การเตรียมแอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียว

วิจิตร เกิดผล *ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

Preparation of Monoclonal Antibodies

Wichit Kirdpon Ph.D. (Pharm. Sci.)
Department of Radiology, Faculty of Medicine, Khon kaen University.

Technical descriptions of method for preparation of monoclonal antibodies are described in detail. The rationales and principles are supported scientifically. The possible clinical applications of monoclonal antibodies are also mentioned. (*Srinagarind Hosp Med J.* 1986 ; 1 : 59 – 63)

แอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียว (monoclonal antibodies) เป็นแอนติบอดี้ที่สร้างขึ้นภายนอกร่างกายของคนหรือสัตว์ แล้วเจริญเติบโตขยายจำนวนขึ้นโดยมีคุณสมบัติที่จะ recognize แอนติเจนตัวใดตัวหนึ่งที่เราต้องการ (pre-assigned antigen) และมีความสามารถจับกับแอนติเจนชนิดนั้น ๆ ชนิดเดียวเท่านั้น การเตรียมแอนติบอดี้ชนิดนี้เป็นการเปิดทางที่จะศึกษาหรือนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันของสารชนิดต่าง ๆ การนำไปติดกับสารรังสีเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือไปติดกับสารพิษเพื่อนำไปทำลายเซลล์ที่เป็นอันตรายต่อคน เช่น เนื้อร้าย, เนื้องอก หรือพยาธิต่าง ๆ ที่ผลิตสารแปลกปลอมซึ่งถูกจับโดยแอนติบอดี้ชนิดนี้ นับได้ว่าการคิดค้นวิธีการเตรียมแอนติบอดี้ชนิดนี้เป็นผลงานชิ้นมหัศจรรย์ที่มนุษย์สามารถนำเอาความรู้เรื่องแอนติบอดี้กับความรู้เกี่ยวกับเซลล์ที่ไม่รู้จักตายของมะเร็งชนิดหนึ่งมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์

