ไฮบริโดมา เทคโนโลยี : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเชิงอุตสาหกรรมและวิศวกรรมโปรตีน

กรกช อินทราพิเชฐ[1]

Indrapichate, Korakod (1994). **Hybridoma Technology : Industrial Monoclonal Antibody Production and Protein Engineering.** *Suranaree J. Sci. Technol. 1 : 133 - 138.*

Abstract

Hybridoma culture in fermenters is now the method of choice in producing monoclonal antibodies at industrial levels. The culture technology has some advantages over the conventional, ascitic technique, including only few mice required. Hybridoma technology accompanied with protein engineering is an important tool in producing bispecific monoclonal antibodies which now have the impact on the diagnosis and treatment of diseases.

บทคัดย่อ

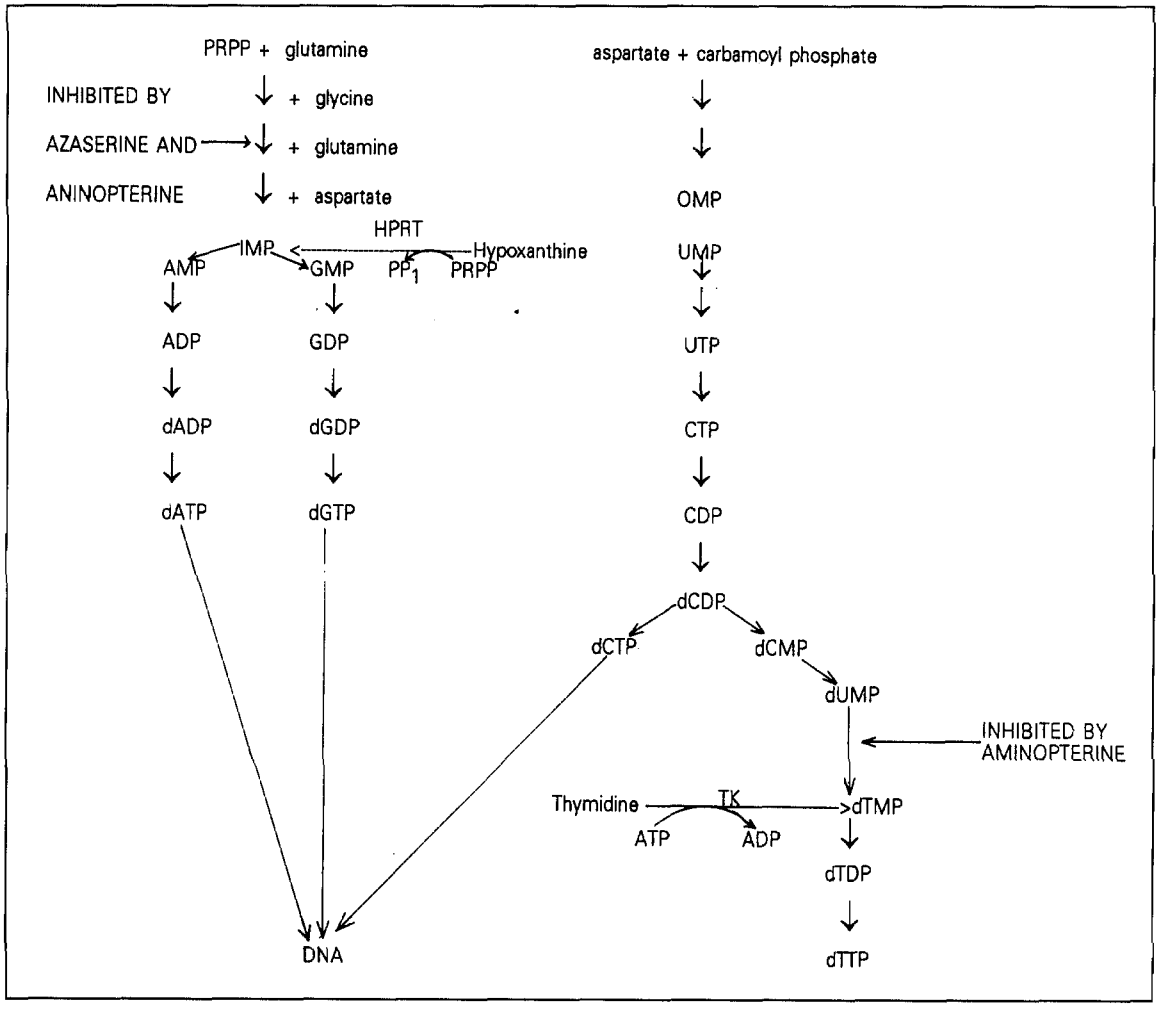
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีระดับอุตสาหกรรม โดยวิธีเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาในถังหมักให้ผลดีหลายประการ กว่าการผลิตโดยวิธีแอสไซทีสในหนู ซึ่งต้องใช้หนูจำนวนมาก เทคโนโลยีไฮบริโดมาควบคู่กับวิศวกรรม โปรตีน สามารถผลิตโมโนโคลนอนแอนติบอดีที่มีคุณลักษณะจำเพาะสองอย่างได้ กล่าวคือ มีความเป็นสารภูมิคุ้มกัน และเป็นตัวกลางนำสารหรือยา เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและรักษาโรค

โมโนโคลนอล แอนติบอดี (monoclonal antibody เขียนย่อ MAB) เป็นสารโปรตีนคุ้มกันที่มีความจำเพาะเดี่ยว (monospecificity) ต่อโมเลกุลของสารก่อภูมิคุ้มกัน (antigen) ชนิดหนึ่ง เทคโนโลยีการผลิต MAB ได้รับการพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1975 โดย Kohler และ Milstein โดยใช้ ไฮบริโดมา เทคโนโลยี (hybridoma technology) อันเป็นเทคนิคการรวมเซลล์เนื้อร้ายไฮบริโดมาที่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารได้ตลอดไป และในขณะเดียวกันไฮบริโดม สามารถผลิตโปรตีนซึ่งเป็นคุณสมบัติของเซลล์ปก ได้ด้วย เช่น การผลิตสารภูมิคุ้มกัน อย่างในกร MAB จากผลงานวิจัยนี้ ทำให้ Kohler และ Milstei ได้รับรางวัลโนเบลในสาขาสรีรวิทยาและการแพท ร่วมกัน ในปี ค.ศ. 1984

เซลล์เนื้อร้ายที่ใช้ในการผลิตไฮบริโดมา เป็ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดผลิตภูมิคุ้มกันที่ได้รับกา

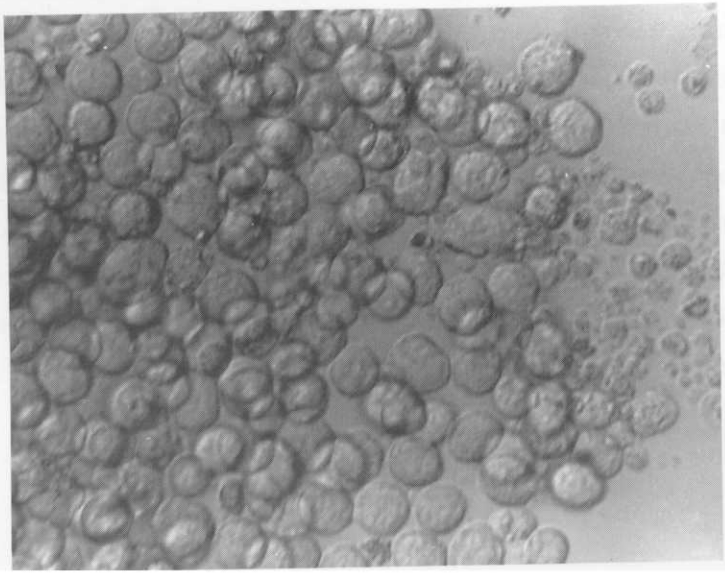
---

[1] *Ph.D., รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 300*



รูปที่ 1. แสดงวิถีหลักของการสังเคราะห์เพียวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) และตำแหน่งยับยั้งของอมินอฟเทอรีน (aminopterine) และอซาเซอรีน (azaserine).

