

Thesis Title Production of Monoclonal Antibodies Against Glycoconjugates and Their Applications

Author Mr. Theerawut Chanmee

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Advisor

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ongchai Co-advisor

Lect. Dr. Peraphan Pothacharoen Co-advisor

ABSTRACT

Changes in glycoconjugate production have been reported in many diseases including Osteoarthritis (OA) and Hepatocellular carcinoma (HCC). Cell surface glycoconjugates have been expected for discovery of novel cellular biomarkers for diagnosis and prognosis of the diseases. The objectives of the present study were the production of the specific monoclonal antibody (mAb) against human chondrocyte surface antigen and antigen specific hepatocellular carcinoma; glypican3 (GPC3) and use these molecules as a diagnostic markers for OA and HCC, respectively.

For identification and characterization of chondrocyte surface molecules, primary human chondrocytes were used as an immunogen. After mAb production, a

mAb named 5D2 was selected for further characterization. Biochemical analysis revealed that the antigen which recognized by 5D2 mAb is a protein with a molecular weight of approximately 25–35 kDa. Protein identification by mass spectrometry and molecular cloning revealed that this molecule is identical to the Thy-1 molecule. We examined the role of the Thy-1 molecule in induced animal papain-induced rat arthritis, and OA human articular cartilage section. Both rat and human OA cartilage showed a higher expression of Thy-1 as compared with normal tissue in all experimental approaches.

For the HCC, we developed a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of serum GPC3 levels by using anti human GPC3 to evaluate its diagnostic role and clinical correlations in patients with HCC. Six groups were studied which included healthy subjects, chronic hepatitis (CH), liver cirrhosis (LC), HCC, intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and metastatic carcinoma (MCA). We found that 53% of HCC patients had elevated serum GPC3 levels with values ranging 35.5–7826.6 ng/mL. The serum marker was undetectable in other groups except one patient (2%) with LC and another patient (2%) with MCA. In most cases of HCC, elevated GPC3 values did not correlate with α -fetoprotein (AFP) levels. Detectable GPC3 was significantly correlated with the presence of viral hepatitis markers but was not correlated with tumor size and stage of HCC. Serum GPC3 was superior to AFP in detecting small HCC (56.3% and 31.3%, respectively). A combination of serum GPC3 and AFP improved sensitivity for detecting small HCC to 75%.

Taken all together, these data revealed that the identification of Thy-1 and GPC3 would be benefit for diagnosis of OA and HCC, respectively.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไกลโคคอนจูเกตและการประยุกต์ใช้	
ผู้เขียน	นายธีระวุฒิ จันทรมี	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์		
	รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	อ. ดร. พิรพรรณ โปธาเจริญ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงระดับการสร้างสารในกลุ่มไกลโคคอนจูเกตมีรายงานพบได้ในโรคหลายชนิดรวมถึงโรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis; OA) และ โรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma; HCC) สารไกลโคคอนจูเกตที่พบบนผิวเซลล์อาจสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรคได้ จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์กระดูกอ่อน และ โมเลกุลที่จำเพาะกับโรคมะเร็งตับ; glypican 3 เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคข้อเสื่อมและโรคมะเร็งตับ ตามลำดับ

เพื่อระบุและศึกษาลักษณะโมเลกุลบนผิวเซลล์กระดูกอ่อนจึงใช้เซลล์กระดูกอ่อนเป็นสารอิมมูโนเจน หลังการสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีโมโนโคลนอลแอนติบอดีชื่อ 5D2 ถูกเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป การศึกษาทางชีวเคมีพบว่าโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี 5D2 เป็นโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 25-35 kDa การวิเคราะห์โดยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีและการโคลนอินพบว่าโมเลกุลชนิดนี้มีความเหมือนกันกับโมเลกุล Thy-1 การศึกษาถึงบทบาทของโมเลกุล Thy-1 ในตัวอย่างของโรคข้อเสื่อมได้แก่ หนูที่เป็นโรคข้อเสื่อมเนื่องจากการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ปาเปน และ จี้นกระดูกอ่อนโรคข้อเสื่อมของมนุษย์ ในจี้นกระดูกอ่อนที่เป็นโรคข้อเสื่อมพบมีการแสดงออกของโมเลกุล Thy-1 ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับจี้นกระดูกอ่อนปกติ

สำหรับการวิเคราะห์โรคมะเร็งตับนั้น ได้ทำการพัฒนาวิธี ELISA ในการวัดระดับของ glypican3 ในซีรัม โดยใช้แอนติบอดีต่อ glypican3 เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและอธิบายความสัมพันธ์

ทางคลินิกในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับ โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 6 กลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่างปกติ โรคไวรัสตับอักเสบ โรคตับแข็ง โรคมะเร็งตับ โรคมะเร็งท่อน้ำดี และ metastatic carcinoma (MCA) โดยพบว่า 53% ของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับมีระดับของ glypican3 ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้น ความเข้มข้นอยู่ที่ระดับ 35.5–7,826.6 ng/mL โดยไม่พบในโรคนิโคอื่นๆ ยกเว้น ในโรคตับแข็งที่พบ 2% และ MCA อีก 2% ในกลุ่มโรคมะเร็งตับการเพิ่มขึ้นของระดับ glypican3 ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของ α -fetoprotein (AFP) และพบความสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้ของไวรัสตับอักเสบ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนมะเร็งและระยะของมะเร็ง glypican3 มีความเหนือกว่า AFP ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับที่มีขนาดเล็ก (56.3% และ 31.3% ตามลำดับ) การใช้ glypican3 และ AFP ร่วมกันในการวินิจฉัยโรคจะเพิ่มความไวในการตรวจได้ถึง 75%

จากผลการศึกษาทั้งหมดเหล่านี้จึงกล่าวได้ว่า Thy-1 และ glypican3 น่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมและโรคมะเร็งตับตามลำดับ