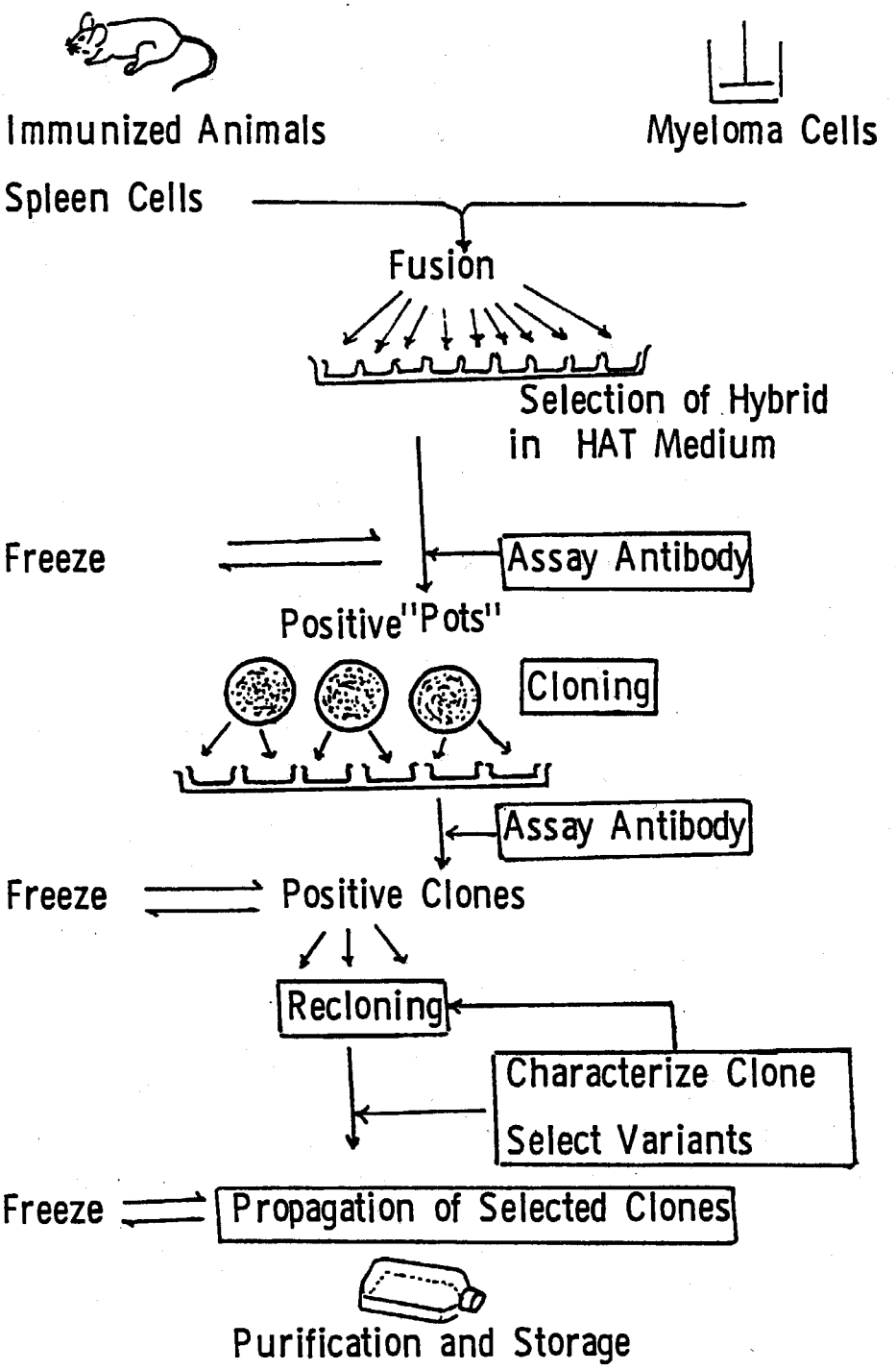
—x—

MONOCLONAL ANTIBODIES

ภายหลังที่ Kohler และ Milstein[1] ได้เสนอวิธีการทำ hybridization ของเซลล์ในปี 1975 เพื่อให้ได้คุณสมบัติที่สำคัญ 2 ประการ คือ เซลล์นั้นไม่รู้จักตายสามารถแพร่พันธุ์ต่อไปได้ และมีคุณสมบัติที่สร้างแอนติบอดี้ต่อแอนติเจนเดิมได้ โดยคุณสมบัติดังกล่าวนั้นได้มาจากการทำ hybridization ของ mouse myeloma cell กับ mouse lymphoid cells การทดลองดังกล่าวเป็นการเริ่มต้นของการสร้างแอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียวในปัจจุบัน กล่าวคือใช้การผสม (fusion) ของเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี้ที่เฉพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่เราต้องการ กับ myeloma cells ซึ่งมีคุณสมบัติเจริญเติบโตได้ตลอด ถ้ามี media ที่เหมาะสม

หลักการและเทคนิค

ตัวอย่างแผนภูมิของการเตรียมแอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียว ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนการเตรียมแอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียว

ในขบวนการที่ทำนั้น จะอธิบายรายละเอียดได้ดังนี้

ขั้นที่ 1 เตรียม lymphoid cell จากม้ามของหนู โดยส่วนมากจะใช้หนูถีบจักร (ขาว) Balb/C mice ซึ่งเป็น nude mice โดยฉีดแอนติเจนที่ต้องการให้เข้าไปในตัวหนู เช่น ต้องการแอนติบอดี้ที่ต่อต้านมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma[2] ก็ใช้แอนติเจนของมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma ฉีดเข้าไป การ immunization ดังกล่าวมีจุดมุ่งหมาย 2 ประการ คือ

1. เพื่อจะขยายพันธุ์ (clones) ซึ่งรักษาคุณสมบัติต่อต้านแอนติเจนชนิดนั้น ๆ อยู่

2. เป็นการกระตุ้นให้ B-Cell แบ่งตัวและได้เซลล์ที่สร้างแอนติบอดี้ต่อต้านแอนติเจนที่เราต้องการเพื่อที่จะนำไปผสมกับ myeloma cells ต่อไป

ขั้นที่ 2 Hybridization Fusion

ระยะเวลาที่จะนำ lymphoid cell จากม้ามหนูมาทำการ hybridization คือ 3–4 วัน หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้ายเข้าไปแล้ว