ทำให้กลายพันธุ์ มีคุณสมบัติของเซลล์เนื้อร้าย เรียกว่า ไมอิโลมา (myeloma) ซึ่งไม่มียีน (gene) สำหรับผลิตเอนไซม์อย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้คือ เอนไซม์ไฮโพแซนธีน - กัวนีน ฟอสโฟไรโบซิล ทรานสเฟอเรส (hypoxanthin-guanine phosphoribosyl transferase เขียนย่อ HGPRT) หรือเอนไซม์ไธมิดีนไคเนส (thymidine kinase เขียนย่อ TK) เอนไซม์ทั้งสองเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ (DNA-deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของเซลล์ แม้ไมอิโลมาไม่มีเอนไซม์เหล่านี้ แต่ก็ตายในอาหารเลี้ยงที่มีไฮโพแซนธีน - อมินอพเทอรีน-ไธมิดีน (hypoxanthin-aminopterine thymidine เขียนย่อ HAT) เนื่องจากอมินอพเทอรีนเป็นสารพิษยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (รูปที่ 1) ส่วนเซลล์คู่ผสมคือ เซลล์ม้าม (spleen cell) ปกติที่ได้รับการกระตุ้นให้ก่อภูมิคุ้มกันแล้ว (immunized) เซลล์ม้ามปกติตายในอาหารเลี้ยง HAT เช่นกัน แต่เซลล์ลูกผสมคือ ไฮบริโดมาได้รับยีนสำหรับสร้าง HGPRT หรือ TK ชดเชยคืน จึงสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยง HAT ได้เป็นปกติ (รูปที่ 2) และ



รูปที่ 2. Hybridomas ที่ผลิต monoclonal antibodies ต่อ luteinizing hormone receptor (LH-R) ของหนู rats hybridomas นี้ผลิตจากการรวมเซลล์ของม้ามหนู mouse สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับการกระตุ้นให้ผลิต antibodies ด้วย LH-R กับเซลล์ myeloma สายพันธุ์ NS-1 และใช้ polyethylene glycol เป็นสารช่วยการรวมเซลล์ (กรกช อินทราพิเชฐ, 2534 a)

สามารถตรวจหาจากไฮบริโดมาที่ต้องการได้หลายวิธี (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมได้จาก โมโนโคลนอล แอนติบอดีเทคโนโลยี 1 และ 2 โดย กรกช อินทราพิเชฐ, 2534, a และ b)

