

15 JUL 1999



STUDIES ON THE IMPROVEMENT OF IMMUNOGENICITY  
OF ELAPID SNAKE POSTSYNAPTIC NEUROTOXINS

PATCHAREE SUNTHORNANDH

**With compliments**

of

*ศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณิศา*

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1991

TH

PATCHAREE

1991

3.6.1

310457

ที่อภิวชิยานพนธ์

การศึกษาเพื่อเพิ่มความสามารถในการกระตุ้น  
การสร้างแอนติบอดีในหนู ต่ออิมมูโนเจนชนิด  
ต่าง ๆ ที่เตรียมจากพิษประสาทของงูพิษใน  
วงศ์ Elapidae

ผู้วิจัย

พัชรี สุนทรนนท

ปริญญา

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์วิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D.

สกลิตย์ สิริสิงห, D.M.D., Ph.D.

พรชัย มาตังคสมบัติ, M.D., Ph.D.

วันเพ็ญ ชัยคำภา, D.V.M. (Hons.), Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา

31 พฤษภาคม พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดลองเตรียมสารอิมมูโนเจน 9 ชนิด โดยใช้พิษประสาทบริสุทธิ์  
(postsynaptic neurotoxin) ของงูเห่าไทย (Naja naja siamensis, NNS)  
งูจงอาง (Ophiophagus hannah, OH) และงูสามเหลี่ยม (Bungarus fasciatus,  
BF) นำมาเชื่อมต่อกันเองเพื่อให้โมเลกุลใหญ่ขึ้น (polymerization) หรือนำมาเชื่อม  
ต่อ (conjugation) กับโปรตีนโมเลกุลใหญ่ เช่น tetanus toxoid (TT), bovine  
serum albumin (BSA) หรือ diphtheria toxoid (DT) โดยใช้ carbodiimide  
(ECDI) หรือ glutaraldehyde (GA) เป็นตัวเชื่อม (conjugating agent)  
จากการทำปฏิกิริยาภายใต้การควบคุมให้เกิด polymerization หรือ conjugation  
ของพิษประสาทประมาณ 25-60% ของปริมาณพิษที่ใช้ ทำให้ได้อิมมูโนเจน 9 ตัว ดังนี้ คือ  
: I, NNS-ECDI; II, NNS-OH-BF-ECDI; III, NNS-BSA-DT-ECDI; IV,  
NNS-TT-ECDI; V, NNS-OH-BF-TT-ECDI; VI, NNS-GA; VIII  
NNS-OH-BF-GA; VIII, NNS-DT-ECDI และ IX, NNS-OH-BF-DT-ECDI ได้  
ทำการตรวจวิเคราะห์ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเตรียมอิมมูโนเจนเหล่านี้เพื่อทราบถึง  
ขนาดของโมเลกุลของ polymer และ conjugate ที่เกิดขึ้น ปริมาณของพิษประสาทที่  
เข้าทำปฏิกิริยา และคำนวณหา toxin density ในอิมมูโนเจนแต่ละชนิด โดยใช้วิธี  
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis และใช้  
พิษประสาทที่ตัดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความเป็นสารอิมมู  
โนเจน ของอิมมูโนเจน I-VII ที่เตรียมขึ้นโดยการฉีดอิมมูโนเจน ที่ผสมกับ  
incomplete Freund's adjuvant (IFA) เข้าในหนูทดลอง (rat) กลุ่มละ 8  
ตัวต่ออิมมูโนเจน และฉีดพิษงูเห่าไทย (crude cobra venom) และพิษประสาทบริสุทธิ์  
จากงูเห่าไทยเป็นตัวเปรียบเทียบ ได้ทำการตรวจวัดปริมาณของแอนติบอดีที่สร้างขึ้น  
ที่เฉพาะต่อพิษประสาทของงูทั้ง 3 ชนิด โดยใช้ Enzyme Linked Immunosorbent

Assay (ELISA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการสร้างแอนติบอดีต่ออิมมูโนเจนต่าง ๆ โดยวิธี multiple comparison จากผลการทดลองปรากฏว่าอิมมูโนเจนทุกตัวที่สังเคราะห์ขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้หนูสร้างแอนติบอดีได้ดีเท่าหรือดีกว่าพิษงูเห่า โดยอิมมูโนเจนที่เตรียมจากพิษประสาทบริสุทธิ์ที่เชื่อมต่อกับ tetanus toxoid (NNS-TT-ECDI) ให้ผลดีที่สุดเป็น 2.7-6.2 เท่าเมื่อเทียบกับผลที่ได้จากพิษงูเห่า นอกจากนี้ยังพบว่า อิมมูโนเจนที่เป็น multispecific ทุกตัวยังเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีต่อพิษประสาทของงูเห่า งูจงอาง และงูสามเหลี่ยมได้พร้อม ๆ กัน และในปริมาณพอ ๆ กันอีกด้วย

