



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิเคราะห์กัมมันตภาพรังสีของดิน 6-ซีเมนต์ ซึ่งถูกเจือจางด้วย
ไนโนไทเทเนียมออกไซด์ WF6 และการนำไปประยุกต์ใช้

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิเคราะห์หัตถิโทป ของสายคอนครอยดิน 6-อัลเฟด ซึ่งถูกจดจำโดย
โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 และการนำไปประยุกต์ใช้

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

31 สิงหาคม 2547

Executive Summary

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การวิเคราะห์อีพิโทป ของสายคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ซึ่งถูกจดจำโดยโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 และการนำไปประยุกต์ใช้
(ภาษาอังกฤษ) Investigation of the epitope in chondroitin 6-sulphate chains recognized by monoclonal antibody WF6 and its applications
2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ email
 ชื่อหัวหน้าโครงการ นายปรัชญา คงทวีเลิศ
 หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 ที่อยู่ 99/31 หมู่ 6 ถนน เชียงใหม่ - สอด
 ต. บ้านแหวน อ. หางดง จ. เชียงใหม่ 50230
 โทรศัพท์ (ที่บ้าน) 053-336176
 (ที่ทำงาน) 053-894188, 053-945322 Ext 217
 โทรสาร 053-894188, 053-217144, 053-894031
3. สาขาที่ทำการวิจัย ความรู้พื้นฐานทางด้านชีวเคมีภูมิคุ้มกัน
4. งบประมาณทั้งโครงการ 1,564,000.- บาท
5. ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี
6. วัตถุประสงค์ เป็นการวิจัยพื้นฐานเพื่อวิเคราะห์หาอีพิโทปที่แท้จริงของโมโนโคลนอลแอนติบอดี และการนำเอาแอนติบอดีนี้ไปประยุกต์ใช้ ในการวิจัย และการวินิจฉัยโรค การศึกษาหาอีพิโทป ที่แท้จริงของแอนติบอดีตัวนี้ มีความสำคัญมากเพื่อที่จะนำไปประยุกต์เพื่อการจดสิทธิบัตรเป็นการค้าต่อไปในอนาคต
11. Output ของโครงการ

Publication	2	paper (submitted)
Patent	2	patents (ประเทศไทย, UK)

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาวิเคราะห์หาโครงสร้าง และคุณสมบัติของ chondroitin sulfate-C (CS-C) ที่ทำปฏิกิริยาได้กับ monoclonal antibody WF6 (MAb WF6) และการนำไปประยุกต์ใช้ การศึกษาหาโครงสร้างสามารถทำได้โดยการใช้ย่อย chondroitin sulfate-C จากกระดูกอ่อน ปลาดุกตามโดยใช้เอนไซม์ chondroitinase ABC และแยกส่วนโดยใช้วิธีทาง chromatography ชนิด Bio-Gel P6 และ FPLC system โดยใช้ Mono-Q column และ HPLC แต่ละส่วนของ oligosaccharides ที่แยกได้นำมาทดสอบกับคุณสมบัติกับ MAb WF6 ด้วยวิธี ELSA และ micro-array analysis โดยนำส่วนที่เล็กที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ มาวิเคราะห์ขนาดน้ำหนักโมเลกุล โดยเทคนิค MALDI-TOF mass spectrometer และ novel oligosaccharide sequencing โดยพบว่า สาย oligosaccharide ที่ทำปฏิกิริยาได้กับ MAb WF6 มีขนาดเท่ากับน้ำตาล 8 หน่วย และมีการเรียงของสายน้ำตาลเป็น $\Delta D-C-C-C$

ได้ทำการนำแอนเชอร์ WF6 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิต MAb WF6 จากนั้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาแยกบริสุทธิ์ โดยวิธี Thiophilic gel chromatography เพื่อนำมาพัฒนาวิธีการ ตรวจวัดปริมาณของ WF6 epitope โดยการใช้ shark A1-proteoglycan fraction เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำวิธีการที่พัฒนาได้นี้มาศึกษาหาปริมาณในซีรัมของคนปกติ และโรคต่าง ๆ เช่น ข้ออักเสบ ข้อเสื่อม และมะเร็งชนิดต่าง ๆ นอกจากนั้นยังนำไปศึกษาทางด้าน immuno-histological staining อีกด้วย

Abstract

This project was concerned about the analysis of the epitope of chondroitin 6-sulfate of monoclonal antibody WF6 and its applications.

The commercial shark chondroitin sulfate C as a source for the substrate subjected to the chondroitinase ABC and fractionated by Bio-Gel P6 chromatography, FPLC system with Mono-Q and HPLC. Then each fraction was tested against monoclonal antibody WF6 using ELISA technique and microarray. The positive fraction was then further analysed for the molecular weight using MALDI-TOF mass spectrometer, and a novel oligosaccharide sequencing. It was found that the oligosaccharide which reacted with monoclonal antibody WF6 was octasaccharide and the oligosaccharide sequence was $\Delta D-C-C-C$.

The hybridoma cell line, WF6, was retrieved from the storage and grown up by *in vitro* tissue culture. They grown in Iscove's DMEM (10% FBS) and serum-free medium as sources of large quantity of monoclonal antibody. The thiophilic gel chromatography was used to purify this antibody and then used as for the development of ELISA for quantitation of the WF6 epitope by using shark A1-proteoglycan fraction as standard. The developed method was used to quantify in normal and various diseases' samples such as rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA), and cancers. Furthermore, this monoclonal antibody WF6 was applied in immuno-histological studies.

สัญญาเลขที่ BRG4680004

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การวิเคราะห์อิทธิพล ของสายคอนครยตึน 6-ซัดเฟด ซึ่งถูกจคจำโดย
โมโนโคลนอด แอนคิบอติย์ WF6 และการนำไปประยุกต์ใช้

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ
ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
ชกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
Executive Summary	3
เนื้อหางานวิจัย	4
ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา	4
วัตถุประสงค์	5
ระเบียบวิธีวิจัย และผลการทดลอง	5
ผลงาน (output) ที่ได้จากโครงการ	32
ภาคผนวก	33
รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือนสุดท้าย	34
Manuscript I	37
Manuscript II	65
Patent I	96
Patent II	143
Hybridoma cell line WF6 deposition	173

เนื้อหางานวิจัย

ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิจัยทางด้าน monoclonal antibody ต่อสารชีวโมเลกุลชนิด proteoglycans และ polysulfated polysaccharides ตั้งแต่ศึกษาระดับปริญญาเอก ที่ประเทศออสเตรเลีย เมื่อกลับมาทำงานที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับทุนจากสหภาพยุโรป เพื่อทำการศึกษาวิจัยทางด้านนี้ต่อ และได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดสารชีวโมเลกุลชนิด hyaluronan ซึ่งในโครงการนี้ได้ทำการผลิต monoclonal antibody ต่อ shark proteoglycans ซึ่งมีความจำเพาะ และอาจจะใช้เป็นตัวสำคัญในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมได้

จากการศึกษาดังกล่าว ทำให้ได้ monoclonal antibodies จำนวนมาก ซึ่งหนึ่งในจำนวนนั้นมี hybridoma cell line อยู่หนึ่งชนิดที่เรียกว่า WF6 เป็น monoclonal antibody ชนิด IgM ซึ่งเบื้องต้นพบว่าเป็น antibody ที่มีความจำเพาะต่อสารคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งคือ chondroitin 6-sulfate และเมื่อนำมาพัฒนาเป็นการตรวจวัดโดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (ELISA) พบว่าสามารถนำมาเป็นสารบ่งชี้ (marker) เพื่อการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อมได้

อย่างไรก็ตาม จากความรู้ที่มีรายงาน และได้ประสบการณ์มา พบว่า สารชีวโมเลกุลชนิด chondroitin 6-sulfate (CS-C) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากกระดูกอ่อนปลาฉลาม (shark cartilage proteoglycans) มีการเรียงตัวของ oligosaccharides ไม่เหมือนกับ CS-C ที่พบได้ในกระดูกอ่อนทั่วไป

และเนื่องมาจากการที่ monoclonal antibody ชนิด WF6 นี้มีแนวโน้มที่จะนำมาซึ่งการนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคได้ ทั้งโรคข้อเสื่อม และ โรคมะเร็งบางชนิด เช่น ovarian cancer หรืออาจจะนำไปประยุกต์ในการศึกษาวิจัยทางด้าน extracellular matrix proteoglycans ซึ่งปัจจุบันมีการขายน้ำยาขึ้นในราคาแพง ซึ่งเป็นน้ำยาจากประเทศญี่ปุ่น แต่ WF6 เป็น monoclonal antibody ที่สามารถผลิตขึ้นได้เอง จากการวิจัย และพัฒนาในประเทศไทย ทั้งยังมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากที่มีอยู่แล้วในห้องตลาด

ผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะนำ monoclonal antibody WF6 นี้ไปประยุกต์ในเชิงการค้าด้วย โดยจะต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมว่า มี epitope ของ chondroitin sulfate เป็นแบบใดอย่างแน่ชัด โดยทำการศึกษาหาโครงสร้าง และการเรียงตัวของ oligosaccharides และจากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประกอบในการทำการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต รวมทั้งที่จะทำการจดสิทธิบัตรต่อไป ข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ มีความจำเป็นต้องทำการวิจัยพื้นฐาน เพื่อให้ได้คำตอบที่ชัดเจน และเป็นความรู้ใหม่ว่า oligosaccharides ส่วนใดที่ทำหน้าที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) และเป็นพื้นฐานเพื่อไปประยุกต์และพัฒนาใช้ในวงการวิจัยต่อไป

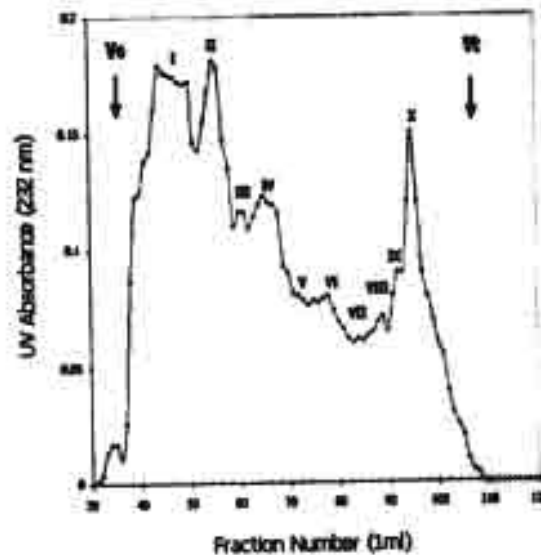
วัตถุประสงค์

เป็นการวิจัยพื้นฐานเพื่อวิเคราะห์หาอิทธิพลที่แท้จริงของโมโนโคลนอล แอนติบอดี และการนำเอาแอนติบอดีนี้ไปประยุกต์ใช้ ในการวิจัย และการวินิจฉัยโรค การศึกษาหาอิทธิพลที่แท้จริงของแอนติบอดีตัวนี้ มีความสำคัญมากเพื่อที่จะนำไปประยุกต์เพื่อการจดสิทธิบัตรเป็นการค้าต่อไปในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

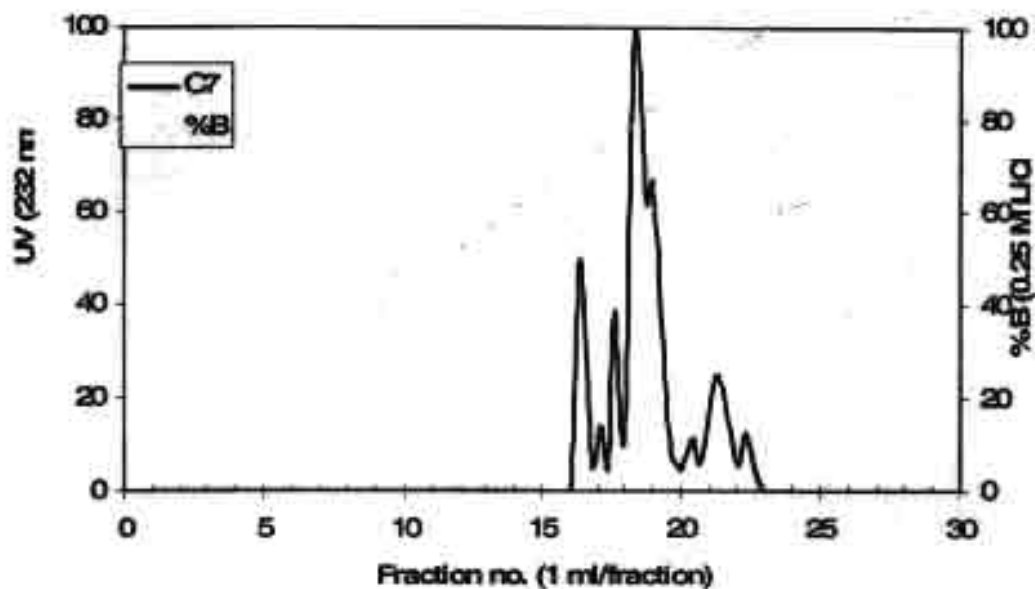
การแยกสายโพลีโกลแซคคาไรด์จาก คอนดรอยติน ซัลเฟต

เนื่องจากโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับคอนดรอยติน 6-ซัลเฟต ดังนั้น จึงจำเป็นต้องแยกสายโพลีโกลแซคคาไรด์ จากคอนดรอยติน 6-ซัลเฟต โพลีแซคคาไรด์ ที่เตรียมได้จาก proteoglycans จากกระดูกอ่อนปลาฉลาม การศึกษาสามารถทำได้โดยการนำเอา chondroitin sulfate-C มาย่อยด้วย chondroitinase ABC แล้วนำเอาผลิตภัณฑ์ได้นั้นมาแยกขนาดโดยใช้วิธีการทาง gel filtration chromatography (Bio-Gel P6) และนำแต่ละ fraction ที่แยกได้มาทดสอบปฏิกิริยากับ WF6 antibody จากนั้นนำเอาส่วนของ fraction ที่ทำปฏิกิริยาได้นั้นมาแยกต่อโดยวิธี strong anion exchange chromatography ชนิด Mono-Q FPLC system



รูปที่ 1 ลักษณะกราฟที่แสดงการแยกส่วนของคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ chondroitinase ABC โดยการใช้คอลัมโครมาโตกราฟฟีที่มีเจลชนิด Bio-Gel P6 เป็นตัวกลาง

นำเอา fraction ที่ 7 มาแยกบริสุทธิ์ต่อไปโดยใช้เทคนิคทาง ion-exchange chromatography โดยใช้เครื่อง FPLC และ Mono-Q column chromatography โดยใช้ lithium percholate เป็นบัฟเฟอร์เคลื่อนเพื่อได้ oligosaccharides ออกจาก column ทำให้ได้กราฟดังรูปที่ 2

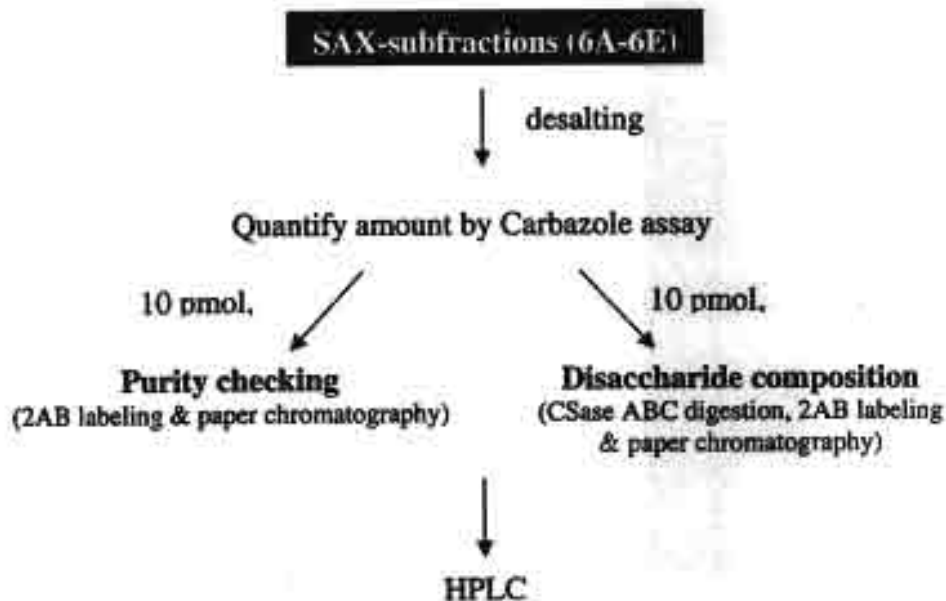


รูปที่ 2 แสดงคุณสมบัติของ oligosaccharides fraction 6 เมื่อแยกโดยการ
ใช้ Strong Anion Exchange Mono Q column chromatography
(FPLC system) (SAX)

จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อย่อยสายของ คอนดรอยติน ซัลเฟต ให้มีขนาด
เล็กลงเป็น oligosaccharides โดยการใช้เอนไซม์ chondroitinase ABC สามารถแยก
สาย oligosaccharides ที่มีขนาดต่าง ๆ กันได้โดยการใช้ BioGel P-6 column
chromatography และเมื่อนำเอาแต่ละส่วนที่แยกได้นี้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อ โดยการใช้
เทคนิคทาง ion-exchange FPLC chromatography ซึ่งทำให้ได้ oligosaccharides ที่
ยังคงทำปฏิกิริยาได้กับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ทำให้ทราบว่า โมโน
โคลนอล แอนติบอดี WF6 สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ chondroitin 6-sulfate
oligosaccharides ได้จริง และมีเอกลักษณ์ของ sulfatation pattern ของสาย
oligosaccharides ดังได้แสดงไว้ในรูปที่แยกได้โดย Mono-Q FPLC column
chromatography งานในขณะนี้คือส่งแต่ละ fraction ที่ให้ผลทำปฏิกิริยาได้กับ โมโน
โคลนอล แอนติบอดี ไปทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างและส่วนประกอบด้วย Mass
Spectrometry ที่ประเทศญี่ปุ่น

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และส่วนประกอบของ disaccharide จาก SAX-subfraction (6A-6E)

เพื่อทำการตรวจสอบถึงความบริสุทธิ์ของ oligosaccharide ที่แยกได้จาก Strong Anion Exchange chromatography (MonoQ) ซึ่งได้แก่ Fraction 6A-6E โดยวิธีการดังนี้

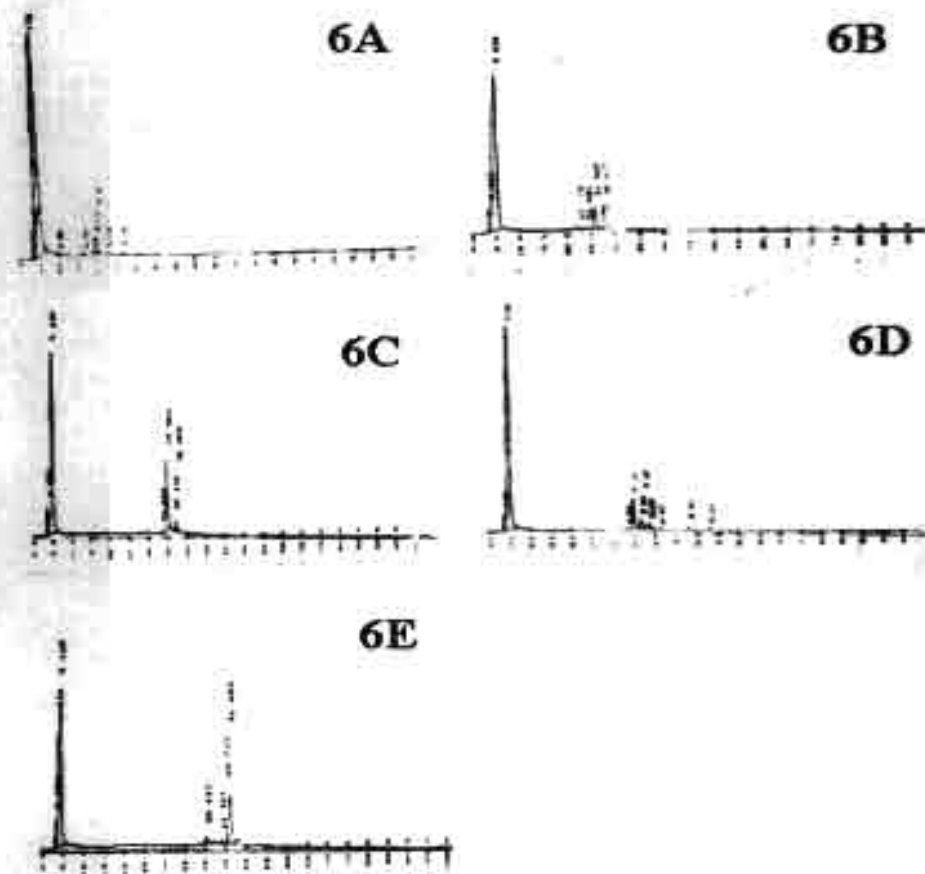


Chromatogram ของแต่ละ SAX-subfractions (6A-6E) แสดงดังรูปที่ 1 โดยสามารถ สรุป เป็น ปริมาณ, ความบริสุทธิ์ และ ชนิดของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 The amount, percent purity and disaccharide composition of SAX-subfractions

SAX Subfraction	Amount (nmol)	Purity (%) ^a	Disaccharides form (%molar ratio)
			Unsaturated
C6A	8.2	85.6	Δ Di-OS (12) + Δ Di-6S (78) + Δ Di-4S (10)
C6B	28.4	49.8	Δ Di-OS (1) + Δ Di-6S (82) + Δ Di-4S (17)
C6C	535.0	80.7	Δ Di-6S (88) + Δ Di-4S (12)
C6D	45.8	53.5	Δ Di-6S (80) + Δ Di-4S (19.3) + Δ Di-SD (1.4)
C6E	320.0	82.2	Δ Di-OS (2.6) + Δ Di-6S (55) + Δ Di-4S (26) + Δ Di-SD (17)

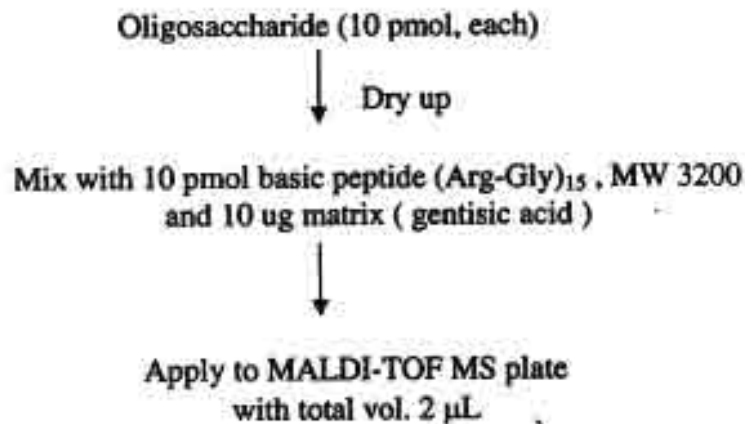
^a The percent purity was calculated based on the difference of the major and minor peak area on HPLC chromatogram.



รูปที่ 3 แสดง purity checking chromatogram ของ 6A-6E subfractions โดย วิธี 2AB-labeling และ HPLC analysis

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี MALDI-TOF MS ของ SAX-subfractions

เพื่อยืนยันถึงขนาดและจำนวนการเติม sulfate ของ oligosaccharide subfractions ได้ทำการวิเคราะห์โดยวิธีการ MALDI-TOF MS ดังแสดงวิธีการด้านล่าง

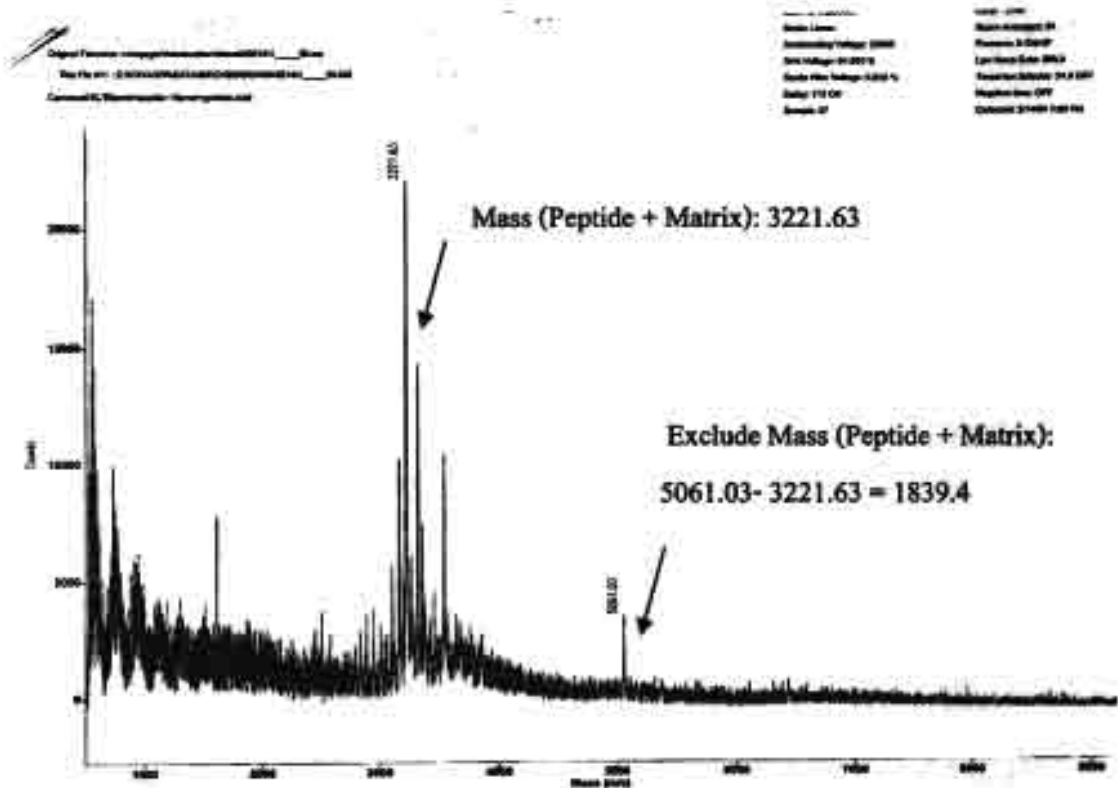


การวิเคราะห์โดย MALDI-TOF MS ของ SAX subfractions สรุปได้ดังตารางที่ 2 และ MALDI mass spectra ของ fraction 6C-6E แสดงในรูปที่ 4-6 (6A และ 6B ไม่มี chromatogram แสดงเนื่องจาก มีความเข้มข้นของตัวอย่างน้อย จึงทำให้ไม่มีสัญญาณ)

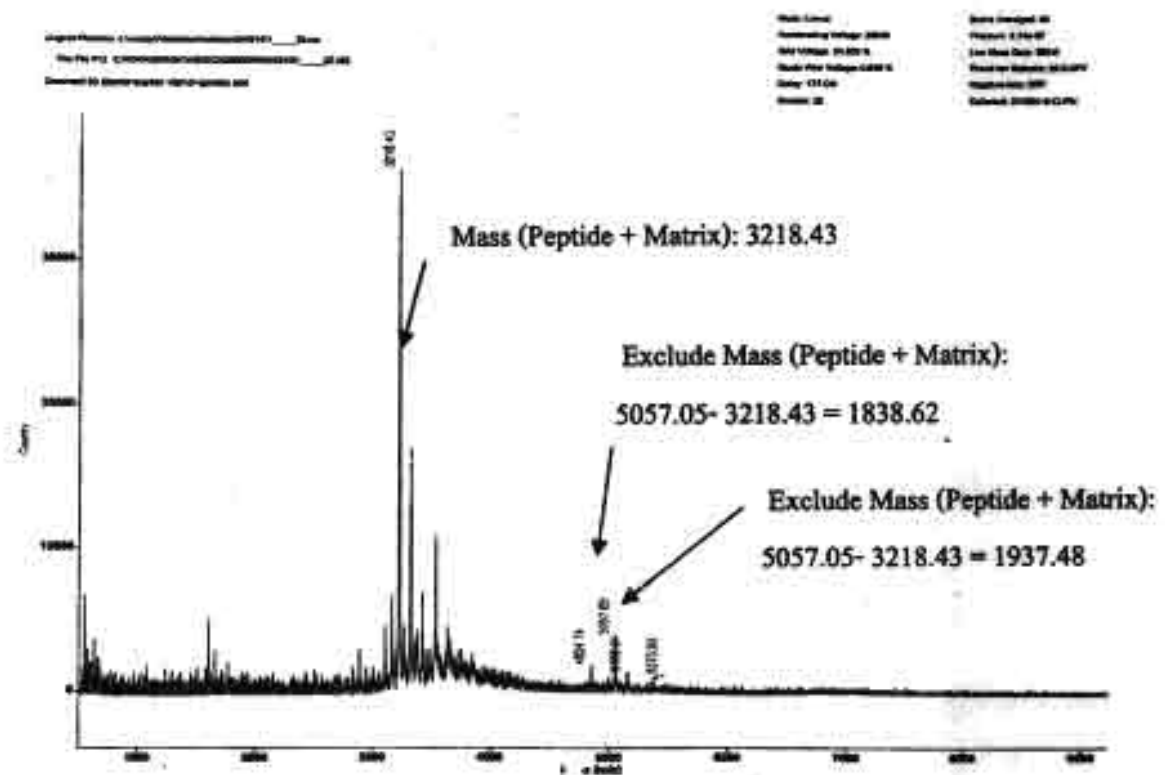
ตารางที่ 2 แสดงขนาดของสาย oligosaccharide ของแต่ละ fraction

SAX		
Subfraction	Found ^a	Assignment
C6A	no signal	-
C6B	no signal	-
C6C	1843.3	8-mer 4S
C6D	1842	8-mer 4S
	1942.2	8-mer 5S
C6E	1918.5	8-mer 5S
	2016.1	8-mer 6S

^a The masses of the components found, exclude the basic peptide mass



รูปที่ 4 แสดง MALDI mass spectrum ของ C6C



รูปที่ 5 แสดง MALDI mass spectrum ของ C6D

การแยกส่วนย่อย และการหาการเรียงตัวของหน่วยน้ำตาลของสาย oligosaccharide

จากผลการทดสอบ inhibitory activity ต่อ MAb WF6 พบว่า fraction 6C-CE ให้ผล positive ในการทดลองนี้ จึงทำการหาลำดับของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของ oligosaccharide fraction 6C-CE แต่เนื่องจากในแต่ละ fraction ยังไม่บริสุทธิ์มากพอ จึงต้องทำการ subfractionation ต่อ โดย PA-03 HPLC column เพื่อแยกเอา major component มาทำการหาลำดับ disaccharide ดังวิธีการด้านล่าง

SAX oligosaccharide fractions (6C-6E)

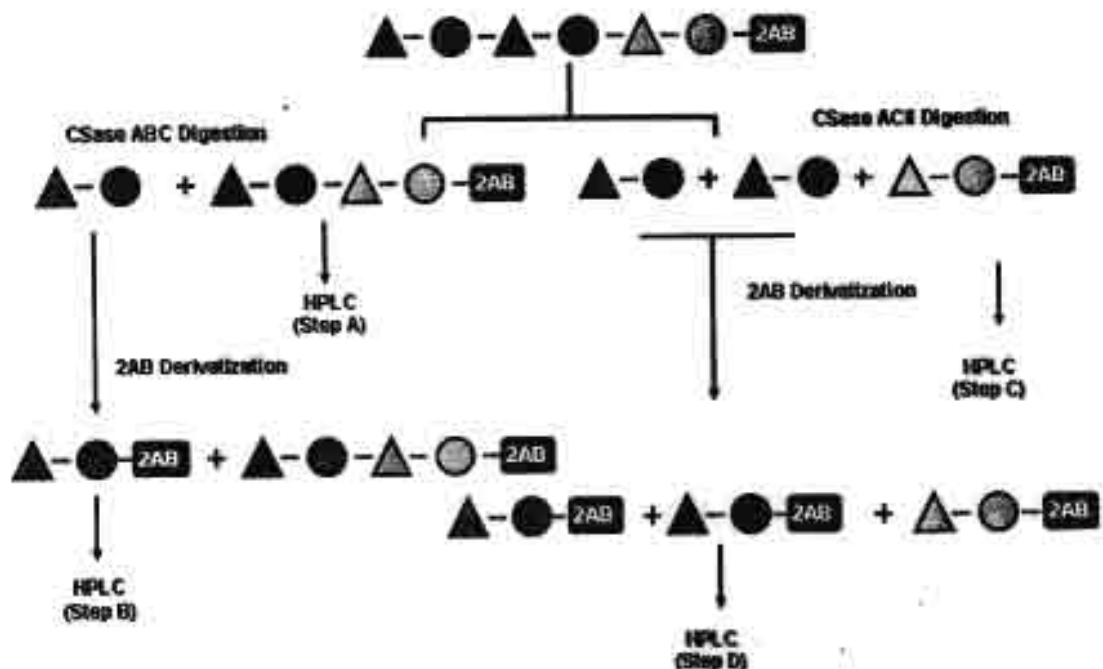
↓ Dry up

Subfractionation by PA-03 column

↓

Sequencing the major subfraction

วิธีการในการหาลำดับของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบของสาย oligosaccharide ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธี 2AB labeling and Enzymatic digestion ดังแผนภูมิแสดงด้านล่าง



วิธีการสังเขปเป็นดังนี้ ทำการติดฉลากสาย oligosaccharide ทางด้าน reducing terminal ด้วยสารเรืองแสง 2AB (2-aminobenzamide) ซึ่งสามารถติดตามได้ด้วย Fluorescence detector แล้วทำการย่อยสาย oligosaccharide ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากภายนอก (exoenzyme) ซึ่งได้แก่ chondroitinase ABC, chondroitinase ACI และ chondroitinase ACII และจาก activity ของ exoenzyme ดังกล่าวพบว่า Chondroitinase ABC จะสามารถย่อยสาย 2AB labeling oligosaccharide ทางด้านปลาย non-reducing end เข้ามาจนกระทั่งถึง tetrasaccharide-2AB เท่านั้น และจะไม่สามารถย่อยต่อได้อีก ส่วน chondroitinase ACI และ ACII นั้นสามารถที่จะย่อยจนได้ disaccharide-2AB เมื่อเราทำการติดฉลาก product ที่ได้จากปฏิกิริยา (disaccharide) และนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยฉีดผ่าน anion exchange PA-03 column เทียบกับ 2-AB disaccharide หรือ 2AB tetrasaccharide standard ก็จะทำให้เราทราบชนิดและสัดส่วน (molar ratio) และลำดับของ disaccharide ที่เป็นองค์ประกอบได้

Sequencing chromatograms ของแต่ละ major subfractions แสดงในรูปที่ 7 และตารางสรุปแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณ ความบริสุทธิ์ (%) และส่วนประกอบของ C6C, C6D and C6E subfractions

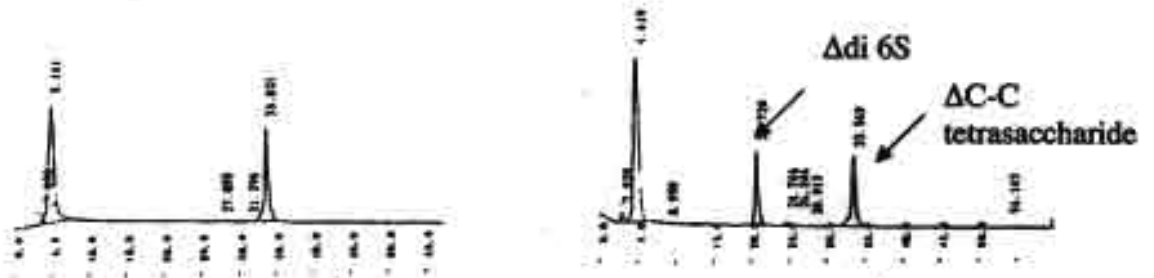
SAX	Amount	Disaccharides form (%molar ratio)		possible
Subfraction	(nmol)	Purity (%) ^a	Unsaturated	sequence
C6Cp3	43.8	95	ΔDi-6S (100)	ΔC-C-C-C
C6Dp1	7.0	100	ΔDi-6S (100)	ΔC-C-C-C
C6Ep2.1	9.4	100	ΔDi-6S (78)+ ΔDi-S ₀ (24)	Δ?-?-C-C
C6Ep2.2	6.5	41	ΔDi-6S (81)+ ΔDi-S ₀ (19)	
C6Ep5	10.0	58		
C6Ep6	11.8	100	ΔDi-6S (55)+ ΔDi-4S (26)+ΔDi-S ₀ (17)	ΔC-A-D-C

^a The percent purity was calculated based on the difference of the major and minor peak area on HPLC chromatogram

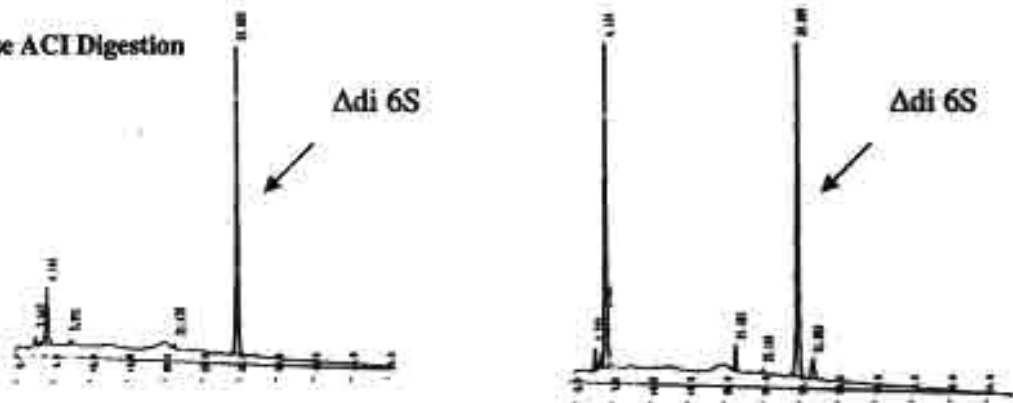
การหาการเรียงตัวของน้ำตาลในส่วนของ fraction C6Cp3

Chromatogram ด้านซ้ายแสดง product ที่ได้จากการย่อย 2AB labeling oligosaccharide และทางด้านขวามือแสดง chromatogram ที่ได้จากการคิดผลจาก 2AB ที่ได้จากซ้ายมือซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

