ว218

การคัดเลือกและการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีรวมกันเพื่อเสริมการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับคน

นางสาว จันทิมา จันทร์ฉาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2537

ISBN 974-584-878-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I14192201

SELECTION AND COMBINATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR INCREASING BINDING ACTIVITY TO HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Miss Jantima Janchai

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1994

ISBN 974-584-878-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีรวมกัน เพื่อเสริมการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับคน
โดย	นางสาว จันทิมา จันทร์ฉาย
ภาควิชา	สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นาง ประไพพิศ สุปรารภ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(นางประไพพิศ สุปรารภ)

_____ กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ)

_____ กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C426340 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: HEPATOCELLULAR CARCINOMA/HEPATOMA/MONOCLONAL ANTIBODY/EPITOPE
JANTIMA JANCHAI : SELECTION AND COMBINATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR INCREASING BINDING ACTIVITY TO HEPATOCELLULAR CARCINOMA. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : MRS. PRAPAIPIT SUPRAROP. 84 pp. ISBN 974-584-878-2

The early diagnosis which has sufficient specificity and sensitivity to human hepatocellular carcinoma is important for successful treatment because the clinical symptom show in advanced stages of the disease. Recently monoclonal antibodies (MAbs) are being used for diagnosis of many cancers. However there is problem about heterogeneity of antigen on cancer cell surface. Therefore single MAbs will not have sufficient sensitivity for diagnosis and treatment. This problem may be eliminated by using MAb which do not interfere in antigen binding of each other. This technique can increase sensitivity of MAb for diagnosis of cancers. In this study, fourteen antihepatoma of difference epitope MAbs were selected. They were classified into three groups based on non interfering antigen binding reaction. By using single, double or triple mixtures of I^{125}- labelled MAbs of these three groups on hepatoma cells binding, it was observed that mixed MAbs enhanced the binding activity either at saturated or half-saturated concentration.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จันทิมา จันทร์ฉาย : การคัดเลือกและการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีรวมกัน เพื่อเสริมการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับคน (SELECTION AND COMBINATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR INCREASING BINDING ACTIVITY TO HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.นลิน นิลอุบล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : นางประไพพิศ สุปรารภ, ๘๔ หน้า. ISBN 974-584-878-2

การวินิจฉัยในระยะเริ่มแรกของโรคมะเร็งตับ ด้วยวิธีการที่มีความจำเพาะและความไวสูง เป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้การรักษาได้ผลดีขึ้น เนื่องจากอาการทางคลีนิคมักแสดงออกเมื่อโรคอยู่ในระยะสุดท้าย ทำให้การรักษาไม่ได้ผล ผู้ป่วยจึงมีอัตราการตายสูง ปัจจุบันมีการนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีมาใช้ศึกษาโรคมะเร็งหลายชนิด แต่เนื่องจากความหลากหลายของแอนติเจนบนเซลล์มะเร็งตับ ทำให้การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีชนิดเดียวมีความไวไม่พอในการวินิจฉัยโรคมะเร็งตับ งานวิจัยนี้ได้จัดกลุ่มโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสมที่ควรใช้ร่วมกัน โดยนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับ 14 โคลน มาหาความแตกต่างในแง่การจับกับเอพิโทป พบว่าแยกได้เป็น 3 กลุ่ม ที่ไม่มีการรบกวนการทำปฏิกิริยาซึ่งกันและกัน นำโมโนโคลนัลแอนติบอดีทั้ง 3 กลุ่มมาติดฉลากด้วยไอโอดีน-125 ทดสอบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสมทีละสองและสามโคลน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โมโนโคลนับแอนติบอดีเดี่ยว พบว่าการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีผสม สามารถเสริมการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับได้ ทั้งที่ใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีแต่ละชนิดผสมในปริมาณสูงสุดที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับและลดปริมาณลงครึ่งหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต จันทิมา จันทร์ฉาย

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของรองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และ นางประไพพิศ สุปรารภ นักวิทยาศาสตร์นิวเคลียร์ ระดับ 6 สังกัดสำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ ซึ่งได้ให้คำปรึกษาและข้อแนะนำต่างๆทุกด้าน รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสุด ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. กิ่งกาญจน์ เลาหทัย ที่ได้กรุณาเอื้อเพื้อสถานที่ ให้โมโนโคลนัลแอนติบอดี และให้คำแนะนำต่างๆในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ และรองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการในการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร.สุเนตรา ดำรงค์พิสุทธิกุล ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางทรงจันทร์ ภู่ทอง และ นางสาว ดวงแข นนท์ศรี ที่ช่วยกรุณาสอนเทคนิคต่างๆในการเลี้ยงเซลล์