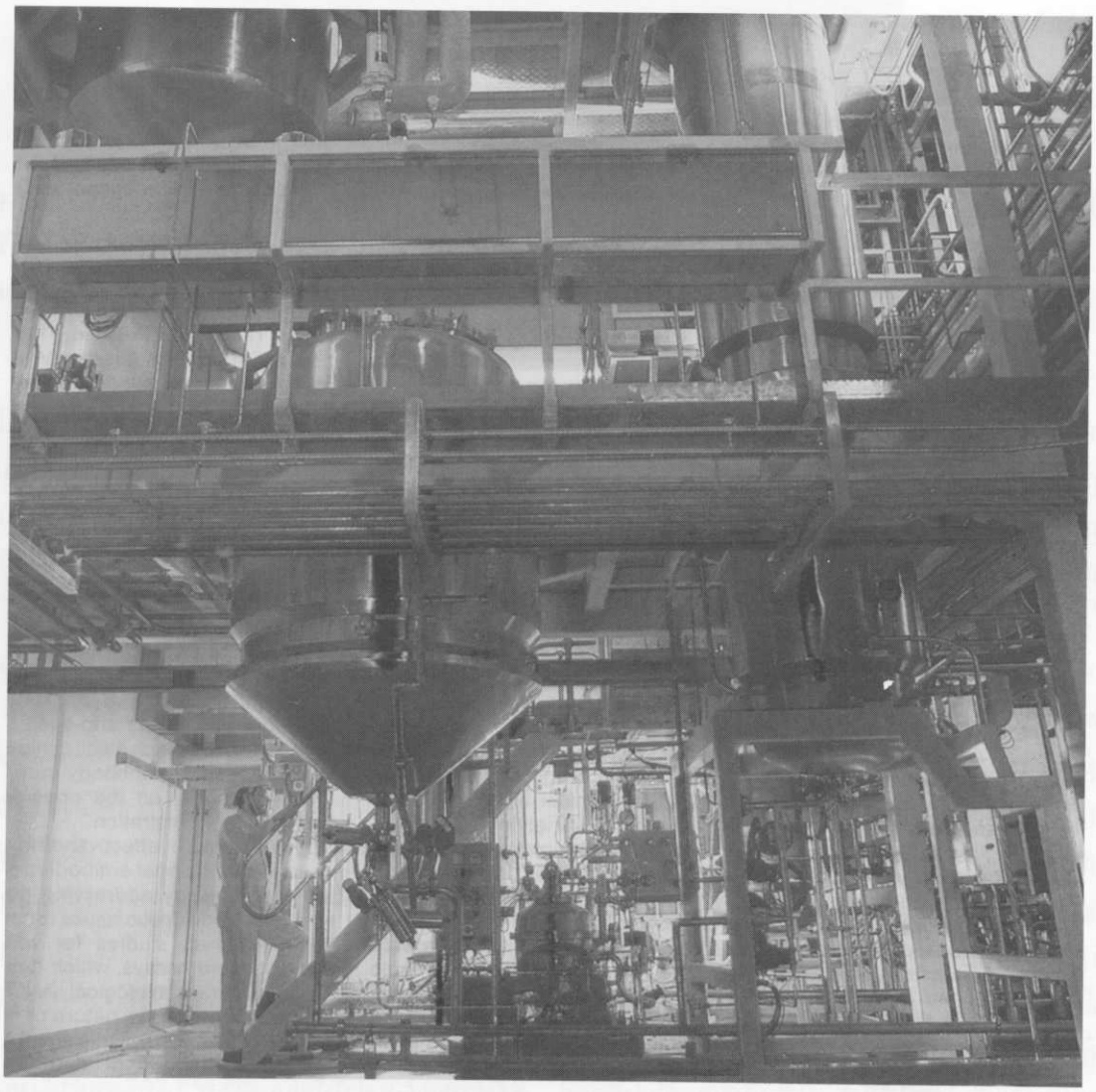
การผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ปริมาณมากในห้องปฏิบัติการ ปกติกระทำได้ 2 วิธีคือ (1) โดยการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาในขวดเลี้ยงหรือเครื่องหมัก (fermenter) ขนาดเล็ก และ (2) โดยการฉีดไฮบริโดมาเข้าไปและให้เจริญเป็นเนื้องอกชนิดเหลว (soft tumor) ในช่องท้องหนูทดลอง เรียกว่า แอสไซทีส (ascites) วิธีหลังนี้แม้ว่าจะสามารถดูดของเหลวที่มี MAB ความเข้มข้นสูงมากจากแอส ไซทีสได้ถึงประมาณ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่หนูหนึ่งตัวผลิตแอสไซทีสได้เพียงประมาณ 5 มิลลิลิตร นอกจากนี้การผลิตแอสไซทีส มีข้อเสียและข้อจำกัดอยู่มากกล่าวคือ (1) ต้องการแรงงานและค่าใช้จ่ายสูง (2) ปริมาณของ MAB ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของหนู (3) MAB ติดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ง่าย และ (4) ในอารยะประเทศมีแนวปฏิบัติให้หลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลองหากมีวิธีอื่นที่ทดแทนกันได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาในอาหารจึงเหมาะแก่การผลิต MAB ปริมาณมาก แม้ว่าการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาผลิตให้ MAB ที่มีปริมาณแตกต่างกันแล้วแต่สายพันธุ์ของเซลล์ชนิดของอาหารและภาชนะเพาะเลี้ยงแต่มีข้อดีกว่าการผลิตแอสไซทีสหลายอย่างคือ (1) เทคโนโลยีที่มีในปัจจุบันสามารถเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาได้ถึง 3,000 ลิตร ซึ่งเป็นการผลิตระดับเศรษฐกิจ (2) สามารถผลิตซ้ำได้สูง (3) ผลิต MAB ของคนและผลิตข้ามต่างพันธุ์สัตว์ได้ (4) ผลผลิตเป็นที่ต้องการมากในการรักษาโรค และ (5) ไฮบริโดมาสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงปราศจากซีรัม (serum) ทำให้แยก MAB ให้บริสุทธิ์ได้ง่าย