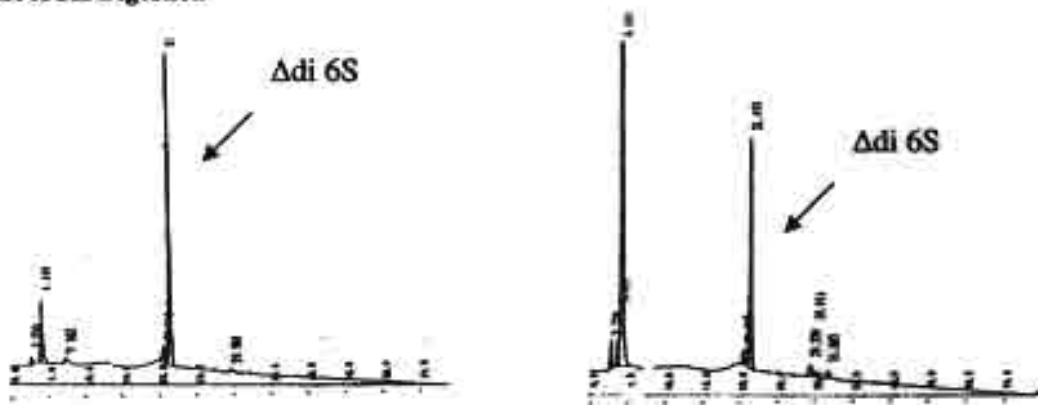
CSase ABC Digestion



CSase ACI Digestion



CSase ACII Digestion

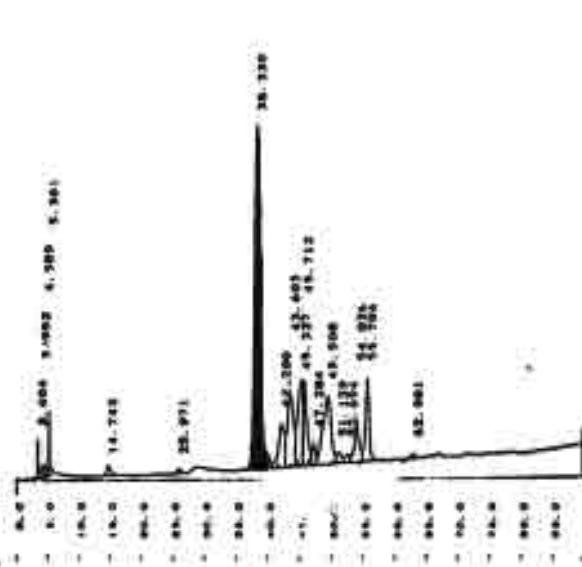


รูปที่ 10 การหาการเรียงตัวของ C6Cp3 โดยวิธี 2AB labeling และ enzymatic digestion

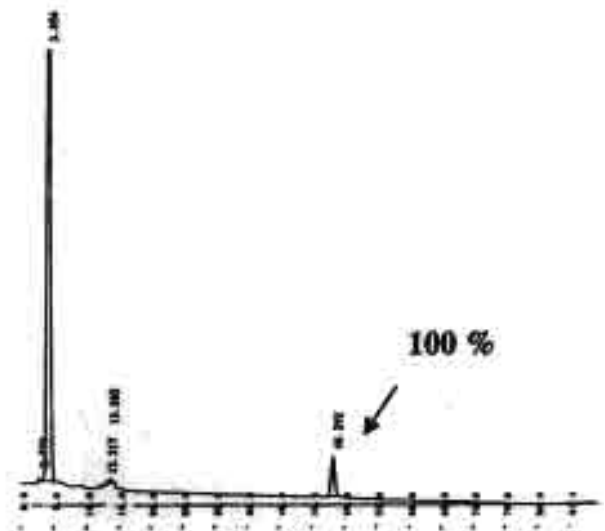
เมื่อทำการย่อย 2AB labeled C6Cp3 oligosaccharide ด้วย chondroitinase ABC และฉีดวิเคราะห์ ผ่าน PA-03 HPLC column พบว่ามี 2AB tetrasaccharide ทางด้าน reducing terminal เกิดขึ้นเพียง fraction เดียว และเมื่อทำการคิดผลอีกครั้งด้วย 2AB พบว่า disaccharide ที่เพิ่มขึ้นมาเป็นชนิด Δ di6S นอกจากนั้นผลของการวิเคราะห์ product ที่ได้จากการย่อยด้วย chondroitinase ACI และ ACII ก็พบเพียง disaccharide ชนิด Δ di6S เพียงชนิดเดียวที่เป็นองค์ประกอบ เมื่อนำมารวมกับ disaccharide composition จึงสามารถสรุป sequence ของ C6Cp3 oligosaccharide ได้ว่าเป็น Δ c-c-c-c

Subfractionation C6D fraction chromatogram ด้วย PA-03 HPLC column ได้ major subfractions ให้ชื่อว่า C6Dp1 subfraction

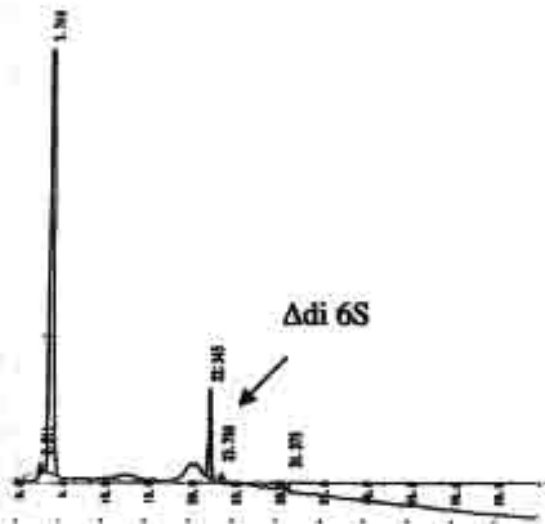
พบมีความบริสุทธิ์ถึง 100% และจาก disaccharide composition analysis พบมีเฉพาะ Δ di6S ชนิดเดียวที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งน่าจะเป็น fraction ที่มีองค์ประกอบเดียวกันกับ C6Cp3 ที่ทราบ sequence ก่อนหน้านี้แล้ว จึงได้ทำการพิสูจน์โดยการคิดผลจากสาย oligosaccharide C6Dp1 และ C6Cp3 ด้วย 2AB และฉีดผ่าน PA-03 column (Co-chromatography) ก็พบมี fraction ที่ปรากฏเพียงชนิดเดียว จึงสรุปได้ว่า C6Dp1 และ C6Cp3 นั้นเป็น fraction เดียวกัน และมี sequence เป็น Δ c-c-c-c



รูปที่ 11 C6D subfractionation ด้วย PA-03 HPLC



รูปที่ 12 Purity checking ของ C6Dp1



รูปที่ 13 Disaccharide composition ของ C6Dp1

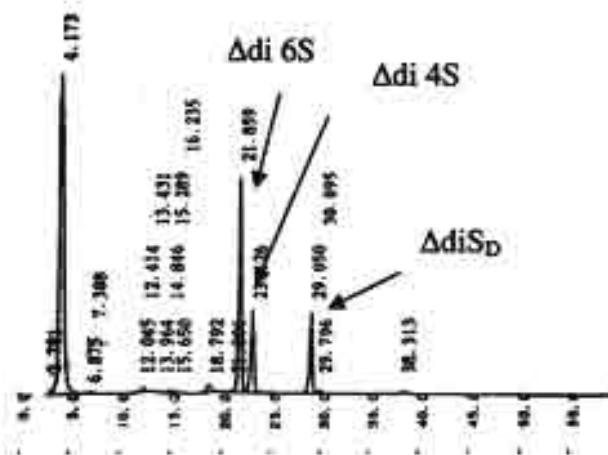


รูปที่ 14 C6Cp3 และ C6Dp1 Co-chromatography

การแยกส่วนย่อยของ C6E fraction chromatogram ด้วย PA-03 HPLC column ได้ major subfractions ให้ชื่อว่า C6Ep6 subfraction

พบมีความบริสุทธิ์ถึง 100% และจาก disaccharide composition analysis พบมี disaccharide เป็นองค์ประกอบอยู่สามชนิด คือ $\Delta di6S$: $\Delta di4S$: ΔdiS_0 ในอัตราส่วน 2:1:1

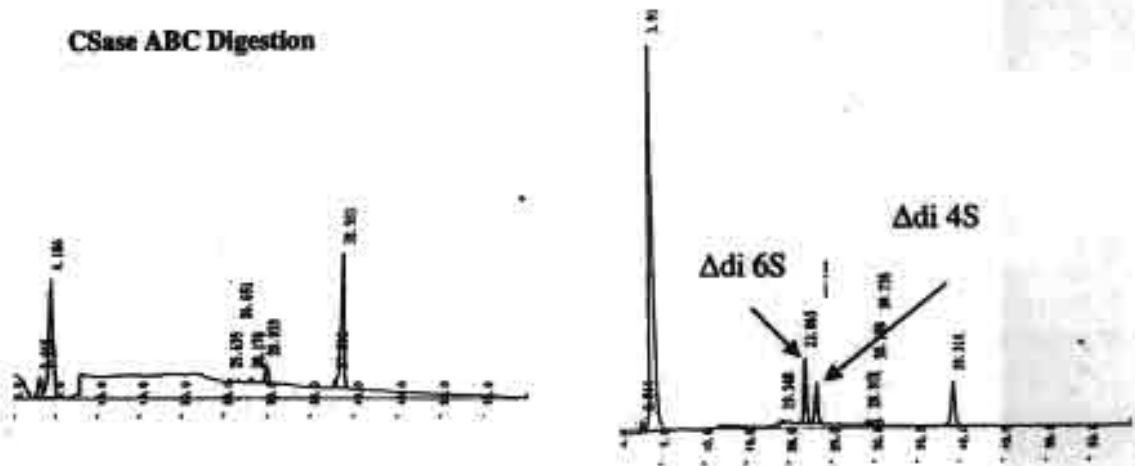
จากการย่อยด้วย 2AB ที่ติดฉลากกับ C6Ep3 ด้วย chondroitinase ABC และติดฉลากอีกครั้งด้วย 2AB พบ disaccharide ทางด้าน reducing end สองชนิดคือ $\Delta di6S$ และ $\Delta di4S$ และจากการย่อยด้วย chondroitinase ACII พบ disaccharide ที่ non-reducing end คือ $\Delta di6S$ จึงทำการหาชนิดของ tetrasaccharide ทางปลาย non-reducing ที่ได้จากการย่อยด้วย chondroitinase ABC ด้วยการ co-chromatography กับ $\Delta D-C$ tetrasaccharide standard พบว่า สารตัวอย่างและ tetrasaccharide standard ถูก elute ออกมาจาก column ที่ตำแหน่งเดียวกัน ทำให้ สามารถคาดเดา sequence ได้ว่าน่าจะเป็น $\Delta C-A-D-C$ นอกจากนั้นในรูปที่ ยังได้ทำการยืนยัน sequence โดยการ co-chromatography กับ $\Delta C-A-D-C$ oligosaccharide stand



รูปที่ 17 Disaccharide composition ของ C6Ep6

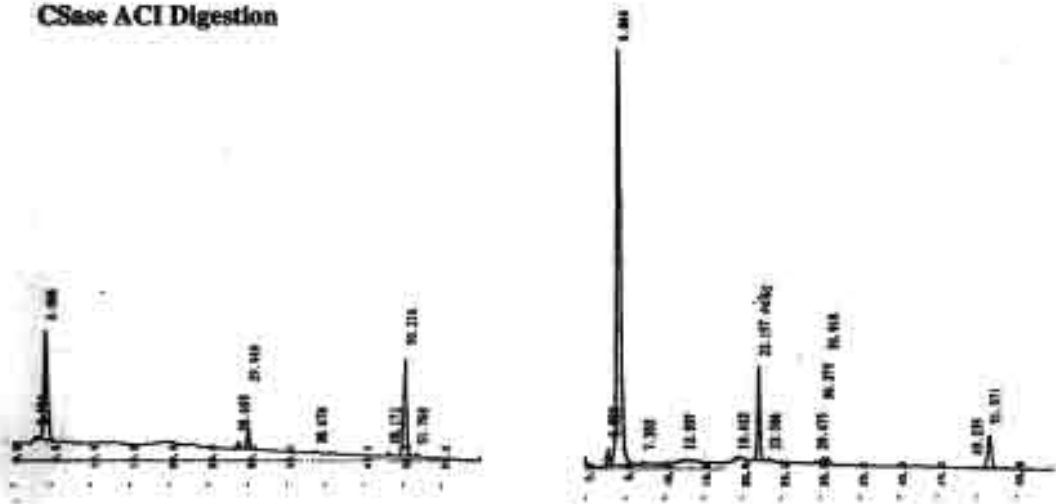
C6Ep6 sequencing

Chromatogram ด้านซ้ายแสดง product ที่ได้จากการย่อย 2AB labeling oligosaccharide และทางด้านขวามือแสดง chromatogram ที่ได้จากการติดฉลาก 2AB ที่ได้จากซ้ายมือซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

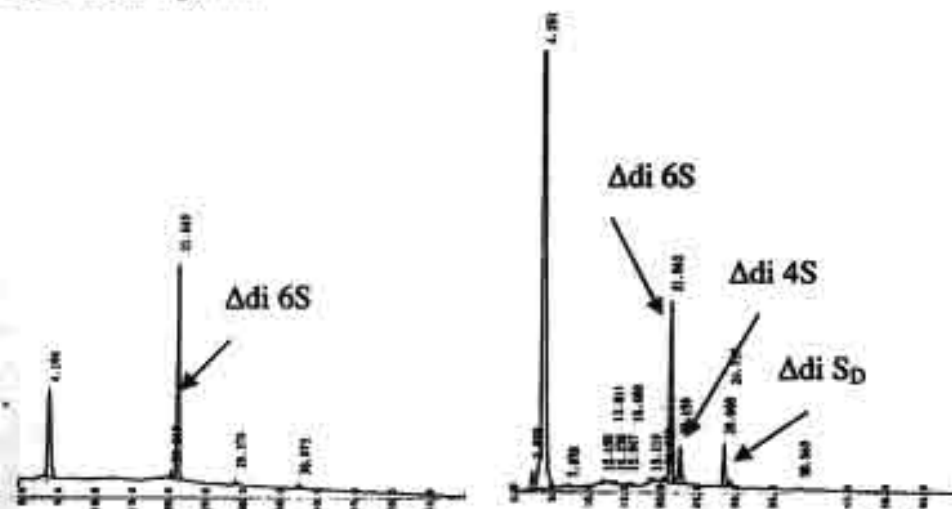


รูปที่ 18 C6Ep6 sequencing โดยวิธี 2AB labeling and enzymatic digestion

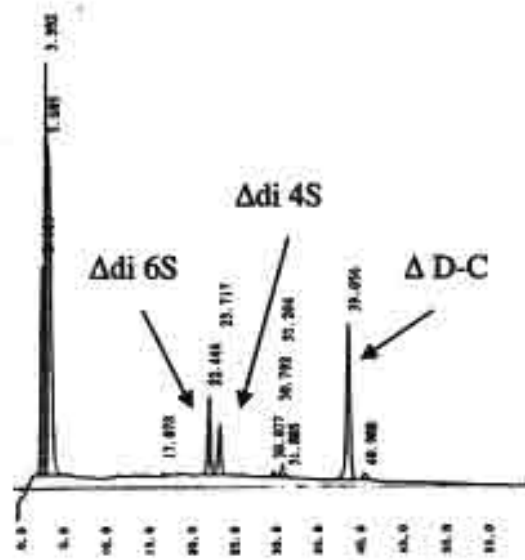
CSase ACI Digestion



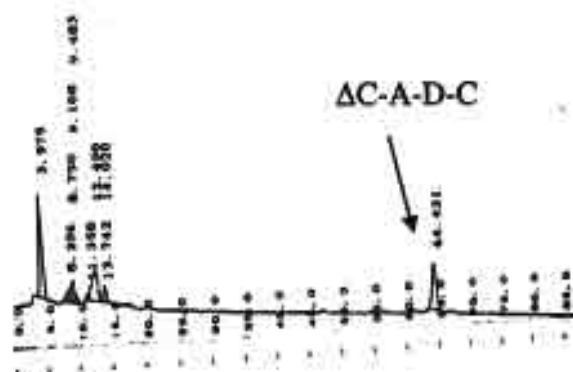
CSase ACII Digestion



รูปที่ 19 C6Ep6 sequencing โดยวิธี 2AB labeling และ enzymatic digestion



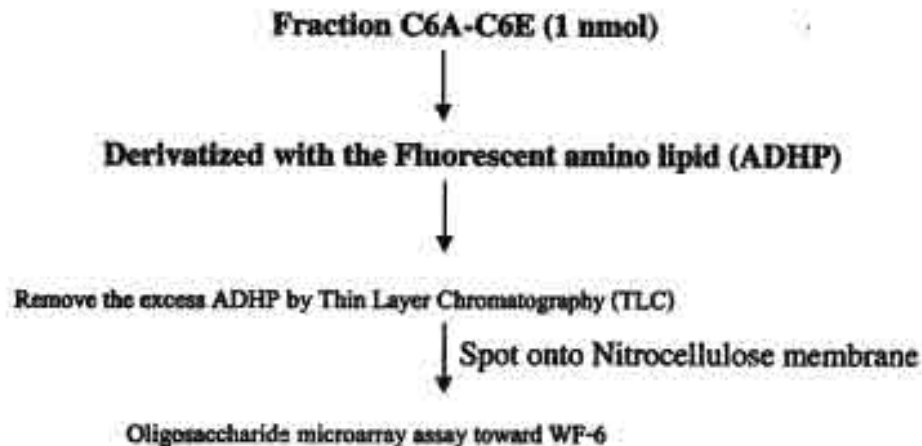
รูปที่ 20 co-chromatography ของ standard tetrasaccharide Δ D-C กับ
ChondroitinaseABC digested product ที่ label ข้าพวง 2AB



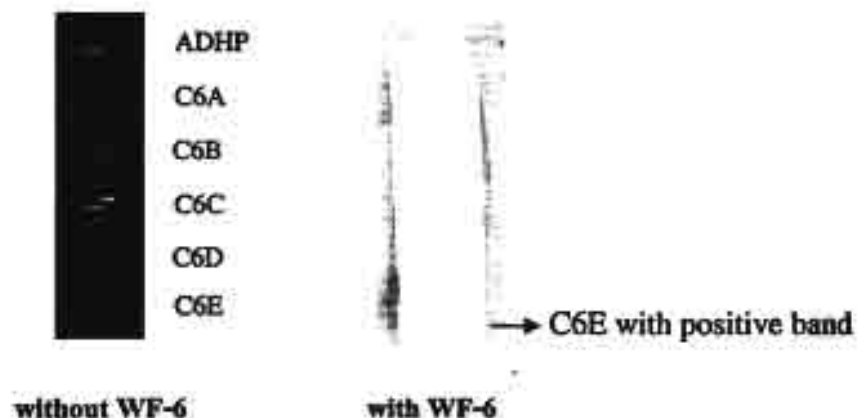
รูปที่ 21 Δ C-A-D-C standard co-chromatography กับ
C6Ep6 oligosaccharide

การทดสอบการทำปฏิกิริยาของ subfractions ที่แยกได้จาก strong anion exchange (SAX) chromatography กับ Mab WF6

จากการทำ Strong Anion Exchange chromatography (MonoQ) พบว่ามี 5 subfractions คือ fraction C6A-C6E ซึ่งได้นำมาทดสอบกับ mAb WF-6 โดยวิธี oligosaccharide microarray assay เพื่อทดสอบว่า fraction ใด ที่มี สายของ chondroitin sulfate ที่ เป็น epitope ของ WF-6



พบว่า มีเพียง fraction C6E เท่านั้นที่ แสดงผล positive กับ mAbWF-6 ในขณะที่ fraction อื่นๆ รวมทั้ง negative control คือ ADHP ไม่สามารถถูกจดจำได้โดย WF-6



รูปที่ 22 แสดงผลของการทำปฏิกิริยาของ oligosaccharide แต่ละ fraction กับ Mab WF6

โดยวิธี oligosaccharide microarray

ดังนั้น fraction C6E จึงน่าจะเป็น fraction ที่มีสาย chondroitin sulfate ที่ เป็น epitope ของ WF-6 C6E จึงถูกนำมาแยกบริสุทธิ์อีกที โดย anion-exchange chromatography (HPLC) ซึ่งพบว่า C6E นั้นประกอบไปด้วย 5 major subfractions

เพื่อที่จะทดสอบว่า subfraction ใดใน fraction C6E ที่มี epitope ของ WF-6 โดยได้ทำการ derivatized subfraction C6Ep2.1, p2.2, p4, p5 และ p6 ด้วย ADHP และทดสอบ reactivity กับ WF-6 โดยวิธี oligosaccharide microarray assay ซึ่งจากการทดสอบพบว่า ทุก subfraction สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ WF-6 ยกเว้น subfraction C6Ep6



รูปที่ 23 แสดงผลของการทำปฏิกิริยาของ oligosaccharide แต่ละ fraction กับ Mab WF6 โดยวิธี oligosaccharide microarray

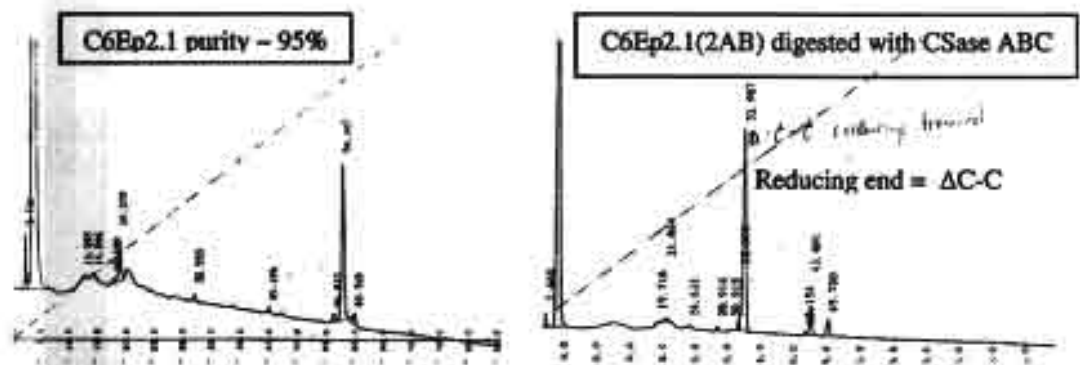
ดังนั้น จึงอาจจะสรุปได้ว่า epitope ของ WF-6 น่าจะมีมากกว่าหนึ่ง epitopes

การหาการเรียงตัวของหน่วยน้ำตาลของ C6E major subfraction

เพื่อที่จะหาลำดับการเรียงตัวของน้ำตาลในสาย chondroitin sulfate ทั้งที่เป็น epitope และไม่เป็น epitope ของ WF-6 ที่อยู่ใน fraction C6E

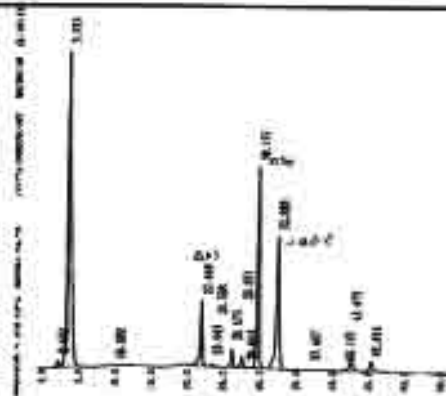
Sequencing ของ C6Ep2.1

จากการหารส่วนประกอบของ disaccharide นั้นพบว่า C6Ep2.1 สำหรับ พบว่าเป็นสายน้ำตาลที่มีขนาด octasaccharide ที่ประกอบไปด้วย Δ di6S 3 หน่วย และ Δ diS_D 1 หน่วย และมี % purity ประมาณ 95 % และพบว่า ทางด้าน reducing terminal นั้น ประกอบไปด้วย Δ di6S 3 หน่วย ดังนั้นจึงเหลือน้ำตาลเพียงตัวเดียวที่อยู่ทางด้าน non-reducing terminal คือ Δ diS_D จึงสรุปได้ว่า sequence ของ C6Ep2.1 คือ Δ D-C-C-C



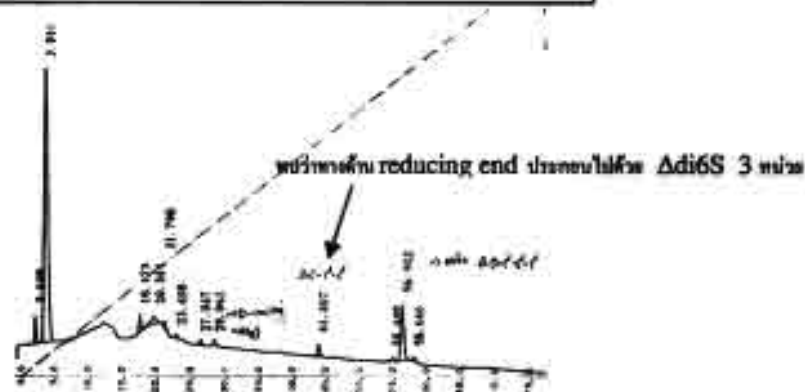
รูปที่ 24 แสดง chromatogram ของ C6Ep2.1

C6Ep2.1 (2AB) digested with CSase ABC $\rightarrow$ 2AB labeling



รูปที่ 25 Non-reducing end ประกอบไปด้วย Δ di6S และ Δ diS₆ อย่างละ 1 หน่วย
ในขณะที่ทางด้าน reducing end คือ tetrasaccharide ที่ประกอบด้วย Δ di6S 2
หน่วย

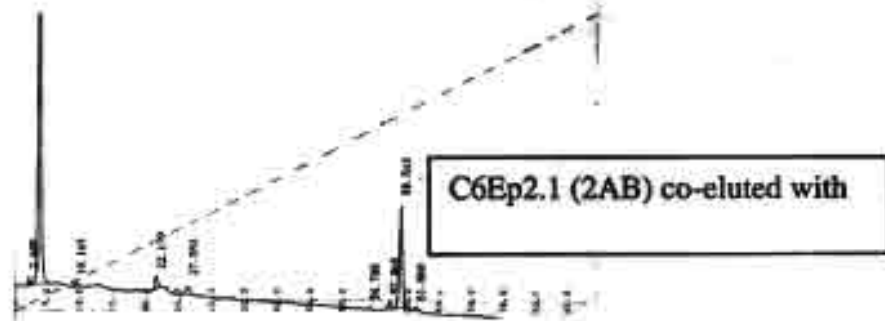
C6Ep2.1 (2AB) digested with CSase ABC (protease free)



รูปที่ 26 chromatogram แสดงว่าทางด้าน reducing end ประกอบด้วย Δ di6S 3 หน่วย

Sequencing ของ C6Ep2.2

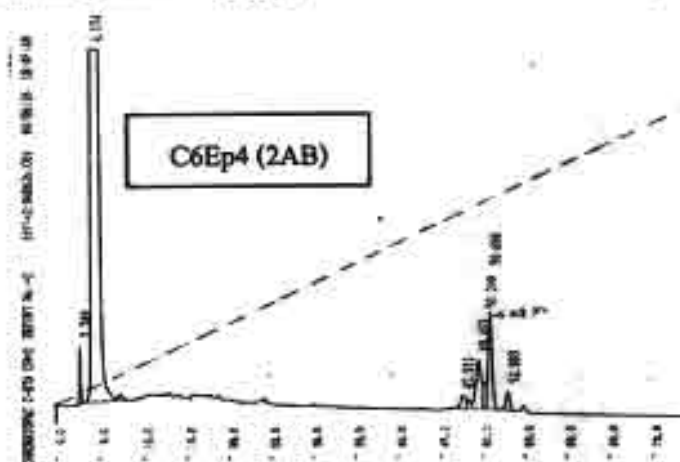
พบว่า C6Ep2.2 นั้นประกอบไปด้วย ΔdiS_3 3 หน่วย และ ΔdiS_1 1 หน่วย และเมื่อทำการ co-chromatographed C6Ep2.1 และ p2.2 ด้วยกันโดยใช้ HPLC แล้วพบว่า C6Ep2.1 นั้น co-eluted กับ C6Ep2.2 จึงสรุปได้ว่า C6Ep2.2 นั้นมี sequence ของน้ำตาลเหมือนกับ C6Ep2.1 คือ $\Delta D-C-C-C$



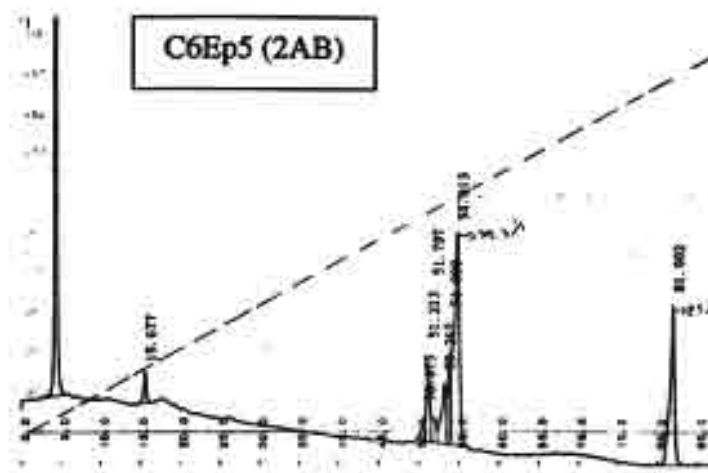
รูปที่ 27 แสดง chromatogram ของ C6Ep2.2 subfraction

Sequencing ของ fraction C6Ep4 และ 5

เนื่องจาก C6Ep4 และ p5 นั้นหลังจากที่ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และทำการคิดผลตก โดย ด้วย สาร fluorescent (2AB) และ จัด HPLC แล้วพบว่าทั้ง C6Ep4 และ C6Ep5 นั้นประกอบไปด้วย สาย chondroitin sulfate มากกว่า 1 สายและ พบว่า C6Ep4 นั้นมี % purity ประมาณ 42 % และ C6Ep5 นั้น 39.3 % ดังนั้น สาย chondroitin sulfate ที่อยู่ใน C6Ep4 และ p5 จะต้องถูกแยกบริสุทธิ์ โดยนำไปผ่าน anion-exchange chromatography โดย HPLC ก่อนทำการหา sequence



รูปที่ 28 การทดสอบความบริสุทธิ์ของ subfraction C6Ep4 โดย HPLC และ 2AB labeling



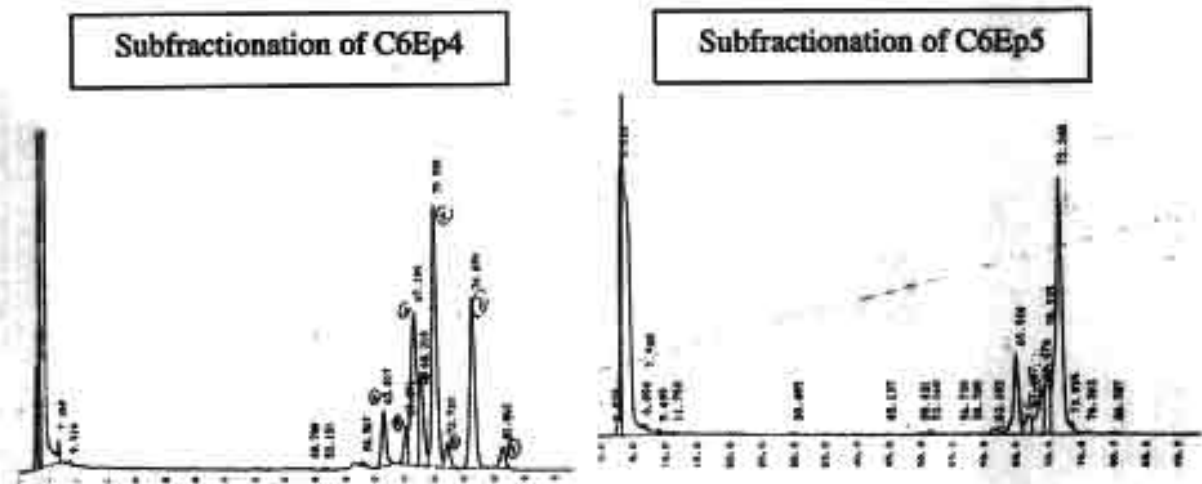
รูปที่ 29 การทดสอบความบริสุทธิ์ของ subfraction C6Ep5 โดย HPLC และ 2AB labeling

การแยกส่วนย่อยของ C6Ep4 และ C6Ep5 โดยการใช้การติดฉลากด้วย 2AB และ anion-exchange chromatography HPLC

C6Ep4 และ p5 ถูกนำมาติดฉลากด้วย สาร 2AB และ นำไปแยกบริสุทธิ์โดยใช้ anion-exchange chromatography (HPLC) โดยเพิ่ม gradient ของเกลือที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์อย่างช้าๆ ทำให้สาย chondroitin sulfate ที่อยู่ใน C6Ep4 และ p5 สามารถแยกออกจากกันได้ ซึ่งพบว่า C6Ep4 นั้นมี 8 subfractions และ C6Ep5 นั้นมี 6 subfractions จากนั้นทำการเก็บแยกแต่ละ subfraction

ย่อยเพื่อ

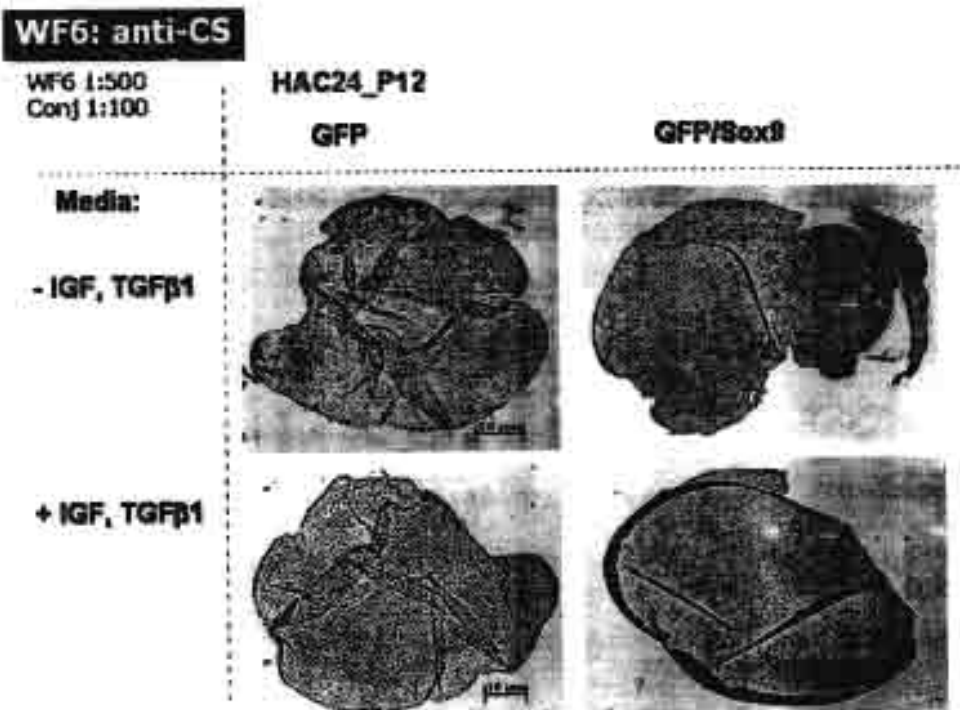
ที่จะนำไปหา sequence ต่อไป



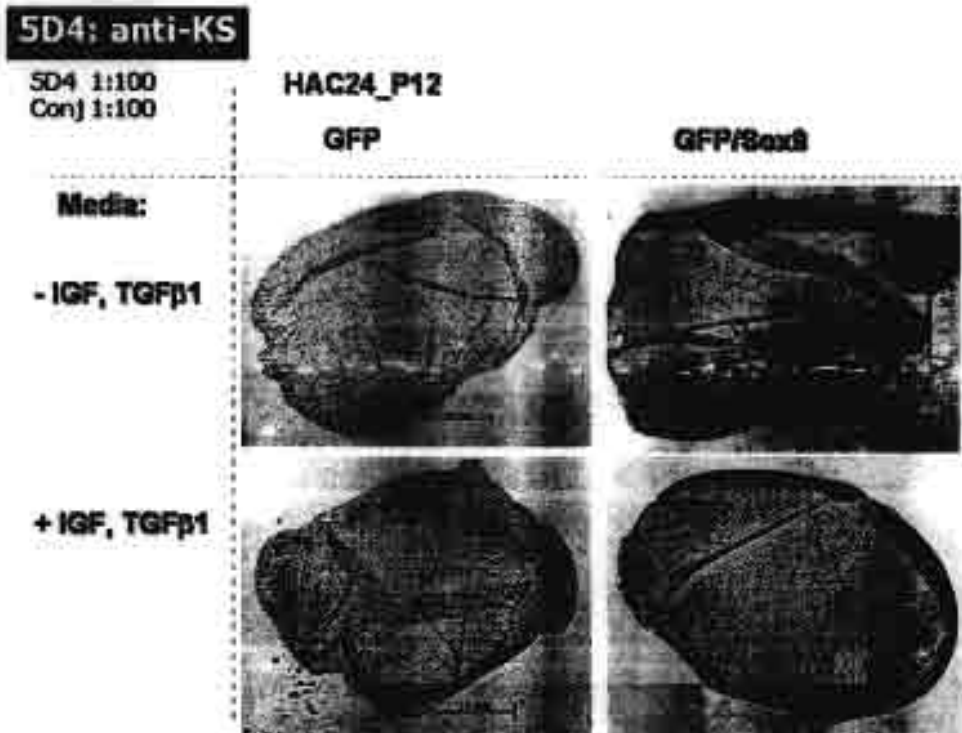
รูปที่ 30 แสดง chromatogram ของการแยก C6Ep4 และ C6Ep5

การนำ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 ไปศึกษาคุณสมบัติในการย้อม chondrocyte cell culture โดยกระตุ้นด้วย growth factor (IGF) และ transcription factor (SOX9)

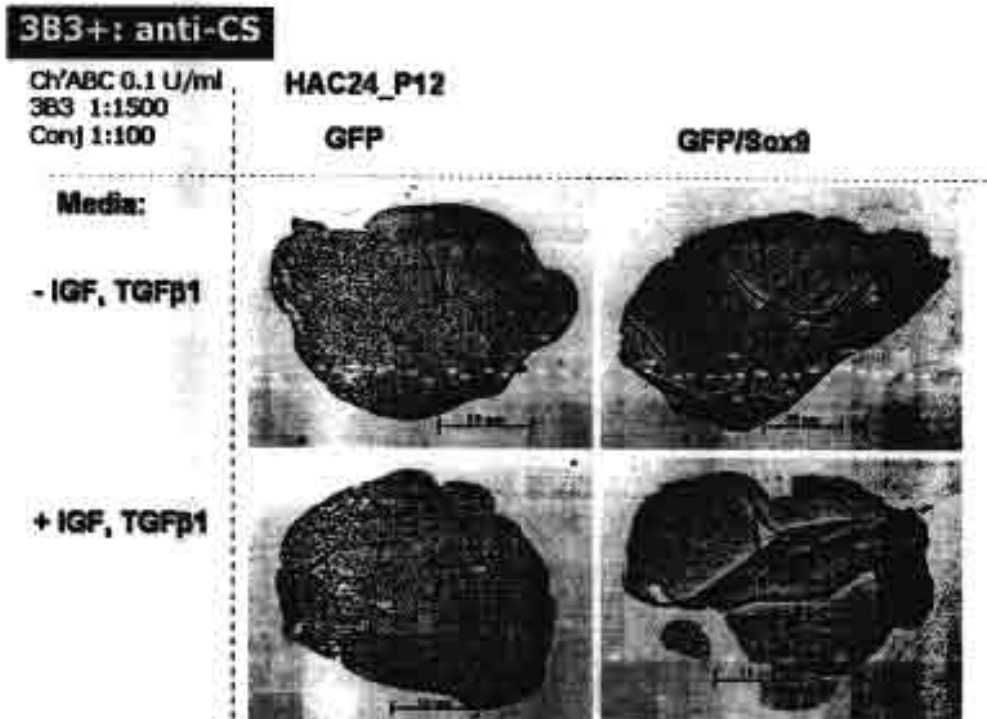
นำเซลล์ที่ได้จากห้องปฏิบัติการที่เลี้ยงเนื้อเยื่อมาผ่านขบวนการทาง histology staining เรียบร้อยแล้วมาทำการย้อมโดยใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6, 3B3 (CS-C ที่ย้อมด้วย chondroitinase ABC), 5D4 (keratan sulfate) ที่เจือจางอย่างเหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) เป็นตัวตรวจวัดหลังจากที่ทำการ fix เซลล์ติดสไลด์ จากนั้นล้างส่วนของ แอนติบอดีที่ไม่ติดด้วย บัฟเฟอร์ แล้วย้อมทับ peroxidase conjugated antibodies ส่วนของ conjugate ที่ไม่ทำปฏิกิริยา ออกด้วยบัฟเฟอร์ แล้วทำให้เกิดสีโดยการย้อมทับด้วย insoluble substrate หตุคปฏิกิริยาของ เอ็นไซม์ด้วยสารละลายกรด แล้วล้างสีส่วนเกินออก จากนั้น นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งให้ผล ดังรูปที่ 22



รูปที่ 31 แสดงรูปของ chondrocyte cells และ extracellular matrix ที่ย้อมด้วย โมโน โคลนอล แอนติบอดี WF6 โดยใช้เทคนิคทาง immunohistological staining



รูปที่ 32 แสดงรูปของ chondrocyte cells และ extracellular matrix ที่
ย้อมด้วย ไมโนโคลนอล แอนติบอดี 5D4 โดยใช้เทคนิคทาง
immunohistological staining



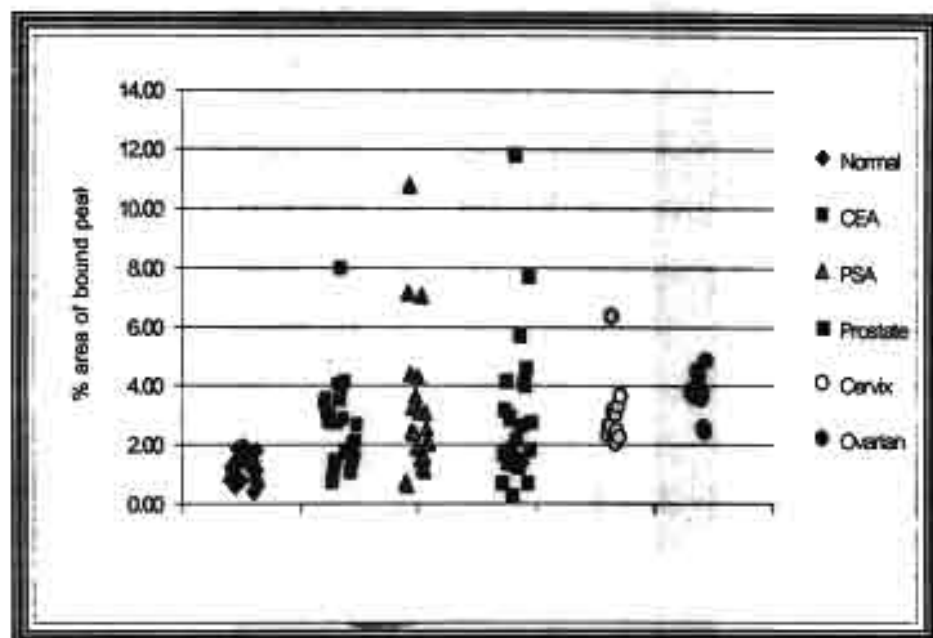
รูปที่ 33 แสดงรูปของ chondrocyte cells และ extracellular matrix ที่ย้อมด้วย
โมโนโคลนอล แอนติบอดี 5D4 โดยใช้เทคนิคทาง
immunohistological staining

จากการทดลอง พบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการ
ย้อมทาง immunohistochemical staining ได้ และแสดงให้เห็นว่าเป็น metabolic marker ของการ
เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในขบวนการเมแทบอลิซึมของ proteoglycans ของกระดูกอ่อนได้เป็นอย่างดี

การนำเอา โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณของสารชีวโมเลกุล เพื่อเป็นสารบ่งชี้โรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ

ได้มีการนำเอา โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 มาประยุกต์ใช้ โดยการพัฒนาโดยใช้เทคนิคทาง flow injection analysis หรือ FIA โดยความร่วมมือกับกลุ่มวิจัยของ รศ. ดร. เกตุ กรุดพันธ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ การศึกษาสามารถทำได้โดยการนำเอา โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 มาเชื่อมติดกับ Sepharose แล้วนำไปทำเป็น minicolumn จากนั้นก็นำไปพัฒนาเป็นระบบ FIA โดยสามารถฉีด ตัวอย่างที่เป็นซีรัมเข้าไป แล้ววิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟในส่วนของผู้ที่ยังติดอยู่กับ minicolumn หลังจากที่ได้ไล่ผ่านเอาส่วนที่ไม่จำเพาะออกไปแล้ว การตรวจวัดสามารถทำได้โดยใช้การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford's reagent

การทดลองสามารถได้ผลดังรูปที่ 34 ซึ่งพบว่าสามารถแยกผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งบางชนิดออกจากคนปกติได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 34 แสดงผลของการตรวจวิเคราะห์หาสารบ่งชี้โดยใช้
โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 และ Flow Injection Analysis
(FIA)

ผลงาน (Output) ที่ได้จากโครงการ

I. Submitted paper :

1. Pothacharoen, P., Teekachunhatean, S., Louthrenoo, W., Yingsung, W., Ong-chai, S., Hardingham, T.E., and Kongtawelert, P. Raised chondroitin sulphate epitopes and hyaluronan in serum of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. (Submitted to Osteoarthritis and Cartilage)
2. Pothacharoen, P., Ong-chai, S., Supaphun, J., Kumja, P., Wanaphirak, C., Sugahara, K., Hardingham, T.E., and Kongtawelert, P. Raised serum chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan levels as biomarkers in ovarian cancer. (Submitted to Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention)

II. Patents :

1. สิทธิบัตรประเทศไทยเลขที่ 091280 : ไมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับคอนดรอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ และคอนดรอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค
2. United Kingdom Patent Application, Date : August 18, 2004, Title : Antibody

III. Cell line deposition for patent at American Type Culture Collection (ATCC)

Description : Hybridoma cell line from Balb/c mouse fused with myeloma X63 Ag8.653:

WF6 assigned PTA-6157

Date of Deposit: August 11, 2004.

અવધાન

รายงานความก้าวหน้ารอบ 6 เดือนสุดท้าย

สัญญาเลขที่ BRG4680004

โครงการ “การวิเคราะห์อิทธิพล ของสายคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ซึ่งถูกจดจำโดย
โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 และการนำไปประยุกต์ใช้”
รายงานสรุปความก้าวหน้าของโครงการในรอบ 24 เดือน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2547 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2547

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : รองศาสตราจารย์ ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

หน่วยงาน : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
50200

1. การดำเนินงาน : ☒ ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ
☐ ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

1. การวิเคราะห์โครงสร้าง และการเรียงตัวของสาย oligosaccharides ที่จำด้วยแอนติบอดี WF6
2. ใช้การตรวจวัด WF6 epitopes ในซีรัมของกบปกติ และคนเป็นโรคข้อ และมะเร็ง
3. จัดทะเบียนสิทธิบัตรในประเทศไทย และประเทศอังกฤษ

2. สรุปผลการดำเนินงาน

ได้ดำเนินการทำการศึกษาวิจัยเป็นไปตามแผนการที่กำหนดไว้ ซึ่งในขณะนี้ ได้ยื่นจัดทำ
สิทธิบัตรภาษาไทย เพื่อขอรับการจดสิทธิบัตรภายในประเทศเป็นที่เรียบร้อยแล้ว โดยได้
หมายเลขสิทธิบัตรเป็น 091280 นอกจากนั้นได้ทำการยื่นฝากเซลด์ ไว้กับ American Type
Culture Collection (ATCC) โดยมีหมายเลขที่ฝากเป็น PTA-6157 ในส่วนของการจดสิทธิบัตร
ในต่างประเทศ ในขณะนี้ได้ทำการยื่นจดสิทธิบัตรที่ประเทศอังกฤษเป็นที่เรียบร้อยแล้วดังเอกสาร
ที่แนบมาด้วย แต่ยังไม่ได้รับหมายเลข ในส่วนของผลงานที่เป็นลักษณะของ published papers
นั้นขณะนี้ได้ทำการส่งออกไปตีพิมพ์อยู่จำนวน 2 เรื่อง (ดังเอกสารแนบ) และมีการศึกษาการ
เป็นไปปฏิกิริยาการพัฒนาเพื่อเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่อไปในอนาคตโดยได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติม
จาก สำนักงานคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติ (วช.)

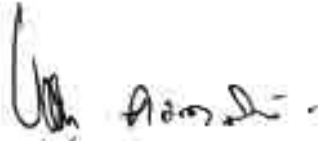
3. ท่านได้พบอุปสรรคในการดำเนินงานหรือไม่ ถ้าพบกรุณาระบุว่ามีอะไรบ้าง และได้แก้ไขอย่างไรบ้าง ?

ไม่มี

4. ข้อคิดเห็นและข้อเสนออื่น ๆ ต่อ สกว.

ได้แนบ manuscripts ที่ส่งไปตีพิมพ์ (Osteoarthritis and Cartilage, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention) และต้นฉบับฉีกฉบับที่จัดทำในประเทศไทย และอังกฤษมากับรายงานชุดนี้ด้วยแล้ว เพื่อเป็นหลักฐานไว้ที่ สกว.

ลงนาม



(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่ 31 สิงหาคม 2547

Manuscript I :

Pothacharoen, P., Teekachunhatean, S., Louthrenoo, W., Yingsung, W., Ongchai, S., Hardingham, T.E., and Kongtawelert, P. Raised chondroitin sulphate epitopes and hyaluronan in serum of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. (Submitted to Osteoarthritis and Cartilage)

Raised chondroitin sulphate epitopes and hyaluronan in serum
of rheumatoid arthritis and osteoarthritis

¹Pothacharoen P, ²Teekachunhatean S, ³Louthrenoo W, ¹Yingsung W,
¹Ong-chai S, ⁴Hardingham T, and ¹Kongtawelert P.

¹Department of Biochemistry, ²Department of Pharmacology and
³Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai
University, Chiang Mai, Thailand; and ⁴UK Centre for Tissue
Engineering, University of Manchester and Liverpool office, School of
Biological Sciences, University of Manchester 2.205 Stopford Building,
Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK.

Correspondence : Kongtawelert, P. Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Chiang Mai, Thailand 50200
email: pkongtaw@mail.med.cmu.ac.th

Summary

Objective: This study assays were developed for a native chondroitin sulphate epitope, WF6 and an unsaturated chondroitin sulphate epitope, 3B3(+) and hyaluronan (HA) in human serum samples. These were applied to the analysis of serum from rheumatoid arthritic and osteoarthritis patients and healthy controls in order to evaluate their potential as biomarkers for joint diseases.

Methods: Human serum samples were obtained from age matched normal, RA and OA patients. A competitive immunoassay with the monoclonal antibody 3B3 was developed to analyse human serum after digestion with chondroitinase ABC to detect 3B3(+) epitope. Human serum samples were diluted and assayed by a competitive immunoassay with monoclonal antibody WF6 that recognises native epitopes in chondroitin sulphate chains. Serum HA was also determined using an ELISA based assay using biotinylated hyaluronan binding proteins.

Results: Assay conditions for human serum samples were developed for chondroitin sulphate epitopes using monoclonal antibody 3B3 and WF6 and for HA using HA binding proteins (HABPs). The analysis of serum showed that the concentration of HA was increased in many RA patients, but not in OA patients in agreement with previous studies. The mean level of 3B3(+) epitope was very high in RA serum, but it was also well above normal in OA serum. WF6 epitope also showed the increases in serum of patients with joint diseases. It was most increased in OA serum and less increased in RA serum.

Conclusion: The serum concentrations of HA, native chondroitin sulphate epitope WF6 and unsaturated chondroitin sulphate epitope 3B3(+) showed a different pattern in OA and RA in comparison with normal. The assay of 3B3(+) epitope appeared

more sensitive than HA in showing elevated levels in RA and it also showed a significant increase in OA. The WF6 epitope was more increased in OA compared with RA. The concentration of serum HA, 3B3(+) and WF6 varied independently in the patient samples. A combination of these serum glycosaminoglycan assays may provide useful tests for diagnosis and monitoring in joint diseases.

Key words: Chondroitin sulphate epitopes, Hyaluronan, Osteoarthritis, Rheumatoid arthritis

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease of diarthrodial joints that may involve bone remodelling, osteophyte formation and frequently leads to cartilage loss¹. The diagnosis is generally based upon clinical and radiographic changes that occur in the later stages of the disease. There is considerable interest in identifying better criteria for diagnosis and methods for monitoring disease activity and progression as such methods would not only enable earlier diagnosis, but would be important tools in the development of better treatments². Measurement of the release of cartilage macromolecules into synovial fluid of OA joints have been investigated to follow the process of cartilage damage and destruction³. However, the abundance of components, such as aggrecan, in synovial fluid progressively decreased with cartilage loss and was not distinctive of OA. Studies of experimental canine OA cartilage revealed that early in disease there were distinctive changes in the chondroitin sulphate (CS) chains of cartilage proteoglycans with changed patterns of sulphation that could be detected with antibodies to native CS epitopes long before there was any cartilage destruction². Changes in the sulphation of chondroitin sulphate were also reported in the proteoglycan fragments found in human OA synovial fluid. There is therefore some potential in measuring cartilage metabolites such as a native chondroitin sulphate epitopes in synovial fluid of patients with arthritis³⁻⁵. However, there is limited access to synovial fluid and if characteristic changes were identified in serum they would have much wider application.

In the present study we have established assays for the investigation of chondroitin sulphate epitopes in serum samples of patients with joint disease. A novel monoclonal antibody (WF6), which recognises a native epitope in chondroitin

Materials and methods

CLINICAL SAMPLES

All subjects gave their informed consent before participation.

Joint diseases subjects. Serum samples were from individuals (Table 1), who has been previously diagnosed with OA and RA according to Rheumatology criteria; suffering from unilateral or bilateral knee pathology according to criteria of the American Collage of Rheumatology¹¹.

Healthy subjects. Serum samples were collected from 20 apparently healthy individuals, age 41-75 years. All subjects were checked to be free from diseases of the joints, bones, liver, endocrine system, or other chronic disorders. None was currently taking any medication known to modify arthritic diseases or influence joint metabolism.

Serum were stored at -20°C before examine.

TREATMENT OF HUMAN SERUM SAMPLES

Prior to competitive immunoassay with monoclonal antibody 3B3, the samples were digested with chondroitinase ABC [equal volume of 0.1 U/ml (of chondroitinase ABC buffer: 0.1 M sodium acetate, Tris-HCl, pH 7.3)], incubated at 37°C for 16 h (overnight) followed by heating at 100°C for 10 min. The digested samples were centrifuged in microfuge for 10 min and the supernatants were collected and kept frozen until they were analysed.

A COMPETITIVE IMMUNOASSAY TECHNIQUE USING MONOCLONAL ANTIBODY 3B3

A quantitative ELISA was modified from an assay in synovial fluid¹² for the epitopes recognized by monoclonal antibody 3B3. The standard used was porcine aggrecan core protein (chondroitinase ABC-digested porcine laryngeal cartilage aggrecan²) at various concentrations (4 – 2,000 ng/ml) in TE buffer (0.1M Tris HCl, pH 7.4, containing 0.15M sodium chloride, 0.1% Tween 20 and 0.1 % BSA) and supernatants from chondroitinase ABC-digested human serum samples were added to 1.5 ml plastic tubes containing an equal volume of monoclonal antibody 3B3 from ascetic fluid diluted (1:10,000 in TE buffer). Samples in triplicate were incubated at 37 °C for 1 h, added to a microplate coated with porcine aggrecan core protein and blocked with 1%BSA and incubated at 37 °C for a further 1 h. The wells were washed and peroxidase-conjugated anti-mouse IgM antibody was added (100 µl/well of 1:1,000 dilution in TE buffer) and incubated at 37 °C for further 1 h. The bound conjugate was detected by adding *o*-PD (*o*-phenylene diamine) substrate (100 µl/well in 0.05 M citrate buffer, pH 5.0). The reaction was stopped with 50 µl/well of 4M sulfuric acid and the absorbance was determined using a microplate reader at 492/690nm. The amount of 3B3(+) epitope in supernatant samples was calculated by reference to the standard curve.

A COMPETITIVE IMMUNOASSAY TECHNIQUE USING MONOCLONAL ANTIBODY WF6

A quantitative ELISA was modified from a previous study for the epitopes recognized by monoclonal antibody WF6. The standard used was shark cartilage aggrecan (A₁D₁ fraction) at concentrations (19-10,000 ng/ml) in 6% BSA in TE

buffer. Diluted human serum samples (1:5 in 6% BSA-TE buffer) were added to 1.5 ml plastic tubes containing an equal volume of monoclonal antibody WF6 (cell supernatant, 1:200 dilution in TE buffer). The plates were incubated at 37 °C for 1 h, and the wells were then washed and peroxidase-conjugated anti-mouse IgM antibody (1:2,000) was added (100 µl/well; in TE buffer). The plate was incubated at 37 °C for another 1 h. The detection of bound conjugate with *o*-PD substrate and plate reading were carried out as described above. The amount of a WF6 epitope in samples was calculated from the standard curve.

AN ELISA BASED ASSAY FOR HYALURONAN USING BIOTINYLATED HA-BINDING PROTEINS

Human serum samples, or standard HA (Healon[®]) at various concentrations (19-10,000 ng/ml in 6% BSA-PBS pH 7.4), were added to 1.5 ml plastic tubes containing an optimal dilution of biotinylated HA-binding proteins. The tubes were incubated at room temperature for 1 h. and then samples (100 µl) were added to the microplate, which was precoated with umbilical cord HA (100 µl/well of 10 µg/ml) and blocked with 1% BSA (150 µl/well) and the plate was incubated at room temperature for 1 h. The wells were then washed and peroxidase-conjugated anti-biotin antibody (1:2,000 dilution, 100 µl/well in PBS) was added. The plate was incubated at room temperature for a further 1 h. The detection of bound conjugate with *o*-PD substrate and plate reading was carried out as described above. The amount of hyaluronan in samples was calculated from the standard curve.

STATISICAL ANALYSIS

Quantitation was achieved by reference to a standard curve, using the DeltaSoft II software. The concentration of serum components in the samples were

determined by using the absorbance values falling between 40-50% inhibition of the standard curve. The ELISA data were analyzed using Student's unpaired *t*-test. In all cases, *p* values less than 0.05 were considered significant. All results compared are from assays performed at the same time and carried out at least in triplicate.

Results

ELISAs were optimized to quantify the epitopes recognized by the monoclonal antibodies 3B3 (+) and WF6 in human serum. It was able to determine the epitope concentration in a small volume of serum sample (175 μ l) by using these assays.

The treatment of the human serum samples by chondroitinase ABC digestion was initially optimised in order to give maximum detection of the epitopes recognized by the monoclonal antibody 3B3 in the competitive immunoassay (results not shown). The optimal concentration of chondroitinase ABC (0.05 U/ml) showed high recovery of added standard. Using this digestion method it was found that the intra- and inter-assay variation were 8 % and 10 %, respectively. From the standard curve it was found that the sensitivity of the assay was in the range 10-500 ng/ml of porcine aggrecan core protein which was generated by chondroitinase ABC digestion. The detection of epitope in the assay was 92.3 % of the expected amount, when a known amount of this standard was added to a pooled human serum sample.

The competitive ELISA with monoclonal antibody WF6 was tested with CS-C (predominantly chondroitin 6-sulphate) and CS-D (predominantly chondroitin 2,6 disulphate), which 50 % inhibition with 100 μ g/ml and 1.10 μ g/ml, respectively. Other GAGs, CS-A (mainly chondroitin 4-sulphate), CS-E (mainly chondroitin 4,6-disulphate), CS-B (dermatan sulphate), hyaluronan (HA) and keratan sulphate (KS) showed no significant inhibitory activity. The WF6 ELISA was also tested with aggrecan-related CS-PG including shark cartilage A₁D₁ fraction (shark-A₁D₁) and porcine cartilage aggrecan core protein (chondroitinase ABC digested porcine laryngeal cartilage aggrecan). Shark- A₁D₁ gave 50 % inhibition at 60 ng/ml. In contrast porcine aggrecan core protein gave no significant inhibition. The result

showed that antibody WF6 reacted with intact chondroitin sulphate proteoglycan (shark- A₁D₁) much more strongly (~200fold) than with free chondroitin sulphate chains (CS-C).

Monoclonal antibody (WF6) recognizes an epitope present in native chondroitin sulphate chains. It was used to determine this epitope in human serum with shark aggrecan (A₁D₁ fraction) as standard. A simple assay was developed by incubating at 37°C instead of two steps of incubation at 4°C and 37°C. In order to remove non-specific binding, that gave a high false positive reaction in undiluted human serum it was found necessary to dilute the human serum samples five folds with 6% BSA (in TE buffer). The intra- and inter-assay was found to be 8 % and 15 %, respectively. The recovery of epitope was 104 % when a known amount of standard was added.

The assays developed using these two monoclonal antibodies [3B3(+) and WF6] were used to investigate chondroitin sulphate epitopes in OA, RA and normal serum (Table 2). Analysis of 3B3(+) epitope (Figure 2) showed that serum levels were significantly higher in OA (80 ± 38 ng/ml) and RA (164 ± 135 ng/ml) than in normal serum (14.41 ± 14.15 ng/ml) (both $p = 0.001$). Analysis of WF6 epitope (Figure 3) showed that it was significantly higher in OA (2.73 ± 2.63 µg/ml) than in normal serum (1.18 ± 0.81 µg/ml) ($p = 0.012$), and it was also significantly higher in RA serum (2.29 ± 1.70 µg/ml) ($p = 0.006$).

To determine whether the changes in level of the two CS epitopes were correlated with each other, the concentration of the 3B3 (+) and WF6 epitopes were compared in the individual serum samples. There was, however, very little correlation (data not shown), suggesting that the levels of these CS epitopes varied independently of each other.

A simple assay for determining HA in human serum was developed using biotinylated HA-binding proteins. This method showed a high correlation coefficient ($r = 0.8$) with the commercially available kit for HA (Pharmacia Radioassay Kit). Using this ELISA based assay for quantitation of HA in human serum (Figure 4) it was found that in the RA serum the mean HA concentration was significantly higher than normal ($p = 0.003$), but there was no significant increase of HA in OA serum samples ($p = 0.720$).

Discussion

The assay developed with 3B3 monoclonal antibody was applied to human serum samples that were digested with chondroitinase ABC. This digested chondroitin sulphate chains and creates unsaturated terminal structures, as it is an exoglycosidase enzyme. If these terminal structures are sulphated they are detected by monoclonal antibody 3B3². However as 3B3 is an IgM, it is most reactive to polyvalent antigens. If the epitopes are on single chondroitin sulphate chains or oligosaccharides, or on larger, but monovalent antigens, they are poorly competitive in the assay¹³. However, if they are present on chondroitin sulphate proteoglycan fragments with several chains attached and they form polyvalent antigens with many epitopes, they are strongly competitive in the assay. The 3B3 antibody also reacts with the corresponding saturated terminal structure (without chondroitinase ABC digestion), but this epitope is present infrequently in native chondroitin sulphate chains¹⁴ and chondroitinase ABC digestion increased the detectible epitope by 20-100 fold in serum samples analysed in this study. The assay of the epitope, with and without chondroitinase ABC digestion, are distinguished by denoting them 3B3(+) and 3B3(-), respectively^{2,6}. The assay of 3B3 (+) epitope after digestion with chondroitinase ABC is therefore a measure of all chondroitin sulphate-proteoglycans in serum that contain 6-sulphated structures, but with a bias to polyvalent structures. The assay may reflect the clearance from many tissues of chondroitin sulphate proteoglycans into the circulation. However, as aggrecan degradation products may be present and are likely to be polyvalent, the detection with 3B3(+) may selectively provide a measure of catabolism in cartilaginous tissues, such as in the joint. The circulating level will be a balance of several factors; their release from the tissues, their uptake within the

lymphatics and their removal from serum by the liver once they have entered the circulation.

The analysis of HA in serum of patients with joint diseases has shown increases particularly in those with RA⁷⁻⁹ and in patients with knee OA a higher value at onset was predictive of a more rapid progression¹⁰. In this study many RA patients had high serum HA, but few OA patients. These results are thus compatible with previous results amongst clinically defined patient groups. The higher levels in RA may reflect the systemic inflammatory component of rheumatoid arthritis, which causes increased mobilisation of tissue HA and which is largely absent from osteoarthritis. There was considerable variation in serum HA amongst the RA patients, which may reflect the extent of the disease in different patients, or the degree of disease activity¹⁵ and inflammation at the time the blood was sampled. The results with the newly developed assay for serum hyaluronan were thus in agreement with previous results⁹, which suggested that serum HA provides a measure of the inflammatory component of joint diseases.

In view of the results with serum HA, it is interesting to compare them with the results with the chondroitin sulphate epitopes. The 3B3(+) epitope may provide a measure of the mobilisation of tissue proteoglycans containing chondroitin 6-sulphate, which may parallel the release of HA. The results showed that indeed many RA serum contained very high levels of 3B3(+) epitope, suggesting that like HA, it may reflect the systemic release of tissue chondroitin sulphate proteoglycans. However, there was no significant correlation between serum HA and serum 3B3(+). They thus varied independently of each other. The OA sera also contained levels of 3B3(+) epitope significantly higher than normal. The raised levels detected in OA suggest that the 3B3(+) epitope in serum may also be contributed to by a greater turnover of joint

tissue chondroitin sulphate proteoglycans, such as aggrecan as note above. The native chondroitin sulphate epitopes detected by monoclonal antibody WF6 were also raised on average in RA serum and indeed the levels were significantly above normal. However, the mean WF6 epitope was even more elevated in OA serum than RA serum. This may reflect the increased expression of the WF6 epitope in OA, or its preferential release into serum associated with OA. The investigation of another chondroitin sulphate epitope (846), which is suggested to reflect an increase in synthesis, has been reported to be highest in serum of early RA patients with slow disease progression¹⁶. If an increase in WF6 epitope also reflects an anabolic response, it may identify those patients with a better prognosis and distinguish them from the group of OA and RA patients with low serum WF6. The present results may be contrasted with the assay of 3B3(-) in serum (i.e. without chondroitinase ABC digestion), which showed levels lower than normal in early RA¹⁷ and in this study a native chondroitin sulphate epitope detected by monoclonal antibody 7D4^{2,6} also showed lower levels in serum in early RA.

Although the 3B3(+) and WF6 epitopes are assayed within the chondroitin-6-sulphate oligosaccharide component, their concentrations in serum were not closely correlated. So, the expression of the WF6 epitope in chondroitin sulphate varied independently of the detection of 3B3(+) after chondroitinase ABC digestion. There was also little correlation between either of the chondroitin sulphate epitopes and hyaluronan in serum.

Whilst mean serum concentrations of 3B3(+) and WF6 epitopes were raised in these disease groups, the distribution of levels found was broad and included many in the normal range. The significance of this has yet to be determined. It is possible that they may identify patient groups with different disease activity and this may be a

guide to their risk of more, or less rapid disease progression. However, there were no obvious clinical criteria that distinguished those with high values from those with low values in this cross sectional study and this will need to be evaluated in a more detailed longitudinal study.

The determination of the chondroitin sulphate epitopes 3B3(+) and WF6 in serum show increases in groups of both OA and RA patients and they may therefore prove useful in the differential diagnosis and monitoring of joint diseases. The value of these markers in the studies of some therapeutic agents such as NSAIDs, newly synthesized polysulphated polysaccharides and alternative medicinal treatment (acupuncture) are under investigation.

Acknowledgements

This work was supported by the European Commission (Contract No: CII*-01-023), the National Research Council of Thailand, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand, The Royal Golden Jubilee project (to P.P.) and Basic Research Grant of the Thailand Research Fund (to P.K.).

References

1. Altman R, Asch E, Bloch D, *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
2. Caterson B, Mahmoodian F, Sorrell JM, Hardingham T, Bayliss MT, Carney SL, *et al.* Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. *J Cell Sci* 1990; 97: 411-17.
3. Lohmander S. Markers of cartilage metabolism in arthrosis. *Acta Orthop Scand* 1991; 62: 623-32.
4. Lewis S, Crossman M, Flannelly J, Belcher C, Doherty M, Bayliss MT, *et al.* Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Ann Rheum Dis* 1990; 58: 441-5.
5. Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 299-307.
6. Caterson B, Hughes CE, Johnstone B, Mort JS. Immunological markers of cartilage proteoglycan metabolism in animal and human osteoarthritis. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. Kuettner K, Schleyerback R, Peyron J, Hascall V, Eds. New York: Raven Press, 1992, pp. 415-26.
7. Paimela L, Heiskanen A, Kurki P, Helve T, Leirisalo-Repo M. Serum hyaluronate levels as a predictor of radiologic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991; 34:815-21.
8. Laurent TC, Fraser JRE, Laurent UBG, Engstrom-Laurent AE. Hyaluronan in inflammatory joint disease. *Acta Orthop Scand* 1995; 66: 116-20.

9. Fex E, Eberhardt K, Saxne T. Tissue derived macromolecules and markers of inflammation in serum in early rheumatoid arthritis: relationship to development of joint destruction in hands and feet. *Br J Rheumatol* 1997;36:1161-5.
10. Sharif M, George E, Shepstone L, Knudson W, Thonar EJ, Cushnaghan J, *et al.* Serum hyaluronic acid as a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1995; 38:760-7.
11. Hochberg M, Altman R, Brandt K, Clark B, Dieppe P, Griffin M, *et al.* Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II Osteoarthritis of the knee-American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1541-6.
12. Hazell PK, Dent C, Fairclough JA, Bayliss MT, Hardingham, T. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 953-9.
13. Hardingham, TE. Immunochemical methods in cartilage research. In: *Methods in Cartilage Research*. Maroudas A, Keuttner K, Eds. London: Academic Press 1991, pp.155-64.
14. Louthrenoo W, Kongtawelert P, Sivasomboon C, Sukitawut W. Correlation between serum hyaluronan and disease activity and severity in Thai patients with rheumatoid arthritis. *J Med Assoc Thai* 2001; 84(5): 622-7.
15. Plaas AH, West LA, Wong-Palms S, Nelson FR. Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. Disease related alterations in the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulphate. *J Biol Chem* 1998; 273: 12642-9.
16. Mansson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole A.R, *et al.* Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 1995; 95(3):1071-7.

17. Middleton J, White S, Parry E, Jackson J, Dixey J, Ashton B. Changes in serum chondroitin sulphate epitopes 3B3 and 7D4 in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38:837-40.

Legend to the Table and Figures :

Table 1. Details of the patients and normal subjects

Table 2. The concentration of hyaluronan, native chondroitin sulphate epitope, WF6 and unsaturated chondroitin sulphate epitope 3B3(+) in human normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis serum samples.

Figure 1. Characterization of mAb WF6.

Figure 2. The distribution of the concentration of unsaturated chondroitin sulphate epitope 3B3(+) in human normal, OA, and RA serum samples.

Figure 3. The distribution of the concentration of native chondroitin sulphate epitope WF6 in human normal, OA, and RA serum samples.

Figure 4. The distribution of the concentration of hyaluronan determined by ELISA based assay using biotinylated HA-binding proteins in human normal, OA, and RA serum samples.

Table 1 Details of the patients and normal subjects

	OA gr.	RA gr.	Normal	Significant level
No. of patient (female/male)				
HA	57 (49/8)	96 (90/6)	20 (13/7)	NS
3B3(+)	40 (30/10)	31 (27/4)	20 (13/7)	NS
WF6	49 (38/11)	56 (52/4)	20 (13/7)	NS
Age (yr.)				
HA	63.1 (42-74)	49.6 (24-75)	60.3 (41-75)	NS
3B3(+)	63.0 (40-75)	52.3 (30-70)	60.3 (41-75)	NS
WF6	63.2 (42-82)	50.4 (30-75)	60.3 (41-75)	NS

Values are mean (range). NS denotes no significant differences between the group.
(*t*-test, $p > 0.05$).

Table 2 The amounts of hyaluronan, native chondroitin sulphate (WF6 epitope) and unsaturated chondroitin sulphate [3B3(+) epitope] in serum samples of normal, osteoarthritic, and rheumatoid arthritic patients.

	HA (ng/ml)	3B3 (+) epitope (ng/ml)	WF6 epitope ($\times 10^3$ ng/ml)
Normal	130.09 ± 82.53 (20)*	14.41 ± 14.15 (20)	1.18 ± 0.81 (20)
Osteoarthritis	160.30 ± 135.66^a (57)	106.29 ± 112.87^b (40)	1.87 ± 1.77^c (49)
Rheumatoid arthritis	297.33 ± 218.48^d (96)	105.41 ± 123.38^e (31)	1.56 ± 1.30^f (56)

Significant value (compared to normal):

* = sample number

a; $p = 0.331$, b; $p = 0.004$, c; $p = 0.088$, d; $p = 0.011$, e; $p = 0.017$, f; $p = 0.214$

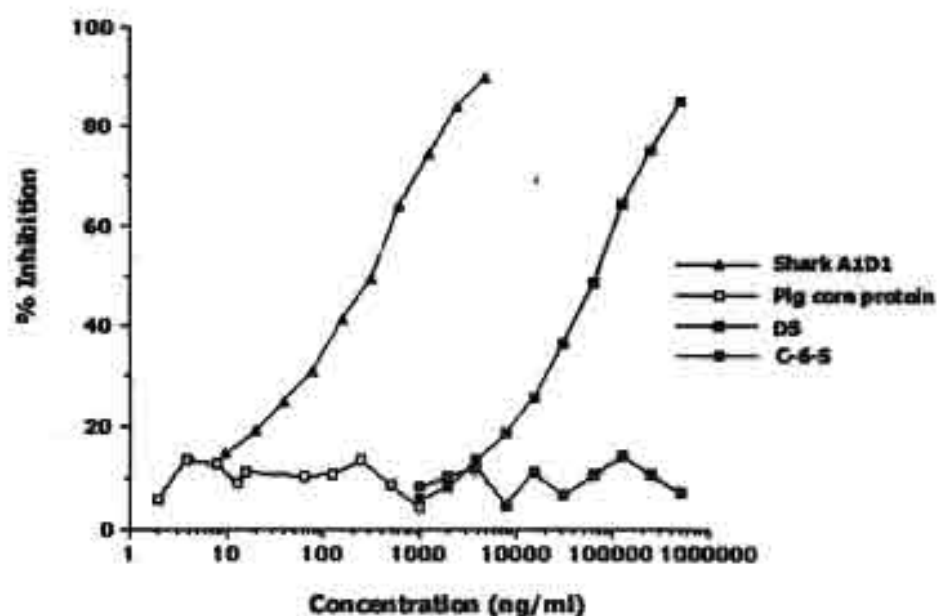


Figure 1 A competitive ELISA assay for characterization of WF6 epitope. Microtitrier plate was coated with shark PGs (A₁-fraction). Antigen used as competitive inhibitor were ▲ shark PGs (A₁D₁-fraction), □ porcine aggrecan core protein (chondroitinase ABC digested porcine laryngeal cartilage aggrecan), ■ dermatan sulphate and ■ chondroitin 6-sulphate.

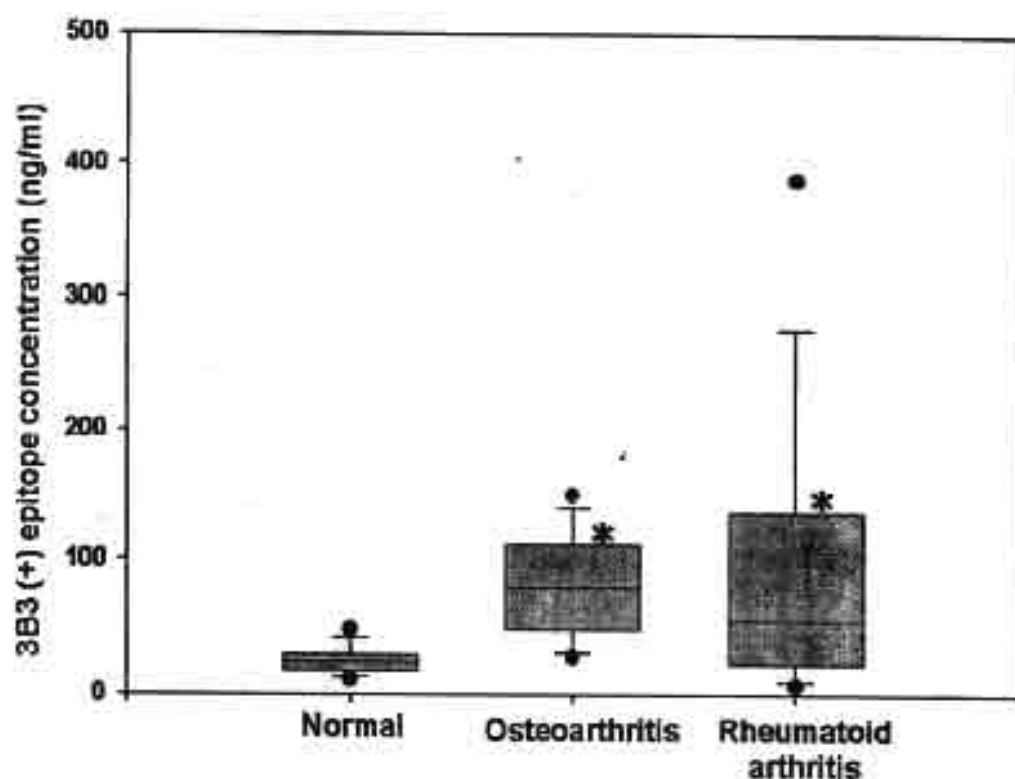


Figure 2 Serum concentration of the 3B3(+) epitope. Comparison of the value obtained in normal human serum (n=20), osteoarthritic serum (n=57) and rheumatoid arthritic serum (n=96). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p < 0.05$) relative to the median of the normal serum.

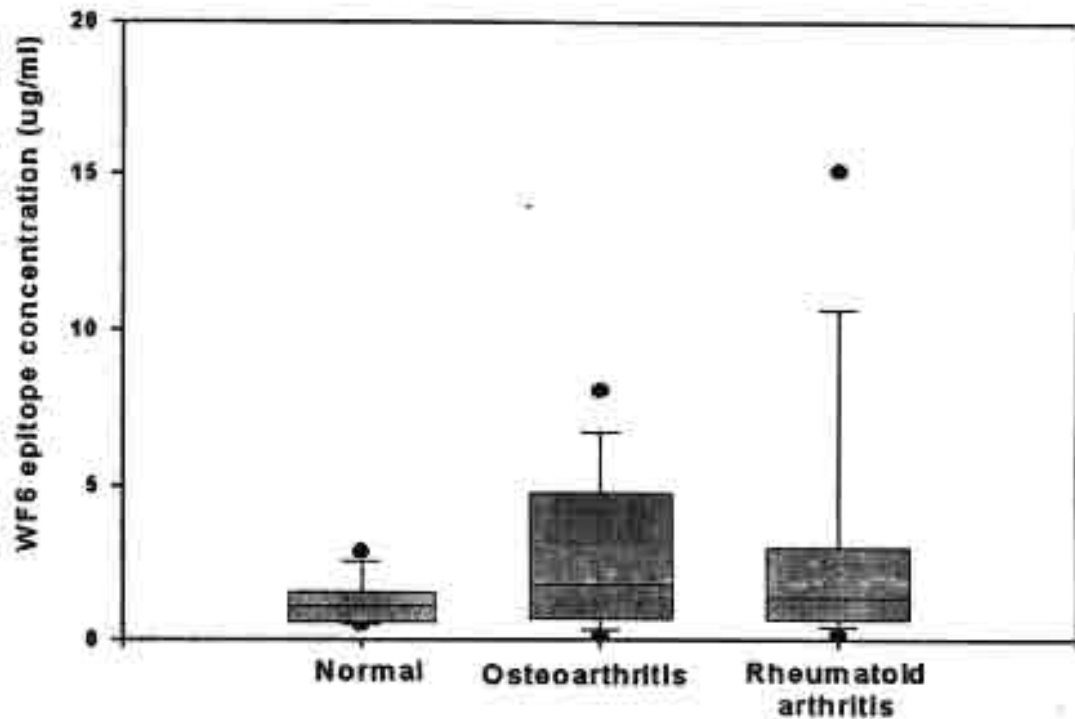


Figure 3 Serum concentration of the WF6 epitope. Comparison of the value obtained in normal human serum ($n=20$), osteoarthritic serum ($n=40$) and rheumatoid arthritic serum ($n=31$). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p<0.05$) relative to the median of the normal serum.