ขอขอบพระคุณ นายประเสริฐ ประสานเหลืองวิไล ที่ช่วยกรุณาสอนเทคนิคต่างๆทางด้านเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณทุกท่านที่กรุณาให้กำลังใจ ตลอดจนกำลังกายในการช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา 1

2. ภูมิคุ้มกันมะเร็ง 4

3. การใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีกับโรคมะเร็ง 8

4. การคัดเลือกโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อเซลล์มะเร็งตับคน 10

5. หลักการติดฉลากสารรังสีโดยวิธีคลอรามีนที 12

6. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย 13

7. ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 14

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

2 วิธีการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์ 15

2. วิธีทำ

2.1 การเตรียมแอนติเจน 19

2.2 การเตรียมแอนติบอดี 20

2.3 การหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธี ELISA 24

2.4 การติดฉลากไอโอดีน-125 โดยวิธีคลอรามีนที 25

2.5 การทดสอบการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ 26

2.6 การหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในแง่ของการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ 26

2.7 การหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ 27

2.8 การผสมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จับกับเอพิโทปต่างกันบนเซลล์มะเร็งตับ 28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3 ผลการทดลอง

1. ผลการหาปริมาณ IgG ในน้ำในช่องท้องหนู..... 29
2. ผลเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของน้ำในช่องท้องหนูก่อนและหลังตกตะกอน..... 31
3. ผลการแยก IgG แต่ละชนิดจากน้ำในช่องท้องหนูโดยวิธี protein A affinity chromatography..... 33
4. ผลการหาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาสูงสุดกับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธี ELISA..... 33
5. ผลการติดฉลากโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยไอโอดีน-125..... 37
6. ผลการหาความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลาก..... 38
7. ผลเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลากสารรังสี..... 40
8. ผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ..... 42
9. ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ..... 44
10. ผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำ inhibition binding assay..... 46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3 ผลการทดลอง(ต่อ)

11. ผลการหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในแง่ของการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ..... 48

12. ผลการหาปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาสูงสุดกับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์..... 55

13. ผลการผสมโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จับกับเอพิโทปต่างกันบนเซลล์มะเร็งตับ..... 59

4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 63

เอกสารอ้างอิง..... 67

ภาคผนวก

ก การเตรียมสารละลาย..... 76

ข การคำนวน..... 79

ค เปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวและโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสมด้วย t'test..... 82

ประวัติผู้เขียน..... 84

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงแอนติเจนที่พบในโรคมะเร็งตับ	7
2	ปริมาณ IgG ในน้ำในช่องท้องหนูหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 50	30
3	แสดงร้อยละของการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับ	45
4	แสดงผลการทำ inhibition binding assay ที่เวลาต่างๆ	47
5	แสดงผลการทำ inhibition binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ	49
6	แสดงผลการหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์	56
7	แสดงปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับจำนวน 1 เซลล์	57
8.1	เปรียบเทียบความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวและผสมที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ S102	82
8.2	เปรียบเทียบความแรงรังสีของโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวและผสมที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ HepG-2	83

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆในประเทศไทยปี 1990....	3
2	ผลเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	32
3	ผลการแยก IgG จากน้ำในช่องท้องหนู.....	34
4	ผลการหาปริมาณสูงสุดของโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธี ELISA.....	35
5	ผลการติดฉลากโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยไอโอดีน-125.....	37
6	ผลการหาความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลาก.....	39
7	ผลเปรียบเทียบการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับระหว่างโมโนโคลนัลแอนติบอดีก่อนและหลังติดฉลาก.....	40
8	ผลการทำปฏิกิริยาของโมโนโคลนัลแอนติบอดีติดฉลากกับเซลล์มะเร็งตับที่เวลาต่างๆ.....	43
9	ผลการทำ inhibition binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ..	50
10	ผลการทำ competitive binding assay เพื่อหาความแตกต่างของโมโนโคลนัลแอนติบอดีในการจับกับเอพิโทปบนเซลล์มะเร็งตับ..	53

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	ปริมาณโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยาสูงสุดกับเซลล์มะเร็งตับโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์	58
12	แสดงค่าความแรงรังสีของของโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสมที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ S102	60
13	แสดงค่าความแรงรังสีของของโมโนโคลนัลแอนติบอดีผสมที่ทำปฏิกิริยากับเซลล์ HepG-2	61
14	แผนภาพการทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งตับของโมโนโคลนัลแอนติบอดีเดี่ยวและผสม	62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย