Thesis title	**Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Chondroitin 6-sulfate**
Author	**Mr. Nathachai Tiengburanatam**
Master of science	**Biochemistry**

Examining committee

Assistant Professor Dr. Prachaya Kongtawelert	**Chairperson**
Associate Professor Dr. Usanee Vinitketkumnuen	**Member**
Associate Professor Dr. Nimit Morakote	**Member**
Associate Professor Dr. Watchara Kasinrerk	**Member**

ABSTRACT

Cartilage diseases are some of many factors affecting world population, and they cause enormous disasters about health care, economics and society. Two most prevalent cartilage diseases, osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA), are still lacking of convenient and efficient methods for early detection of defected biomolecules which occur in early stage of diseases. Recently, monoclonal antibody technique is widely used in the investigation of diseases due to their specificity, convenience, economics and high sensitivity. Thus, this may have potential use for detection of serum chondroitin sulfate which has been reported to be released in the serum of animal models which were induced to have osteoarthritis.

Proteoglycan fraction (associative condition fraction; A1) from embryonic shark was used to immunize Balb/c mice and their spleen cells were fused with myeloma cell line, X63-Ag8.653. Hybridoma culture media (IMDM supplemented with 10% calf serum) which contained antibodies against A1 were screened with chondroitin sulfate by competitive enzyme-link immunosorbent assay (competitive ELISA) and only those from particular cell line named WF6 cell line were found to be positive. Antibody produced by WF6 was found to be IgM isotype. This antibody reacted against shark and embryonic shark A1, chondroitin sulfate C and D and heparin. No reactivity was observed with G1 domain, keratan sulfate, hyaluronan, bovine serum albumin, calf thymus DNA, dextran sulfate, pentosan polysulfate, heparan sulfate and three heparin derivatives. Structure of specific epitope for WF6 was deduced. The competitive ELISA method using WF6 culture medium as antibody source was developed to determine serum WF6 epitopes. Sensitivity of this method was at 1 ng/ml (IC_{50} 0.1 μg/ml), coefficient of variation of intra- and inter- assay were 13.79% (n=20) and 10.29% (n=20), respectively, and recovery was 97.01% (n=7)

Using the developed method, serum WF6 epitope (A1 equivalent) level of normal healthy control group was found to be 0.33 ± 0.29 μg/ml (n=111), rheumatoid arthritis patients 1.72 ± 1.60 μg/ml (n=19) and osteoarthritis patients 1.70 ± 1.30 μg/ml (n=18), respectively. Statistical analysis indicated that serum WF6 epitope level in osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients was significantly higher than that in normal healthy control group ($p < 0.0001$).

It can be concluded that the epitopes of WF6 antibody was situated in glycosaminoglycan moiety which has certain sulfation pattern, position 4 on the first sugar molecule and/or position 6 on the second one of disaccharide repeating unit attached to the peptide. In addition, these epitopes tend to increase in osteoarthritis and rheumatoid arthritis patient sera. Moreover, WF6 epitope constitutes a potential marker used for diagnosis of osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของ โมโนโคลนัล แอนติบอดีต่อคอนโดรอิติน 6-ซัลเฟต
ชื่อผู้เขียน นายณัฐชัย เที่ยงบูรณธรรม
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.ปรัชญา คงทวีเลิศ ประธานกรรมการ
รศ.ดร.อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ กรรมการ
รศ.ดร.นิมิตร มรกต กรรมการ
รศ.ดร.วัชระ กสิณฤกษ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ความผิดปกติของกระดูกอ่อน เป็นหนึ่งในหลายปัจจัย ที่ส่งผลกระทบต่อประชากรโลกและสร้างความเสียหายทางด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจและสังคมอย่างมาก ความผิดปกติที่พบบ่อยได้แก่ โรครูมาตอยด์และข้อเสื่อม ซึ่งปัจจุบันยังไม่วิธีการที่สะดวกและได้ผลดี ในการตรวจหาความผิดปกติของสารชีวโมเลกุลซึ่งจะพบในระยะเริ่มต้นของโรค มีการใช้เทคนิคโมโนโคลนัลแอนติบอดีอย่างแพร่หลายในการนำมาตรวจหาความผิดปกติของโรค เนื่องจากมีข้อดีคือ มีความจำเพาะ สะดวก ประหยัดและความไวสูง ดังนั้น วิธีนี้จึงน่าจะเป็นทางหนึ่งที่จะใช้ตรวจหา chondroitin sulfate ซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่ามีการปล่อยออกมาในซีรั่มของสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นโรคข้อเสื่อม

เมื่อนำส่วนของ proteoglycan (ส่วนที่อยู่ในสภาพรวมตัวกัน; A1) ที่สกัดได้จากตัวอ่อนของฉลามไปฉีดกระตุ้นหนู Balb/c และนำเซลล์ของม้ามไปทำการรวมตัวกับเซลล์ myeloma ชนิด X63-Ag8.653 นำเซลล์ hybridoma ที่ผลิตและตรวจสอบแล้วว่าสร้างแอนติบอดีต่อ A1 มาตรวจสอบหา clones ที่ให้

ผลบวกกับ chondroitin sulfate โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (IMDM ที่เติม 10% calf serum) ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธี competitive enzyme link immunosorbent assay (competitive ELISA) พบว่ามีเพียง clone เดียว คือ WF6 ที่ให้ผลบวกต่อ chondroitin sulfate การศึกษาคุณสมบัติของแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ WF6 พบว่า แอนติบอดีเป็นชนิด IgM และให้ผลบวกกับ A1 ที่ได้จากฉลามและตัวอ่อนของฉลาม, chondroitin sulfate ชนิด C และ D และ heparin และให้ผลลบกับ G1, keratan sulfate, hyaluronic acid, bovine serum albumin, calf thymus DNA, dextran sulfate, pentosanpolysulfate, heparan sulfate และ อนุพันธ์ของ heparin ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณ epitopes ของ WF6 ในซีรั่มโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวพบว่า ความไวของวิธีการตรวจวัดนี้สามารถตรวจวัดปริมาณ epitopes ของ WF6 (A1 equivalent) ได้ถึง 1 นาโนกรัม (IC_{50} 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่า coefficient of variation (CV) ของ intra- และ ของ inter-assay เท่ากับ 13.79% (n=20) และ 10.29% (n=20) ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยของ recovery มีค่าเท่ากับ 97.01% (n=7)

จากการศึกษาระดับ epitopes ของ WF6 ในซีรั่มของผู้ป่วยโรครูมาตอยด์ 19 รายและโรคข้อเสื่อม 18 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีสุขภาพดีจำนวน 111 ราย พบว่าระดับ epitopes ของ WF6 โดยเฉลี่ยในกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.33 ± 0.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผู้ป่วยโรครูมาตอยด์มีค่าเท่ากับ 1.72 ± 1.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและโรคข้อเสื่อมมีค่าเท่ากับ 1.70 ± 1.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ epitopes ของ WF6 ในกลุ่มที่เป็นโรครูมาตอยด์และโรคข้อเสื่อม เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองแสดงสามารถสรุปได้ว่า epitopes ของแอนติบอดีที่ได้จากเซลล์ WF6 จะอยู่ในส่วนที่เป็น glycosaminoglycans (GAGs) ซึ่ง

มีรูปแบบจำเพาะของหมู่ซัลเฟต คือตำแหน่งที่ 4 ของน้ำตาลโมเลกุลแรก และ/หรือตำแหน่งที่ 6 ของน้ำตาลตัวที่สองของ repeating disaccharide ร่วมกับส่วนที่เป็นเปปไทด์ นอกจากนี้ยังพบว่า epitopes ดังกล่าวมีปริมาณเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรครูมาตอยด์และข้อเสื่อม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า epitopes ของ WF6 อาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรครูมาตอยด์และข้อเสื่อมได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University