MONOCLONAL ANTIBODIES NEUTRALIZING THE NEUROTOXIN FROM THE VENOM OF THE SNAKE *NAJA KAOUTHIA*

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

CHULEE MASATHIEN

17 มี.ค. 2532

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1988

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

12044

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตโมโนคลอนอล แอนติบอดี ที่สามารถทำลายคุณสมบัติของพิษประสาทจากงูเห่า Naja kaouthia

ผู้วิจัย น.ส. ชุลี มาเสถียร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

มร. ปีเตอร์ บี บิลลิงส์

นายกวี รัตนบรรณางกูร

นางปราณี สิทธิสาร

นส. ศรีสิน คูสมิทธิ์

วันที่สำเร็จการศึกษา 20 พฤษภาคม 2531

บทคัดย่อ

โมโนคลอนอล แอนติบอดี ถูกผลิตขึ้นโดยมีความจำเพาะต่อพิษประสาท (siamensis toxin 3) บริสุทธิ์ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในพิษงูเห่าไทย (Naja kaouthia หรือ Naja naja siamensis) โดยการวิจัยนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการเพิ่มประสิทธิภาพเซรุ่ม ที่ผลิตได้จากม้าในการทำลายคุณสมบัติ (neutralize) ของพิษงูเห่า โดยมุ่งหมายที่จะศึกษาเพื่อประเมินช่วงความสามารถในการทำลายคุณสมบัติของพิษประสาท (neurotoxin) จากพิษงูเห่าไทย โดยแต่ละกลุ่มของแอนติบอดีที่จำเพาะที่ผลิตจากหนู เนื่องจากความรุนแรงของพิษ และความสามารถต่ำในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีตอบสนอง (poor immunogenicity) ของพิษประสาท จึงได้ทำการดัดแปลงเพื่อลดความเป็นพิษลง รวมทั้งช่วยให้สามารถฉีดในปริมาณที่สูงขึ้นได้ วิธีการดัดแปลงเพื่อลดความเป็นพิษเหล่านี้ได้แก่ การทำปฏิกิริยากับ glutaraldehyde หรือ formaldehyde และการเชื่อมต่อโดย carbodiimide ระหว่างพิษประสาทกับโปรตีนอื่น ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าโดยในที่นี้ได้ใช้ thyroglobulin การดัดแปลงนี้ได้ช่วยให้สามารถเพิ่มปริมาณของพิษประสาท เพื่อฉีดเข้าหนูได้สูงขึ้นมาก เป็นผลให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีขึ้น เซลล์ hybridomas ได้ถูกผลิตขึ้นจากเซลล์ม้ามของหนูที่มีภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อ toxin-thyroglobulin หรือ glutaraldehyde toxoid. Hybridomas จำนวน 10 clones ที่ผลิตโมโนคลอนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อพิษประสาทได้ถูกเลือกโดยวิธี ELISA เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โมโนคลอนอล แอนติบอดีจาก 9 ใน 10 clones ของ hybridomas จากน้ำในช่องท้องหนู ได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ และมีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยการตกตะกอนด้วย 50% $(NH_4)_2SO_4$ ในการ

