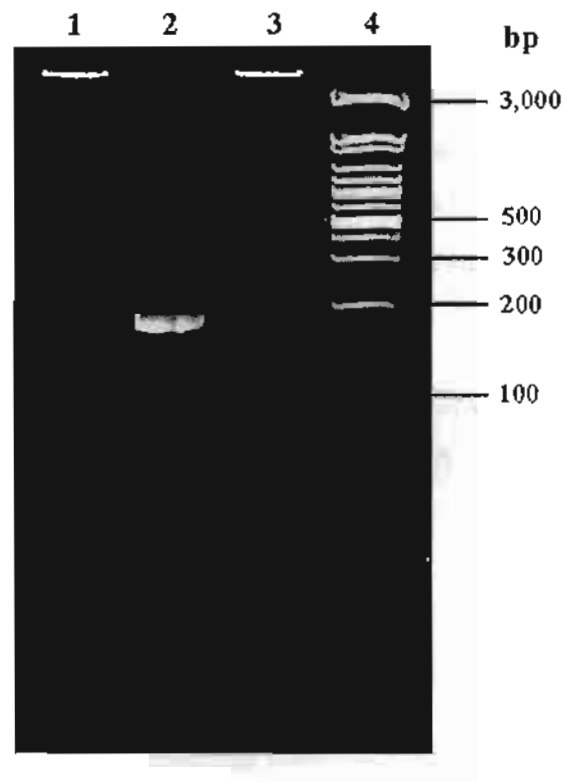
Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C



รูปที่ 1.48 แสดง PCR amplicons ของ humanized VL segments 1+2, 3+4 และ humanized VL

Lane 1, amplicon of humanized VL segments 1+2

Lane 2, amplicon of humanized VL segments 3+4

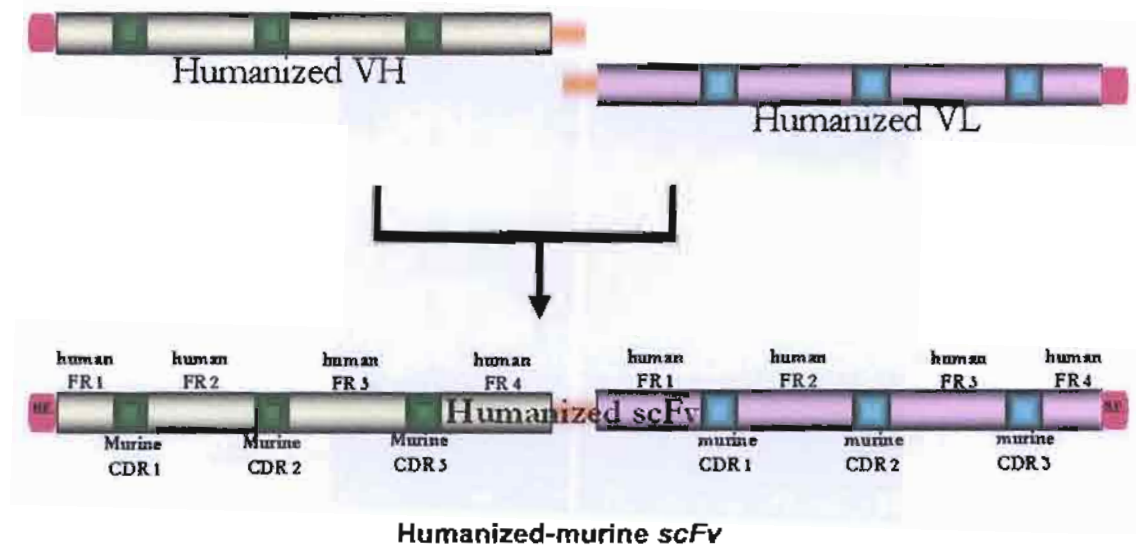
Lane 3, amplicon of humanized VL

Lane 4, 100 bp DNA ladder

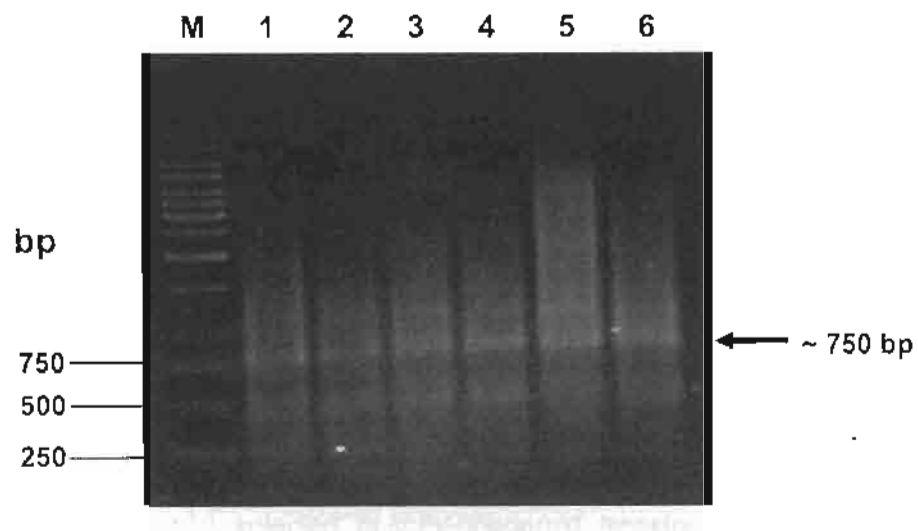
8.6 การสร้าง humanized-murine *scFv* segment (*huscFv*)

การสร้าง humanized *scFv* ใช้วิธี SOE-PCR โดย humanized-murine *VH* เชื่อมต่อกับ humanized-murine *VL* segments ตรงส่วน nucleotide linker ที่ overlap กัน (รูปที่ 1.49) ส่วนผสมของสารเคมีใน SOE-PCR ประกอบด้วย UDW 18.25 μ l, 10x buffer 2.5 μ l, outer forward primer 1.0 μ l, outer reverse primer 1.0 μ l, humanized-murine *VH* DNA template 0.5 μ l, humanized-murine *VL* DNA template 0.5 μ l, 10 mM dNTPs 1.0 μ l และ *Taq* polymerase 0.25 μ l โดยใช้ condition แบบ gradient PCR โดยอุณหภูมิ annealing ผันแปรจาก 52.2°C ถึง 60.7°C

จากนั้นนำ gradient PCR amplicons ไปตรวจด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งได้ผล humanized *scFv* amplicon ดังรูปที่ 1.50



รูปที่ 1.49 แสดงขั้นตอนการเชื่อมต่อ humanized-murine VH และ VL segments เข้าด้วยกัน โดย SOE-PCR ให้เป็น humanized-murine scFv (*huscFv*)



รูปที่ 1.50 แสดง gradient SOE-PCR amplicons ของ humanized scFv segment

Lane M, 1 kb DNA ladder

Lane 1, annealing temperature 52.2°C

Lane 2, annealing temperature 53.1°C

Lane 3, annealing temperature 54.6°C

Lane 4, annealing temperature 56.4°C

Lane 5, annealing temperature 58.5°C

Lane 6, annealing temperature 62.9°C

ขั้นตอนที่เก้าของงานวิจัยส่วนที่หนึ่ง:

การ clone humanized scFv fragment เข้าสู่ phagemid vector

9.1 การ clone humanized scFv fragment จากข้อ 8.6 เข้าสู่ pCANTAB5E phagemid และ transform เข้าสู่ *E. coli* โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.3 และ 4.4 และได้ transformed *E. coli* colonies บน SOBAG plate ดังรูปที่ 1.51

9.2 การคัดเลือก transformed *E. coli* clones ซึ่ง carry huscFv-phagemids และการ express huScFv protein

หลังจากได้ transformed *E. coli* clones ที่ carry humanized scFv-phagemids แล้ว ผู้วิจัยได้กู้ mature phages ออกจาก *E. coli* แล้วนำไปทำ biopanning ต่อ *Leptospira* homogenate เช่นเดียวกับข้อ 5.2 จากนั้นได้ screen หา high affinity phage clones โดยใช้วัสดุ วิธีการ และ ขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 5.3 และได้ selected huscFv-phagemid transformed-*E. coli* clones ตามตารางที่ 1.17



รูปที่ 1.51 แสดง *huscFv*-phagemid transformed *E. coli* clones or SOBAG plate