

**IMMUNOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL COMPARISONS OF  
EQUINE MONOVALENT AND POLYVALENT SNAKE  
ANTIVENOMS AND A NEW FRACTIONATION  
SCHEME FOR EQUINE ANTIVENOM**

**RUTAI RAWEERITH**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(BIOTECHNOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2004**

**ISBN 974-04-4493-8**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การเปรียบเทียบทางอิมมูโนเคมีและชีวเคมีของเซรุ่มแก้พิษงูชนิด monovalent และ polyvalent และกระบวนการใหม่ในการแยกภูมิคุ้มกันจากเซรุ่มม้า

(IMMUNOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL COMPARISONS OF EQUINE MONOVALENT AND POLYVALENT SNAKE ANTIVENOMS AND A NEW FRACTIONATION SCHEME FOR EQUINE ANTIVENOM)

ฤทธิ์ วรวิทย์ 4136671 SCBT/D

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D., ทิมโมที วิลเลียม เฟลเกล, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเจิด, Ph.D., อภิญา อัครานิก, Ph.D.

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบทางอิมมูโนเคมีและชีวเคมีของเซรุ่มแก้พิษงูชนิดเดี่ยว (monovalent antivenom) และเซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิด (polyvalent antivenom) ต่อพิษงูเห่า, งูจงอาง และงูสามเหลี่ยม เมื่อวิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่าเซรุ่มทั้ง 2 ชนิดมีรูปแบบของโปรตีนเหมือนกัน ส่วนปริมาณภูมิคุ้มกันทั้งหมดในเซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิดมีมากกว่าในเซรุ่มแก้พิษงูชนิดเดี่ยวเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในเซรุ่มแก้พิษงูชนิดเดี่ยวมีมากกว่าในเซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิดเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี ELISA พบว่าภูมิคุ้มกันชนิด IgG<sub>T</sub> ทั้งหมดที่ถูกกระตุ้นมีปริมาณไม่ต่างกันในเซรุ่มทั้ง 2 ชนิด เซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิดมีปริมาณภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อพิษประสาทของงูเห่าเท่ากับในเซรุ่มแก้พิษงูเห่า แต่มีปริมาณภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อพิษประสาทของงูจงอางและงูสามเหลี่ยมสูงกว่าในเซรุ่มแก้พิษงูจงอางและงูสามเหลี่ยม ตามลำดับ เซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิดมีค่า apparent dissociation constant ( $K_d$ ) ต่อพิษประสาทของงูจงอางเท่ากับในเซรุ่มแก้พิษงูจงอาง แต่มีค่า  $K_d$  ต่อพิษประสาทของงูเห่าและงูสามเหลี่ยมสูงกว่าในเซรุ่มแก้พิษงูเห่าและงูสามเหลี่ยมเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม ค่า  $K_d$  ที่ได้นี้ อยู่ในระดับ nM ซึ่งถือว่าเป็น high affinity binding ดังนั้น เซรุ่มแก้พิษงูหลายชนิด (polyvalent antivenom) จึงมีประสิทธิภาพและปริมาณโปรตีน (ซึ่งเป็นสาเหตุของการแพ้เซรุ่ม) ไม่ต่างกับเซรุ่มแก้พิษงูชนิดเดี่ยว

ส่วนที่สองของการศึกษานี้ได้ทำการแยกภูมิคุ้มกันชนิด F(ab')<sub>2</sub> จากซีรัมที่ย่อยด้วย pepsin โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย caprylic acid และ ion-exchange chromatography ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ caprylic acid ในการตกตะกอนโปรตีนคือ 2% ซึ่งจะได้ภูมิคุ้มกันใน supernatant คืนมาร้อยละ 89.61 และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 1.5 เท่า เมื่อนำส่วนใสจากการตกตะกอนนี้มาแยกโดย SP-Sepharose column chromatography แบบ step-wise elution ด้วย 0.25 M NaCl จะได้ภูมิคุ้มกันคืนมาร้อยละ 65.56 และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 2.91 เท่า ซึ่งเป็นค่าสูงกว่าการแยกภูมิคุ้มกันด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate กระบวนการใหม่นี้ยังสามารถกำจัด pepsin, high molecular weight aggregates และ caprylic acid ที่ปนอยู่ได้อีกด้วย และเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการแยกเซรุ่มม้าในระดับอุตสาหกรรม

122 หน้า ISBN 974-04-4493-8

**IMMUNOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL COMPARISONS OF EQUINE MONOVALENT AND POLYVALENT SNAKE ANTIVENOMS AND A NEW FRACTIONATION SCHEME FOR EQUINE ANTIVENOM**

RUTAI RAWEERITH 4136671 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: KAVI RATANABANANGKON, Ph.D., TIMOTHY WILLIAM FLEGEL, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., APINYA ASSAVANIG, Ph.D.

**ABSTRACT**

Immunochemical and biochemical comparisons of equine polyvalent (pAV) and monovalent (mAV) antivenoms against *Naja kaouthia* (NK), *Ophiophagus hannah* (OH) and *Bungarus fasciatus* (BF) venoms were studied. SDS-PAGE analysis of both types of antivenoms showed similar serum protein profiles. The total immunoglobulin (IgG<sub>T</sub> plus IgG) concentration of pAVs was slightly but significantly higher than that of mAVs while the total serum protein contents in mAVs was slightly but significantly higher than that of pAVs. The amounts of total hyperimmune IgG<sub>T</sub>, determined by ELISA, were similar in mAVs and pAVs. pAVs contained specific antibodies against the postsynaptic toxin NK3 to the same extent as that observed with the anti-*N. kaouthia* mAV. The anti-OH II and anti-BF IX specific antibodies in pAVs were significantly higher than those of the corresponding anti-*O. hannah* and anti-*B. fasciatus* mAVs. The apparent dissociation constant ( $K_d$ ) of anti-OH II antibody in pAVs was comparable to that of the anti-*O. hannah* mAVs. The apparent  $K_d$ 's of anti-NK3 and anti-BF IX antibodies in the corresponding mAVs were slightly but significantly lower than those in pAVs. However, all  $K_d$  values were in nM range and were considered to be high affinity binding. Thus, pAVs could be prepared with potency and protein contents and propensity to cause adverse reaction that were comparable to those of mAVs.

A combined process of caprylic acid (CA) precipitation and ion-exchange chromatography was studied to fractionate pepsin-digested antivenom. In the CA precipitation, the optimal concentration for the fractionation of F(ab')<sub>2</sub> was 2% with 89.61% recovery of antibody activity in the supernatant and 1.5 fold purification. The supernatant from CA precipitation was subjected to SP-Sepharose column chromatography. By step-wise elution (0.25 M NaCl), F(ab')<sub>2</sub> antibody was obtained with 65.56% recovery of antibody and 2.91 fold purification. These figures were higher than those achieved by ammonium sulfate precipitation. This process simultaneously and completely removed residual pepsin, high molecular weight aggregates and CA in the final F(ab')<sub>2</sub> product and should be suitable for large scale fractionation of therapeutic equine antivenoms.

**KEY WORDS : POLYVALENT AND MONOVALENT / ANTIVENOM POTENCY / ANTIVENOM FRACTIONATION / CAPRYLIC ACID / ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY**

122 pp. ISBN 974-04-4493-8