การ Hybridization นั้น ไม่ใช่ว่าทุก culture line ของ mouse myeloma จะใช้ในการผสมได้ จะใช้ได้เพียงบาง cell line เท่านั้น[3,4] ตัวที่นิยมใช้บ่อยที่สุดคือ myeloma cell ที่เป็น mutants ที่ไม่มีเอ็นไซม์ Hypoxanthine Guanine Phospho Ribosyl Transferase (HGPRT) หรือ Thymidine Kinase (TK)[4]

ปริมาณของเซลล์ที่ใช้ในขบวนการผสมนั้นจะใช้ myeloma cell ประมาณ 10^8 เซลล์[5] และจะใช้ lymphoid cells ปริมาณเดียวกัน และ myeloma cell นั้นจะต้องอยู่ในภาวะที่กำลังเจริญเติบโต (exponential growth phase) เพราะถ้าเป็นภาวะที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว การผสมก็จะไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นจึงต้องตรวจดูก่อนทำการผสมว่าเซลล์ยังมีชีวิตอยู่และกำลังเจริญเติบโตหรือไม่ โดยใช้ acridine orange และ ethidium bromide โดยเซลล์ที่ตายจะติดสีส้มจัด ๆ ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะมีสีเขียว

หลังจากผสมแล้วก็จะทำการเลือกชนิดของเซลล์ที่ผสมแล้วและเซลล์ที่ไม่ได้ผสมทันที หรือถ้าจะรอก็รอได้ไม่เกิน 2–3 วัน เพราะหลังจากนั้นแล้วเซลล์จะเริ่มตาย การเลือกจะใช้ HAT Selective Media (HAT คือ Hypoxanthine Aminopterin และ Thymidine) โดยใน Media จะประกอบด้วย

ก. Working solution

เป็น Cell Culture Medium ผสมกับ Fetal Calf Serum 10% กับ Glutamine 2 mM ผสม Penicillin 100 IU/ml และ Streptomycin 100 ug/ml[1]

ข. เตรียม HAT Medium

- นำ Working solution มาเติม Hypoxanthine (136 ug/ml) aminopterin (0.19 μg/ml) และ Thymidine (3.88 μg/ml) เป็น stock solution เวลาใช้จะเจือจางอีก 100 เท่า โดย stock solution จะเก็บไว้ในตู้เย็นและเก็บในที่มืดเพราะ Aminopterin จะเสียเมื่อถูกแสง

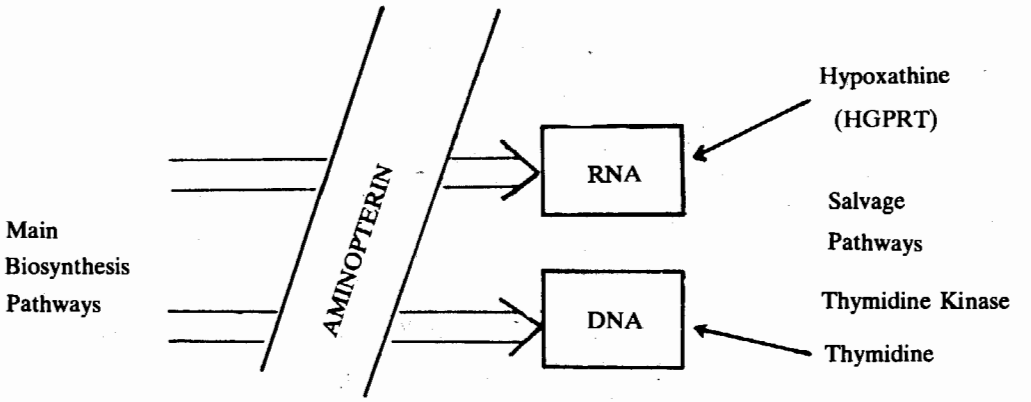
หลักการของการใช้ HAT SELECTION

วิธีการที่จะแยก Hybrids จากเซลล์แม่ของมันทำได้หลายวิธี[1] เช่น ใช้ differential sedimentation, selective medium หรือ fluorescent activated cell sorting แต่ในทางปฏิบัติแล้ววิธีที่สะดวกก็คือ การใช้ selective medium