ในการทดลองชุดที่สองได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของ adjuvant 3 ชนิดคือ IFA, bentonite และ squalene-Arlacel A การสร้างแอนติบอดีต่ออิมมูโนเจน 3 ตัว คือ VII, NNS-OH-BF-GA; VIII, NNS-DT-ECDI และ IX, NNS-OH-BF-DT-ECDI และมีพิษงูเห่าเป็น control พบว่า IFA ช่วยกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่ออิมมูโนเจนทุกตัวได้ดีกว่า adjuvant อีก 2 ชนิด และ bentonite เป็น adjuvant ที่ดีกว่า squalene-Arlacel A ในบางอิมมูโนเจน นอกจากนี้อิมมูโนเจนที่เป็น multispecific 2 ชนิด ยังสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อพิษประสาทของ NNS, OH และ BF ได้ดีกว่าพิษงูเห่าในแต่ละ adjuvant อีกด้วย

ผลของการวิจัยนี้น่าจะนำมาซึ่งการผลิตเซรุ่มแก้พิษงู ที่มีประสิทธิภาพสูง และแก้พิษงูในกลุ่ม elapid ได้พร้อมกัน (polyvalent antivenom) เพื่อใช้ในการบำบัดรักษา

Thesis Title : Studies on the Improvement of Immunogenicity of Elapid Snake Postsynaptic Neurotoxins.

Name : Patcharee Sunthornandh

Degree: Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee :

Kavi Ratanabanangkoon, Ph.D.

Stitaya Sirisinha, D.M.D., Ph.D.

Pornchai Matangkasombut, M.D., Ph.D.

Wanpen Chaicumpa, D.V.M. (Hons.), Ph.D.

Date of Graduation : 31 May B.E. 2534 (1991)

#### ABSTRACT

Nine polymeric forms and conjugates of purified principal postsynaptic neurotoxins of Naja naja siamensis (NNS), Ophiophagus hannah (OH) and Bungarus fasciatus (BF) have been synthesized by controlled polymerization in which only 25-60 % of the toxins were allowed to react. A carbodiimide (ECDI) and glutaraldehyde (GA) were used as coupling agents while BSA, diphtheria toxoid (DT) and tetanus toxoid (TT) were used as carriers. The antigenic mosaic of these immunogens were: I, NNS-ECDI; II, NNS-OH-BF-ECDI; III, NNS-BSA-ECDI; IV, NNS-TT-ECDI; V, NNS-OH-BF-TT-ECDI; VI, NNS-GA; VII, NNS-OH-BF-GA; VIII, NNS-DT-ECDI and IX, NNS-OH-BF-DT-ECDI. By using SDS-PAGE and radioactive toxin, each immunogen preparation was characterized in terms of molecular size and abundance of protein components, percent toxin reacted and toxin density. The relative

immunogenicities of seven immunogens (I to VII) along with those of crude NNS venom and pure NNS postsynaptic neurotoxin were evaluated in groups of 8 rats using incomplete Freund's adjuvant (IFA). The levels of specific antibody against each of the neurotoxins were determined by ELISA's. Multiple comparisons between antibody responses to these immunogens were made. All the chemically modified immunogens were found to be at least as immunogenic as NNS venom. NNS-TT-ECDI gave the highest antibody response (2.7-6.2 fold higher than that induced by NNS venom) while pure NNS postsynaptic neurotoxin was among the least immunogenic. The 3 multispecific immunogens (II, V and VII) induced comparable specific antibodies to BF,OH and NNS neurotoxins. The results showed that the presence of protein carrier and the relative degree of toxin density affected the immunogenicities.

In another set of experiment, the effect of 3 adjuvants: IFA, bentonite and squalene-Arlacel A were studied in groups of 8 rats using one monospecific (VIII) and two multispecific (VII and IX) immunogens while crude NNS venom was used as control. It was found that IFA gave the highest antibody responses with each of the 4 immunogens. The 3 chemically modified immunogens were also shown to be more immunogenic than the crude NNS venom in most adjuvants. The two multispecific immunogens (VII and IX) also stimulated high antibody titers against OH and BF neurotoxins in all 3 adjuvants.

The results of this study should pave the way to the production of potent, polyvalent antivenoms against these and other deadly elapid snakes.