Copyright by Mahidol University

ศึกษาในหนูถึงความสามารถในการทำลายคุณสมบัติของพิษประสาท ได้ใช้โมโนคลอนอล แอนติบอดี ปริมาณ 1 มก. (ประมาณ 17 เท่าของ IgG paratope) ผสมเข้ากับพิษประสาทบริสุทธิ์ในขนาด 2 เท่าของปริมาณที่มีผลทำให้หนูทดลองตาย 50% ($2 \times LD_{50}$) พบว่าโมโนคลอนอล แอนติบอดีทั้งหมดที่นำมาศึกษามีผลทำให้เกิด prolongation of survival time จากพิษประสาทได้ต่างๆ กัน ในหนูกลุ่มทดลอง ระหว่าง 2.6 - 41.8 เท่า จากหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่พบว่ามี clone ใดที่ให้ผล protection อย่างสมบูรณ์ วิธี solid-phase antibody binding competition assay แสดงให้เห็นว่าทั้ง 8 clones มีแนวโน้มของความจำเพาะต่อตำแหน่งเดียวกัน หรือตำแหน่งที่คาบเกี่ยวกันบนโมเลกุลของพิษประสาท โดยมีความสัมพันธ์กันอย่างน้อย 1 ทิศทาง ทำให้คาดว่าตำแหน่งซึ่งโมโนคลอนอล แอนติบอดีเหล่านี้จำเพาะต่อ น่าจะเป็นบริเวณใหญ่ที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดีกว่าตำแหน่งอื่น (a large immunodominant region) บนโมเลกุลของพิษประสาท ซึ่งไม่ถูกดัดแปลงไปในขั้นตอนของการลดความเป็นพิษ และยังแสดงให้เห็นถึงความหลายหลากในแง่ของความสามารถในการทำลายคุณสมบัติของพิษประสาท โดยแอนติบอดีจำเพาะที่สร้างจากหนู อย่างไรก็ตาม ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นที่ตำแหน่งอื่นบนโมเลกุลของพิษประสาทนอกเหนือจากตำแหน่งที่โมโนคลดนอล แอนติบอดีเหล่านี้จำเพาะต่อ หรือ affinity ของโมโนคลอนอล แอนติบอดีเหล่านี้ หรือแม้กระทั่งปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipition) ที่จะนำไปสู่การทำลายคุณสมบัติของพิษประสาทได้อย่างสมบูรณ์

Copyright by Mahidol University

Thesis Title MONOCLONAL ANTIBODIES NEUTRALIZING THE NEUROTOXIN FROM THE VENOM OF THE SNAKE *NAJA KAOUTHIA*

Name Chulee Masathien

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Peter B. Billings, Ph.D. Major Advisor

Kavi Ratanabangkoon, Ph.D.

Pranee Sithisarn, M.Sc.

Srisin Khusmith, D.Sc.

Date of Graduation

May 20, 1988

ABSTRACT

Monoclonal antibodies were produced against the principal neurotoxin (siamensis toxin 3) purified from venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia (Naja naja siamensis)*, as part of a study aimed at enhancing the neutralization capacity of commercial horse antivenins. The rationale is to assess the range of neutralization capacities within a population of mouse anti-toxin antibodies by sampling individual specificities of varying degrees of neutralization. In order to overcome the lethal toxicity and poor immunogenicity of the native toxin, several modified forms of the low MW toxin were made to be used as immunogen including: reaction with glutaraldehyde or formaldehyde and crosslinking of toxin to higher MW carrier proteins such as thyroglobulin, using a water-soluble carbodiimide. These modifications of

©Copyright by Mahidol University

toxin enable higher doses for immunization, thus enhancing the antibody responses. The hybridomas were produced using splenocytes from mice immunized with toxin-thyroglobulin conjugates or glutaraldehyde toxoid. Ten hybridomas secreting monoclonal antibodies against the purified native toxin were selected by ELISA for further analysis. Eight of 10 monoclonal antibodies concentrated from hybridoma-induced ascites fluids by half-saturated ammonium sulfate fractionation, were mixed in approximately a 17-fold excess (*i.e.*, 1 mg Ig) of IgG paratope with an amount of purified toxin equivalent to two mouse 50% lethal doses ($2 \times LD_{50}$). All clones tested exhibited a degree of protection reflected by a prolongation of survival time of mice injected with neurotoxin ranging from 2.6-41.8 times that of the control group. None, however, showed absolute protection. A solid-phase antibody binding competition assay showed some relationship in terms of recognition of the same or overlapping epitopes among all the tested clones in at least 1 direction, but not in both directions for half of them. This suggests that the epitopes recognized by these monoclonal antibodies are members of a large immunodominant region on the toxin molecule which was not destroyed by the modification. The data clearly indicate heterogeneity among anti-toxin antibodies; not all antibodies are equivalent in neutralizing capacity. It is not clear from these results whether additional epitope variation differentiates the best neutralizing antibodies, nor the extent to which antibody affinities and even precipitation reactions contribute to neutralization.

Copyright by Mahidol University