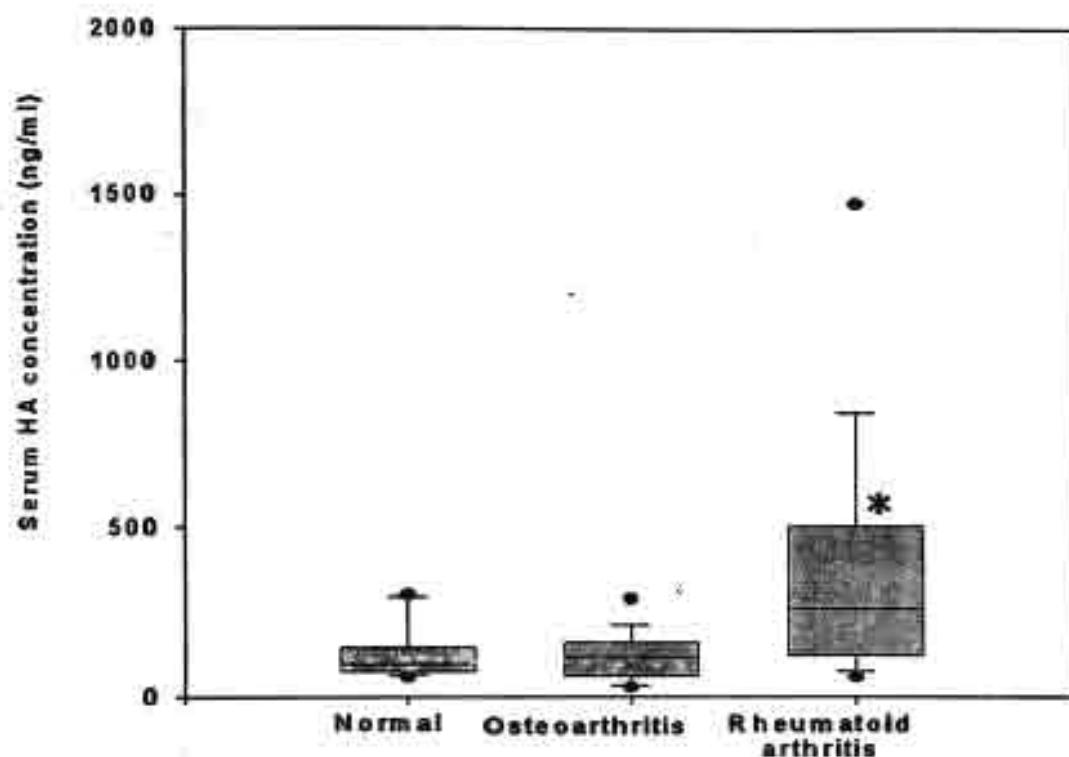


Figure 4 Serum concentration of hyaluronan (HA). Comparison of the value obtained in normal human serum ($n=20$), osteoarthritic serum ($n=41$) and rheumatoid arthritic serum ($n=56$). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p<0.05$) relative to the median of the normal serum.

Manuscript II :

Pothacharoen, P., Ong-chai, S., Supaphun, J., Kumja, P., Wanaphirak, C., Sugahara, K., Hardingham, T.E., and Kongtaweert, P. Raised serum chondroitin sulfate epitopes and hyaluronan levels as biomarkers in ovarian cancer. (Submitted to Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention)

Raised Serum Chondroitin Sulfate Epitopes and Hyaluronan Levels as Biomarkers in Ovarian Cancer

¹Pothacharoen, P., ¹Ong-Chai, S., ¹Supaphun, J., ²Kumja, P., ²Wanaphirak, C.,
³Sugahara, K., ⁴Hardingham, T., and ¹Kongtawelert, P.

¹Department of Biochemistry, and ²Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

³Department of Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University 4-19-1 Motoyama-
kita-machi, Higashinada Kobe 658-8558, JAPAN

⁴UK Centre for Tissue Engineering, Universities of Manchester and Liverpool Office,
School of Biological Sciences, University of Manchester 2.205 Stopford Building,
Oxford Road Manchester M13 9PT, UK

All correspondence: Kongtawelert, P., Department of Biochemistry, Faculty of
Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

Abstract

Ovarian cancers have been reported to accumulate the extracellular matrix components, chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs) and hyaluronan (HA), associated with tumor growth and cell migration. In this study the presence of these components in serum has been investigated as possible biomarkers of pathology in ovarian cancer and disease. Serum CS epitope was determined by a competitive immunoassay with two monoclonal antibodies (mAb), which recognize different structures on CSPG. In serum a native CS epitope was determined using a mAb, WF6, and a CS epitope created by digestion with chondroitinase ABC was determined using mAb, 3B3. In addition, serum HA concentration was measured by an ELISA-based assay with a biotinylated affinity probe specific for HA. The results showed that the concentration in serum of WF6 epitope and CS epitope (3B3+) were highly increased in all types and stages of ovarian disease ($p < 0.001$). Serum HA of ovarian cancer was significant higher than in normal ($p < 0.001$). Furthermore, high serum HA was associated with cancer of poor prognosis, clear cell and mixed type, and with an advanced stage, but it was not increased in serum from patients with non-cancer ovarian disorders. These results may reflect changes in ECM metabolism in progressive ovarian cancer, which cause an increase in serum of CS epitopes and HA. Therefore, serum CS epitopes may provide useful markers for cancers and other disorders of the ovaries. The measures of serum HA are complementary and help distinguish between ovarian cancer and other ovarian diseases.

Introduction

Ovarian cancer is a major health threat to women over age of 35 and represents the fifth most common type of women's cancer and the second most common female reproductive cancer ^{1,2}. The high mortality rate of ovarian cancer is due to the clinical symptoms of this disease, which are often vague and nonspecific during its early stage and typically it goes undetected and untreated until an advanced stage ³. Initial clinical evaluation of the symptoms is limited by a lack easily available laboratory tests or imaging modalities. The gynecological oncologist usually detects tumor development when it is at a late stage, when the risk of metastasis is already high. Therefore, simple, cost-effective, specific and sensitivity methods are needed for early diagnosis and monitoring of this disease. Early detection would enable better clinical intervention and would significantly improve patient morbidity and mortality.

Various cell surface proteoglycans are important in cellular recognition and adhesion. They may modulate adhesion by binding extracellular matrix components or by forming direct ligand-receptors interactions between cells. Structurally, CS-PGs consist of a core protein that modified depending upon the cell type and the core protein, by the addition of either heparan sulfate (HS) or chondroitin sulfate (CS), which are linear, anionic glycosaminoglycans (GAGs). They play several roles in the normal physiology of animal tissues, regulating cell migration, cell recognition, growth factor binding and tissue morphogenesis. HA is a high molecular weight linear polysaccharide, which is a ubiquitous component of extracellular matrix and cell associated matrices in most body tissues. It is essential for growth and motility of both normal and transformed cells. A family of large CS-PGs bind to HA forming large supramolecular assemblies, which contribute to ECM properties. Animal studies

have shown that HA is synthesized and turned over in the body at the rate of about 15g/day⁴.

There are many published reports of elevated CS-PG levels in tumors, when compared with the tissue in which they originate and attempts have been made to establish a relationship between tumor glycosaminoglycans and tumor-cell properties⁵⁻⁸. Currently, there is evidence to show that CS-PGs are synthesized by the ovarian carcinoma cells and are involved in cell-matrix adhesion to interstitial matrix⁹. In addition, several malignant ovarian tumors are reported to accumulate HA, which may relate to a possible role in the invasiveness of ovarian tumor cells¹⁰. These observations have led us to speculate that increased metabolism and clearance of these matrix proteoglycans and HA in the circulation may provide potential markers for these types of cancer.

There is a previous study reporting an elevated level of HA in urine and serum correlated with advance cancer¹¹. There has also been a few previous investigations on the detection of serum CS-PG epitopes and HA in ovarian cancer. HA concentration in body fluids were determined by He, W., *et al.*¹², who reported an elevated level of serum and urine HA in malignant compare with benign ovarian tumors. In this study serum HA and CS epitopes have been investigated in patients with ovarian cancer and with non-cancer gynecological disorders. We have established assays for the investigation of chondroitin sulfate epitopes with a novel monoclonal antibody (WF6) which recognizes a native epitope in chondroitin 6-sulfate and a well characterised monoclonal antibody 3B3, which recognizes unsaturated terminal chondroitin 6-sulfate after chondroitinase ABC digestion (3B3+)^{13,14}. Serum HA was detected by an ELISA based assay with biotinylated affinity probe a specific for HA.

Materials and Methods

Cell culture and Antibodies Reagents. Hybridoma cells synthesizing mAb WF6, a mouse monoclonal antibody (IgM) raised against shark aggrecan, were grown using a standard hybridoma technique as previously described ¹⁵.

Serum samples. All subjects gave their informed consent before participation. Blood from healthy women were collected from the Clinic of Gynecologist, Maharaj Nakon, Chiang Mai Hospital (Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand. Serum samples from healthy women used in this study were collected from 30 women, average age 46.8 years (range 19-70 years). Each healthy donor provided recent medical history and was subjected to a physical examination and were reported to be free from articular, bone, liver, endocrine, or other chronic disorders.

Serum from patients with ovarian cancer (n= 37) and non cancer gynecological disorders (n= 39) with average age 53.1 (range 18-85 years) and 41.5 years (range 12-70 years), respectively. Patients with ovarian cancer were classified as having International Federation of Gynecology and Obstetrics stage I, II, III or IV disease at the time of laboratory analysis and tumor reductive surgery as shown in Table 2.

Treatment of human serum samples. Prior to competitive immunoassay with monoclonal antibody 3B3, the samples were digested with chondroitinase ABC (equal volume of 0.1 U/ml (in chondroitinase ABC buffer: 0.1M sodium acetate, Tris-HCl, pH 7.3), incubated at 37°C for 16 h followed by heating at 100°C for 10 min. The digested samples were spun in a microfuge for 10 min and the supernatants were collected and subjected to analysis.

A competitive immunoassay technique using monoclonal antibody 3B3. A quantitative ELISA was modified from an assay in synovial fluid¹⁶ for the epitopes recognized by monoclonal antibody 3B3. The standard used was porcine aggrecan core protein (chondroitinase ABC-digested porcine laryngeal cartilage aggrecan)¹⁴ at various concentrations (4 - 2,000 ng/ml) in TE buffer (0.1M Tris HCl, pH 7.4, 0.15M sodium chloride, 0.1% Tween 20 and 0.1% BSA) and supernatants from chondroitinase ABC digested human serum samples were added to the 1.5 ml plastic tubes containing an equal volume of monoclonal antibody 3B3 (1:10,000 dilution in TE buffer). Samples were incubated at 37°C for 1 h, added to the microplate coated with porcine aggrecan core protein and blocked with 1%BSA, incubated at 37°C for a further 1h. The wells were washed and peroxidase conjugated anti-mouse IgM antibody was added (100 µl/well of 1:1,000 dilution in TE buffer) and incubated at 37°C for a further 1 h. The bound conjugate was detected by adding of *o*-PD substrate (100 µl/well in citrate buffer, pH 5.0). The reaction was stopped with 50 µl/well of 4M sulfuric acid and the absorbance was determined using a microplate reader at 492/690nm. The concentration of 3B3(+) epitope in supernatant samples was calculated from the standard curve.

A competitive immunoassay using monoclonal antibody WF6. A quantitative ELISA was modified from a previous study¹⁶ for the epitopes recognized by monoclonal antibody WF6. The standard used was shark cartilage aggrecan (A₁D₁ fraction) at concentrations 19-10,000 ng/ml in 6% BSA in TE buffer. Diluted human serum samples (1:5 in 6% BSA-TE) were added to 1.5 ml plastic tubes containing an equal volume of WF6 (cell culture supernatant, 1:200 dilution in TE buffer). They were incubated at 37°C for 1 h, and then added to the microtitre plate, which was previously coated with shark aggrecan (A₁ fraction), and blocked with BSA. The

plates were incubated at 37°C for 1 h. and the wells were then washed and peroxidase conjugated anti-mouse IgM antibody (1:2,000) was added (100 µl/well; in TE buffer). The plate was incubated at 37°C for another 1 h. The detection of conjugate antibody with *o*-PD substrate and plate reading was carried out as described above. The concentration of WF6 epitope in samples was calculated from the standard curve.

An ELISA based assay for HA using biotinylated HA-binding proteins. Human serum samples, or standard HA (Healon[®]) at various concentrations (19-10,000 ng/ml in 6% BSA-PBS pH 7.4), were added to 1.5 ml plastic tubes containing biotinylated HA-binding proteins (1:200 in 0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.6). The tubes were incubated at room temperature for 1 h. and then samples were added to the microplate, which was previously coated with umbilical cord HA (100 µl/well of 10 µg/ml) and blocked with 1% BSA (150 µl/well) and the plate was incubated at room temperature 1 h. The wells then were washed and peroxidase conjugated anti-biotin antibody (1:2000 dilution), 100 µL/well in PBS was added. The plate was incubated at room temperature for a further 1 h. The detection of conjugated antibody was with *o*-PD substrate and plate reading was carried out as described above. The concentration of HA in samples was calculated from the standard curve.

Statistical analysis. Quantitation was achieved by reference to a standard curve, using the DeltaSoft II software. The concentrations of the serum components in the samples were determined by using the absorbance values falling between 40-50% inhibition of the standard curve. The ELISA data were analyzed using the statistical program SPSS 11.0.

The Mann-Whitney U-test was used for comparison of different serum components. In all cases, *p* values less than 0.05 were considered significant. All

results compared are from assays performed at the same time and carried out at least in triplicate.

Results

Ovarian cancer and ovarian disorder patients have higher serum CS epitopes

We have investigated CS epitopes; both native (WF6) and unsaturated (3B3+) in serum samples from a group of healthy women (normal), patients with ovarian cancer and from a further group of similar age with non-cancerous gynecological disorders. (Figure 1, Table 3) The serum concentration of WF6 epitope in healthy women was 106.1 ± 122.5 ng/ml. In contrast, patients with ovarian cancer and non-cancerous gynecological disorders, the serum levels were much higher, 1138.9 ± 645.6 ng/ml and 1674.7 ± 1269.8 ng/ml respectively. For 3B3+ epitope the serum concentrations were also increased from 51.4 ± 77.8 ng/ml to 648.3 ± 1547.3 ng/ml in ovarian cancer patients and to 405.2 ± 673.4 ng/ml in non-cancerous gynecological disorders. These results indicated that serum WF6 and 3B3+ epitopes were markedly increase in ovarian cancer pateints and non-cancer ovarian disorders. In each case the difference was highly significant when compared to healthy serum.

Serum HA level was markedly elevated in ovarian cancer patients

Serum HA was determined using a biotinylated affinity probe specific for HA in a ELISA-based assay. Results showed that serum HA of ovarian cancer patients (933.5 ± 1368.9 ng/ml) was markedly elevated (~8 fold, $p= 0.001$) above normal (118.5 ± 89.1 ng/ml), (Figure 1, Table 3). In non-cancerous gynecological disorders serum HA (104.1 ± 137.9 ng/ml) was much lower than in ovarian cancer patients , ($p < 0.05$) and was not significant higher than normal. The results were analysed further based on the histological characterisation of the cancer in order to establish if high levels of the CS epitopes and HA were distinctive for particular forms. However, the serum CS epitopes, both WF6 and 3B3+ and HA were significant higher in all types of ovarian cancer.

Serum HA in epithelial ovarian cancer was correlated with poor prognosis.

Epithelial ovarian cancer (EOC) represents the most common type of ovarian cancer. Based on histological grading of EOC (see table 2), we found that serum CS epitopes, both WF6 and 3B3+ gave high level in all types of EOC compare to healthy normal serum (Figure 3, Table 5). The highest average serum HA was also associated with EOC of poor prognostic types, particularly in clear cell and mixed cell types.

High Serum HA was associated with advanced ovarian cancer.

In a prospective study of 36 patients with ovarian cancer of International Federation of Gynecology and Obstetric (FIGO) Stage I-IV, we categorized stage I as early disease (n= 19) and stage III and IV as late disease (n = 15). There was no difference between the concentration of serum CS epitopes in early and late disease although both groups were significant higher than normal. In contrast, the average serum HA was higher in the late stage of ovarian cancer compared to the early stage group (Figure 5, Table 7).

Discussion

Ovarian cancer is the most common female reproductive cancer and leads to more deaths than any other cancer of the female reproductive system. In general, the mortality is made worse by late diagnostic. This is because the disease is clinically silent in the early stages and symptoms only appear late in the disease process. There is therefore an important need for improved methods for early diagnosis, and for monitoring subsequent therapy and for predicting outcome. Ovarian cancer is classified as a solid neoplasm, which depends on an extracellular matrix for physical coherence and biochemical support and also requires vascular channels ¹⁷. Dynamic turnover of the matrix is involved in the processes of tissue invasion and metastasis. The changes in GAG metabolism of the matrix is therefore likely to reflect essential aspects of tumor biology ¹⁸.

Many previous studies have described ECM markers in ovarian cancer tissue with synthesis and accumulated of CS-PG ⁹ and HA ¹⁹ for mediating cell adhesion, cell motility and metastasis. In contrast, there are few reports describing these components in the circulation (or bodily fluids) for possible use as a biomarkers ^{12,11}. The present study we investigated serum GAGs as biomarkers in patients with ovarian cancer and non-cancer gynecological disorders. The initial results showed elevated level of two serum CS epitopes (native and unsaturated CS structures) in both cancer and non-cancer gynecological disorder patients. The accumulation of CS-PG especially chondroitin 6-sulfate proteoglycan, may be synthesized by the tumor cells themselves and may be correlated with previous immunohistochemical localisation with mAb 3B3 of extracellular matrix of ovarian cancer tumors ⁶. CS-PGs have been identified on tumor cell surface and have been suggested to promote tumor invasion by reducing interaction of cells with the interstitial extracellular matrices ²⁰, whilst

permitting attachment to basement membrane. From other reports, the degradation of GAGs on the ovarian carcinoma cell showed that CS-chains were components of cell surfaces PGs involved in mediating cell adhesion⁹, cell motility and invasion¹⁸. Ovarian cancer cells are thus likely to be significant producers of CS-PG and may contribute directly to elevated level of CS epitopes in serum.

Ovarian cancer cells and several other human cancer tissues have been shown to accumulate a high level of HA, which may be associated with enhanced tumor progression²¹. HA accumulation may also offer tumor cells some protection against immune surveillance and chemotherapeutic agents. Our results show that serum HA levels were significantly elevated in ovarian cancer patients and the increase was correlated with the progression and the aggressiveness of the cancer. This finding is comparable to previous reports of elevated level of HA in urine and serum correlated with cancer^{11,22}. The most probable source of increase serum HA is synthesized by the tumor cell and local tissue cells in response to tumor invasion²³⁻²⁵. In this context it is interesting that in recent findings over expression of the hyaluronan synthase gene transfected into cancer cells enhanced their anchorage-independent growth, tumorigenicity and metastatic potential^{26,27}.

In conclusion this study is the first report of serum CS epitopes and HA in patients with ovarian cancers and non-cancer ovarian disease. Serum analysis of CS epitopes and HA demonstrated that patients with ovarian cancer have elevated level of HA and CS epitopes associated with virulence of type and stage of cancer. In addition, the results suggested that altered and/or elevated serum CS-epitopes and HA level may provide non-invasive methods for the diagnosis and prognosis in patients with ovarian cancer and other gynecological disorders.

References

1. Harlap, S. The epidemiology of ovarian cancer. *In*: M. Markman and W. J. Hoskins (eds.), *Cancer of the Ovary*, pp. 79-93. New York: Raven Press, Ltd., 2003.
2. Look, K. Y. Epidemiology, etiology, and screening of ovarian cancer. *In*: S. C. Rubin and G. P. Sutton (ed.), *Ovarian Cancer*, pp. 175-187. New York: McGraw Hill, Inc., 1993.
3. Ruddon, R. W. Causes of Cancer. *In* R. W. Ruddon (ed.), *Cancer Biology*, pp. 231-276. New York: Oxford University Press, 1995.
4. Laurent, T. C., Laurent, U. B., and Fraser, J. R. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann.Med.*, 28: 241-253, 1996.
5. Adany, R., Heimer, R., Caterson, B., Sorrell, J. M., and Iozzo, R. V. Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. *J. Biol. Chem.*, 265: 11389-11396. 1990.
6. Meng, N., Nakashima, N., Nagasaka, T., Fukatsu, T., Nara, Y., Yoshida, K., Kawaguchi, T., and Takeuchi, J. Immunohistochemical characterization of extracellular matrix components of granulosa cell tumor of ovary. *Pathol.Int.*, 44: 205-212, 1994.
7. Isogai, Z., Shinomura, T., Yamakawa, N., Takeuchi, J., Tsuji, T., Heinegard, D., and Kimata, K. 2B1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. *Cancer Res.*, 56: 3902-3908, 1996.

8. Nash, M. A., Deavers, M. T., and Freedman, R. S. The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clin.Cancer Res.*, 8: 1754-1760, 2002.
9. Kokenyesi, R. Ovarian carcinoma cells synthesize both chondroitin sulfate and heparan sulfate cell surface proteoglycans that mediate cell adhesion to interstitial matrix. *J.Cell Biochem.*, 83: 259-270, 2001.
10. Zhu, D. and Bourguignon, L. Y. Interaction between CD44 and the repeat domain of ankyrin promotes hyaluronic acid-mediated ovarian tumor cell migration. *J.Cell Physiol.*, 183: 182-195, 2000.
11. Delpech, B., Chevallier, B., Reinhardt, N., Julien, J. P., Duval, C., Maingonnat, C., Bastit, P., and Asselain, B. Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients. *Int.J.Cancer*, 46 : 388-390, 1990.
12. He, W., Chang, J., and Zhang, J. [A research on serum, urine and tumor tissue hyaluronate assays for detecting malignant ovarian tumors]. *Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.*, 30: 161-163, 1995.
13. Caterson, B. Hughes, C. E., Johnstone, B., and Mort, J. S. Immunological markers of cartilage proteoglycan metabolism in animal and human osteoarthritis. In K.Kuettner, R, Schleyerbacek, J. Peyron, V. Hascall. (eds.), *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, pp. 415-426. New York: Raven Press, 1992.
14. Caterson, B. Mahmoodian, F., Sorrell, J. M., Hardingham, T., Bayliss, M. T., Carney, S. L., Ratcliffe, A., and Muir, H. Modulation of native chondroitin sulfate structure in tissue development and in disease. *J.Cell Sci.*, 97: 411-417, 1990.

15. Tiengburanathum, N. The production and characterization of monoclonal antibody against chondroitin sulfate C. 1996. Graduate School, Chiangmai University.
16. Hazell, P. K., Dent, C., Fairclough, J. A., Bayliss, M. T., and Hardingham, T. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arthritis Rheum.*, 38: 953-959, 1995.
17. Haroon, Z. A., Peters K. G. G., Greenberg, C. S., and Dewhirst, M. W. Angiogenesis and oxygen transport in solid tumors. *In*: B.A. Teicher (ed.), *Angiogenic Agents in Cancer Therapy*, pp. 3-21. Totowa Humana Press, 1999.
18. Iida, J., Meijne, A. M., Oegema, T. R., Jr., Yednock, T. A., Kovach, N. L., Furcht, L. T., and McCarthy, J. B. A role of chondroitin sulfate glycosaminoglycan binding site in $\alpha 4 \beta 1$ integrin-mediated melanoma cell adhesion. *J.Biol.Chem.* 273: 5955-5962, 1998.
19. Jones, L. M., Gardner, M. J., Catterall, J. B., and Turner, G. A. Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: a natural barrier to ovarian cancer cell adhesion. *Clin.Exp.Metastasis*, 13: 373-380, 1995.
20. Oldberg, A., Hayman, E. G., and Ruoslahti, E. Isolation of a chondroitin sulfate proteoglycan from a rat yolk sac tumor and immunochemical demonstration of its cell surface localization. *J.Biol.Chem.*, 256: 10847-10852, 1981.
21. Anttila, M. A., Tammi, R. H., Tammi, M. I., Syrjanen, K. J., Saarikoski, S. V., and Kosma, V. M. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.*, 60: 150-155, 2000.

22. Manley, G. and Warren, C. Serum hyaluronic acid in patients with disseminated neoplasm. *J.Clin.Pathol.*, 40: 626-630, 1987.
23. Asplund, T. and Heldin, P. Hyaluronan receptors are expressed on human malignant mesothelioma cells but not on normal mesothelial cells. *Cancer Res.*, 54: 4516-4523, 1994.
24. Knudson, W., Biswas, C., and Toole, B. P. Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 81: 6767-6771, 1984.
25. Knudson, W. Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am.J.Pathol.*, 148: 1721-1726, 1996.
26. Itano, N., Sawai, T., Miyaishi, O., and Kimata, K. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.*, 59: 2499-2504, 1999.
27. Kosaki, R., Watanabe, K., and Yamaguchi, Y. Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.*, 59: 1141-1145, 1999.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund (Basic Research Grant to PK), and The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (to PP).

Legend of Tables and Figures:

Table 1	Data of the study population
Table 2	Clinicopathological characterization of the subjects
Table 3	Analysis of biomarkers for healthy, patients with ovarian cancer and patients with gynecological disorder (non-cancer)
Table 4	Analysis of biomarkers for healthy and patients with ovarian cancer
Table 5	Analysis of biomarkers for healthy and patients with epithelial ovarian cancer
Table 6	Analysis of biomarkers for healthy and patients with gynecological disorder (non-cancer)
Table 7	Analysis of biomarkers among healthy and ovarian cancer patients with early and late stage
Figure 1	Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the values obtained from healthy women, patients with ovarian cancer and gynecological disorder with non-ovarian cancer
Figure 2	Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the values obtained from healthy women, patients with ovarian cancer
Figure 3	Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the values obtained from healthy women, patients with epithelial ovarian cancer
Figure 4	Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the values obtained from healthy women and patient with gynecological disorders (non-ovarian cancer)
Figure 5	Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the values obtained from healthy women, early stage and late stage ovarian cancer

Results

Table 1 Data of the study population

Statistic		Control	Ovarian cancer	gynecological disorder with non cancer
		(N=30)	(N=37)	(N=39)
Patient age	Mean	46.8 $\pm$ 16.4	53.1 $\pm$ 15.0	41.5 $\pm$ 13.5
	Range	19-70	18-85	12-70
	Percentage	28	35	37

Table 2 Clinicopathological characterization of the subjects

Variable	n	Percentage
Group		
Normal	30	28
Ovarian cancer	37	35
Non ovarian cancer	39	37
Type of ovarian cancer		
Epithelial	31	84
Germ cell	3	8
Metastatic type	3	8
Epithelial Tumor		
Serous cystadenoma	8	26
Mucinous cystadenoma	14	45
Endometrioid cell	1	3
Clear cell	3	10
Mixed type	5	16
Stage		
Early stage (FIGO Stage I)	19	56
Late stage (FIGO Stage III+IV)	15	44
Type of non-ovarian cancer		
Benign cystadenoma	1	26
Dermoid cell	8	20
Endometrioma	4	10
Myoma uteri	12	31
etc.	5	13

Table 3 Analysis of biomarkers for healthy, patients with ovarian cancer and gynecological disorder with non-cancer.

	HA (ng/ml)	WF6 (ng/ml)	3B3(+) (ng/ml)
Normal (n=30)	118.5 ± 89.1	106.1 ± 122.5	51.4 ± 77.8
(median)	94.3	63.3	29.8
Ovarian cancer (n=37)	933.5 ± 1368.9*	1138.9 ± 645.6**	648.3 ± 1547.3**
(median)	268.1	1024.1	223.4
non-Ovarian cancer (n=39)	104.1 ± 137.9*	1674.7 ± 1269.8**	405.2 ± 673.4**
(median)	31.08	1468.2	197.4

Significant value (compare to normal)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Table 4 Analysis of biomarkers for healthy and patients with ovarian cancer.

	HA (ng/ml)	WF6 (ng/ml)	3B3(+) (ng/ml)
Normal (n=30)	118.5 ± 89.1	106.1 ± 122.5	51.4 ± 77.8
(range)	(20.6-360.8)	(4.4-627.8)	(3.9-416.0)
Epithelial cell type (n=31)	986.8 ± 1465.5*	1157.0 ± 638.9**	614.3 ± 1603.0**
(range)	(3.12-5087.9)	(142.1-2668.2)	(24.1-8977.3)
Germ cell type (n=3)	717.8 ± 762.8	1280.4 ± 884.5*	1229.7 ± 1940.3*
(range)	(3.12-1521.1)	(552.3-2264.7)	(72.4-3470.3)
Metastatic type (n=3)	598.2 ± 808.8	811.0 ± 637.4*	648.3 ± 419.5*
(range)	(62.4-1528.6)	(237.3-1497.1)	(135.9-899.9)

Significant value (compare to normal)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Table 5 Analysis of biomarkers for healthy and epithelial ovarian cancer patients

	HA (ng/ml)	WF6 (ng/ml)	3B3(+) (ng/ml)
Normal (n=30)	118.5 ± 89.1	106.1 ± 122.5	51.4 ± 77.8
(range)	(20.6-360.8)	(4.4-627.8)	(3.9-416.0)
Serous type (n=8)	386.8 ± 469.4	1061.9 ± 701.5**	262.8 ± 171.9**
(range)	(26.9-1290.7)	(273.2-2477.3)	(123.8-607.4)
Mucinous type (n=14)	827.7 ± 1519.6	1172.8 ± 469.5**	914.2 ± 2331.6**
(range)	(3.12-5087.9)	(552.3-2264.7)	(24.1-8977.3)
Endometrioid cell (n=1)	83.4	510.2	184.3
(range)			
Clear cell (n=3)	1731.7 ± 1272.6*	1143.8 ± 1337.8*	417.5 ± 419.5*
(range)	(464.3-3009.5)	(369.6-2688.2)	(94.2-262.7)
Mixed type (n=5)	2125.8 ± 2087.3*	1402.7 ± 625.1**	695.1 ± 882.5*
(range)	(254.9-4887.9)	(700.6-1996.2)	(140.9-2261.7)

Significant value (compare to normal)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

Table 6 Analysis of biomarkers for healthy and gynecological disorder (non-cancer) patients .

	HA (ng/ml)	WF6 (ng/ml)	3B3(+) (ng/ml)
Normal (n=30)	118.5 ± 89.1	106.1 ± 122.5	51.4 ± 77.8
(range)	(20.6-360.8)	(4.4-627.8)	(3.9-416.0)
Cystadenoma (n=10)	116.0 ± 117.8	2050.7 ± 2037.3**	307.1 ± 342.5**
(range)	(3.1-284.3)	(367.9-7030.3)	(39.2-1232.3)
Dermoid cyst (n=8)	65.1 ± 135.1	1075.4 ± 703.1**	1045.0 ± 1331.9*
(range)	(3.1-396.1)	(292.8-2312.8)	(8.9-3509.3)
Endometrioma (n=4)	181.4 ± 170.8	2148.4 ± 1068.4*	427.9 ± 487.2*
(range)	(3.1-412.2)	(1245.5 - 3667.9)	(95.0-727.0)
Myoma uteri (n=12)	100.0 ± 154.0	1805.7 ± 896.5**	187.0 ± 112.9**
(range)	(3.1-507.3)	(511.1-3022.6)	(14.3-458.8)
others (n=5)	118.5 ± 90.9	1187.9 ± 284.6**	162.8 ± 43.5*
(range)	(3.1-67.5)	(366.8-1491.1)	(124.8-224.3)

Significant value (compare to normal)

*p < 0.05, **p < 0.001

Table 7 Analysis of biomarkers for healthy, patients with early and late stage of ovarian cancer

	HA (ng/ml)	WF6 (ng/ml)	3B3(+) (ng/ml)
Normal (n=30)	118.5 $\pm$ 89.1	106.1 $\pm$ 122.5	51.4 $\pm$ 77.8
(range)	(20.6-360.8)	(4.4-627.8)	(3.9-416.0)
Early stage; I (n=19)	503.7 $\pm$ 819.4*	1219.6 $\pm$ 643.1**	878.4 $\pm$ 2105.3**
(range)	(3.12-3505.7)	(142.1-2688.2)	(24.1-8977.3)
Late stage; III - IV (n=15)	1544.9 $\pm$ 1285.3**	1102.4 $\pm$ 670.5**	402.9 $\pm$ 533.4**
(range)	(36.5-5087.9)	(237.3-2477.3)	(94.2-2261.7)

Significant value (compare to normal)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

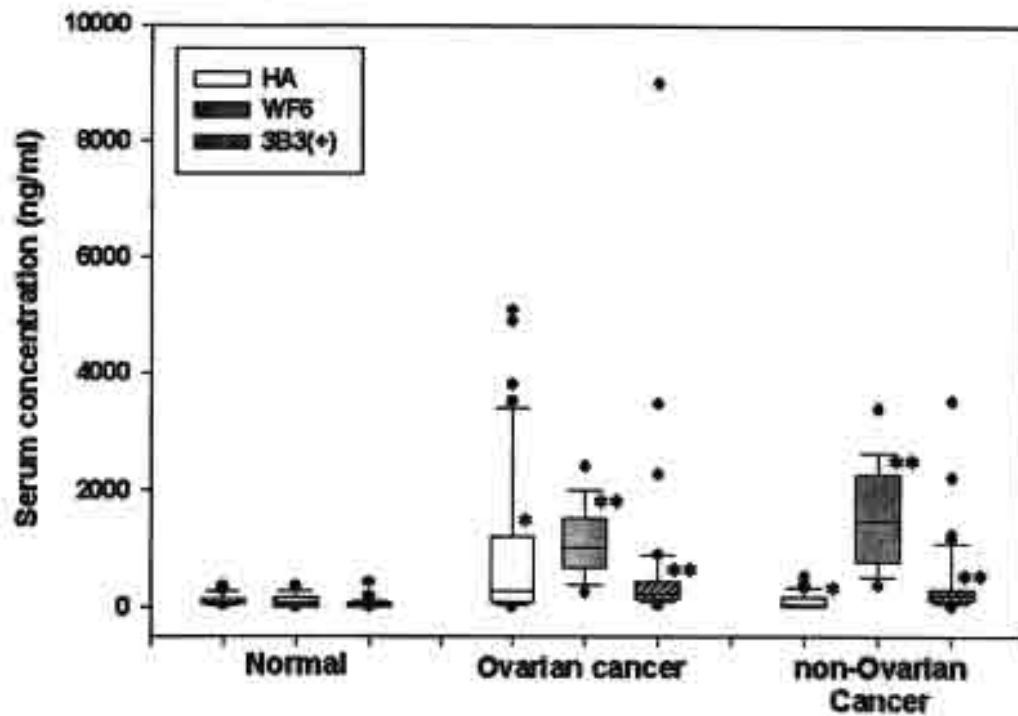


Figure 1 Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the value obtained from healthy women ($n=30$), patients with ovarian cancer ($n=37$) and patients with gynecological disorder with non-ovarian cancer ($n=39$). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p<0.05$ and $p<0.001$ shown with an asterisk and double asterisks, respectively) relative to the median of the healthy women.

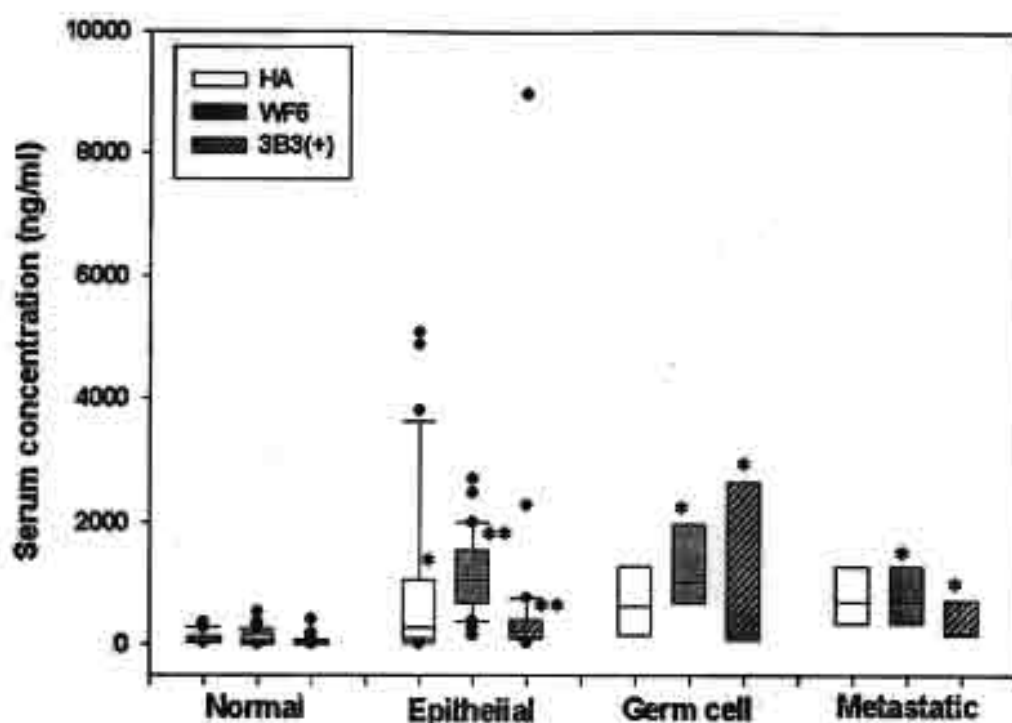


Figure 2 Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the value obtained from healthy women ($n=30$), patients with ovarian cancer: Epithelial type ($n=31$), germ cell type ($n=3$) and metastasis type ($n=3$). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p<0.05$ and $p<0.001$ shown with an asterisk and double asterisks, respectively) relative to the median of the healthy women.

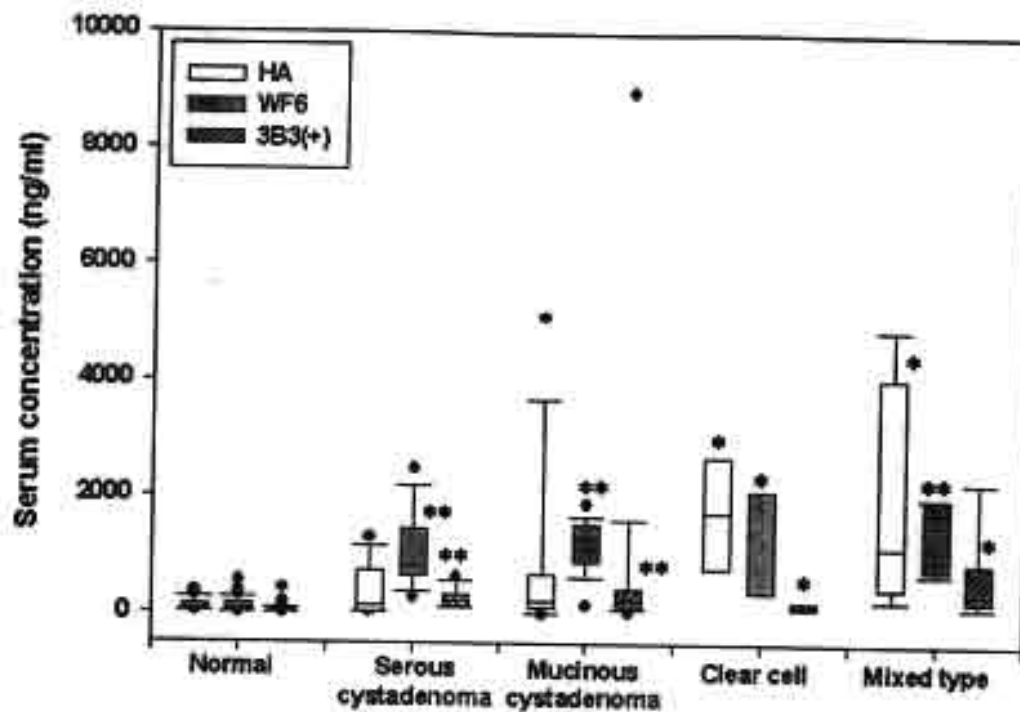


Figure 3 Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the value obtained from healthy women (n=30), patients with epithelial ovarian cancer: serous cystadenoma (n=8), mucinous cystadenoma (n=14), clear cell (n=3) and mixed type (n=5). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ shown with an asterisk and double asterisks, respectively) relative to the median of the healthy women.

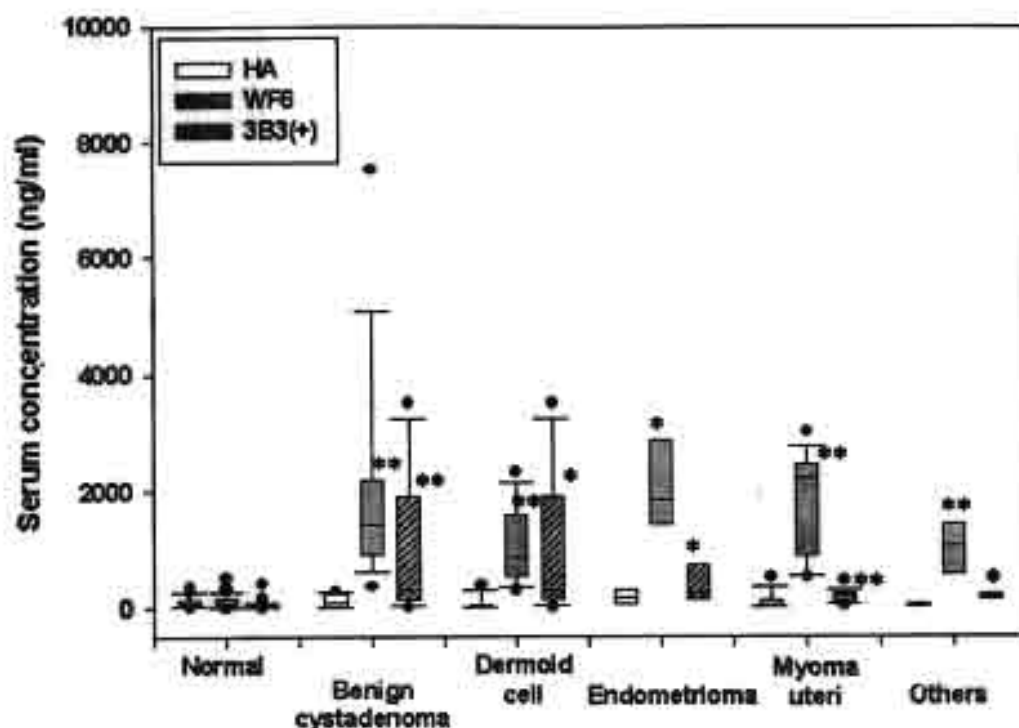


Figure 4 Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the value obtained from healthy women ($n=30$), patients with gynecological disorder with non-ovarian cancer: benign cystadenoma ($n=10$), dermoid cell ($n=8$), endometrioma ($n=4$), myoma uteri ($n=12$) and others ($n=5$). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p < 0.05$ and $p < 0.001$ shown with an asterisk and double asterisks, respectively) relative to the median of the healthy women.