การผลิต MAB ระดับอุตสาหกรรมโดยการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาในอาหารทำได้ 2 วิธีคือ (1)

เลี้ยงเซลล์ลอยแขวนเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous suspension culture) ซึ่งอาจเป็นถังเลี้ยงแบบให้อากาศ (airlift reactor) หรือถังเลี้ยงแบบกวนต่อเนื่อง (continuous stirred reaction) และ (2) เลี้ยงเซลล์อยู่กับที่ (immobilized หรือ entrapped cell culture) โดยเลี้ยงเซลล์ในเส้นใยกลวง (hollow fiber perfusion) หรือในแค็ปซูลขนาดเล็ก (microcapsules)

รูปที่ 3 แสดงการผลิต MAB แบบถังเลี้ยงให้อากาศขนาด 2,000 ลิตร ของบริษัท Celltech Ltd. ประเทศอังกฤษ ซึ่งสามารถผลิต MAB ได้ประมาณ 10 กิโลกรัมต่อปี ผลผลิตนี้ถ้าผลิตโดยแอสไซทีสต้องใช้หนูถึงประมาณ 4,000,000 ตัว

การใช้ MAB เป็นการปฏิวัติการวินิจฉัยเชิงภูมิคุ้มกันโดยใช้สารรังสีติดฉลาก (radio immunoassay เขียนย่อ RIA) ซึ่งเดิมใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody เขียนย่อ PCA) ที่มีขอบเขตจำกัด กล่าวคือ PCA มีโมเลกุลหลายชนิดรวมกัน จึงต้องการความเข้มสูงและต้องมีสัมพรรคภาพ (affin-