Aminopterin จะขัดขวางการสังเคราะห์ของ nucleic acid ทั้ง RNA และ DNA แต่เซลล์ยังสามารถแบ่งตัวโดยใช้ salvage pathway ถ้ามี hypoxantine และ thymidine อยู่ใน media ในพวก myeloma mutant cells ซึ่งขาดเอ็นไซม์ HGPRT หรือ TK มันจะไม่สามารถแบ่งตัวได้เลยถ้ามี Aminopterin อยู่ใน media ด้วย แม้จะเติม hypoxanthine และ thymidine ลงไปมันก็ยังแบ่งตัวต่อไปไม่ได้เพราะนำสารดังกล่าวเข้าไปในเซลล์ไม่ได้ ส่วนเซลล์ที่

ผสมแล้วจะได้ HGPRT ของ lymphoid cells จากม้ามหนู ดังนั้นจึงอยู่ใน HAT media ได้และแพร่พันธุ์โดยคุณสมบัติของ myeloma cell ได้ด้วย ดังนั้นเซลล์ที่ไม่ได้ผสมจึงตายใน HAT media หลังจากทิ้งไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จึงทำให้เหลือแต่เซลล์ที่ผสมแล้วหรือที่เรียกว่า hybridoma

HAT MEDIUM SELECTION SYSTEM



รูปที่ 2 หลักการของ HAT Selection System

ขบวนการชีวสังเคราะห์หลักของเซลล์จะถูกขัดขวางโดย aminopterin (A) แต่เซลล์จะสามารถสังเคราะห์ nucleic acid โดย salvage pathways ได้ถ้ามี Hypoxanthine(H) และ Thymidine(T) อยู่ใน media ใน salvage pathways นั้นต้องอาศัยเอ็นไซม์ HGPRT และ TK ถ้าหากไม่มี เอ็นไซม์ดังกล่าวแล้ว เซลล์จะไม่สามารถสร้าง nucleic acid ได้แล้วจะตายไปในที่สุด

การใช้ระบบการคัดเลือกวิธีอื่น ๆ ก็อาจจะทำได้แต่ไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ใน hybridoma work เท่าใดนัก เช่น เลือก myeloma ที่ mutant เป็นชนิดที่ขาดเอ็นไซม์ adenine phosphoribosyl transferase หรือ adenosine kinase ซึ่งใช้ประโยชน์ในการศึกษาเรื่องยาปฏิชีวนะพวก amphotericin B, methyl ester หรือ oubain ซึ่งจะไม่กล่าวในที่นี้

ตัว hybridoma ที่ได้นั้นมีคุณสมบัติที่นำไปเพาะให้เจริญเติบโตได้ (propogation) โดยนำไป assay ตรวจสอบคุณสมบัติการเป็นแอนติบอดี้ แล้วนำไปเพาะ (cloning) ต่อไป จากแต่ละ clone ก็นำไป assay คุณสมบัติของแอนติบอดี้อีก แล้วนำไป recloning พร้อมทั้ง characterize clone เพื่อเลือก variants ชนิดต่าง ๆ ของแต่ละ clone แล้วเอา clone ที่มีคุณสมบัติทำปฏิกริยากับแอนติเจนได้ตรงและดีที่สุดมาขยายพันธุ์ต่อไป แล้วเก็บไว้ใช้โดยอาจจะเก็บในรูป freeze ไว้หรือเก็บในรูป lyophilized (ทำเป็นผงแห้งโดยอาศัยความเย็นและหลักการในการระเหิด) และเวลาจะใช้จึงนำมาเติมสาร buffer ลงไป

ประโยชน์ของแอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียว

แอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียวใช้เป็นเครื่องมือเพื่อ

1. ศึกษาโรคภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ที่มี surface antigen หรือ glycoprotein antigen อื่น ๆ แอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียวนี้จะช่วยในการจำแนกชนิดของแอนติเจนต่าง ๆ[5] เช่น T-cell, Thymocyte, B-cell, Monocyte, T-leukemias, T-cell lines, B-cell lines ซึ่งใช้ในการจำแนก lymphocyte ชนิดต่าง ๆ เพื่อให้แน่ใจในการรักษาโรคบางชนิด เช่น การนำเอาเซลล์ที่ผิดปกติออกจากไขกระดูก การ graft เซลล์เพื่อตรวจดูว่าเกิดปฏิกริยากับเซลล์ของร่างกายหรือไม่