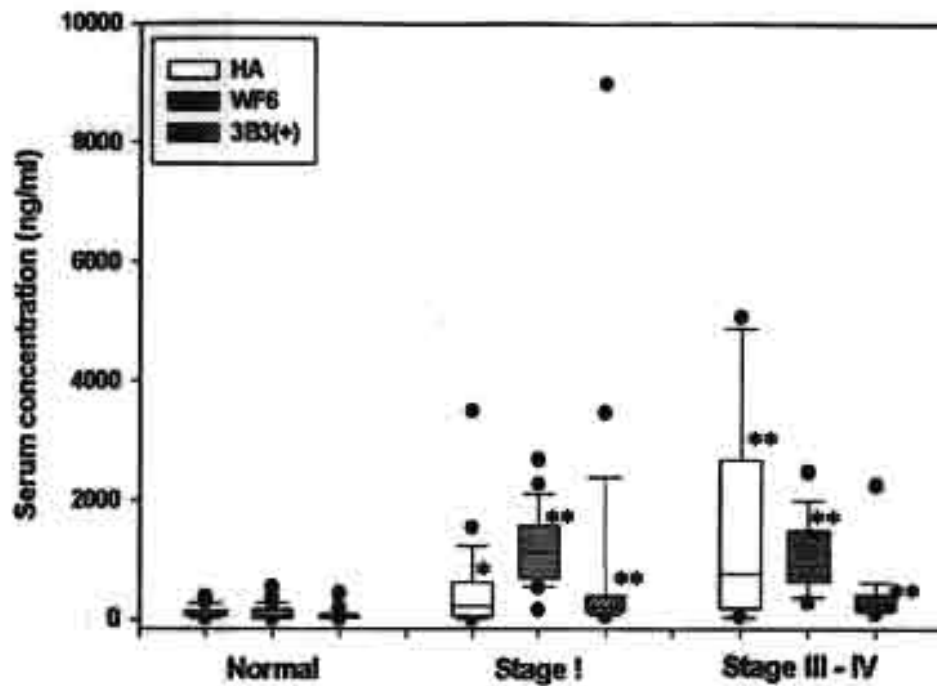


Figure 5 Serum concentration of the biomarkers. Comparison of the value obtained from healthy women ($n=30$), early stage; stage I ($n=19$) and late stage; stage III-IV ($n=15$). Boxes represent median and the interquartile range, between 25th and 75th quartile with error bars. Statistically significant difference ($p<0.05$ and $p<0.001$ shown with an asterisk and double asterisks, respectively) relative to the median of the healthy women.

Patent I:

สิทธิบัตรประเทศไทยเลขที่ 091280 : โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำ
ปฏิกิริยาได้กับ กอนดรอยติน 6-ซัลเฟต ไฮโดรอกซิด และกอนดรอย
ติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค

 คำขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร ☐ การประดิษฐ์ ☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ อนุสิทธิบัตร ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตรขอสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ.2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร(ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542		สำหรับเจ้าหน้าที่	
		วันรับคำขอ - 3 มิ.ย. 66	เลขที่คำขอ
		วันยื่นคำขอ	091280
		สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
		ใช้กับระบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา		เลขที่ประกาศโฆษณา	
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร		เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	
		ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	
1. ชื่อที่แสดงถึงภาพประดิษฐ์การออกแบบผลิตภัณฑ์ โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่หาปฏิกิริยาได้กับคอนครอยติน 6-ซัลเฟต โกลิโกแซ็กคาไรด์ และ คอนครอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซ็กคาไรด์ และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค 2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและยื่นคำขอสำหรับ ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน 3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) ที่หน้า 3 3.1 สัญชาติ 3.2 โทรศัพท์ 3.3 โทรสาร 3.4 อีเมล 4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยแทนผู้อื่น 5. ตัวแทน (ถ้ามี) ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์) นายมงคล แก้วมุกดา สถาบันทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติศูนย์วิจัยและพัฒนาชีววิทยา 344 ซอย จุฬาฯ 22 ถ.บรรทัดทอง แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 5.1 ตัวแทนเลขที่ 1453 5.2 โทรศัพท์ 0-2218-2889-90 5.3 โทรสาร 0-2611-6927 5.4 อีเมล 6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ) นายปรัชญา กงทวีเลิศ อยู่ที่ 181/22 หมู่ที่ 2 ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงจตุจักร อำเภอจตุจักร จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10200 7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากเรื่องเกี่ยวกับคำขอเดิม ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอโน้มน้าวได้ว่าเป็นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกันกับคำขอรับสิทธิบัตร เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากเรื่องเกี่ยวกับคำขอเดิมเพราะ ☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากไม่มีความใหม่ ☐ ขอบเขตการคุ้มครองไม่ชัดเจน			

หมายเหตุ: ในกรณีที่ไม่มีอาจะบรรณจะแนบใบสมัครยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้โดยระบุรายละเอียดเกี่ยวกับข้อและข้อเท็จจริงที่สนับสนุนและเกี่ยวข้อง
เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8. การยื่นคำขอออกใบอนุญาตฯ				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเภท	ลักษณะการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				
8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตรขอสิทธิบัตรโดยถือว่าคำขอมีวันที่ยื่นคำขอรับสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย ☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอ ☐ ขอเป็นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอ				
9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้คิด วันแสดง: _____ วันเปิดงานแสดง: _____ ผู้คิด: _____				
10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับธุรกิจ				
10.1 เลขทะเบียนฝากฉบับ		10.2 วันที่ฝากฉบับ		10.3 สถานะฝากฉบับประเทศ
11. ผู้ขอรับสิทธิบัตรขอสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรจากต่างประเทศก่อนยื่นคำขอรับสิทธิบัตรในประเทศไทย โดยจะจัดเป็นคำขอรับสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรนี้ เป็นภาษาใดภาษาใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอรับสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรเป็นภาษา ☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่น ๆ				
12. ผู้ขอรับสิทธิบัตรขอสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรโดยประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตรหรือจะจดทะเบียนและประกาศโฆษณาสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____ ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตรขอสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรให้รู้ทั่วถึงกันโดยเผยแพร่ในการประกาศโฆษณา				
13. คำขอรับสิทธิบัตรขอสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรประกอบด้วย ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 24 หน้า ค. ข้อสิทธิ 2 หน้า ง. รูปเขียน รูป หน้า จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์ ☐ รูปเขียน รูป หน้า ☐ รูปถ่าย รูป หน้า ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า			14. เอกสารประกอบคำขอ ☒ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตร ☐ หนังสือรับรองการแสดงผลการประดิษฐ์การออกแบบ ผลิตภัณฑ์ ☒ หนังสือขอรับอำนาจ ☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับธุรกิจ ☐ เอกสารการขอรับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็น วันยื่นคำขอในประเทศไทย ☐ เอกสารขอเปลี่ยนประเภทของสิทธิ ☒ เอกสารอื่น ๆ	
15. จำหน่ายหรือรับราคา ☒ การประดิษฐ์นี้มีลักษณะที่ขอรับสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตรขอรับสิทธิบัตร ☐ การประดิษฐ์นี้ได้คิดค้นมาปรับปรุงมาจาก.....				
16.ลายมือชื่อ (☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร / ☒ ทนายความ) มวลก แก้วงาม (นายมงคล แก้วงาม)				

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรือขอรับสิทธิบัตร โดยทำแบบแสดง ความจริงเป็นเท็จว่าตนเป็นเจ้าของงานที่ตน
 เสนอให้ได้รับสิทธิบัตรหรือขอรับสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

อยู่ที่ ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

3.1 สัญชาติ ไทย 3.2 โทรศัพท์ 0-2298-0455 3.3 โทรสาร 0-2298-0476

และ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อยู่ที่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ถนนห้วยแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

- 5 โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับคอนครอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ และ
คอนครอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค

(Monoclonal antibody against chondroitin 6-sulfate oligosaccharides and chondroitin 6-sulfate polysaccharide and its application for diagnosis)

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- 10 โมโนโคลนอล แอนติบอดีนี้ เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้จากการใช้ โปรติโอ
กลัยแคนจากกระดูกอ่อนปลาฉลามตัวอ่อนเป็นแอนติเจน ในการกระตุ้นเพื่อให้เกิดภูมิคุ้มกันในหนูชนิด
Balb/c จากนั้นนำเอาเซลล์ม้ามของหนูมาเชื่อมต่อกับเซลล์มะเร็งชนิด X63 Ag 8.653 ทำให้ได้เซลล์ชนิด
ฮัยบริโดมา ที่สร้างแอนติบอดี โดยมีคุณสมบัติที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ โอลิโกแซคคาไรด์ และ
พอลิแซคคาไรด์ ที่มีส่วนประกอบหลักเป็น คอนครอยติน 6-ซัลเฟต เมื่อนำเอาโมโนโคลนอล
15 แอนติบอดีชนิดนี้มาพัฒนาเป็นน้ำยาเพื่อการตรวจวัดปริมาณของสารชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง
สารชีวโมเลกุลที่มีส่วนประกอบเป็น คอนครอยติน 6-ซัลเฟต เช่น โปรติโอกลัยแคน ชนิดต่าง ๆ วิธีการ
ตรวจวัดที่สามารถนำมาใช้ได้จะเป็นวิธีหรือเทคนิคทางภูมิคุ้มกัน เช่น อีไลซ่า (ELISA), อิมมูโนบลอตติง
(immunoblotting), และการย้อมเนื้อเยื่อทางอิมมูน (immunohistostaining) โรคที่มีความผิดปกติของ
ปริมาณของสารเหล่านี้ เช่น โรคข้อเสื่อม ข้ออักเสบ และมะเร็งชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถตรวจวัดระดับได้
20 จากของเหลวต่าง ๆ จากร่างกาย เช่น ซีรัม หรือน้ำเลี้ยงข้อ ทำให้สามารถใช้เพื่อการวินิจฉัยความผิดปกติ
และนอกจากนั้นยังสามารถใช้ในการติดตามผลการรักษา หรือติดตามความรุนแรงของโรคได้ อีกทั้งยัง
สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยพื้นฐาน และประยุกต์ทางด้านชีวเคมีของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น
การวัดการสลายของกระดูกอ่อนในหลอดทดลอง

- 25 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

ถึงประดิษฐ์นี้เกี่ยวข้องกับสาขาชีวเคมีภูมิคุ้มกัน และชีวเคมีคลินิก

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

โรคข้อที่เกิดเนื่องมาจากโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) และโรคที่มีการทำลายของกระดูกอ่อน (cartilage destruction) นับเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขโรคหนึ่ง เนื่องจาก มีผู้เจ็บป่วยกันจำนวนมาก และเป็นสาเหตุที่สำคัญของการสูญเสียทางสังคม และเศรษฐกิจ

- 5 โรคข้อเสื่อม (Osteoarthritis (OA)) เป็นโรคที่เกิดมาจากการทำลายของกระดูกอ่อนภายในข้อ (articular cartilage) เป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุด พบว่า ในประชากรที่มีอายุมากกว่า 75 ปี กว่า 60 % จะเป็นโรคนี้ สาเหตุของโรคข้อเสื่อมยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าในขณะที่เป็นโรคจะมีการเปลี่ยนแปลงของกระดูกอ่อนและกระดูกใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone) และเยื่อข้อ (synovial membrane) พยาธิกำเนิดของโรคจะทำให้กระดูกอ่อนในข้อที่เป็นโรคสูญเสียความทนทานจากแรงกระทำภายนอก สูญเสีย
- 10 ความยืดหยุ่น และความเรียบของข้อ

- ส่วนข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis (RA)) เป็นการทำลายเพิ่มขึ้น (progressive destruction) ของกระดูกอ่อนเช่นเดียวกับโรคข้อเสื่อม ผู้ที่เป็นโรคจะมีการฉีกขาดและมีการถูกทำลายของสารมห-
- 15 โมเลกุล (macromolecule) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อน โดยการแยกออกของโปรติโอไลติก (proteolytic cleavage) และทำให้ชิ้นส่วนของมหโมเลกุลเหล่านั้นถูกปล่อยออกมาสู่ น้ำไขข้อ (synovial fluid) โดยพบมีการทำลายของผิวหน้ากระดูกอ่อนของข้อต่อ (articular cartilage surface) และกระดูกอ่อน ซึ่งสามารถที่จะดูได้จากภาพถ่ายเอกซเรย์ ของข้อที่จะมีผิวหน้าของกระดูกอ่อน (cartilage surface) และ
- 20 ส่วนสร้างกระดูกอ่อน (cartilage matrix) หายไป แต่สัญญาณนี้จะพบหลังจากที่ผู้ป่วยได้เป็นข้ออักเสบ และมีการดำเนินของโรคไปมากแล้ว ดังนั้นหากมีวิธีการอย่างง่ายที่สามารถที่จะตรวจสอบถึง มห โมเลกุล โดยเฉพาะโปรติโอไกลัยแคน (proteoglycan) หรือ สารอื่นที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อนของข้อต่อ (articular cartilage) ที่ถูกปล่อยออกมาในระยะแรก ๆ ของการดำเนินโรค ย่อมจะเป็นประโยชน์ในการ
- วินิจฉัย ตลอดจนสามารถที่จะติดตามการดำเนินไปของโรคในระยะต่าง ๆ ได้

- ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการวินิจฉัยที่จำเพาะกับโรคข้อเสื่อม แต่การตรวจวัดหาปริมาณของโปรติโอ
- 25 กลัยแคน และชิ้นส่วนของโปรติโอไกลัยแคน โดยเฉพาะกลัยโคซามิโนไกลัยแคน (glycosaminoglycan) สามารถทำได้โดยวิธีทางภูมิคุ้มกัน โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับชิ้น
- ส่วนของโปรติโอไกลัยแคนและสารที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกอ่อน ซึ่งพบว่ามีหลายชนิด ในปัจจุบัน ได้มีการผลิตและพัฒนาภูมิคุ้มกันโมโนโคลนอล (monoclonal antibodies) ในการตรวจวัด เคอรานเทน ซัลเฟต (keratan sulfate) เปปไทด์, คอนดรอยติน ซัลเฟต (chondroitin sulfate) ฮิพิโทป, ไฮยาลูโรแนน (hyaluronan:HA) และด้วยวิธีการใช้ภูมิคุ้มกัน โมโนโคลนอล และโปรตีนเกี่ยวข้อง (binding proteins) เหล่านี้ ทำให้สามารถที่จะตรวจวัดสารดังกล่าวที่มีอยู่ในซีรัม หรือของเหลวที่มาจากร่างกายได้ โดยอาศัย

ที่มีหลักการเช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์อิมมูโนซอร์เบนต์ เอ็นไซม์ลิงค์ (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))

โรคกระดูกข้อต่าง ๆ เป็นโรคที่เกิดขึ้นจากหลายสาเหตุที่เป็นผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งที่มีการเจริญเติบโตอย่างไม่หยุด โดยมีคุณสมบัติที่สามารถสร้างสารชีวโมเลกุลหลายอย่างได้เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้น ยังสามารถสร้างเอ็นไซม์ที่สามารถทำลาย หรือสลายสารชีวโมเลกุลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้อย่างมาก และสารชีวโมเลกุลที่พบมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน คือ สารชีวโมเลกุลประเภทโปรตีนไกลิโคแคนนินเอง และสารโปรตีนไกลิโคแคนนินคอนครอยติน ซัลเฟต ก็เป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ถึงสภาวะของโรคกระดูกได้ และยังสามารถใช้ในการติดตามผลการรักษา หรือความรุนแรงของโรคได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Howell DS. Pathogenesis of osteoarthritis. *Am J Med* 1986; 80(4B):24-8
2. Muir H. and Hardingham TE. "Structure of proteoglycan" *Biochemistry of carbohydrate*. W.J. Ehelen Ed. 1975; 5:153
3. Hochberg Mc., Altman RD., Brandt KD., Clark BM., Dieppe PA., Griffin MR., Moskowitz RW., Schnitzer TJ. Buidselines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Ostroarthritis of the knee. American Collage of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1995; 38(11): 1541-6
4. Fassbender HG. Joint destruction in various arthritic disease. *Articular cartilage biochemistry* 1986; 371-90
5. Sexne T. and Heinegard D. Involvement of nonarticular cartilage, as demonstrated by release of cartilage specific protein in Rheumatoid arthritis. *Arthristis Rheum*; 32(9): 1080-86.
6. Hardingham T. and Bayliss M. Proteoglycans of articular cartilage: Change in aging and in joint disease. *Seminar in arthritis and rheumatism*. 1990; 20(3): 12-33
7. Caterson B., Christner JE., Baker TR. Characterization of monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulphate. *J Biol Chem* 1983; 258: 8848-54
8. Caterson B., Christner JE., Baker JR. Monoclonal antibodies against chondroitin sulphate isomer : their use as probes for investigating proteoglycan metabolism. *Biochem Soc Trans.* 18,820-3

9. Nathachai T.(1996) Production and characterization of monoclonal antibody against chondroitin 6-sulfate.M.S. Thesis, Chiang Mai University,1997
10. Damrasamon S.(1997)The development of methods for quantitation of serum total sialic acid and hyaluronan.M.S.Thesis, Chiang Mai University,1998
- 5 11. Heinegard D., Hascall VC. Aggregation of cartilage proteoglycan III. Characterizations of the proteins isolated from trypsin digests of aggregate. *J Biol Chem* 1974; 249(13): 4250-6
12. Fraser JR., Applegren LE., Laurent TC. Tissue uptake of circulating hyaluronic acid : A Whole body autoradiographic study. *Cell Tissue Res* 1983; 233:285-93
13. Ratcliffe A., Shurety W., Caterson B. The quantitation of a native chondroitin sulphate epitope
10 in synovial fluid lavages and articular cartilage from canine experimental osteoarthritis and disuse atrophy. *Arthritis Rheum* 1993; 36(4): 543-51
14. Kempson GE., Tuke MA., Dingle JT., Barrett AJ., Horsfield PH. The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1976; 428(3): 741-60
- 15 15. Ratcliffe A. and Seibel MJ. Biochemical markers of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1990; 2: 770-6
16. Caterson B., Baker JR., Christner JE. Immunological methods for the detection and determination of connective tissue proteoglycan. *J Invest Dermatol* 1982; 79(suppl 1): 45s-50s
17. Williams JM., Downey C., Thonar EJ., Increase in level of serum keratan sulfate following
20 cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee joint . *Arthritis Rheum* 1988; 31(5): 557-60
18. Sweet MB., Coelho A., Schnitzler CM., Schnitzer TJ., Lenz ME., Jakim I., Kuetlner KE., Thonar EJ. Serum keratan sulfate levels in osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 1988; 31(5): 648-52
19. Spector TD., Woodward L., Hall GM., Hammond A., Williams A., Butler MG., James IT., Hart DJ., Thompson PW., Scott DL. Keratan sulfate in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and
25 inflammatory disease. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(10): 1134-7
20. Ghosh P., Sutherland JM., Taylor TK., Bellenger CR., Pettit GD. The effect of bilateral medial meniscectomy on articular cartilage of the hip joint. *J Rheumatol* 1984; 11(2): 197-201
21. Sharif M., George E., Shepstone L., Knudson W., Thonar EJ-MA., Cushnaghan J., Dieppe P. Serum hyaluronic acid level as a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee.
30 *Arthritis Rheum* 1995; 38: 760-7

22. Cooper EH. And Rathbone BJ. Clinical significance of the immunometric measurements of hyaluronic acid. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 444-51
23. Smith PK., Krohn RL, Hermanson GT., Mallic AK., Garther FH., Prorenzano MD., Fujimoto EK., Goeke NM., Olson BJ. and Klenk DC. Measurement of protein using by bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76-85
24. Farndale RH. And Buttle DJ. Improved quantitative and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylene blue. *Biochemica-Biophysica Acta* 1986; 883: 173-77
25. Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 1973; 54:484-89

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- 15 กรรมวิธีการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับ คอนครอยติน 6-ซัลเฟต การศึกษาคุณสมบัติ และการพัฒนาวิธีการตรวจวัดโดยเทคนิคทางชีวเคมีภูมิคุ้มกันวิทยา

1. การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา ที่สร้างโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ คอนครอยติน 6-ซัลเฟต

- 20 การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ทำโดยฉีดหนู Balb/C ด้วย โปรติโอกลัยแคน ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากกระดูกอ่อนปลาฉลามตัวอ่อน (embryonic shark cartilage proteoglycans) จากนั้นนำเซลล์ไข่มของหนูที่ได้รับการกระตุ้น และตรวจสอบแล้วว่าการสร้างแอนติบอดี ต่อคอนครอยติน ซัลเฟต โปรติโอกลัยแคน มาเชื่อมกับเซลล์มะเร็งชนิดไมอีโลมา (myeloma, X63-Ag8.653) ในอัตราส่วน 5 : 1 จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine), อะมิโนพเทอริน (Aminopterin), และไทมีน (Thymine) แล้วเก็บส่วนน้ำโต
- 25 เซลล์เพาะเลี้ยง (culture supernatant) มาตรวจหา (screen) โคลน (clone) ที่สร้างแอนติบอดีต่อคอนครอยติน 6-ซัลเฟต โดยวิธีอิมมูโนแอสเซย์ (indirect ELISA) โดยการใช้ คอนครอยติน 6-ซัลเฟต เป็นตัวตรวจสอบ หรือเป็นแอนติเจนที่เคลือบติดอยู่บนเพลทจากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบ จึงนำเซลล์ไฮบริโดมาที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์นั้นมาทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยการทำการเจือจางแบบจำกัด (limiting dilution) ก็จะทำให้ได้เซลล์ที่มีลักษณะเป็นโมโนโคลน (monoclone) เรียกกลุ่มของ
- 30 เซลล์นี้ว่า WF6 โดยพบว่าเป็นชนิด IgM, สายเบาแคปปา (Kappa-light chain)

โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ได้ดังกล่าวอาจจะอยู่ในรูปของ แอนติบอดีที่คอนจูเกตกับเอ็นไซม์ (enzyme conjugated antibody), ไบโอดีโนเลทแอนติบอดี (biotinylated antibody), ฟลูออเรสเซนต์แอนติบอดี (fluorescence antibody), แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (radioactive labelled antibody), แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยทอง (gold labelled antibody) และชิ้นส่วนของโมเลกุลของแอนติบอดีที่ยังคงคุณสมบัติที่จำเพาะไว้ ชิ้นส่วนที่เตรียมได้จากการใช้เอ็นไซม์ หรือสารเคมีตัดแยก

2. ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ คอนครอยติน 6-ซัลเฟตในรูปน้ำท้องมาน (ascitic fluid) และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (serum free-medium)

การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 ปริมาณมากสามารถทำได้โดยการฉีดเซลล์ชนิด WF6 ที่ได้จากการผลิตใบข้อ 1 เข้าไปในช่องท้องหนู Balb/c ที่ทำการฉีดด้วยสารพริสเทน (pristane) จำนวน 0.5 มล. ก่อนหน้าประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นประมาณ 2-4 สัปดาห์ เจาะเก็บน้ำท้องมาน (ascitic fluid) ซึ่งจะมีแอนติบอดีต่อ คอนครอยติน 6-ซัลเฟตอยู่เป็นจำนวนมาก

ส่วนการผลิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (serum free medium) สามารถทำได้โดยการนำเซลล์ WF6 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% ซีรัมมาเลี้ยงในอาหารที่ลดปริมาณซีรัมลงเหลือ 5% 1% 0% ซึ่งในขณะเดียวกันก็เพิ่มปริมาณของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่เตรียมขึ้นเพื่อให้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ต้องมีซีรัมโดยเฉพาะ จะทำให้ได้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม และมีแอนติบอดีที่ต้องการ ซึ่งสามารถตรวจวัดคุณสมบัติได้

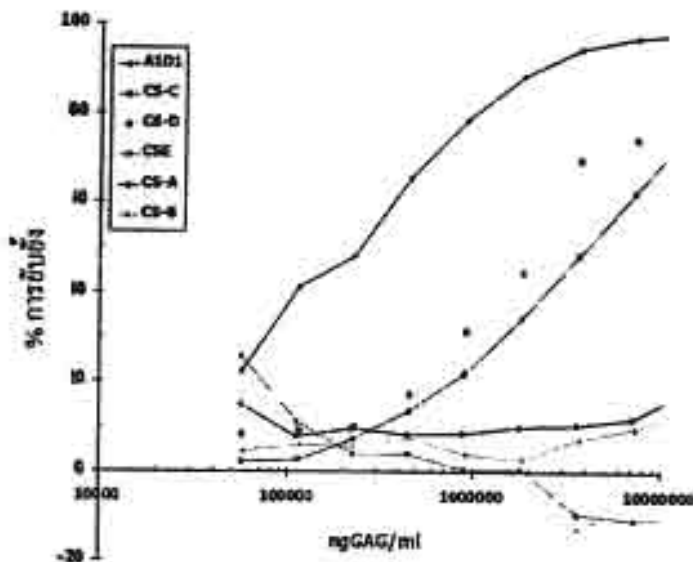
3. การศึกษาคุณสมบัติของ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 โดยวิธี อีไลซ่า (ELISA)

3.1 เคลือบเพลท (Maxisorp, Nunc) ด้วย โปรตีนโอกลัยแคน (fraction A1, aggregate form of shark proteoglycans) จากกระดูกอ่อนปลาฉลาม และก๊อชวางด้วย 1% BSA

3.2 เตรียมของผสมยับยั้ง (inhibition mixture) ที่ประกอบไปด้วย โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 และสารที่ต้องการตรวจวัดปริมาณ หรือต้องการตรวจหาคุณสมบัติที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในปริมาตรที่เท่ากัน ในหลอดพลาสติก จากนั้นนำไปอบที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชม.

3.3 นำของผสมยับยั้งที่เตรียมไว้เติมลงเพลทที่เคลือบด้วยลำดับส่วนโปรตีนโอกลัยแคน A1 ของปลาฉลาม (shark A1-fraction proteoglycans) แล้วนำไปอบที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชม.

- 3.4 ล้างเพลทด้วยน้ำยาล้างเพลท (PBS-Tween) จำนวนสามครั้ง แล้วเติมด้วยแอนติ-IgM แอนติบอดีของหนูที่คอนจูเกตด้วยเพอร์ออกซิเดส (peroxidase conjugated anti-mouse IgM antibody) แล้วนำไปอบที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชม.
- 3.5 ล้างเพลทด้วยน้ำยาล้างเพลทจำนวนสามครั้ง แล้วเติมด้วยซับสเตรท โอพีดี (OPD substrate) จากนั้นทิ้งไว้ในที่มีคประมาณ 15 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 4 โมลาร์ แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 492/620 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader)
- 3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างมาเขียนกับความเข้มข้นของตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ซึ่งสามารถได้ผลตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงคุณสมบัติของ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 ที่ทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล โปรตีนโอกลัยแคนชนิดต่าง ๆ ที่ประกอบด้วยคอนครอยตินชนิดต่าง ๆ

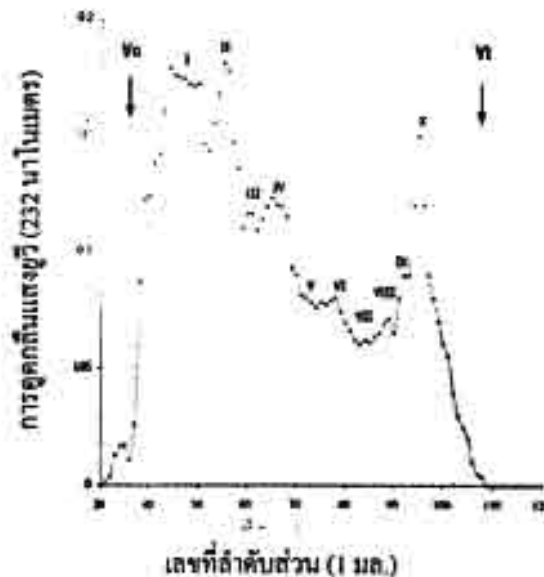
ผลจากการศึกษา แสดงให้เห็นว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 สามารถทำปฏิกิริยาได้กับสารชีวโมเลกุลที่ประกอบไปด้วย คอนครอยติน 6-ซัลเฟต (CS-C) โดยที่พบว่าในส่วนของ CS-D นั้นมีการปนเปื้อนของ CS-C จึงทำให้เห็นผลดังแสดงไว้ในกราฟที่ได้จากการศึกษา

4. การศึกษาถึงคุณลักษณะเฉพาะของโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6

4.1 นำเอาคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ที่เตรียมจากกระดูกอ่อนปลาฉลามมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ เอบีซี คอนครอยติเนส (chondroitinase ABC) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จะตัดสายคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ออกเป็นท่อน ๆ ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อน ๆ ของสายคอนครอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจะมีปลายด้านหนึ่งที่มีลักษณะเป็นพันธะคู่ซึ่งสามารถดูลักษณะได้ที่ 232 นาโนเมตร

4.2 นำเอาผลผลิตที่ได้จากการย่อยคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ด้วยเอนไซม์เอบีซี คอนครอยติเนส นี้ มาทำการแยกโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีด้วยเจลชนิด Bio-Gel P6 ทำให้ได้ผลดังรูปที่ 2

4.3 เก็บแยกส่วนตามลักษณะของกราฟที่แสดงไว้โดยแยกตามขนาด ซึ่งสามารถจัดเก็บได้เป็น 10 ส่วน แล้วนำทั้ง 10 ส่วนนี้มาทำให้เข้มข้น แล้ววัดความสามารถที่จะทำปฏิกิริยาได้กับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 โดยทำการเปรียบเทียบกันว่าส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนใดที่ยังทำปฏิกิริยาได้กับ WF6 และส่วนที่ทำปฏิกิริยาได้นั้น ทำได้มากน้อยต่างกัน อย่างไร โดยทำการคำนวณจากปริมาณของกรดยูโรนิก (uronic acid) ของแต่ละส่วนที่ทำปฏิกิริยาได้ 50 % หรือเรียกว่า IC50 (Inhibition concentration at 50%) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 ซึ่งพบว่าส่วนที่เป็นคอนครอยติน ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ ที่ยังสามารถทำปฏิกิริยาได้อยู่ นั้น เป็นส่วนที่ 1 - 6 ซึ่งส่วนที่ 6 นี้ คาดว่ามีขนาดความยาวของหน่วยน้ำตาล 8-12 หน่วย (octasaccharides - dodecasaccharides)



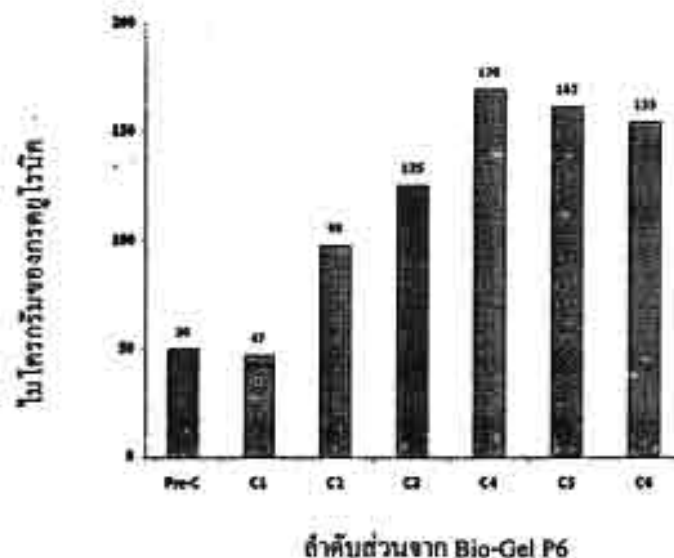
รูปที่ 2 ลักษณะกราฟที่แสดงการแยกส่วนของคอนครอยดิน 6-ซัลเฟต ที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์เอปิซี คอนครอยคินเนส โดยการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่มีเจลชนิด Bio-Gel P6 เป็นตัวกลาง

4.4 นำเอาลำดับส่วนที่ 6 มาแยกบริสุทธิ์คือโดยการใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีที่แลกเปลี่ยน (ion-exchange chromatography) โดยใช้เครื่อง FPLC และ Mono-Q คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีโดยใช้ลิเทียมเพอร์โคเลต (lithium percholate) เป็นบัฟเฟอร์เกลือเพื่อไล่อิโกลิแกแซคคาไรด์ออกจากคอลัมน์ทำให้ได้กราฟดังรูปที่ 4

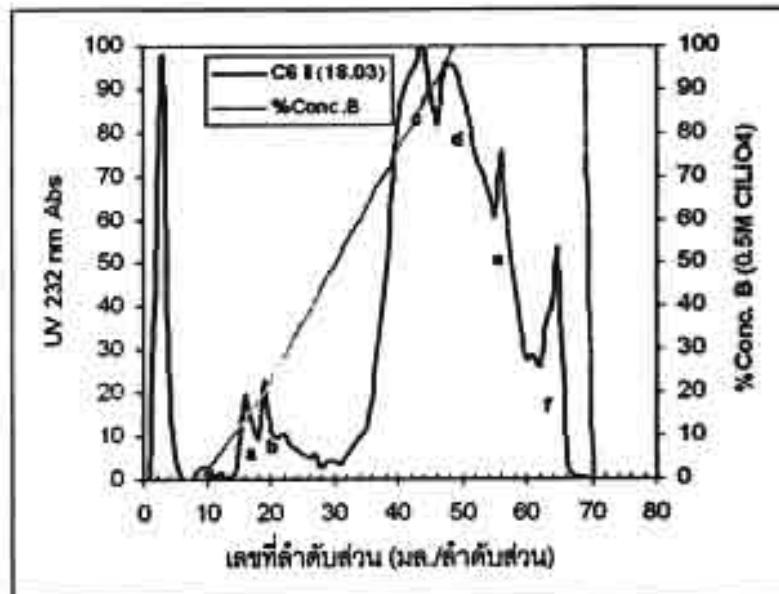
จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อย่อยสายของ คอนครอยดิน ซัลเฟต ให้มีขนาดเล็กลงเป็นอิโกลิแกแซคคาไรด์ โดยการใช้เอ็นไซม์เอปิซี คอนครอยคินเนส สามารถแยกสายอิโกลิแกแซคคาไรด์ที่มีขนาดต่าง ๆ กันได้โดยการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่มีเจลชนิด Bio-Gel P6 (BioGel P-6 column chromatography) และเมื่อนำเอาแต่ละส่วนที่แยกได้นี้มาทำให้บริสุทธิ์คือโดยการใช้เทคนิคทาง FPLC โครมาโตกราฟฟี

แลกเปลี่ยน (ion-exchange FPLC chromatography) ซึ่งทำให้ได้โอลิโกแซคคาไรด์ ที่ยังคงทำปฏิกิริยาได้ กับโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ทำให้ทราบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 สามารถทำ ปฏิกิริยาได้กับคอนครอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ ได้จริง และมีเอกลักษณ์ของรูปแบบการเติมหมู่ ซัลเฟต (sulfatation pattern) ของสายโอลิโกแซคคาไรด์ ดังได้แสดงไว้ในรูปที่แยกได้โดย Mono-Q FPLC

5 คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

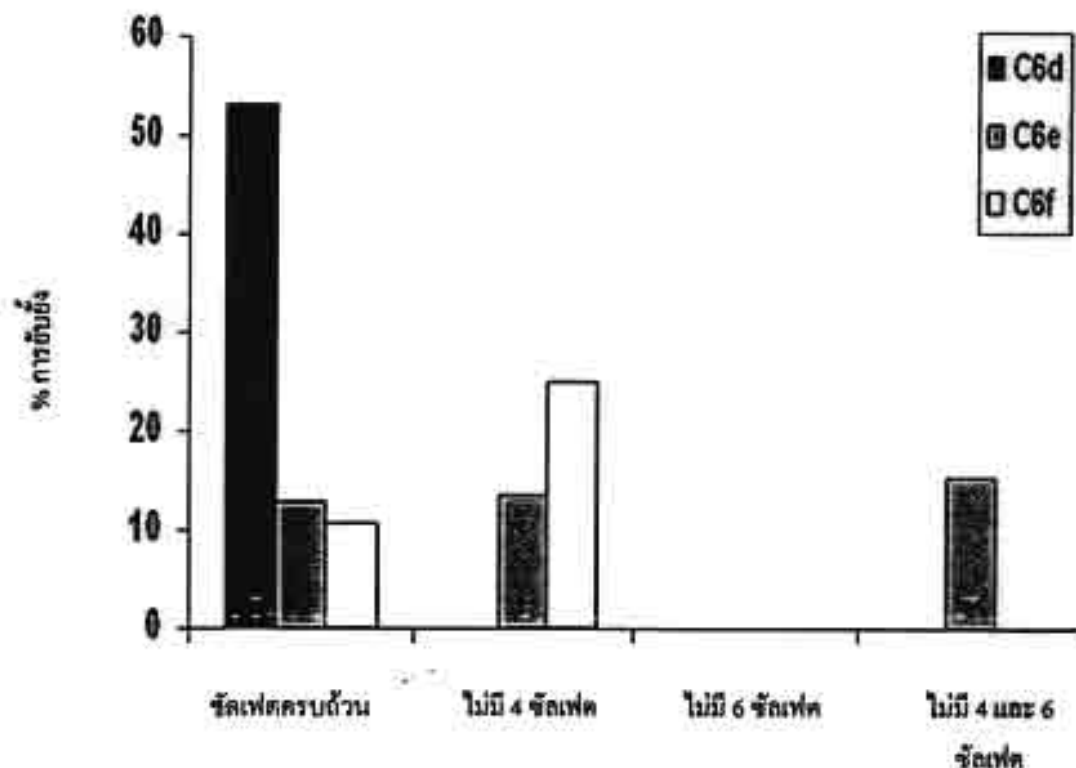


รูปที่ 3 แสดงปริมาณของกรดยูโรนิกเป็นไมโครกรัมของโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ แยกได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่มีเจลชนิด Bio-Gel P6 ที่สามารถ ทำปฏิกิริยาได้กับโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ที่ 50% (IC50) โดย ใช้เทคนิคทางอีโกลซ่าชนิดแข่งขัน



รูปที่ 4 แสดงคุณสมบัติของลำดับส่วนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 เมื่อแยกโดยการใช Mono Q คอลัมน์โครมาโตกราฟี (FPLC system)

5. การทดลองเพื่อพิสูจน์ว่า หมู่ซัลเฟตตำแหน่งที่ 6 ของสายโอลิโกแซคคาไรด์ มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6
 - 5.1 นำเอาลำดับส่วน โอลิโกแซคคาไรด์ที่แยกได้จากเจลฟิเตรชัน (gel filtration) โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่มีชนิด Bio-Gel P6 และ Mono-Q FPLC คอลัมน์โครมาโตกราฟี มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ 4-ซัลเฟเตส, และ 6-ซัลเฟเตส
 - 5.2 นำเอาผลิตภัณฑ์ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์แล้วมาทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำปฏิกิริยากับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 โดยใช้วิธีอิมมูโนแอสเซย์แข่งขันดังแสดงไว้ในข้อ 3
 - 5.3 ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองทั้งในส่วนที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอ็นไซม์ ที่ย่อยด้วย 4-ซัลเฟเตส และ 6-ซัลเฟเตส ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงผลของการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ 6-ซัลเฟเตส และ 4-ซัลเฟเตส โดยใช้ การศึกษาหาคุณสมบัติที่ยังทำปฏิกิริยาได้กับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6