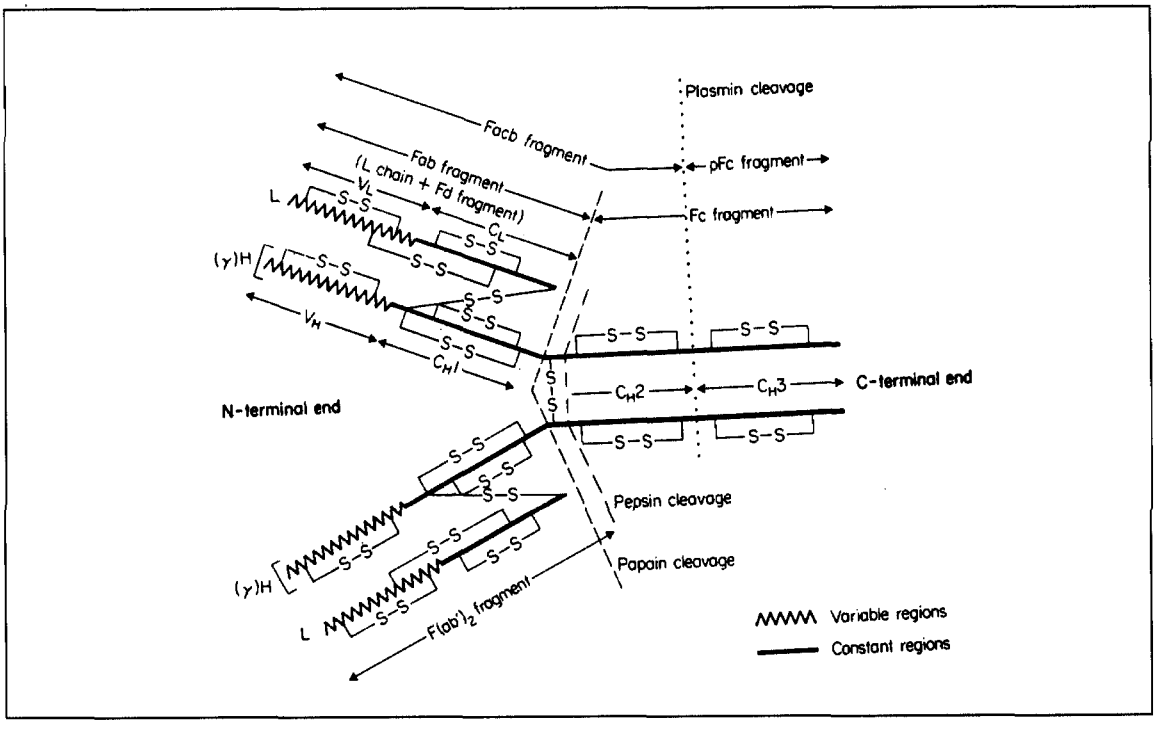


รูปที่ 3. แสดงถังเลี้ยงแบบให้อากาศ (airlift fermenter) ขนาด 2,000 ลิตร สำหรับผลิต monoclonal antibody ของบริษัท Celltech ที่มีกำลังผลิตได้ประมาณครึ่งหนึ่งของบริษัท (O'Hagan, 1990)

ity) สูงในการจับกับแอนติเจน ทั้งนี้เพื่อให้ได้สัญญาณของสารรังสีที่ต้องการในเวลาอันสั้น MAB สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้เพราะ MAB มีความจำเพาะเดี่ยว ให้ความไวสูงกว่า และผลิตได้โดยไม่มีขอบเขตจำกัด MAB จึงมีแรงผลักดันในการเข้ามาแทนที่ PCA

ยุทธวิธีในการรักษาโรคของ MAB พิจารณาได้จากตัวแอนติบอดีเองและตำแหน่งที่จับสารอื่น (antibody binding site) ทั้งนี้เพื่อนำสารที่ให้ผลทางการรักษา เช่น ยา ไปยังตำแหน่งที่เป็นโรค จัดเป็นการรักษาโดยการยับยั้งเชิงภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive therapy) และโดยการมองเห็นบริเวณเฉพาะที่แสดงอาการของโรค เช่น โรคไต หัวใจ ตับ และการถ่ายไขกระดูก ยาที่มีแอนติบอดีเป็นฐาน (antibody-based drug หรือ immunoconjugate) ซึ่งกำลังพัฒนา ก้าวหน้า และทดลองใช้รักษาโรคหลายอย่าง เช่น ได้มีการนำสารต่อต้านมะเร็ง เมโธทรีเซท (methotrexate) แอนทราไซคลิน (anthracycline) และริซิน (ricin) เป็นต้น เชื่อมต่อเข้ากับแอนติบอดีและติดฉลากด้วยสารรังสี I131 หรือสารเรืองแสงเพื่อการรักษาหรือติดตาม แอนติบอดีจะนำสารเหล่านี้ไปออกฤทธิ์ยังเป้าหมาย