2. ใช้ในการตรวจและการรักษาโรคมะเร็ง โดยการนำแอนติบอดี้ที่ต่อต้านสารชนิดเดียวนี้ไปติดกับสารรังสี เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง และเอาไปติดกับสารพิษเพื่อให้แอนติบอดี้นำไปทำลายเซลล์มะเร็ง แอนติเจนที่เซลล์มะเร็งจะทำปฏิกริยากับแอนติบอดี้เฉพาะที่มีสารพิษติดมาด้วย ทำให้เซลล์มะเร็งตายไป

3. ช่วยในการวินิจฉัยโรคพยาธิต่าง ๆ เช่น พยาธิใบไม้ในเลือด (schistosomiasis), พยาธิตัวกลมในเนื้อเยื่อ (filariasis), มาลาเรีย (malaria)[6] การตรวจหาแอนติเจนต่าง ๆ ที่เป็น single antigenic epitope ใช้ในการศึกษาแอนติเจนของพยาธิและแอนติบอดี้ที่ต่อต้านพยาธิ[7] ของพยาธิใบไม้ในเลือด[8] ทั้งแอนติเจนของไข่, ตัวอ่อน, และตัวที่สมบูรณ์แล้ว ซึ่งใช้ทั้งวิธี competitive, non competitive radioimmunoassay และ ELISA[2,9] เพื่อช่วยให้การวินิจฉัยถูกต้องและง่ายกว่าสมัยก่อน ๆ มาก

เอกสารอ้างอิง

1. Kohler G, Milstein C. Cutaneous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London) 1975 ; 256 : 495-497.
2. Varki NM, Reisfeld RA, Walker LE. Antigen associated with a human lung adenocarcinoma defined by monoclonal antibodies. Cancer Res 1984 ; 44 : 681-687.
3. Brooks D, Zola H. Techniques for the production and characterization of monoclonal hybridoma antibodies In : Hurrell JGR, ed. Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications. Florida : CRC Press Inc., 1985 : 1-57.
4. Milstein C. Monoclonal antibodies for hybrid myeloma. Theoretical Aspect and general comments. In : Mc Michael AJ, Farbre JW, eds. Monoclonal Antibodies in clinical Medicine. New York : Academic Press, 1982 : 3-16.
5. Hosking CS, Georgion GM Application of monoclonal antibodies to the study of human lymphocytes surface antigen. In : Hurrel JGR, ed. Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Application. Florida : CRC Press Inc., 1985 : 178-192.
6. Perrin H, Gabra M. Immunodiagnosis of malaria. In : Immunodiagnosis of parasitie infections using nuclear Techniques. A Technical document issued by International Atomic energy Agency. Vienna (IAEA-TECDOC-339) 1985 : 91-102.
7. Linder E. Developments in Immunoassay for diagnosis of parasitic diseases. In : Immunodiagnosis of parasitic infections using nuclear Techniques. A technical document issued by International Atomic Energy Agency. Vienna (IAEA TECDOC-339) ; 1985 : 27-34.
8. Phillips SM, Fox EG, Fathelbab MN, Walker DJ. Zodda DM. Studies on epitopic and idiotypic regulation in schistosomiasis : The use of monoclonal antibodies in Radio-immuno and avidin-biotin enzyme assay. In : Immunodiagnosis of parasitic infection using nuclear Techniques. A technical document issued by International Atomic Energy Agency. Vienna (IAEA-TECDOC-339) 1985 : 63-74.
9. Dessaint JP, Capron A : Immunoassays of antibodies and circulating antigen in schistosomiasis. In : Immunodiagnosis of parasitic infections using nuclear Techniques. A Technical document issued by the International Atomic Energy Agency. Vienna (IAEA TECDOC-339) 1985 : 35-49.