- 5 จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าหมู่ซัลเฟต (sulfate group) ที่มีอยู่บนสายของโอลิโกแซคคาไรด์นั้นมีความสำคัญต่อการจับกับ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 เมื่อนำมาประกอบกับผลการทดลองอื่น ๆ เช่น การทดลองที่ 3 นั้น ก็จะสามารถสรุปได้ว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 นี้ มีคุณสมบัติที่ทำปฏิกิริยาได้กับสายคอนครอดิน ซัลเฟต ที่มีลักษณะเป็นทั้งพอลิเมอร์ และ โอลิโกแซคคาไรด์ และนอกจากนั้น ความจำเพาะของคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดีนี้มีอยู่ที่หมู่ 6-
- 10 ซัลเฟต (6-sulfate group) โดยจะมีหมู่ 4-ซัลเฟต (4-sulfate group) เป็นตัวช่วยให้การจับดีขึ้น หรืออาจจะสรุปได้ว่าทำปฏิกิริยาได้กับรูปแบบการเติมหมู่ซัลเฟตที่จำเพาะ (specific sulfatation pattern) ที่มีหมู่ 6-ซัลเฟต อยู่ที่สำคัญเนื่องจากที่เอนไซม์ซัลเฟเตสนั้นทำปฏิกิริยาได้กับหมู่ซัลเฟตที่อยู่ส่วนปลาย ๆ ของสายโอลิโกแซคคาไรด์

6. การนำ ไมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 ไปศึกษาคุณสมบัติในการย้อมเนื้อเยื่อ

6.1 นำเนื้อเยื่อนิตพิวหนังที่ได้จากห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยาที่ผ่านขบวนการของการย้อมทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (histology staining) เรียบร้อยแล้วมาทำการย้อม

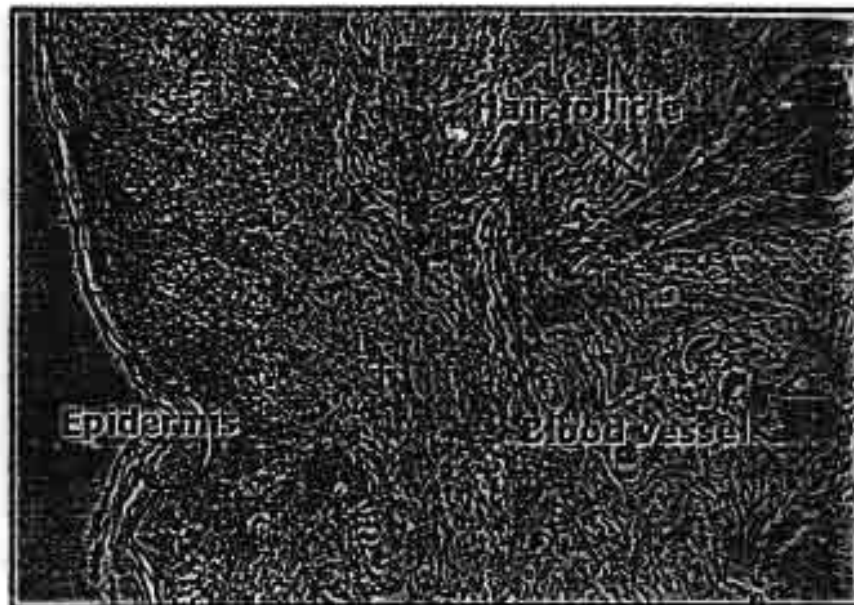
6.2 ใช้ ไมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ที่เจือจางอย่างเหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ (PBS) เป็นตัวตรวจวัดหลังจากที่ทำการติดเนื้อเยื่อติดสไลด์

6.3 ถ้างส่วนของแอนติบอดีที่ไม่ติดด้วยบัฟเฟอร์ แล้วย้อมทับแอนติ-IgM ที่คอนจูเกตกับเพอร์ออกซิเดส (peroxidase conjugated anti-IgM)

6.4 ถ้างส่วนของคอนจูเกตที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกด้วยบัฟเฟอร์ แล้วทำให้เกิดสีโดยการย้อมทับด้วยซับสเตรตที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble substrate)

6.5 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยสารละลายกรด แล้วล้างสีส่วนเกินออก จากนั้นนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งให้ผลดังรูปที่ 6

อินมูโนฮิสโตเคมีสำหรับ WF6 อีพิโทป
(การย้อมด้วยเพอร์ออกไซด์ และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์รวมค่า : 100X)

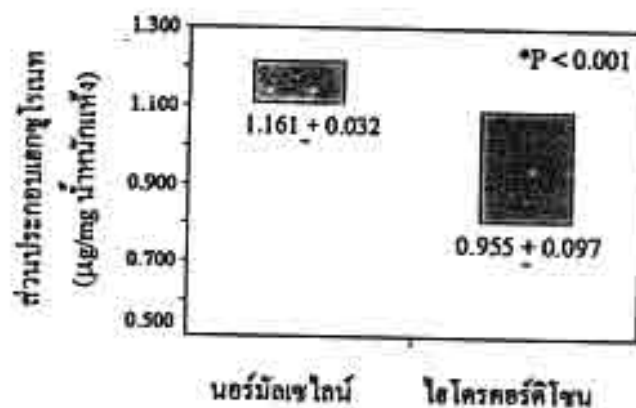


รูปที่ 6 แสดงรูปของเนื้อเยื่อผิวหนังของมนุษย์ที่ย้อมด้วย โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 โดยใช้เทคนิคการย้อมสีเนื้อเยื่อทางอิมมูโน

- 5
7. การนำ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 ไปประยุกต์ใช้เพื่อการติดตามความรุนแรงของโรคในสัตว์ทดลอง
- 7.1 ทำการทดลองเหนี่ยวนำให้กระต่ายมีการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน โดยการใช้สารเคมีจำพวก ไฮโดรคอร์ติโซน (hydrocortisone) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถทำให้กระดูกอ่อนเสื่อมสลายได้โดยการใช้เป็นระยะเวลานาน ๆ ซึ่งทำได้โดยการฉีดเข้าข้อด้วย 200 มก. ของไฮโดรคอร์ติโซน (Solu-Cortef[®]) ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือในลักษณะเดียวกัน
- 10
- 7.2 ทำการเจาะเลือดกระต่ายทุกสัปดาห์ รวมทั้งก่อนทำการทดลอง จากนั้นนำมาเตรียมเป็นซีรัม เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณของสารที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 โดยใช้วิธีเดียวกับที่แสดงไว้ในข้อ 3
- 15

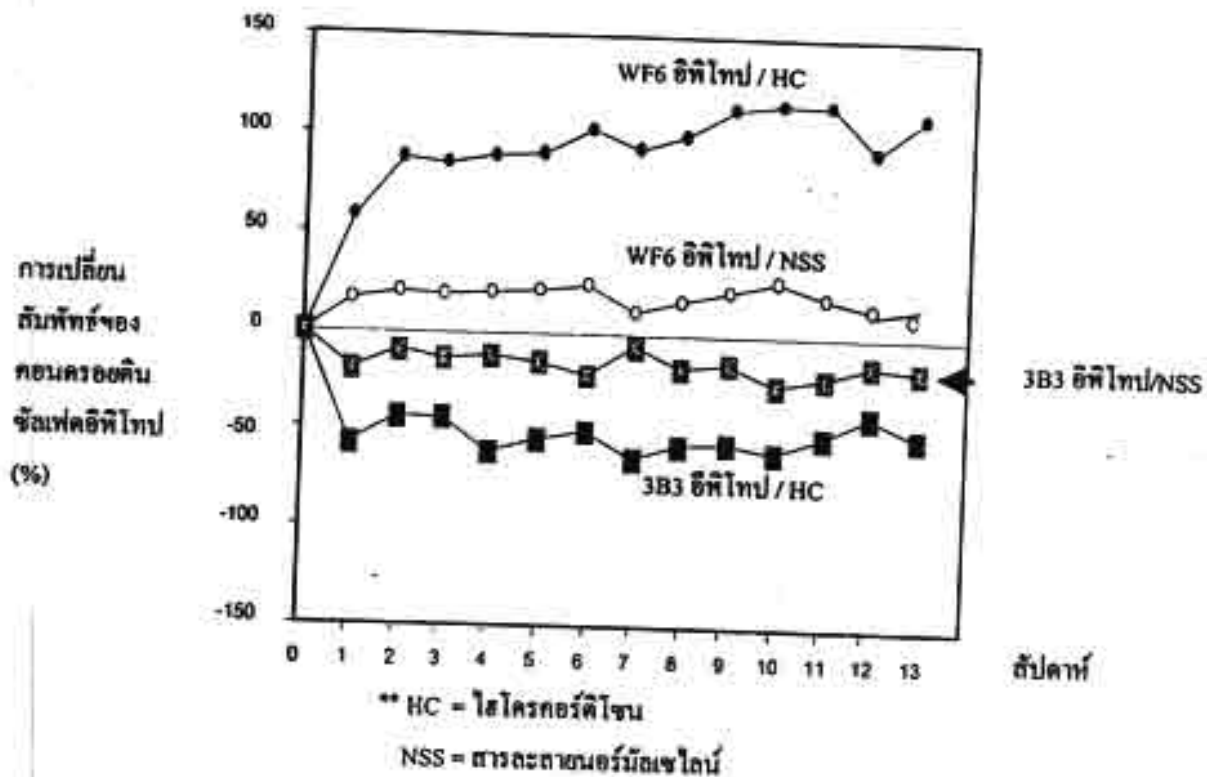
7.3 ทำการเปรียบเทียบกับ โมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด 3B3 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่มีวางจำหน่าย และเป็นที่ยอมรับว่าทำปฏิกิริยาได้กับคอนครอยติน จัดเฟด ที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated chnodoitin sulfate) และแสดงให้เห็นการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนไกลิแคนมากขึ้น

5 7.4 ทำการศึกษาหาปริมาณของสารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนไกลิแคน โดยการตรวจวัดปริมาณของกรดยูโรนิก ซึ่งเป็นตัวชี้วัดระดับของสารชีวโมเลกุลชนิดนี้ได้ในการปลูกอ่อน ซึ่งแสดงผลไว้ในรูปที่ 6



รูปที่ 7 แสดงปริมาณของกรดยูโรนิก ซึ่งเป็นตัวแทนของปริมาณของสารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนไกลิแคนในการปลูกอ่อนของสัตว์ทดลอง

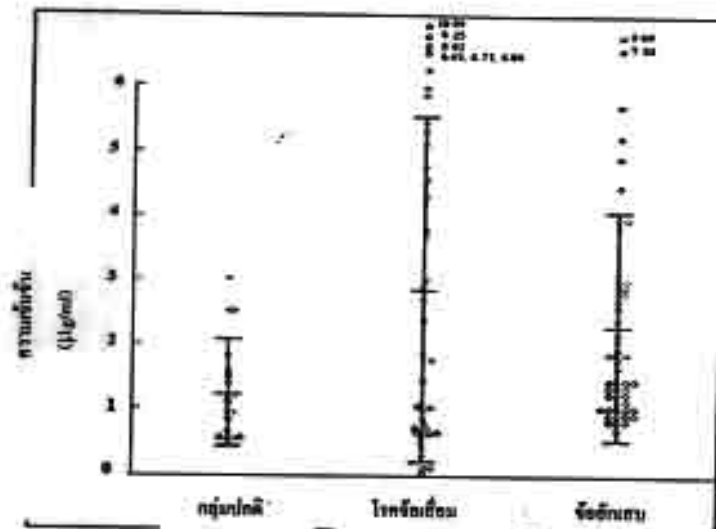
15 7.5 ปริมาณที่ตรวจวัดได้นำมาเขียนเพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับของคอนครอยติน 6-ซัลเฟต โดยทำการศึกษาร่วมกับการตรวจวัดด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด 3B3 ซึ่งแสดงผลไว้ในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงผลการทดลองการตรวจวัดปริมาณของโปรตีนไอโกลัยแคน ชนิด
คอนครยติ 6-ซัลเฟต โดยโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ในซีรัม
ของกระต่ายกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน
โดยการฉีดเข้าข้อด้วยไฮโดรคอร์ติโซน และกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำ
เกลือ (normal saline solution)

ผลจากการศึกษาพบว่า โมโนโคลนอล แอนติบอดี สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจวัด
ปริมาณของสารชีวโมเลกุล โปรตีนไอโกลัยแคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ประกอบไปด้วย คอนครยติ 6-
ซัลเฟต และการตรวจวัดนี้สามารถบอกถึงการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนได้เป็นอย่างดี โดยได้มีราย
งานมาจำนวนมากแล้วว่าการใช้ไฮโดรคอร์ติโซนจำนวนมาก ๆ นั้น จะสามารถทำลาย หรือทำให้
กระดูกอ่อนเสื่อมสภาพได้ จากกราฟจะเห็นได้ว่าการเพิ่มขึ้นของสารชีวโมเลกุลนี้ที่สามารถตรวจวัด
ได้ ซึ่งสามารถเรียกได้ว่าเป็น WF6 อิทธิพล และจากผลการทดลองนี้ ยังสามารถชี้ให้เห็นว่าจะ
สามารถติดตามความรุนแรงของการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนได้อีกด้วย

8. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 เพื่อการตรวจหาสารบ่งชี้ (biomarker) สำหรับการวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) และข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis)
 - 8.1 นำซีรัมของคนไข้โรคข้อเสื่อม และข้ออักเสบ มาตรวจวิเคราะห์หาสารบ่งชี้โดย โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 โดยการใช้ซีรัมที่เจือจาง 5 เท่า ด้วย 6 % BSA-PBS
 - 5 8.2 ทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีอีไลซ่าชนิดแข่งขัน ซึ่งรายงานไวโนข้อ 3 โดยการนำเอาซีรัมที่เจือจางแล้วแทนตัวยับยั้ง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟทดลองที่ใช้ลำดับส่วนโปรตีนโกลัยแคน A1 (proteoglycan A1-fraction) จากกระดูกอ่อนปลาฉลามเป็นสารมาตรฐาน
 - 8.3 ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่เป็นซีรัมของคนปกติซึ่งมีอายุไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกลุ่มที่เป็นโรคดังกล่าว
 - 10 8.4 ผลการทดลองนำมาหาค่าทางสถิติ และเขียนเป็นแผนภูมิการกระเจิง (scatering chart) ดังรูปที่ 9



	WF6 ออปติคัล
	(กม.ล.)
กลุ่มปกติ	1.18 ± 0.81 (N = 20)
โรคข้ออักเสบ	$2.73 \pm 2.63^*$ (N = 49)
ข้ออักเสบ	$2.29 \pm 1.70^*$ (N = 56)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

รูปที่ 9 แสดงระดับของสารชีวโมเลกุลชนิด โปรตีนโอกลัยแคน ชนิด คอนครอยติน 6-ซัลเฟต ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดย โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6

จากการทดลอง พบว่าโมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 สามารถใช้ประยุกต์เพื่อการตรวจวัดระดับของสารบ่งชี้โรคข้ออักเสบ และข้ออักเสบได้ โดยอาจจะพบว่าค่าของสารบ่งชี้ในคนไข้บางคนยังอยู่ในช่วงเดียวกับคนปกติ นั้น อาจจะเป็นเพราะว่ามีความรุนแรงของโรคแตกต่างกัน อีกทั้งคนไข้บางคนนั้นได้รับยารักษาโรคมานานแล้วจึงทำให้ระดับมีความแตกต่างกันบ้าง ซึ่งอาจจะทำให้แปลผลได้ว่าการตรวจวัดโดยใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 นี้ยังสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ เพื่อติดตามผลการรักษาได้อีกด้วย

9. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 เพื่อการติดตามผลการรักษาโรคข้อ โดยการทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง

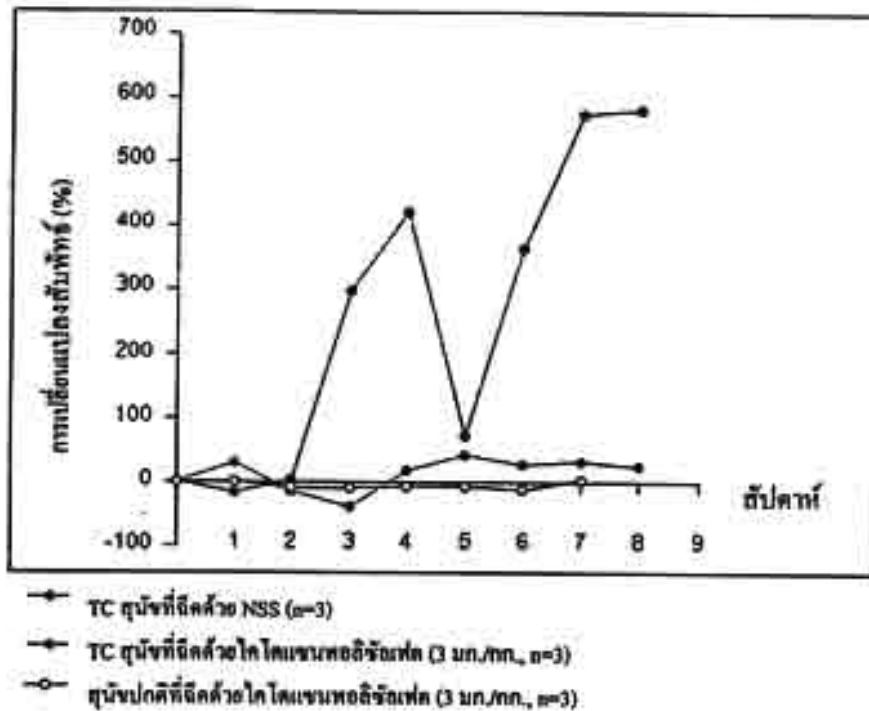
9.1 ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคข้อเสื่อมในสุนัข โดยการผ่าตัด (cruciate ligament transection) โดยทำการผ่าตัดที่ข้อเท้าหลังซ้ายของสุนัขโดยสัตวแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ จำนวน 6 ตัว โดยแบ่งกลุ่มออกเป็นสองกลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว

9.2 โดยที่กลุ่มหนึ่งฉีดด้วยน้ำเกลือทางการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) ทุกสัปดาห์ ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งฉีดด้วยไคโตแซน พอลิซัลเฟต (chitosan polysulfate) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ พอลิซัลเฟต พอลิแซ็กคาไรด์ (polysulfated polysaccharides) ที่พบว่ามียุทธศาสตร์สามารถทำหน้าที่เป็นคอนไดร โพรเทคชั่น (chondroprotection) ได้ โดยใช้ความเข้มข้น 3mg / kG น้ำหนักตัว

9.3 สุนัขกลุ่มที่ 3 จำนวน 3 ตัว จะไม่ถูกผ่าตัดข้อเพื่อทำให้เกิดโรค เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม โดยจะฉีดไคโตแซน พอลิซัลเฟต ทางฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) โดยใช้ความเข้มข้น 3mg / kG น้ำหนักตัว โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

9.4 ทำการเจาะเลือดเพื่อเตรียมเป็นซีรัม เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ โปรตีนโอกลัยแกน ชนิด คอนดรอยติน 6-ซัลเฟต โดยใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 (WF6 epitope) ดังรายละเอียดข้อที่ 3 และข้อที่ 7

9.5 จากนั้นนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบดังรูปที่ 9



รูปที่ 10 แสดงระดับของ โปรตีนโอกลัยแคน ชนิด คอนครอยติน 6-ซัลเฟต ในซีรัมของสัตว์ทดลองที่เปลี่ยนแปลง (percentage of relative change) เมื่อมีการดำเนินการของโรค และเมื่อสัตว์ทดลองได้รับการรักษาด้วยไคโดเซนพอลิซัลเฟต โดยเปรียบเทียบกับระดับของตัวเองเมื่อยังไม่ได้ทำการทดลอง

5 ผลจากการทดลอง แสดงให้เห็นชัดว่าไบโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 สามารถประยุกต์เพื่อ
10 การตรวจวัดระดับการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน เพื่อการประเมินผลการรักษา หรือความรุนแรงของโรคได้

10. การประยุกต์ใช้เพื่อการประเมินการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อนในหลอดทดลอง โดยการเลี้ยงชิ้นของกระดูกอ่อน (cartilage explant tissue culture)

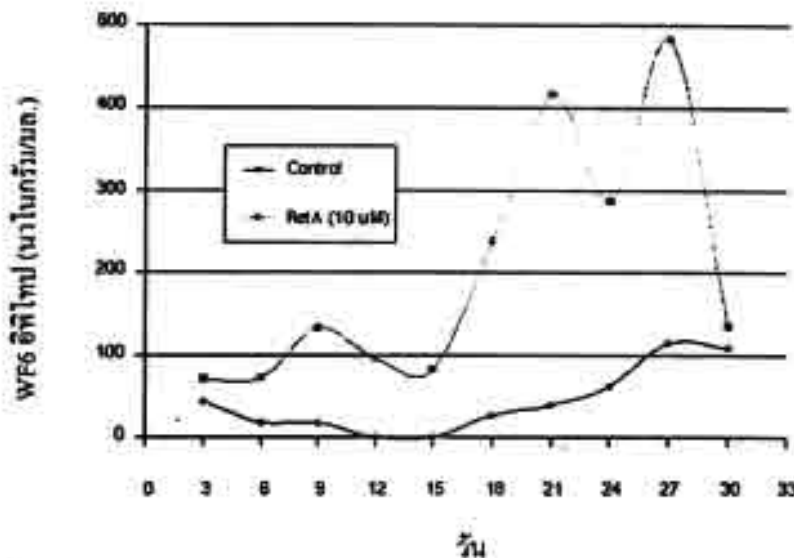
10.1 นำชิ้นกระดูกอ่อนชิ้นเล็ก ๆ ที่มีขนาดใกล้เคียงกันของหมูมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรีย และภายใต้อุณหภูมิ 37 °C โดยมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

5. 10.2 ทำการกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน โดยการใช้กรดเรติโนอิก (retinoic acid)

10.3 เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดช่วงที่ทำการทดลองเพื่อนำมาหาปริมาณของโปรตีนออกิลลิแคน โดยการใช้ ไมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 โดยวิธีอิมมูโนแอสเซย์ ดังแสดงไว้ในข้อ 3

10.4 นำระดับของ WF6 อิมูโนแอสเซย์ ที่วัดได้มาสร้างกราฟในช่วงเวลาต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 11

การปลดปล่อยของ CSPG (WF6 อีพิโทป) จากเอกซัแทนท์ของกระดูกอ่อนที่ชักนำโดย RA



รูปที่ 11 แสดงการตรวจวัดระดับของคอนครอยติน ซัลเฟต โปรตีโอไกลัยแคน (WF6 epitope) โดยการใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 และเทคนิคอีไลซ่าชนิดแข่งขัน เพื่อการประเมินการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนในหลอดทดลองโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (cartilage explant tissue culture technique)

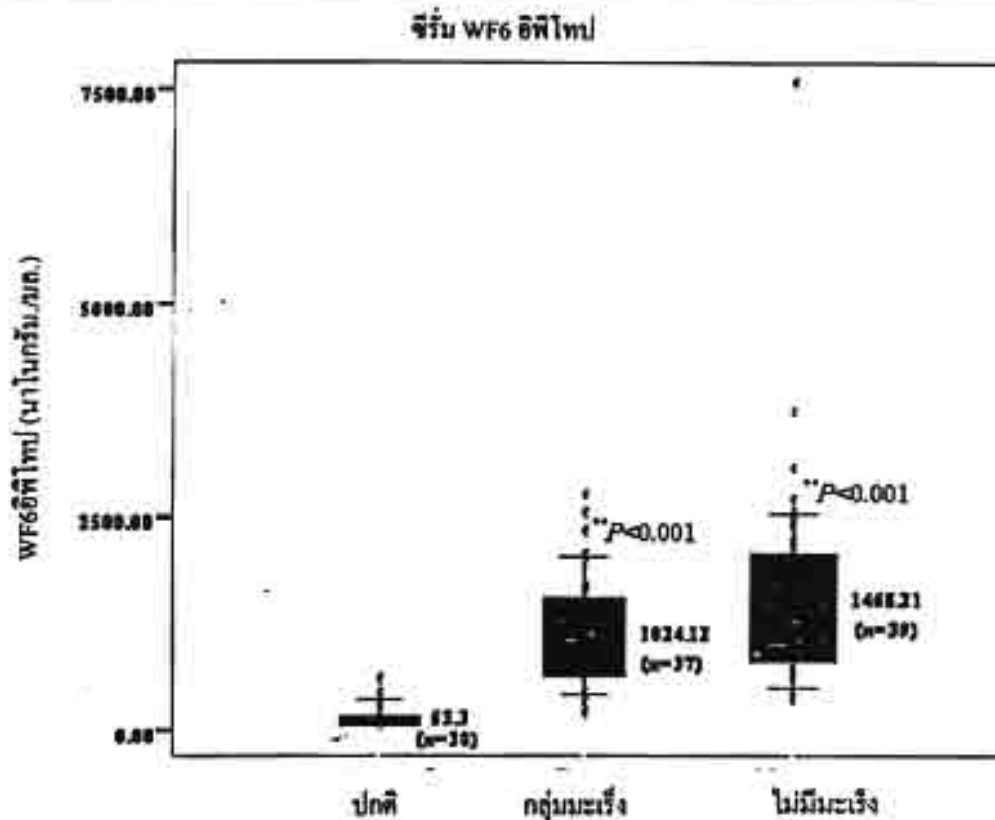
จากการทดลองพบว่า เมื่อมีการสลายของกระดูกอ่อน โดยการกระตุ้นด้วยกรดเรติโนอิก ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีรายงานมาแล้ว สามารถใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 ตรวจวัด และประเมินสารบ่งชี้ (marker, WF6 epitope) ได้ในน้ำเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า สามารถนำเอา โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 นี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อการประเมินการเสื่อมสลายของกระดูกในการทดลองในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

11. การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี WF6 เพื่อการตรวจวัดสารบ่งชี้ (marker) ในโรคมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer)

จากการศึกษาพบว่า มะเร็งหลายชนิด มีการสร้างสารชีวโมเลกุลชนิดคอนครอยติน ซัลเฟต โปรตีโอไกลัยแคน ได้มากกว่าเนื้อเยื่อปกติ อีกทั้งยังทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบ ๆ มะเร็งนั้น ๆ เพื่อทำให้เกิด

การกระจายตัวของเซลล์มะเร็งได้มากขึ้น หรือเร็วขึ้นจึงทำให้เป็นเหตุผลที่จะใช้โมโนโคลนออกแอนติบอดี WF6 นี้มาประยุกต์ใช้เพื่อการประเมินสารบ่งชี้สถานะของพยาธิสภาพนี้

- 11.1 นำซีรัมของคนปกติ และคนไข้โรคมะเร็งรังไข่ และโรคที่เกี่ยวข้องกับรังไข่มาเป็นตัวอย่าง โดยได้รับการรับรองทางจริยธรรมวิจัยเรียบร้อยแล้ว
- 5 11.2 นำซีรัมมาทำการทดสอบ เพื่อการตรวจวัดระดับของ WF6 อีพีโทป โดยวิธีอีไลซ่าชนิดแข่งขัน
- 11.3 สร้างกราฟโดยการเปรียบเทียบระหว่างแต่ละกลุ่ม และหาค่าความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 กราฟแสดงระดับของคอนครอยติน จัฒเฟต โปรตีนโอกลัยแทน (WF6 epitope) ในจี้รึบของคณไ้มะเร็งรังไข่ (Cancer) และโรคที่มีความผิดปกติของรังไข่ (Ovarian tumor)

5

จากผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดระดับของคอนครอยติน จัฒเฟต โปรตีนโอกลัยแทน (WF6 epitope) สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของความผิดปกติของรังไข่ได้

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

10

เหมือนกับที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้ออธิบัต

1. ไมโนโคลนอล แอนติบอดีที่มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยาได้กับคอนครอยติน จัลเฟด โปรติโอกลัยแกน, คอนครอยติน จัลเฟด พอลิเมอร์ และคอนครอยติน จัลเฟด โอลิโกแซคคาไรด์
2. ไมโนโคลนอล แอนติบอดีตามข้ออธิบัต 1 ที่ซึ่งไมโนโคลนอล แอนติบอดีที่กล่าวถึงเป็นกลุ่มเซลล์ชนิด IgM หรือสายเบาแคปปา (Kappa light chain)
3. ไมโนโคลนอล แอนติบอดีตามข้ออธิบัต 1 หรือ 2 ที่ซึ่งไมโนโคลนอล แอนติบอดีที่กล่าวถึงทั้งที่อยู่ในรูปของ แอนติบอดีที่คอนจูเกตกับเอนไซม์ (enzyme conjugated antibody), ไบโอดีโนเลทแอนติบอดี (biotinylated antibody), ฟลูออเรสเซนส์แอนติบอดี (fluorescence antibody), แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (radioactive labelled antibody), แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยทอง (gold labelled antibody) และชิ้นส่วนของโมเลกุลของแอนติบอดีที่ยังคงคุณสมบัติที่จำเพาะไว้ ชิ้นส่วนที่เตรียมได้จากการใช้เอนไซม์ หรือสารเคมีตัดแยก
4. ไมโนโคลนอล แอนติบอดีตามข้ออธิบัต 1 ที่ซึ่งคอนครอยติน จัลเฟด โปรติโอกลัยแกน, คอนครอยติน จัลเฟด พอลิเมอร์ และคอนครอยติน จัลเฟด โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นชนิดที่มีหมู่ซัลเฟตอยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 เป็นสำคัญ และมีรูปแบบการเติมหมู่ซัลเฟตที่จำเพาะ (specific sulfatation pattern)
5. ไมโนโคลนอล แอนติบอดีตามข้ออธิบัต 1 ที่ซึ่งคอนครอยติน จัลเฟด โอลิโกแซคคาไรด์ที่กล่าวถึง มีขนาดตั้งแต่ 8 - 12 หน่วยน้ำตาลเป็นต้นไป หรือใหญ่กว่า (octa / dodecasaccharides)
6. คอนครอยติน จัลเฟด พอลิเมอร์ และคอนครอยติน จัลเฟด โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากกระดูกอ่อนปลาฉลาม หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากสัตว์ หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ หรือกรรมวิธีที่มีการสังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมี หรือเทคโนโลยีชีวภาพ ที่มีหมู่ซัลเฟตอยู่ที่ตำแหน่งที่ 6 เป็นสำคัญ และมีรูปแบบการเติมหมู่ซัลเฟตที่จำเพาะ
7. ผลิตภัณฑ์ได้จากเซลล์ไลน์ (cell lines) ซึ่งเป็น ไมโนโคลนอล แอนติบอดี ตามข้ออธิบัต 1 ถึง 6 ข้อใดข้อหนึ่ง สามารถทำการผลิตขึ้นได้จาก ตัวทดลอง (ascitic fluids), เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture technique) หรือเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ (gene cloning, phage display, genetic engineering)

8. การใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดีตามข้อดีข้อเสีย 1 เพื่อวินิจฉัยโรคข้อเสื่อม ข้ออักเสบ,
โรคมะเร็ง, โรคที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน, หรือโรคในช่องปาก และการตรวจหาสาร
ชีวโมเลกุลชนิดคอนครอยติน ซัลเฟต โปรตีนไกลิแคนในตัวอย่างต่างๆ

5

10

15

20

25

บทสรุปการประดิษฐ์

การผลิต และศึกษาคุณสมบัติของโมโนโคลนอล แอนติบอดีชนิด WF6 ที่สามารถทำปฏิกิริยา
ได้กับสารชีวโมเลกุลชนิด โอลิโกแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ ที่มีคอนครอยติน 6-ซัลเฟต เป็นส่วน
ประกอบหลัก แล้วนำมาพัฒนาเพื่อเป็นส่วนสำคัญของชุดตรวจสอบวัดปริมาณระดับของสารชีวโมเลกุล
5 ที่มีคอนครอยติน 6-ซัลเฟต ซึ่งสามารถใช้ให้เกิดประโยชน์เพื่อการวินิจฉัยโรคที่มีระดับของสารชีว
โมเลกุลนี้มีปริมาณมากกว่าปกติ เช่น โรคข้อเสื่อม และโรคมะเร็งบางชนิด สามารถใช้เพื่อการติดตาม
ความรุนแรงของโรค หรือการรักษาโรค ศึกษาการกระจายตัวโดยการย้อมด้วยวิธีทางการย้อมสีเนื้อเยื่อ
ทางอิมมูน (immunohistostaining) และสามารถใช้เป็นเครื่องมือเพื่อศึกษาการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อน
10 ในหลอดทดลอง หรือในสภาวะที่มีสารหรือยาที่มีผลต่อการเสื่อมสลายของกระดูกอ่อนได้ โดยการเพาะ
เลี้ยงกระดูกอ่อน

15

20

25

30

หนังสือสัญญาโอนสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร

เขียนที่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน
แขวงสามเสนใน เขตพญาไท
กรุงเทพฯ 10400

วันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2547

สัญญาระหว่างผู้โอน คือ นายปรัชญา คงทวีเลิศ อยู่ที่ 181/22 หมู่ที่ 2 ถนนริมคลอง
ชลประทาน ตำบลช้างเผือก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50300 และผู้รับโอนคือ สำนักงาน
กองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย นายปิยะวัติ บุญ-หลง ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย อยู่ที่ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสาม
เสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400 และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดย นายนิพนธ์ สุวานนท์ ตำแหน่ง
อธิการบดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อยู่ที่ ถนนห้วยแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

โดยสัญญาผู้โอนซึ่งเป็นผู้ประดิษฐ์ที่เกี่ยวข้องกับ ไมโครคอนโทรลเลอร์แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยา
ได้กับคอนครอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์และคอนครอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์และการ
นำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค โอนสิทธิในการประดิษฐ์ดังกล่าว ซึ่งรวมทั้งสิทธิในการขอรับ
สิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรและสิทธิอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องให้แก่ผู้รับโอน

เพื่อเป็นหลักฐานแห่งการนี้ ผู้โอนและผู้รับโอนได้ลงลายมือชื่อไว้ข้างล่างนี้

ลงชื่อ ผู้โอน
(นายปรัชญา คงทวีเลิศ)

ลงชื่อ ผู้รับโอน
(นายปิยะวัติ บุญ-หลง)

ลงชื่อ ผู้รับโอน
(นายนิพนธ์ สุวานนท์)

หนังสือมอบอำนาจ

เขียนที่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน
แขวงสามเสนใน เขตพญาไท
กรุงเทพมหานคร 10400

โดยหนังสือนี้ ข้าพเจ้า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย นาย ปิยะวัติ บุญ-หลง ตำแหน่ง ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย อยู่ที่ ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร 10400 และ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดย นายนิพนธ์ ตวานนท์ ตำแหน่ง อธิการบดี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อยู่ที่ ถนนห้วยแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200 ขอมอบหมายและแต่งตั้งให้ นายมงคล แก้วมหา แห่งมูลนิธิสถาบันทรัพยากรสิ่งแวดล้อมแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อยู่ที่ 344 ซอยจุฬาฯ 22 ถนนบรรทัดทอง แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330 เป็นตัวแทนและผู้รับมอบอำนาจของข้าพเจ้าอันแท้จริงและชอบด้วยกฎหมาย เพื่อข้าพเจ้าและในนามของข้าพเจ้าในประเทศไทย ให้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร หรืออนุสิทธิบัตรและให้ได้มาซึ่งสิทธิบัตร หรืออนุสิทธิบัตร ภายใต้ชื่อ

โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับคอนดรอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์และ
คอนดรอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค

ให้รับโอนการประดิษฐ์ การออกแบบผลิตภัณฑ์ สิทธิบัตร อนุสิทธิบัตร คำขอรับสิทธิบัตรและคำขอรับอนุสิทธิบัตร ต่างๆ และเพื่อความประสงค์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในนามของข้าพเจ้าให้ลงนามและยื่นบรรดาหนังสือและเอกสาร ทั้งมวลซึ่งตัวแทนผู้รับมอบอำนาจในฐานะดังที่ได้กล่าวมาแล้ว อาจคิดเห็นว่าเป็นการจำเป็นหรือพึงต้องการ ให้เปลี่ยนแปลง แก้ไข และเพิกถอนคำขอรับสิทธิบัตร หรืออนุสิทธิบัตร และเอกสารต่างๆ เช่นว่ามานั้น ให้ไปปฏิบัติการ ณ สถานที่ทำการรัฐบาลหรือ ณ ที่อื่นใดในประเทศไทยหรือต่างประเทศ ให้ต่อสู้หรือป้องกันคำขอรับ สิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรให้พ้นจากการปฏิเสธ การคัดค้านหรือการขัดขวางใดๆ ให้ยื่นคำร้องคัดค้านและยื่นอุทธรณ์ ให้ชำระค่าธรรมเนียมทั้งหลายทั้งปวง และให้แต่งตั้งหรือยกเลิกการแต่งตั้งตัวแทนช่วงภายในอำนาจของตัวแทนผู้รับ มอบอำนาจ เพื่อกะทำการอย่างหนึ่งอย่างใด หรือกระทำการทั้งมวลดังที่กล่าวมาแล้วนั้น ที่ได้กระทำไปโดยชอบ ด้วยกฎหมาย อาศัยอำนาจแห่งหนังสือนี้ ข้าพเจ้าขอรับผิดชอบต่อการกระทำของผู้รับมอบอำนาจที่ได้กระทำการ ภายในวิสัยประสงค์ของการมอบอำนาจข้างต้น เสมือนเป็นการกระทำของข้าพเจ้าเอง เพื่อเป็นหลักฐานข้าพเจ้าได้ลง นามไว้ต่อหน้าพยาน

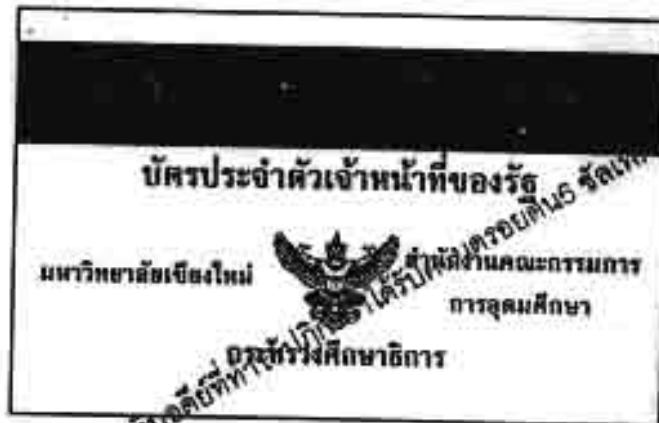
ลงวันที่ ณ วันที่ 1 มีนาคม พ.ศ. 2547



ลงชื่อ ผู้มอบอำนาจ
(นายปิยะวัติ บุญ-หลง)

ลงชื่อ ผู้มอบอำนาจ
(นายนิพนธ์ ตวานนท์)

ลงชื่อ ผู้รับมอบอำนาจ
(นายมงคล แก้วมหา)



รับรองสำเนาถูกต้อง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิพนธ์ ตูวานนท์)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หน้า ๑๑

เล่ม ๑๑๗ ตอนที่ ๘๘ ง

ราชกิจจานุเบกษา

๗ พฤศจิกายน ๒๕๔๓

ประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี
เรื่อง แต่งตั้งอธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตามที่มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้ง นายโชติ ชีตรานนท์ ให้ดำรงตำแหน่งอธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ ๑๐ พฤศจิกายน ๒๕๓๕ ตามประกาศสำนักนายกรัฐมนตรี ลงวันที่ ๕ ตุลาคม ๒๕๓๕ นั้น

บัดนี้ นายโชติ ชีตรานนท์ ได้ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาจะครบกำหนดตามวาระในวันที่ ๕ พฤศจิกายน ๒๕๔๓ จึงมีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ แต่งตั้ง นายนิพนธ์ ตวานนท์ ให้ดำรงตำแหน่ง อธิการบดีมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตั้งแต่วันที่ ๑๐ พฤศจิกายน ๒๕๔๓

ประกาศ ณ วันที่ ๑๑ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๔๓

ผู้รับสนองพระบรมราชโองการ

ชวน หลีกภัย

นายกรัฐมนตรี

กฤษณ์ ฤกษ์ชัย
มอคค เกษมณ

คำสั่งคณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ที่ 1/2544

เรื่อง แต่งตั้งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

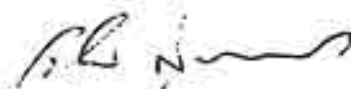
.....

ตามที่วาระการดำรงตำแหน่ง 4 ปี ในวาระที่สองของ ศาสตราจารย์นายแพทย์ วิจารณ์ พานิช ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยคนปัจจุบัน ซึ่งเริ่มตั้งแต่วันที่ 8 เมษายน 2540 เป็นต้นมา จะสิ้นสุดลงในวันที่ 7 เมษายน 2544 นั้น

คณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย ในการประชุมครั้งที่ 1/2544 เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2544 ได้พิจารณาคัดเลือกผู้ที่จะดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในวาระต่อไป จากผลการดำเนินการสรรหาของคณะกรรมการสรรหาผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในวาระต่อไป ซึ่งได้รับแต่งตั้งตามคำสั่งคณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ 1/2543 ลงวันที่ 3 ตุลาคม 2543 ตามแนวทางในข้อบังคับคณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย ว่าด้วยวาระการดำรงตำแหน่งของผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และแนวทางในการสรรหาผู้สมควรดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ. 2540 และได้มีมติให้ ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง เป็นผู้ได้รับตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในวาระต่อไป

ฉะนั้น อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 14 (5) แห่งพระราชบัญญัติกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ. 2535 จึงแต่งตั้งให้ ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง ดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ตั้งแต่วันที่ 8 เมษายน 2544 เป็นต้นไป เป็นเวลา 4 ปี

สั่ง ณ วันที่ 21 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2544


(ศาสตราจารย์นายแพทย์ จรัส สุวรรณเวลา)
ประธานกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย


5 มีนาคม 2544

(ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง)

ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย



เลขประจำตัวประชาชนของผู้บังคับ

1-5099-00200-75-6

ชื่อ นายปิยะวัติ บุญ-หลง

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

พันตำรวจตรี

(ยังอยู่ สาระสมบัติ)

ตำแหน่ง ปลัดสำนักงานกฤษฎีกา

ผู้ออกบัตร

ลายมือชื่อ
นายปิยะวัติ บุญ-หลง

บัตรประจำตัวเจ้าหน้าที่ของรัฐ



พนักงานองค์การของรัฐ

เลขที่ 1/2546

สำนักงานกฤษฎีกา

วันออกบัตร 15 ธ.ค. 2546 บัตรหมดอายุ 14 ธ.ค. 2552

รับเอกสาร

(ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง)

ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย



พระราชบัญญัติ
กองทุนสนับสนุนการวิจัย

พ.ศ. ๒๕๓๕

ภูมิพลอดุลยเดช ป.ร.

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๘ มีนาคม พ.ศ. ๒๕๓๕

เป็นปีที่ ๔๗ ในรัชกาลปัจจุบัน

พระบาทสมเด็จพระปรมินทรมหาภูมิพลอดุลยเดช มีพระบรมราชโองการโปรดเกล้าฯ ให้ประกาศว่า

โดยที่เป็นการสมควรมีกฎหมายว่าด้วยกองทุนสนับสนุนการวิจัย

จึงทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ตราพระราชบัญญัติขึ้นไว้โดยคำแนะนำและยินยอมของ
สภานิติบัญญัติแห่งชาติ ทำหน้าที่รัฐสภา ดังต่อไปนี้

มาตรา ๑ พระราชบัญญัตินี้เรียกว่า “พระราชบัญญัติกองทุนสนับสนุนการวิจัย พ.ศ. ๒๕๓๕”

มาตรา ๒ พระราชบัญญัตินี้ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษา
เป็นต้นไป

มาตรา ๓ ในพระราชบัญญัตินี้

“การวิจัย” หมายความว่า การค้นคว้าโดยการทดลอง สืบหาหรือการศึกษา
ตามหลักวิชาการเพื่อให้ได้ข้อมูล ความรู้ รวมทั้งการพัฒนาลัทธิและกระบวนการต่าง ๆ อันจะ
สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจ สังคม วิชาการ หรือเป็นพื้นฐานของการพัฒนาประเทศ
ในด้านต่าง ๆ ต่อไป

“กองทุน” หมายความว่า กองทุนสนับสนุนการวิจัย

รัฐมนตรีว่าการศึกษา

ยว

(ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง)

ผู้ช่วยกรรมการเลขาธิการกองทุนสนับสนุนการวิจัย

“คณะกรรมการนโยบาย” หมายความว่า คณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย

“คณะกรรมการประเมินผล” หมายความว่า คณะกรรมการติดตามและประเมินผลการสนับสนุนการวิจัย

“สำนักงาน” หมายความว่า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

“ผู้อำนวยการ” หมายความว่า ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มาตรา ๔ ให้จัดตั้งกองทุนขึ้นกองทุนหนึ่งเรียกว่า “กองทุนสนับสนุนการวิจัย” ประกอบด้วยเงินและทรัพย์สินตามมาตรา ๕ เพื่อเป็นทุนหมุนเวียนและใช้จ่ายในการสนับสนุนการวิจัยอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพในด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี สังคมศาสตร์ มนุษยศาสตร์ การวิจัยเชิงนโยบายและการวิจัยประยุกต์ต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม และวิชาการของประเทศ

ให้กองทุนเป็นนิติบุคคล มีวัตถุประสงค์เพื่อดำเนินกิจการสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยตามพระราชบัญญัตินี้ และให้มีอำนาจกระทำการใด ๆ ที่จำเป็นหรือต่อเนื่องเพื่อบรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวนี้ได้ แต่จะต้องไม่ดำเนินการวิจัยเอง

ให้กองทุนมีสำนักงานใหญ่ในกรุงเทพมหานครเรียกว่า “สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย” โดยให้เป็นหน่วยงานในกำกับของสำนักนายกรัฐมนตรี มีระบบการบริหารงานที่แตกต่างจากระบบราชการเพื่อให้เกิดความคล่องตัวภายใต้นโยบายของคณะกรรมการนโยบาย

มาตรา ๕ เงินและทรัพย์สินของกองทุนประกอบด้วย

(๑) เงินที่รัฐบาลจัดสรรให้

(๒) เงินอุดหนุนจากต่างประเทศรวมทั้งองค์กรระหว่างประเทศ

(๓) เงินหรือทรัพย์สินที่มีผู้มอบให้เพื่อสมทบกองทุน

(๔) ดอกผลหรือรายได้ของกองทุน รวมทั้งผลประโยชน์จากทรัพย์สินทางปัญญาและผลประโยชน์อื่น ๆ ที่เกิดจากการวิจัย

ให้ออเงินงบประมาณกองทุนสนับสนุนการวิจัยตามมาตรา ๒๖ (๒) แห่งพระราชบัญญัติงบประมาณรายจ่ายประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๓๕ จำนวนหนึ่งพันสองร้อยล้านบาทมาเป็นเงินของกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มาตรา ๖ การใช้จ่ายเงินกองทุนให้เป็นไปตามที่คณะกรรมการนโยบายกำหนดโดยให้ใช้เพื่อกิจการดังต่อไปนี้

วิจิตร ภูมิคุ้มกัน

Signature

(ดร. ปิยะ เฉลิมกลิ่น)

(๑) การสนับสนุนการดำเนินงานวิจัย การติดตามประเมินผล การเผยแพร่ผลงานวิจัย และการส่งเสริมการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

(๒) การบริหารกองทุน

(๓) การดำเนินงานของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

มาตรา ๘ เงินกองทุนให้นำไปฝากไว้ที่ธนาคารที่เป็นรัฐวิสาหกิจที่คณะกรรมการนโยบายกำหนด

เงินกองทุนส่วนหนึ่งอาจนำไปซื้อพันธบัตรของรัฐบาล ขององค์การของรัฐหรือของรัฐวิสาหกิจได้ ทั้งนี้ ให้เป็นไปตามที่คณะกรรมการนโยบายกำหนด

มาตรา ๘ รายได้ของกองทุนให้นำเข้าสมทบกองทุนโดยไม่ต้องส่งกระทรวงการคลังตามกฎหมายว่าด้วยเงินคงคลัง หรือกฎหมายว่าด้วยวิธีการงบประมาณ หรือกฎหมายอื่น

มาตรา ๙ ให้มีคณะกรรมการนโยบายกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประกอบด้วยผู้ทรงคุณวุฒิที่มีความรู้และประสบการณ์สูงด้านการวิจัยซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งเป็นประธานกรรมการ ปลัดสำนักนายกรัฐมนตรีเป็นรองประธานกรรมการ ปลัดกระทรวงกลาโหม ปลัดกระทรวงการคลัง ปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ปลัดกระทรวงสาธารณสุข ปลัดกระทรวงอุตสาหกรรม ปลัดทบวงมหาวิทยาลัย เลขาธิการคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และผู้อำนวยการสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เป็นกรรมการโดยตำแหน่ง และผู้ทรงคุณวุฒิอื่นที่มีความรู้และประสบการณ์สูงด้านการวิจัยซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งไม่น้อยกว่าสี่คน และไม่เกินเจ็ดคน เป็นกรรมการ และผู้อำนวยการเป็นกรรมการและเลขานุการ

ประธานกรรมการ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิและผู้อำนวยการต้องไม่เป็นข้าราชการการเมืองที่ปรึกษา เจ้าหน้าที่หรือกรรมการของพรรคการเมือง

มาตรา ๑๐ ประธานกรรมการและกรรมการซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งอยู่ในตำแหน่งคราวละสามปี และอาจได้รับแต่งตั้งอีกได้ แต่รวมแล้วต้องไม่เกินสองวาระติดต่อกัน

ในกรณีที่กรรมการซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งพ้นจากตำแหน่งก่อนวาระหรือ ในกรณีที่คณะรัฐมนตรีแต่งตั้งกรรมการเพิ่มขึ้นในระหว่างที่กรรมการซึ่งแต่งตั้งไว้แล้วยังมีวาระอยู่ในตำแหน่ง ให้ผู้ได้รับแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งแทนหรือเป็นกรรมการเพิ่มขึ้นอยู่ในตำแหน่งเท่ากับวาระที่เหลืออยู่ของกรรมการซึ่งได้แต่งตั้งไว้แล้ว

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เมื่อครบกำหนดตามวาระดังกล่าวในวาระหนึ่ง หากยังมีได้มีการแต่งตั้งกรรมการขึ้นใหม่ ให้

54
(ดร. ปิยะฉะ บุญ-หลง)

กรรมการซึ่งพ้นจากตำแหน่งตามวาระนั้นอยู่ในตำแหน่งเพื่อดำเนินงานต่อไปจนกว่ากรรมการซึ่งได้รับแต่งตั้งใหม่เข้ารับหน้าที่

มาตรา ๑๑ นอกจากการพ้นจากตำแหน่งตามวาระตามมาตรา ๑๐ ประธานกรรมการและกรรมการซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งพ้นจากตำแหน่งเมื่อ

- (๑) ตาย
- (๒) ลาออก
- (๓) คณะรัฐมนตรีให้ออก
- (๔) เป็นบุคคลล้มละลาย
- (๕) เป็นคนไร้ความสามารถ หรือคนเสมือนไร้ความสามารถ
- (๖) ได้รับโทษจำคุกโดยคำพิพากษาถึงที่สุดให้จำคุก เว้นแต่เป็นโทษสำหรับความ

ผิดที่ได้กระทำโดยประมาท หรือความผิดลหุโทษ

มาตรา ๑๒ การประชุมคณะกรรมการนโยบายต้องมีกรรมการมาประชุมไม่น้อยกว่ากึ่งหนึ่งของจำนวนกรรมการทั้งหมด จึงจะเป็นองค์ประชุม

ในการประชุมคณะกรรมการนโยบาย ถ้าประธานกรรมการไม่มาประชุมหรือไม่อาจปฏิบัติหน้าที่ได้ ให้รองประธานกรรมการเป็นประธานในที่ประชุม ถ้าประธานกรรมการและรองประธานกรรมการไม่มาประชุมหรือไม่อาจปฏิบัติหน้าที่ได้ ให้ที่ประชุมเลือกกรรมการคนหนึ่งเป็นประธานในที่ประชุม

การวินิจฉัยชี้ขาดของที่ประชุมให้ถือเสียงข้างมาก กรรมการคนหนึ่งให้มีเสียงหนึ่งในการลงคะแนน ถ้าคะแนนเสียงเท่ากันให้ประธานในที่ประชุมออกเสียงเพิ่มขึ้นอีกเสียงหนึ่งเป็นเสียงชี้ขาด

มาตรา ๑๓ ให้ประธานกรรมการ รองประธานกรรมการและกรรมการได้รับเบี้ยประชุมและประโยชน์ตอบแทนอื่นตามระเบียบที่คณะรัฐมนตรีกำหนด

มาตรา ๑๔ คณะกรรมการนโยบายมีอำนาจหน้าที่ดังต่อไปนี้

- (๑) กำหนดนโยบายและแผนการให้ทุนสนับสนุนการวิจัย
- (๒) กำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการการสนับสนุนการวิจัยของนักวิจัยและหน่วยงานของรัฐ รัฐวิสาหกิจ และเอกชน

(๓) กำหนดนโยบาย วางระเบียบ ข้อบังคับการบริหาร และควบคุมดูแลการดำเนินงานของสำนักงานในการบริหารกองทุน รวมทั้งแต่งตั้งและถอดถอนผู้อำนวยการ

(๔) กำหนดมาตรการการเผยแพร่และถ่ายทอดผลงานวิจัยไปยังผู้ใช้และกำหนดหลักเกณฑ์การแบ่งปันผลประโยชน์ของงานวิจัยที่เกิดขึ้น

- (๕) ระดมเงินทุนจากแหล่งต่าง ๆ เข้าสู่กองทุน
- (๖) วางระเบียบหรือข้อบังคับเกี่ยวกับการรับและจ่ายเงินกองทุน
- (๗) กำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการจัดสรรเงินกองทุน
- (๘) อนุมัติงบประมาณประจำปีสำหรับการดำเนินงานของกองทุนและสำนักงาน
- (๙) ควบคุมดูแลการรับและการใช้จ่ายเงินกองทุน
- (๑๐) ดำเนินงานอื่น ๆ เพื่อสนับสนุนการวิจัย
- (๑๑) เสนอรายงานประจำปีต่อนายกรัฐมนตรี

มาตรา ๑๕ ให้มีคณะกรรมการติดตามและประเมินผลการสนับสนุนการวิจัย ประกอบด้วย ผู้ทรงคุณวุฒิที่มีความรู้และประสบการณ์สูงด้านการวิจัยซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งเป็นประธานกรรมการ ผู้แทนกรมวิชาการเกษตร ผู้แทนกองบัญชาการทหารสูงสุด ผู้แทนสำนักงานประมาณ ผู้แทนสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ผู้แทนกรมบัญชีกลาง ผู้แทนสภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย ผู้แทนสภาหอการค้าแห่งประเทศไทย ผู้แทนสมาคมธนาคารไทย และผู้ทรงคุณวุฒิอื่นที่มีความรู้และประสบการณ์สูงด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี สังคมศาสตร์ หรือนมนุษยศาสตร์ ซึ่งคณะรัฐมนตรีแต่งตั้งไม่น้อยกว่าสี่คนและไม่เกินเก้าคน เป็นกรรมการ และผู้อำนวยการเป็นกรรมการและเลขานุการ

ให้นำมาตรา ๑๐ มาตรา ๑๑ มาตรา ๑๒ และมาตรา ๑๓ มาใช้บังคับโดยอนุโลม

มาตรา ๑๖ คณะกรรมการประเมินผลมีอำนาจหน้าที่ดังต่อไปนี้

- (๑) ติดตาม ตรวจสอบ และประเมินผลงานวิจัยที่ได้รับการสนับสนุน
- (๒) รายงานผลการปฏิบัติงานพร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่อคณะกรรมการนโยบาย

มาตรา ๑๗ ในการปฏิบัติหน้าที่ตามพระราชบัญญัตินี้ คณะกรรมการนโยบายและคณะกรรมการประเมินผล อาจแต่งตั้งคณะอนุกรรมการเพื่อพิจารณาและเสนอความเห็นในเรื่องหนึ่งเรื่องใด หรือมอบหมายให้ปฏิบัติกรอย่างหนึ่งอย่างใดได้ตามที่เห็นสมควร

ให้นำมาตรา ๑๒ และมาตรา ๑๓ มาใช้บังคับกับการปฏิบัติหน้าที่ของคณะอนุกรรมการตามวรรคหนึ่งโดยอนุโลม

มาตรา ๑๘ ให้สำนักงานมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- (๑) บริหารกองทุนตามระเบียบ ข้อบังคับ และมติของคณะกรรมการนโยบาย

รัชดาภรณ์กิติยา

๕.๖

(๒) ศึกษา วิเคราะห์ และประเมินความต้องการการวิจัยในด้านต่าง ๆ ของประเทศทั้งในปัจจุบันและอนาคต และความเหมาะสมในการดำเนินการวิจัยในด้านต่าง ๆ เพื่อสนองความต้องการนั้น เพื่อเสนอให้คณะกรรมการนโยบายพิจารณา

(๓) ประสานงานและสนับสนุนการวิจัย เผยแพร่ผลงานวิจัย และนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ ตลอดจนประเมินผลของการดำเนินการดังกล่าว

(๔) จัดทำรายงานและการบัญชีของกองทุน

(๕) ปฏิบัติงานธุรการของคณะกรรมการนโยบาย และคณะกรรมการประเมินผล

(๖) กระทำการอื่นใดเกี่ยวกับการสนับสนุนการวิจัยตามที่คณะกรรมการนโยบาย และคณะกรรมการประเมินผลมอบหมาย ทั้งนี้ สำนักงานจะไม่ดำเนินการวิจัยเอง

มาตรา ๑๘ สำนักงานมีผู้อำนวยการเป็นผู้มีหน้าที่ควบคุมดูแลงานโดยทั่วไปของสำนักงาน เป็นผู้บังคับบัญชาพนักงานของสำนักงาน และมีอำนาจหน้าที่ดังต่อไปนี้

(๑) เสนอแผนรวมทั้งเป้าหมายของการสนับสนุนการวิจัยตามที่ได้รับมอบหมาย ต่อคณะกรรมการนโยบายเพื่อพิจารณา

(๒) รายงานผลการวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนรวมทั้งผลการดำเนินงานเผยแพร่ และการนำไปใช้ประโยชน์ต่อคณะกรรมการนโยบายและคณะกรรมการประเมินผล

(๓) เสนอรายงานการเงินและการบัญชี และแผนการเงินและงบประมาณของ ปีต่อไปต่อคณะกรรมการนโยบายเพื่อพิจารณา

(๔) เสนอการแต่งตั้งผู้ประเมินโครงการและผู้ประเมินผลงานวิจัยและรายงานผลการติดตามประเมินผลต่อคณะกรรมการประเมินผลเพื่อพิจารณา

(๕) บริหารงานของสำนักงานตามนโยบายและมติของคณะกรรมการนโยบาย และคณะกรรมการประเมินผล

(๖) ดำเนินงานอื่นๆ ตามที่ได้รับมอบหมายจากคณะกรรมการนโยบายและคณะกรรมการประเมินผล

มาตรา ๒๐ ในกิจการเกี่ยวกับบุคคลภายนอก ให้ผู้อำนวยการเป็นผู้กระทำการแทนกองทุน และสำนักงาน ในการนี้ ผู้อำนวยการจะมอบให้บุคคลใด ๆ ปฏิบัติการแทนโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการนโยบายก็ได้

วิมลภาณุภคิณี

มาตรา ๒๑ การบัญชีของกองทุน ให้จัดทำบัญชีตามหลักสากล โดยให้มีการตรวจสอบภายใน

เกี่ยวกับการเงิน การบัญชี และการพัสดุของกองทุน และรายงานผลการตรวจสอบให้คณะกรรมการนโยบายทราบอย่างน้อยปีละหนึ่งครั้ง

มาตรา ๒๒ ให้สำนักงานจัดทမ်းบดุล งบการเงิน และบัญชีทำการส่งผู้สอบบัญชีตรวจสอบภายในหนึ่งร้อยยี่สิบวันนับแต่วันสิ้นปีบัญชีทุกปี

ให้สำนักงานตรวจเงินแผ่นดินเป็นผู้สอบบัญชีของสำนักงานทุกรอบปี แล้วทำรายงานผลการสอบบัญชีเสนอต่อคณะกรรมการนโยบาย

มาตรา ๒๓ ให้นายกรัฐมนตรีรักษาการตามพระราชบัญญัตินี้

วิจิตร ภูมิภักดิ์

ผู้รับสนองพระบรมราชโองการ

อานันท์ ปันยารชุน

นายกรัฐมนตรี

84/

(ดร. ปิยะวัณ บุญ-แสง)

ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

หมายเหตุ :- เหตุผลในการประกาศใช้พระราชบัญญัติฉบับนี้ คือ โดยที่การวิจัยที่มีประสิทธิภาพในด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี สังคมศาสตร์ และมนุษยศาสตร์ และการนำผลของการวิจัยดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ เป็นการจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจ สังคมและวิชาการของประเทศ แต่ในปัจจุบันการวิจัย และการใช้ประโยชน์จากผลของการวิจัยดังกล่าว ยังไม่ได้รับการส่งเสริมและสนับสนุนในด้านงบประมาณจากรัฐบาลอย่างเพียงพอ สมควรจัดตั้งกองทุนสนับสนุนการวิจัยขึ้นเป็นอิสระจากระบบราชการเพื่อส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและการใช้ประโยชน์จากผลของการวิจัยให้กว้างขวางยิ่งขึ้น โดยสามารถดำเนินงานได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อเนื่องและเอื้อต่อการวิจัยเพื่อประโยชน์สูงสุด จึงจำเป็นต้องตราพระราชบัญญัตินี้



เลขหมายประจำตัวของผู้ถือบัตร
3,8401 00084-78 5

ชื่อ นาย มงคล

ชื่อสกุล แก้วมหา

เกิดวันที่ 26 ต.ค. 2520 หมู่ที่ 1 -

ถือบัตร 251/16 หมู่ที่ 1 ต.ปากน้ำพรหม

อ.เมืองระยอง จ.สุราษฎร์ธานี

30 มี.ค. 2542
วันหมดอายุ

29 มี.ค. 2546
วันหมดอายุ


นายแพทย์ศิริ สันติสุข
เจ้าพนักงานสาธารณสุข

บัตรประจำตัวประชาชน

กรมการปกครอง

กระทรวงมหาดไทย

๕๗๕

สำนักงานสาธารณสุข
จังหวัด ระยอง
44/เทศบาลต.ปากน้ำพรหม

**The memorandum of understanding for patent application in Thailand
of monoclonal antibody WF6**

It is acknowledged that those named below are co-discoverers of the monoclonal antibody WF6 and have contributed to its characterization. As a result those named have ownership rights in the intellectual property protected by the patent application. By signing this document, those named are agreeing that the Thailand Research Fund (TRF) and its representative can file the patent application in Thailand.

Kongtawelert, P.

(Prachya Kongtawelert,
Chiang Mai University, Thailand)

Tim Hardingham

Timothy E Hardingham,
Victoria University of Manchester, UK)

K. Sugahara

(Kazuyuki Sugahara,
Kobe Pharmaceutical University,
Japan)

Siriwan Ong-chai

(Siriwan Ong-chai,
Chiang Mai University, Thailand)

Pothacharoen, P.

(Peraphan Pothacharoen,
Chiang Mai University, Thailand)

Natthachai Teingburanathum

(Natthachai Teingburanathum
Chiang Mai University, Thailand)

มูลนิธิสถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University Intellectual Property Institute Foundation

สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University Intellectual Property Institute



ที่ สทปจ. ๑๙๔ / 2547

16 มิถุนายน 2547

เรื่อง ขอส่งเอกสารการจดทะเบียนสิทธิบัตร

เรียน คุณปรีชา คงทวีเลิศ

สิ่งที่ส่งมาด้วย สำเนาคำขอรับสิทธิบัตร เรื่อง โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับคอน ตรอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ และคอนตรอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค

ตามที่สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ได้มอบหมายให้สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการยื่นคำขอรับสิทธิบัตร เรื่อง “โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาได้กับคอนตรอยติน 6-ซัลเฟต โอลิโกแซคคาไรด์ และคอนตรอยติน 6-ซัลเฟต พอลิแซคคาไรด์ และการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการวินิจฉัยโรค” บัดนี้ ทางสถาบันฯ ได้ดำเนินการยื่นคำขอรับสิทธิบัตรเรื่องดังกล่าวต่อกรมทรัพย์สินทางปัญญาเรียบร้อยแล้ว ทางสถาบันฯ จึงใคร่ขอส่งสำเนาคำขอรับสิทธิบัตรมาให้แก่ท่าน เพื่อบันทึกไว้เป็นหลักฐาน

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิศณุ ทรัพย์สมพล)

ผู้อำนวยการ

สถาบันทรัพย์สินทางปัญญาแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Patent II:

United Kingdom Patent Application, Date : August 18, 2004. Title : Antibody

MARKS & CLERK

Intellectual Property

144

European Patent Attorneys
Chartered Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys
Registered Trade Mark Attorneys

Established 1887

Cambridge Office
66 - 68 Hills Road
Cambridge
CB2 1LA

Tel: +44(0)1223 345520
Fax: +44 (0)1223 365560
Email: cambridge@marks-clerk.co.uk
<http://www.marks-clerk.com>

Dr Prachya Kongtawelert
Department of BioChemistry
Faculty of Medicine
Chiang Mai University
Chiang Mai
Thailand 50200

please quote
our reference

GOW/ss/GBP290245

your reference

date

18th August 2004

Dear Prachya

**RE: New United Kingdom Patent Application
In the name of The National Research Council of Thailand**

Further to our previous discussions, I confirm that we have now filed a Patent Application for your invention relating to the WF 6 Antibody against Chondroitin Sulfate with the UK Patent Office. The Application should receive the filing date of 18th August 2004. We will not receive the Filing Receipt for another week or two, but we will forward this to you as soon as we can.

Yours sincerely

Gareth Williams
Marks & Clerk, Cambridge

Partners
E W B Lyndon-Elmhurst LLCs UK Ltd
C J P O'Brien UK Ltd
D Cooper UK Ltd
C Whalley UK Ltd
P J Burrell UK Ltd
B Spink UK Ltd
M R Higgins UK Ltd
D G Tully UK Ltd
A J Gashin UK Ltd
A J Gashin UK Ltd
G E Sullivan UK Ltd
J L Boddison UK Ltd
J A Boddison UK Ltd

A H W Luff UK Ltd
A V Luff UK Ltd
P F Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
C J Gashin UK Ltd
P A Gashin UK Ltd
H D Luff UK Ltd
P F Higgins UK Ltd
P J Higgins UK Ltd
K L Hoddison UK Ltd
B D Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd

J P Hoddison UK Ltd
H C Hoddison UK Ltd
D A Hoddison UK Ltd
A V Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd
S J Hoddison UK Ltd

S Luff UK Ltd
P A Hoddison UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd

S Luff UK Ltd
P A Hoddison UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd
S Luff UK Ltd

M&C Folio: GBP290245

Antibody

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to an antibody and to methods for producing the antibody. Aspects of the invention also relate to diagnostic methods, test kits, and pharmaceutical compositions using the antibody. More particularly, the antibody of the present invention is an antibody to chondroitin sulfate.

BACKGROUND TO THE INVENTION

Joint diseases resulting from osteoarthritis and other diseases which trigger the destruction of cartilage are causes of economic and social loss, and can be considered as major health problems (1, 2).

Osteoarthritis results from the degradation of articular cartilage. It is estimated that up to 60% of the population aged over 75 years old suffer from this disease (3). The real cause of osteoarthritis is still unknown but some reports mention that while this disease is developing cartilage, subchondral bone and synovial membrane undergo some changes. The pathogenesis of this disease causes the affected cartilage to lose resistance to outer impact and also the elasticity and smoothness of the joint.

While rheumatoid arthritis is a progressive destruction of the cartilage similar to osteoarthritis (OA), patients suffering from rheumatoid arthritis (RA) experience the tearing and destruction of macromolecules which are major components of cartilage by proteolytic cleavage; the degradation products are then released to the synovial fluid. The degradation of the surface of articular cartilage and cartilage thickness can be assessed by x-ray diagnosis of the affected joints, but this will only be apparent after a long period of these diseases, which can often be too late for treatment (4, 5).

Provision of an alternative diagnostic test for arthritis and/or other cartilage degradation would therefore be beneficial to patients. In particular, detection of cartilage degradation products in synovial fluid would assist in the development of

diagnostic tests which allow diagnosis at an early stage. Such a test may also assist in monitoring the disease and as a prognosis marker at the different stage of the diseases.

There is an existing test for diagnosis of degenerative joint diseases (6). Quantitation of proteoglycans and their fragments, especially glycosaminoglycans, can be done by an immunoassay using specific monoclonal antibodies to the proteoglycan fragments and other biochemical markers in the cartilage. Monoclonal antibodies have been produced against proteoglycan fragments such as anti-keratan sulfate peptides (KS-peptides) (7), chondroitin sulfate epitopes (CS-epitope) (8, 9), and hyaluronan (HA) (10). Using these antibodies and binding proteins in immunoassays, especially, ELISA-based techniques, can allow a quantitative test of these biomolecules to be performed.

Furthermore, certain types of cancer are known to over-produce these and related biomolecules. Furthermore, cancers can produce many enzymes that degrade biomolecules in connective tissues surrounding them. So, proteoglycans containing chondroitin sulfate can be a useful marker indicating the existence of cancers and can be a potential marker for a prognosis or treatment of disease activities.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present inventors have created a hybridoma cell line which produces a monoclonal antibody specific for a particular chondroitin sulfate epitope. The antibody is designated WF6, and the cell line has been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number PTA-6157. The cell line will be referred to herein as "the WF6 cell line", while "WF6" alone will refer to the antibody. The antibody is shown herein to specifically recognise a short oligosaccharide epitope comprising chondroitin sulfate, and in particular an epitope including at least one chondroitin 6-sulfate unit. A chondroitin sulfate chain consists of a repeating disaccharide unit, D-glucuronate and N-acetyl-D-galactosamine-sulfate linked in a β 1-3 linkage; the chondroitin sulfate oligosaccharide comprises multiple chondroitin sulfate units. Chondroitin sulfate is found in a number of forms, the main ones of which are chondroitin 4-sulfate (also referred to as chondroitin sulfate A, CSA), chondroitin 6-sulfate (or chondroitin sulfate C, CSC), and chondroitin sulfate D, CSD.

According to a first aspect of the present invention, there is provided a WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody.

The invention also comprises functional derivatives of such an antibody, which show the same specificity. Functional derivatives include Fab, Fab' and F(ab)₂ fragments; single chain antibodies; and functional fragments obtained by chemical or enzymatic cleavage of the antibody or molecular biological methods such as phage display technique. Chimeric antibodies are also included within the scope of the invention. The invention further comprises labelled antibodies and functional derivatives thereof. Labelled antibodies include enzyme conjugated antibodies, biotinylated antibodies, fluorescently and radioactive labelled antibodies, gold labelled antibodies, and such like. The skilled person will be aware of suitable techniques for preparing such derivatives; confirming that the antibody has the required specificity may be achieved using the techniques detailed herein which were used to determine the WF6 antibody specificity.

According to a further aspect of the invention, there is provided a hybridoma cell as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number PTA-6157. The invention also relates to functional derivatives of such cells; that is, derived cells which also produce or are capable of producing antibodies having the same specificity as the WF6 antibody. The invention also provides an antibody produced by said cell, and functional derivatives of such antibodies.

A further aspect of the invention provides a monoclonal antibody which recognises a chondroitin sulfate oligosaccharide epitope comprising 8 sugar monomers, the epitope including at least one chondroitin 6-sulfate unit. Preferably the chondroitin 6-sulfate unit is the terminal unit. Detection of the epitope is abolished by digestion of the oligosaccharide with 6-sulfatase, and also by digestion with 4-sulfatase. The epitope is also therefore believed to comprise at least one chondroitin 4-sulfate unit. We believe that at least the sequence Δ DCCC is detected by the WF6 antibody; other specific sequences may also be detected.

According to a further aspect of the invention, there is provided a method of producing monoclonal antibodies, comprising culturing hybridoma cells as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number PTA-6157 in a suitable growth medium, or hybridoma cells producing an antibody having

equivalent specificity to the WF6 antibody; and harvesting growth supernatant to obtain antibodies.

A further method of producing monoclonal antibodies, in accordance with the invention, comprises injecting hybridoma cells as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number PTA-6157, or hybridoma cells producing an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody, into the peritoneum of a host mammal; allowing a tumour to develop; and extracting ascitic fluid from the host mammal. The method may further comprise the step of priming the host mammal prior to injection to produce antibodies; for example, by pristane injection. The host mammal is preferably a non-human mammal, more preferably a rodent, and most preferably a mouse. The host mammal is also preferably of the same type, and optionally also of the same immunological background, as one of the cells used to create the hybridoma. For example, when the cell line X63 Ag 8.653 is used to create the hybridoma (as is the case for the WF6 cell line), the host mammal is preferably a Balb/c mouse.

The invention further provides a method of producing monoclonal antibodies, comprising extracting ascitic fluid from a host mammal having a tumour derived from hybridoma cells as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number PTA-6157, or hybridoma cells producing an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody.

A further aspect of the present invention relates to a method of diagnosis of diseases of connective tissue, the method comprising the steps of obtaining a sample from a patient; contacting the sample with WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent specificity thereto, or a functional derivative thereof; and detecting binding of the antibody to the sample. The antibody will allow detection of degradation products of cartilage or other connective tissue which includes fragments having a chondroitin 6-sulfate component.

The sample may be taken from synovial fluid, other cellular fluid, serum, sputum, tissue samples, tissue culture media, cartilage or the like.

The step of contacting the sample with the antibody may take place *in vivo* or *in vitro* or *in situ*.

The detection step may comprise any convenient detection means; for example, ELISA, indirect ELISA, competitive ELISA, sandwich ELISA, radioimmunoassay,

fluorescent immunoassay, chemiluminescence immunoassay, immunoblotting, immunohistostaining, immunochromatography, immunodiffusion, flow injection analysis, confocal microscope and the like.

The detection step may further comprise quantitating the levels of antibody binding in the sample; this can allow a prognosis of the disease to be obtained.

The disease of connective tissue may be selected from the group comprising osteoarthritis, rheumatoid arthritis, cancers of the connective tissue including sarcomas, cervical and ovarian cancer, and cancer of tissues which produce chondroitin sulfate-containing proteoglycans.

The present invention also provides the use of a WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent specificity thereto, or a functional derivative thereof, in the preparation of a medicament for use in the diagnosis of a disease of the connective tissue.

A further aspect of the present invention comprises a method for diagnosing diseases of connective tissue, the method comprising detecting the presence of chondroitin sulfate oligosaccharides comprising at least 8 sugar monomers, at least one of which is chondroitin 6-sulfate, in a sample. The detection is preferably carried out using a WF6 antibody or an antibody having equivalent specificity thereto.

The present invention further provides a method of detecting chondroitin sulfate oligosaccharides comprising at least 8 sugar monomers, at least one of which is chondroitin 6-sulfate, in a sample, the method comprising contacting the sample with WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent specificity thereto, or a functional derivative thereof; and detecting binding of the antibody to the sample.

A further aspect of the invention provides a test kit comprising a WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent specificity thereto, or a functional derivative thereof. The skilled person will be aware of suitable protocols for the detection of binding of the antibody to a target; for example, various protocols are described herein. The kit may further comprise one or more reagents suitable for the detection of binding of the antibody to a target.

Also provided by the present invention are pharmaceutical compositions comprising WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent

specificity thereto, or a functional equivalent thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

These and other aspects of the present invention will now be described by way of example only with reference to the accompanying drawings, in which:

Figure 1 shows inhibition of WF6 antibody activity by various chondroitin sulfates;

Figure 2 shows an absorbance profile of fractions of oligosaccharides containing chondroitin 6-sulfate from chondroitinase ABC digested CS-C eluted by column chromatography;

Figure 3 shows the level of uronic acid in each fraction from Figure 2 showing IC50 against WF6 antibody using competitive ELISA;

Figure 4 shows the column profile of fraction 6 from Figure 2 analysed by ion exchange FPLC;

Figure 5 shows the effect of sulfatase digestion of the substrate on the reactivity of WF6 antibody;

Figure 6 shows immunohistostaining of human skin tissue section using WF6 as primary antibody;

Figure 7 shows uronic acid content of cartilage from an animal model of cartilage degradation;

Figure 8 shows levels of WF6 epitope in samples from the animal model over time;

Figure 9 shows the level of WF6 epitope in serum of human patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis;

Figure 10 shows the effect of chitosan polysulfate on levels of WF6 epitope on a dog model of cartilage degradation;

Figure 11 shows levels of WF6 epitope in cartilage explants induced by retinoic acid; and

Figure 12 shows levels of proteoglycans containing WF6 epitope in serum from cancer patients.

DETAILED DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

1. The production of hybridoma cells which produce an antibody against chondroitin 6-sulfate.

Purified proteoglycans (A1D1 fraction) from embryonic shark cartilage were used as antigen for the induction of an immune response in Balb/c mice. Spleen cells from mice which gave a high titer of antibody to chondroitin 6-sulfate (chondroitin sulfate C; CS-C) were fused with myeloma cell line X63 Ag8.653 in the ratio of 5:1. The fused cells were cultured in medium containing hypoxanthine, aminopterin, and thymine. Cell cultures were then tested for the production of antibodies by ELISA technique using chondroitin 6-sulfate (chondroitin sulfate C) as coating antigen. A positive cell line was isolated as a monoclonal using a limiting dilution technique. The resulting cell line which produced antibody specifically against chondroitin 6-sulfate was called WF6, and it was found that the isotype of this antibody is Ig M, with Kappa-light chain. The cell line has been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number _____.

2. The production of monoclonal antibody against chondroitin 6-sulfate in ascitic fluid and serum free-medium.

The mass production of this monoclonal antibody WF6 (MAb WF6) can be performed using hybridoma cells injected into the intraperitoneal cavity of Balb/c mice which have been primed by injection with 0.5 ml pristane one week before. Ascitic fluid samples can be obtained after 2-4 weeks which contain a large quantity of MAb WF6.

An alternative technique for mass production makes use of serum-free medium. The hybridoma cell WF6 can be cultured in 10 % fetal calf serum Iscove's modified Eagle's medium, with gradual reduction of the percentage of serum to 5%, 1% and 0% along with an increase in commercial serum-free medium. The final medium should be 100% serum-free media which has been formulated with growth factors. The cells were cultured in 5%CO₂, and 95% humidity and 37 degree C. The supernatant of this media may be further evaluated for antibody activity by ELISA technique and purified further using ammonium sulfate precipitation and chromatography.

3. Characterization of the monoclonal antibody WF6 by ELISA

3.1 Coat plate (polystyrene, Maxisorp Nunc®) with proteoglycans (fraction A1, aggregated form of shark cartilage proteoglycans) and block with 1% BSA

3.2 Prepare the inhibition mixture containing the optimal dilution of MAb WF6 and inhibitor, or standards or unknown samples in equal volume (175 + 175 μ L each) in plastic tubes (1.5 mL tubes), then incubate at 37 degree C for 1 hour.

3.3 Add the inhibition mixture from 3.2 to the coated and blocked plate at 100 μ L/well, and triplicate per sample (three wells), then incubate at 37 degree C for 1 hour.

3.4 Wash plate with washing buffer (PBS-Tween 0.05%) three times and dry before addition of 100 μ L per well of peroxidase conjugated anti-Ig M antibody, then incubate at 37 degree C for 1 hour.

3.5 Wash plate with washing buffer three times, and dry before adding OPD substrate (100 μ L/well), incubate for 15 minutes in the dark, and then stop the reaction by adding of 4 M sulfuric acid (50 μ L/well). Absorbance of the plate was then measured 492/690nm by microplate reader.

3.6 The inhibition graph was plotted showing concentration of inhibitors (or standards) against absorbance (see Figure 1). A range of test compounds were used, being chondroitin sulfate A to E, and the A1D1 proteoglycan fraction.