การรักษาโรคแบบใหม่นี้ ทำให้ต้องออกแบบโมเลกุลและศึกษาวิธีการให้ยา ตลอดจนกลไกการทำงานของยายับยั้งเชิงภูมิคุ้มกันอย่างละเอียด อย่างไรก็ตาม MAB ที่ผลิตในปัจจุบันผลิตจากไฮบริโดมาของหนู เมื่อนำมารักษาโรคของคน ทำให้ต้องศึกษาทางเภสัชวิทยาอย่างละเอียด และต้องใช้ปริมาณมาก นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์และถูกกำจัดออกจากร่างกายได้เร็ว การออกแบบโมเลกุลใหม่โดยมี MAB เป็นฐาน (monoclonal antibody-based molecule) ต้องใช้เทคนิคของสารเคมีเชิงภูมิคุ้มกัน (immuno-chemical) ไฮบริโดมาและวิศวกรรมโปรตีน (protein engineering) ทำให้มีการพัฒนา MAB ที่มี 2 ความจำเพาะ (bispecificity) โดยความจำเพาะหนึ่งเป็นคุณสมบัติทาง



รูปที่ 4. โครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดี (immunoglobulin G)

ภูมิคุ้มกัน และอีกความจำเพาะหนึ่งสำหรับจับสารที่ต้องการนำเช่น เชื่อมต่อส่วนเซอรีนโปรทีเอส (serine protease domain) ของทิชชิว - พลาสมิโนเจน แอ็คติเวเตอร์ (tissue-plasminogen activator) เข้าที่บริเวณเปลี่ยนแปลงได้ (variable region) (รูปที่ 4) ของแอนติ-ไฟบริน-โมโนโคลนอล แอนติบอดี (anti-fibrin-monoclonal antibody) และต่อสารพิษจาก *Pseudomonas* เข้ากับบริเวณเปลี่ยนแปลงได้ของแอนติ - ไอแอล 2 รีเซพเตอร์ แอนติบอดี (anti-IL2 receptor antibody) นอกจากนี้ยังได้มีการลดส่วนประกอบของ MAB ของหนูลงโดยแทนที่ด้วยส่วนของคน ซึ่งเป็นการสร้างโมเลกุลผสมของแอนติบอดี (chimeric molecule) ขึ้นใหม่ เช่น นำเอาส่วนของโมเลกุลบริเวณเปลี่ยนแปลงได้ของหนูเชื่อมต่อเข้ากับบริเวณคงที่ (constant region) (รูปที่ 4) ของคน แม้ว่าการสร้างโมเลกุลใหม่สามารถลดการสร้างภูมิคุ้มกันใหม่ต่อต้านภูมิคุ้มกันเดิม (anti-antibody response) แต่ยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับการศึกษาหาตำแหน่งสำหรับจับกับแอนติเจน (idiotypic determinant) บนโมเลกุลของแอนติบอดี

สรุปได้ว่าการผลิต MAB ระดับเศรษฐกิจต้องเป็นการผลิตจำนวนมากเชิงอุตสาหกรรม โดยการเพาะเลี้ยงไฮบริโดมาในอาหารและการออกแบบสร้างโมเลกุลใหม่ ที่มี MAB เป็นฐานเดิมของโมเลกุลเพื่อการรักษาและติดตามตำแหน่งของโรค โดยเทคนิควิศวกรรมโปรตีนตัดต่อโมเลกุลใหม่ จะเป็นการประยุกต์ใช้ MAB ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวางต่อไป

บรรณานุกรม

กรกช อินทราพิเชฐ (2534a) โมโนโคลนอล แอนติบอดี เทคโนโลยี 1 : ไฮบริโดมา เทคโนโลยี. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 19(1) : 10 - 15.

กรกช อินทราพิเชฐ (2534b) โมโนโคลนอล แอนติบอดี เทคโนโลยี 2 : เทคนิคการตรวจหาไฮบริโดมาและประโยชน์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 19(4) : 200 - 207.

Campbell, A.M. (1986). Monoclonal Antibody Technology. Elsevier Science Publishing Company, New York pp. 265.

Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. Nature 305 : 537-540.

O'Hagan, K.O. (1990). Mab in the Lab. Laboratory & Analysis Technology International 86 - 89.