It was found that the monoclonal antibody shows reactivity (measured as inhibitory activities) only to chondroitin 6-sulfate (CS-C) and CS-D. It was later determined that the CS-D standard compounds contained some chondroitin 6-sulfate units, such that we believe the WF6 antibody shows specificity for chondroitin 6-sulfate containing compounds having a specific pattern of sulfation.

4. Specificity of monoclonal antibody WF6 against oligosaccharides containing chondroitin 6-sulfate.

4.1 Chondroitin 6-sulfate (CS-C) from commercial shark cartilage (Sigma-Aldrich Chemical) was digested with chondroitinase ABC which cleaved the CS-C into small oligosaccharides at various sites. The cleavage products have a double bond at the non-reducing end of the products which has maximal absorption at 232 nm.

4.2 The products from enzyme digestion were separated by column chromatography using a BioGel P-6 column. The absorbance of the column fractions was measured, giving the profile shown in Figure 2.

4.3 The products can be divided into 10 fractions as shown in Figure 2. Each fraction was pooled and concentrated by freeze drying, and the reactivity against MAb WF6 was determined using the method described in section 3. The reactivities from each fraction were compared by calculation of the uronic acid content which gave 50% inhibition (IC₅₀; inhibition concentration at 50%), the results of which are shown in Figure 3. Percentage inhibition can be calculated by $\% \text{ inhibition} = 100 \left[\frac{(A(\text{sample}) - A(\text{blank}))}{(A(\text{control}) - A(\text{blank}))} \times 100 \right]$ where A = absorbance.

It was found that the oligosaccharide fractions which still displayed inhibitory activities were fractions 1 - 6, and by comparison to known standards from previous studies, we determined that fraction number 6 should contain oligosaccharides having 8-12 sugar units (octasaccharides - dodecasaccharides).

4.4 Fraction number 6 of the oligosaccharides was further purified using by ion-exchange chromatography using FPLC and Mono-Q column chromatography using lithium percholate as eluent. The obtained column profile is shown in Figure 4.

From the experimental results above, it was found that the oligosaccharides from gel filtration consisted of various species of chondroitin 6-sulfate oligosaccharides. This demonstrates that the monoclonal antibody WF6 reacts with oligosaccharides containing chondroitin 6-sulfate that have a special pattern of sulfatation as shown in the fingerprinting of Mono-Q ion-exchange FPLC.

5. A sulfate group at position 6 is significant for reaction against monoclonal antibody WF6

5.1 The oligosaccharide fractions d, e and f from the column profile shown in Figure 4 were subjected to digestion with 4- and 6-sulfatase.

5.2 The products from these two enzymes were further evaluated for reactivity against MAb WF6 using competitive ELISA technique as described in section 3.

5.3 The comparison of the reactivities in each product, including a pre-digested sample, is shown in Figure 5. It was found that the sulfate group on the oligosaccharides is required for reactivity against MAb WF6.

Conclusion

When taken together, the results described in sections 3 to 5 above demonstrate that MAb WF6 has reactivity against oligosaccharides and polysaccharides of at least 8 sugar units containing chondroitin 6-sulfate. Furthermore, this reactivity of MAb WF6 requires the functional group of 6-sulfate at the terminal residue because the 6-sulfatase recognises this position. And 4-sulfate needs to be an accessory group, including the specific sulfating pattern along with the oligosaccharide chain.

6. The use of monoclonal antibody WF6 in immunohistostaining of tissues

6.1 Skin tissue samples from the pathological laboratories which had been processed by routine procedures in tissue staining were selected for this study.

6.2 The optimal dilution of MAb WF6 in PBS (for example, 1:500 from ascitic fluid, and 1: 100 tissue culture media) was used as primary antibody in the staining procedure after the tissue section was fixed to the slides.

6.3 Excess antibody was washed from the slide with washing buffer and re-stained with peroxidase conjugated anti-IgM antibody.

6.4 Excess conjugates and non-reacted antibody were washed from the slides, and insoluble substrate added.

6.5 The enzyme reaction was stopped with acid and excess colour washed out; the sample was then observed under light microscope as shown in Figure 6.

7. The application of monoclonal antibody WF6 for the evaluation of cartilage degradation in an animal model

7.1 The animal model was run as previously reported (Kongtawelert et al, 1989) for the induction of cartilage degradation by intra-articular injection of hydrocortisone (Solu-Cortef®). The rabbits were divided into two groups : the control had normal saline solution injection, while the experimental group had hydrocortisone injection of 200mg in every week for up to 12 weeks. Each week before injection the animal was bled for serum preparation.

7.2 The serum samples from each week were assayed for the level of WF6 epitope using the method described in section 3. In addition to this study, the MAb 3B3

(Caterston et al, 1990) has also been used as a biosynthesis marker in cartilage as previously reported.

7.3 At the end of the study, all animals were sacrificed and the articular cartilage were collected for analysis of proteoglycan contents as uronic acid per dried weight of cartilage. This data is shown in Figure 7.

7.5 The level of the WF6 epitope and 3B3 epitope in each week were used to calculate the percentage relative change of each epitope each week. The results are shown in the graph of Figure 8.

It was found that the monoclonal antibody WF6 can be used or applied to use in the technique of immunoassay (competitive ELISA) for quantitation of proteoglycans containing the chondroitin 6-sulfate epitope, and this assay indicates that it can be used as a marker for degradation of cartilage. Figure 8 shows that the WF6 epitope was found at significantly higher levels in hydrocortisone treated animals than normal saline treated animals, and the Figure also demonstrates the early indication of disease activity.

8. The application of MAb WF6 for quantitation of biomarker in diagnosis of osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA)

8.1 Human serum samples from patients with OA, RA and healthy patients were collected to analyze the WF6 epitope. The samples were diluted 5 folds with 6% BSA-PBS to reduce non-specific binding.

8.2 All serum samples were subjected to analysis using competitive ELISA as described in section 3 using shark proteoglycan fraction A1 as relative standards.

8.3 The age of volunteers in each group was not significantly different.

8.4 The level of WF6 epitope from individual samples were plotted as a scatter graph as shown in Figure 9.

It was found that the MAb WF6 can be applied to use in a quantitative assay using immunological method for diagnosis of OA, and RA. However, there were still overlapping of the value in some samples of each group, which might be from the variation of the disease stage, and the treatment of the individual person. In addition, this might be interpreted as showing that the level of WF6 epitope can be used to monitor the disease activities and prognosis as well.

9. The application of monoclonal antibody WF6 for monitoring of treatment in an animal model

9.1 Cruciate ligament transection is used to induce the degradation of cartilage (OA) in 6 dogs by surgical operation at the hind leg (see Batiste et al, 2004).

9.2 These dogs were divided into 2 group (3 each group), one group were injected intramuscularly with normal saline solution and the other group injected with chitosan polysulfate, which is a potential anti-osteoarthritis agent, at the dose of 3mg/kg body weight. The injection was given every week for eight weeks.

9.3 The third group of dogs was not surgically operated upon, and was injected with chitosan polysulfate intramuscularly at 3 mg/kg body weight.

9.4 All of the animals were observed and cared for by a veterinarian. Blood for serum preparation was collected to use for the determination of WF6 by the method described in section 3.

9.5 The relative changes of all experimental animals were averaged in each group and the graph was plotted against time of the study as shown in Figure 10.

It was found that the MAb WF6 can be used in the method of quantitation of its epitope in animal model and can be applied as a marker for monitoring the treatment of the disease, like cartilage degeneration.

10. The application of monoclonal antibody WF6 in the monitoring of cartilage degradation in tissue culture model of cartilage explants

10.1 Porcine cartilage was sterile cut into small pieces and cultured in serum-free media under 37 degree C, and 5% carbon dioxide.

10.2 Retinoic acid was added to the culture at the concentration of 10 μ M for stimulation of cartilage degradation.

10.3 The media were collected every other day for four weeks for determining the level of WF6 epitope using the method described in section 3.

10.4 The level of WF6 epitope from each week was plotted against time (days) of culture as shown in Figure 11.

It was found that the MAb WF6 can be used for monitoring the degradation of cartilage *in vitro* by a well established technique using the induction of retinoic acid when compared with the control. This demonstration showed the applicability of MAb WF6 as a research tool for the cartilage degradation *in vitro*.

11. The application of the monoclonal antibody WF6 for the quantitation of a biomarker in ovarian cancer serum samples

From previous reports (Nash et al, 2002), it was found that there were increased levels of chondroitin sulfate biosynthesis in cancer tissues compared with normal tissues. Furthermore, the cancer cells can produce some kinds of enzymes that can degrade the connective tissues surrounding them. These would make cancer cells intrude through the tissue and metastasize to other areas. We therefore suggest that MAAb WF6 could be used for diagnosis of this pathogenesis including the tumour tissues.

11.1 Serum samples were collected from normal patients, patients having a tumour (non-cancer), and patients with ovarian cancers. This study was approved by the Ethics Committee.

11.2 All serum samples were tested for the determination of WF6 epitope level and compared between group of normal, non-cancer (tumour) and cancer. The results are shown in Figure 12

It was found that the WF6 epitope can be used as a biomarker for the cancerous (ovarian) condition in human.

References

1. Howell DS. Pathogenesis of osteoarthritis. *Am J Med* 1986; 80(4B):24-8
2. Muir H. and Hardingham TE. "Structure of proteoglycan" *Biochemistry of carbohydrate*. W.J. Ehelen Ed.1975; 5:153
3. Hochberg Mc., Altman RD., Brandt KD., Clark BM., Dieppe PA., Griffin MR., Moskowitz RW., Schnitzer TJ. Buidselines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Ostroarthritis of the knee. American Collage of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 1995; 38(11): 1541-6
4. Fassbender HG. Joint destruction in various arthritic disease. *Articular cartilage biochemistry* 1986: 371-90
5. Sexne T. and Heinegard D. Involvement of nonarticular cartilage, as demonstrated by release of cartilage specific protein in Rheumatoid arthritis. *Arthristis Rheum*; 32(9): 1080-86.
6. Hardingham T. and Bayliss M. Proteoglycans of articular cartilage: Change in aging and in joint disease. *Seminar in arthritis and rheumatism*. 1990; 20(3): 12-33
7. Caterson B., Christner JE., Baker TR. Characterization of monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and skeletal keratan sulphate. *J Biol Chem* 1983; 258: 8848-54
8. Caterson B., Christner JE., Baker JR. Monoclonal antibodies against chondroitin sulphate isomer : their use as probes for investigating proteoglycan metabolism. *Biochem Soc Trans*.18,820-3
9. Nathachai T.(1996) Production and characterization of monoclonal antibody against chondroitin 6-sulfate.M.S. Thesis, Chiang Mai University,1997
10. Damrasamon S.(1997)The development of methods for quantitation of serum total sialic acid and hyaluronan.M.S.Thesis, Chiang Mai University,1998
11. Heinegard D., Hascall VC. Aggregation of cartilage proteoglycan III. Characterizations of the proteins isolated from trysin digests of aggregate. *J Biol Chem* 1974; 249(13): 4250-6
12. Fraser JR., Appelgren LE., Laurent TC. Tissue uptake of circulating hyarulonic acid : A Whole body autoradiographic study. *Cell Tissue Res* 1983; 233:285-93

13. Ratcliffe A., Shurety W., Caterson B. The quantitation of a native chondroitin sulphate epitope in synovial fluid lavages and articular cartilage from canine experimental osteoarthritis and disuse atrophy. *Arthritis Rheum* 1993; 36(4): 543-51
14. Kempson GE., Tuke MA., Dingle JT., Barrett AJ., Horsfield PH. The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1976; 428(3): 741-60
15. Ratcliffe A. and Seibel MJ. Biochemical markers of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1990; 2: 770-6
16. Caterson B., Baker JR., Christner JE. Immunological methods for the detection and determination of connective tissue proteoglycan. *J Invest Dermatol* 1982; 79(suppl 1): 45s-50s
17. Williams JM., Downey C., Thonar EJ., Increase in level of serum keratan sulfate following cartilage proteoglycan degradation in the rabbit knee joint. *Arthritis Rheum* 1988; 31(5): 557-60
18. Sweet MB., Coelho A., Schnitzler CM., Schnitzer TJ., Lenz ME., Jakim I., Kuetlner KE., Thonar EJ. Serum keratan sulfate levels in osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 1988; 31(5): 648-52
19. Spector TD., Woodward L., Hall GM., Hammond A., Williams A., Butler MG., James IT., Hart DJ., Thompson PW., Scott DL. Keratan sulfate in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and inflammatory disease. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(10): 1134-7
20. Ghosh P., Sutherland JM., Taylor TK., Bellenger CR., Pettit GD. The effect of bilateral medial meniscectomy on articular cartilage of the hip joint. *J Rheumatol* 1984; 11(2): 197-201
21. Sharif M., George E., Shepstone L., Knudson W., Thonar EJ-MA., Cushnaghan J., Dieppe P. Serum hyaluronic acid level as a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 760-7
22. Cooper EH. And Rathbone BJ. Clinical significance of the immunometric measurements of hyaluronic acid. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 444-51
23. Smith PK., Krohn RI., Hermanson GT., Mallik AK., Garther FH., Prorenzano MD., Fujimoto EK., Goeke NM., Olson BJ. and Klenk DC. Measurement of protein using by bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1):76-85

24. Farndale RH. And Buttle DJ. Improved quantitative and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylene blue. *Biochemica-Biophysica Acta* 1986; 883: 173-77
25. Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 1973; 54:484-89
26. Kongtawelert P, Brooks PM, Ghosh P. Pentosan polysulfate (Cartrophen) prevents the hydrocortisone induced loss of hyaluronic acid and proteoglycans from cartilage of rabbit joints as well as normalizes the keratan sulfate levels in their serum. *J Rheumatol.* 1989 Nov;16(11):1454-9.
27. Caterson B, Mahmoodian F, Sorrell JM, Hardingham TE, Bayliss MT, Carney SL, Ratcliffe A, Muir H. Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. *J Cell Sci.* 1990 Nov;97 (Pt 3):411-7.
28. Batiste DL, Kirkley A, Lavery S, Thain LM, Spouge AR, Gati JS, Foster PJ, Holdsworth DW. High-resolution MRI and micro-CT in an ex vivo rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Aug;12(8):614-26.
29. Nash MA, Deavers MT, Freedman RS. The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clin Cancer Res.* 2002 Jun;8(6):1754-60.]

CLAIMS:

1. A WF6 antibody produced by cell line WF6, or a functional derivative thereof, or an antibody or functional derivative thereof having equivalent specificity to the WF6 antibody.
2. A hybridoma cell as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), under accession number PTA-6157.
3. An antibody, or a functional derivative thereof, produced by the cell of claim 2.
4. An antibody, or a functional derivative thereof, which recognises a chondroitin sulfate oligosaccharide epitope comprising 8 sugar monomers, the epitope including at least one chondroitin 6-sulfate unit.
5. The antibody of claim 4, wherein the chondroitin 6-sulfate unit is the terminal unit.
6. The antibody of claim 4 or 5, wherein the epitope further comprises at least one chondroitin 4-sulfate unit.
7. A method of producing antibodies, comprising culturing hybridoma cells as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) under accession number PTA-6157 in a suitable growth medium, or hybridoma cells producing an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody produced by the cell line PTA-6157; and harvesting growth supernatant to obtain antibodies.
8. A method of producing monoclonal antibodies comprising injecting hybridoma cells as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) under accession number PTA-6157, or hybridoma cells producing an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody produced by the cell line WF6; into the

peritoneum of a host mammal; allowing a tumour to develop; and extracting ascitic fluid from the host mammal.

9. The method of claim 8, wherein the host mammal is a rodent.

10. The method of claim 9, wherein the host mammal is a Balb/c mouse.

11. A method of producing monoclonal antibodies, comprising extracting ascitic fluid from a host mammal having a tumour derived from hybridoma cells as deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) under accession number PTA-6157, or hybridoma cells producing an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody produced by the cell line WF6.

12. A method of diagnosis of diseases of connective tissue, the method comprising the steps of obtaining a sample from a patient; contacting the sample with a WF6 antibody produced by cell line WF6, or an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody, or a functional derivative thereof; and detecting binding of the antibody to the sample.

13. The method of claim 12, wherein the sample is taken from synovial fluid.

14. The method of claim 12, wherein the detection step is selected from the group comprising ELISA, indirect ELISA, competitive ELISA, sandwich ELISA, radioimmunoassay, fluorescent immunoassay, chemiluminescence immunoassay, immunoblotting, and immunohistostaining.

15. The method of claim 12, wherein the detection step further comprises quantitating the levels of antibody binding in the sample.

16. The method of claim 12, wherein the disease of connective tissue is selected from the group comprising osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and cancers of the connective tissue including sarcomas.

17. The use of a WF6 antibody, or an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody, or a functional derivative thereof, in the preparation of a medicament for use in the diagnosis of a disease of the connective tissue.

18. A method for diagnosing diseases of connective tissue, the method comprising detecting the presence of chondroitin sulfate oligosaccharides comprising at least 8 sugar monomers, at least one of which is chondroitin 6-sulfate, in a sample.

19. A method of detecting chondroitin sulfate oligosaccharides comprising at least 8 sugar monomers, at least one of which is chondroitin 6-sulfate, in a sample, the method comprising contacting the sample with a WF6 antibody, or an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody, or a functional derivative thereof; and detecting binding of the antibody to the sample.

20. A test kit comprising a WF6 antibody, or an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody, or a functional derivative thereof.

21. A pharmaceutical composition comprising a WF6 antibody, or an antibody having equivalent specificity to the WF6 antibody, or a functional derivative thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

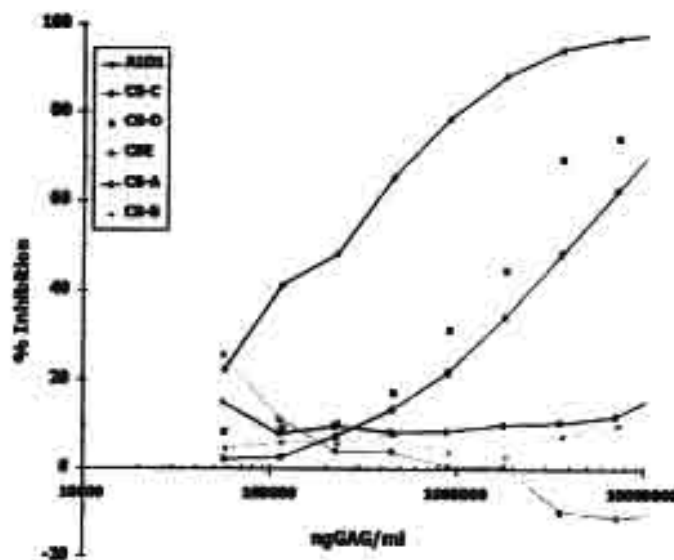


Figure 1 Graph showing the characteristics of monoclonal antibody WF6 reacting with various chondroitin sulfates

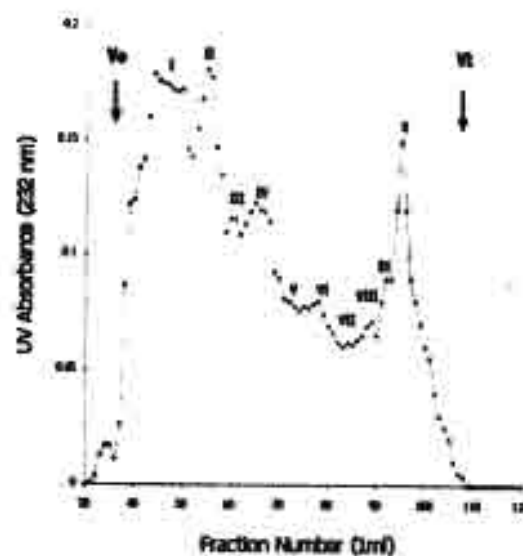


Figure 2 The column profile of oligosaccharides containing chondroitin 6-sulfate from chondroitinase ABC digested CS-C on BioGel P-6 gel filtration

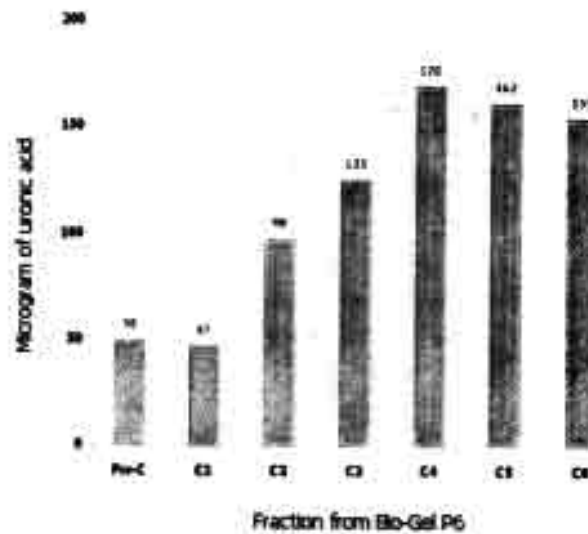


Figure 3. The level of uronic acid in each fraction of oligosaccharides from BioGel P-6 column chromatography which gives reactivities against MAb WF6 at 50 % inhibition (IC₅₀) using competitive ELISA. The number shown in the graph is the amount of uronic acid in microgram.

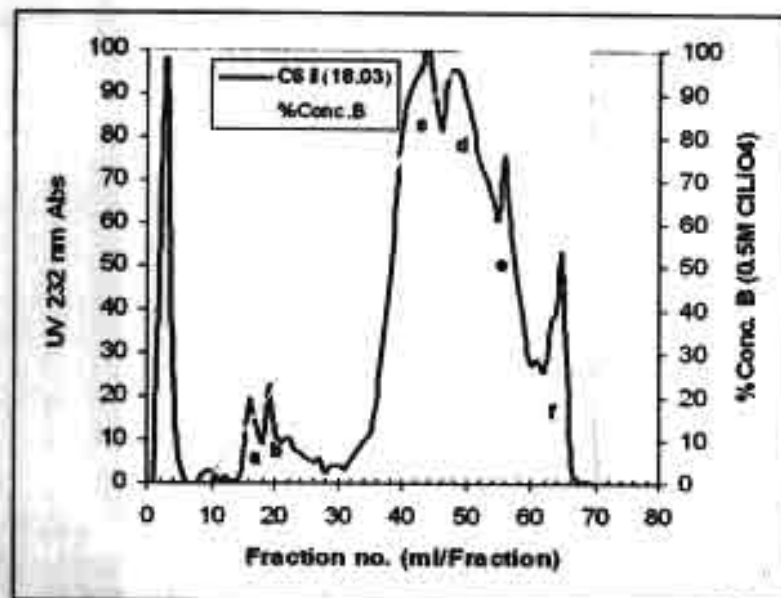


Figure 4 Graph demonstrating the column profile of fraction 6 (from BioGel P-6) on Mono-Q ion-exchange FPLC

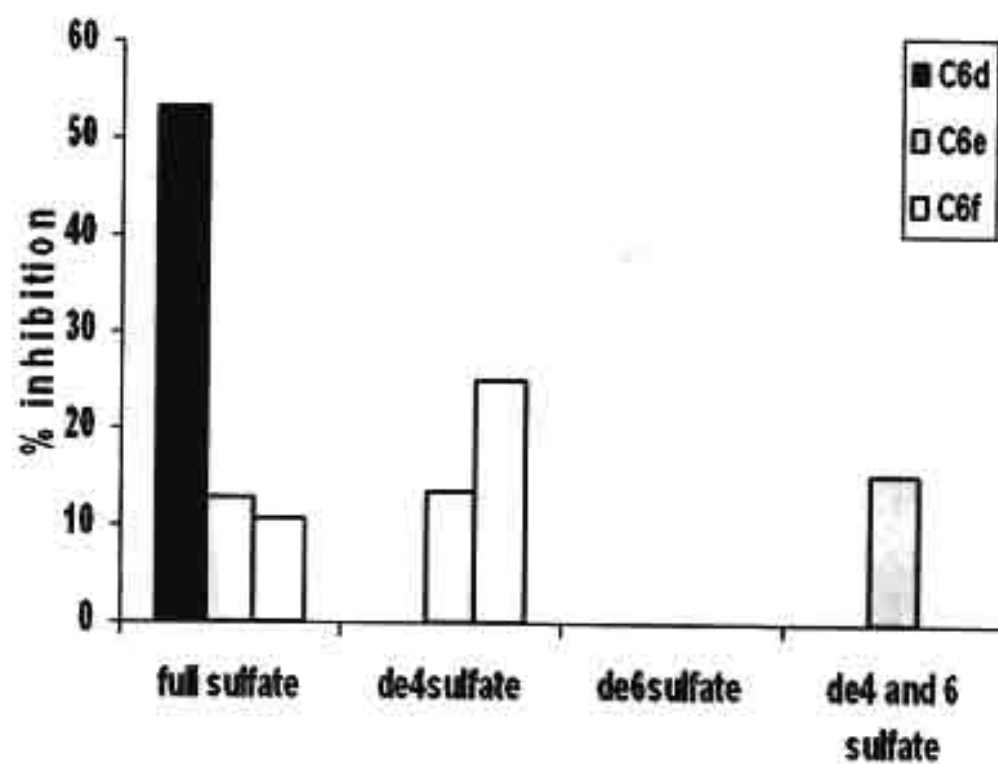


Figure 5 Graph demonstrating the effect of sulfatase enzyme on the reactivities of oligosaccharides digested with 4- and 6-sulfatase against MAb WF6

**Immunohistochem for WF6 eptiope
(light microscope peroxidase staining : 100X)**

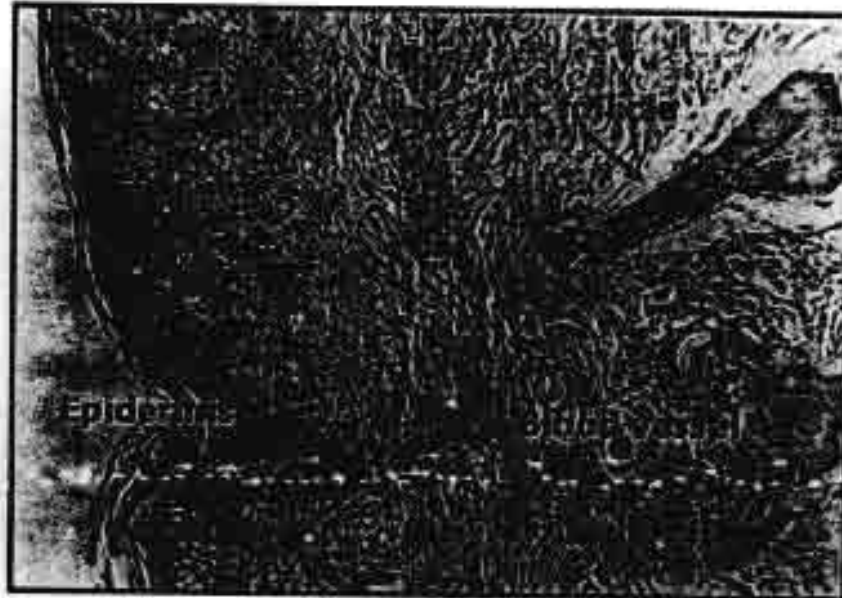


Figure 6. The immunohistostaining of human skin tissue section with MAb WF6 as primary antibody.

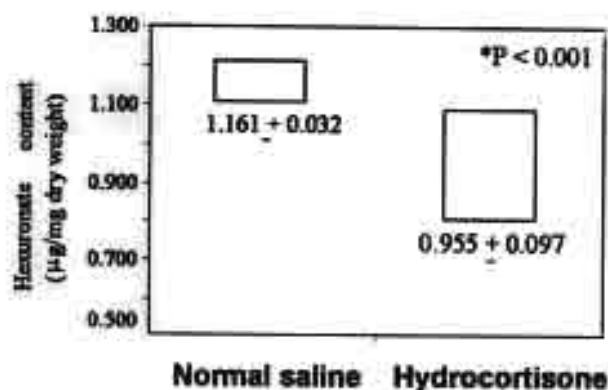


Figure 7 The proteoglycan content (as uronic acid) in cartilage from the animal treated with intra-articular injection of normal saline solution and hydrocortisone

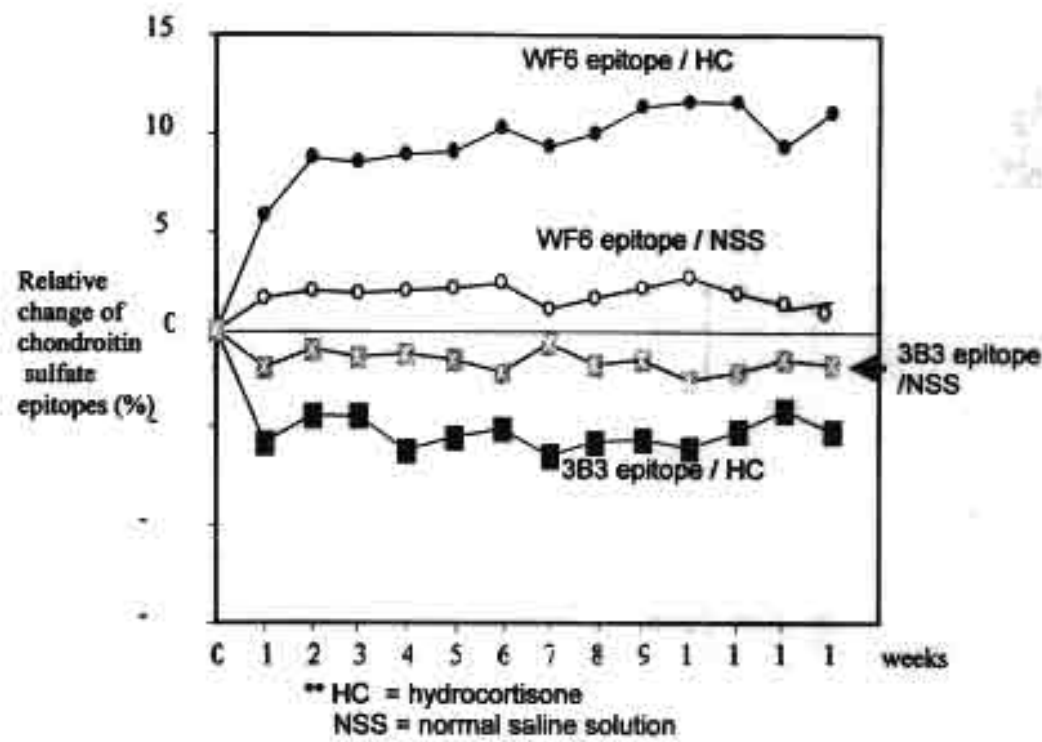


Figure 8 The level of WF6 epitope as catabolic marker and 3B3 epitope (anabolic marker) in the animals treated with normal saline solution and hydrocortisone group

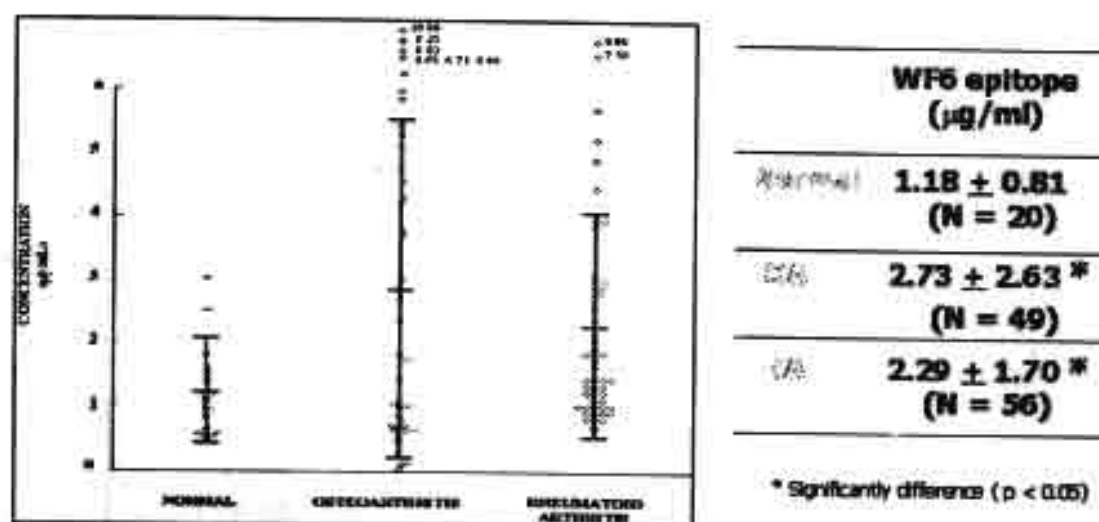


Figure 9 A scatter graph showing the level of WF6 epitope in serum of normal (N = 20), OA (N = 49) and RA (N = 56), the significant level is p < 0.05 using student t-test.

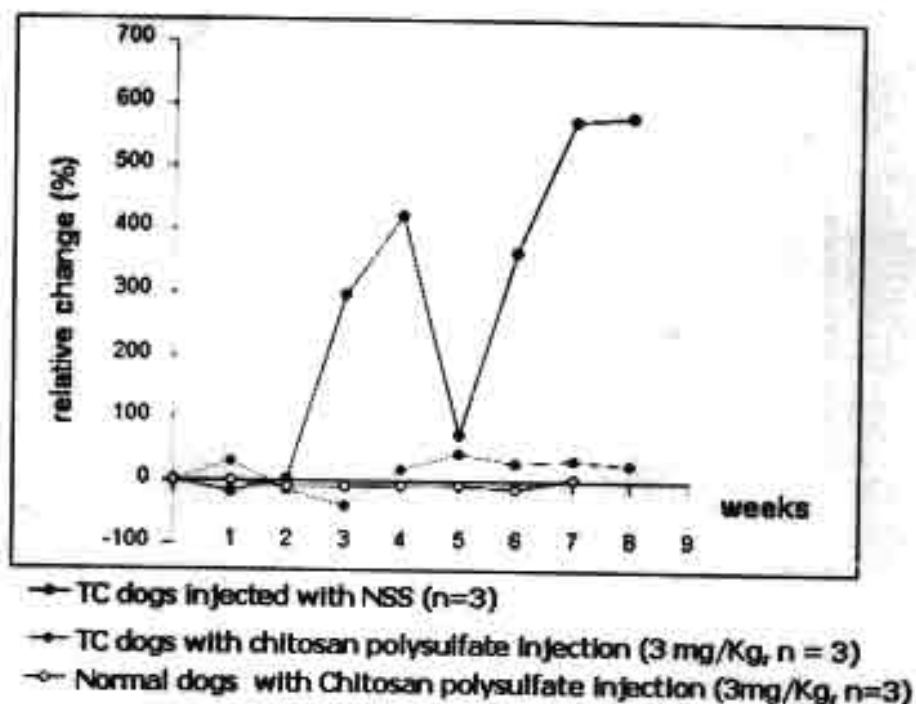


Figure 10. Comparison of the effect of chitosan polysulfate on the level of WF6 epitope and normal saline solution in the cruciate ligament transection in dog model. The relative change is determined by percentage of the level against the pre-treated period (week 0).

The release of CSPG (WF6 epitope) from cartilage explant induced by RA

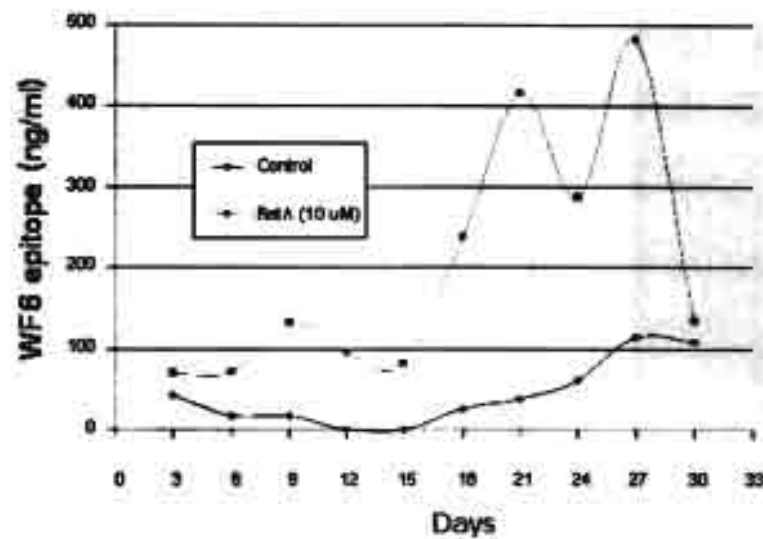


Figure 11 The level of WF6 epitope in cartilage explants culture which have been quantitated by competitive ELISA using monoclonal antibody WF6 for the monitoring the degradation by retinoic acid induction

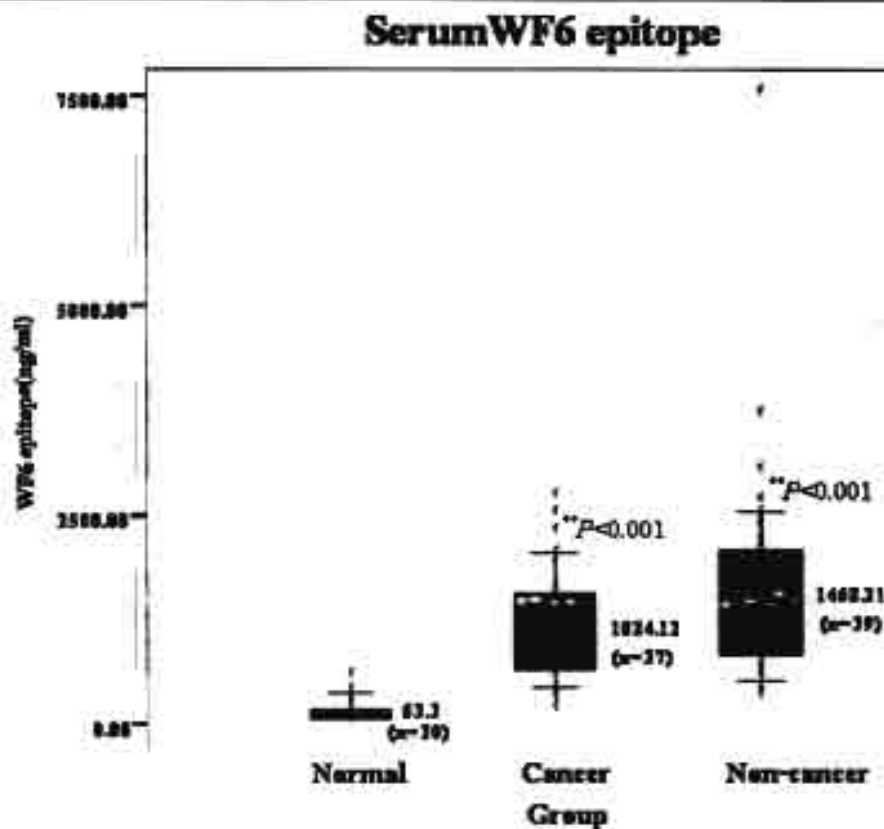


Figure 12. The level of proteoglycan containing chondroitin 6-sulfate WF6 epitope in serum from normal, ovarian cancer group and ovarian non-cancer (tumour). The significantly difference between group shown as $p < 0.05$ by student t-test.

Hybridoma Cell Line WF6 Deposition :

Cell line deposition for patent at American Type Culture Collection (ATCC)

174

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110-2209
Telephone: 703-365-2700
Fax: 703-365-2745

FACSIMILE**Date:** August 17, 2004**To:** Prachya Kongtaweert
Chiang Mai University**Fax Number:** 66 53 894188**From:** ATCC Patent Depository **Number of pages:** 1 (Including this page)**REFERENCE:** Patent Deposit**Description:** Hybridoma Cell Line from Balb/c mouse fused with myeloma X63 Ag8.653: WF6 assigned PTA-6157.**Date of Deposit:** August 11, 2004

The ATCC Certificate of Deposit will be forwarded to you within 30 days. Your VISA account will be invoiced as follows:

Total Fees for PTA-6157	\$ 2,500.00
(Storage/informing/viability testing)	



Marie Harris, Patent Specialist
ATCC Patent Depository

The information contained in this facsimile is intended only for the use of the individual or entity named above. If the reader of this message is not the intended recipient, you are notified that any dissemination or distribution, except to the intended recipient of this communication, is prohibited. If you have received this communication in error, please call us immediately at the telephone number listed above.

