تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال و استفاده از آنها

دکتر علی عطائیان ،متخصص انگل شناسی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان

واژه‌های کلیدی:

ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، آنتی‌بادی مونوکلونال

مقدمه:

امروزه در جهان بطور وسیعی از واکنشهای آنتی‌ژن - آنتی‌بادی (Antigen - Antibody)بعنوان معرف و تشخیص خیلی از بیماریهای مهم استفاده می‌شود. در این واکنشهاهر چه آنتی‌بادی مورد استفاده خالصتر و تمایل و میل ترکیبی مولکولهای آن با آنتی‌ژن بیشتر باشد، واکنشهای انجام شده از حساسیت بیشتری برخوردار خواهد بود.

بعضی از آنتی‌ژنها از نظر ایجاد ایمنی ضعیف هستند و بنابراین آنتی‌بادیهای مناسب و بمقدار کافی نمی‌توانند تولید کنند. توانائی تولید سلولها و موادی که از یک زنجیره یا ستون سلولی خاص مشتق می‌شوند، سبب انقلابی عظیم در رشته ایمونولوژی شده است. تشکیل زنجیره سلولی زنده و پایدار و تولید مقادیر زیادی آنتی‌بادی کاملاً مشخص، خیلی اختصاصی و متحدالشکل که در رشته ایمونولوژی(Immunology) مورد استفاده قرار می‌گیرند مونوکلونال آنتی‌بادی(monochlonal antibody) گفته می‌شود. این آنتی‌بادیها بوسیله سلولهای دختر(clones) از یک سلول هیبرید(Hybrid cell) که خود از آمیزش (Fusion) یک لنفوسیت B مشتق از طحال موش که بر علیه یک آنتی‌ژن ایمن شده است با یک سلول میلومای (Myeloma Cell) موش و یا یک پلاسما سل سرطانی (Cancerous Plasma Cell) بوجود آمده است تولید می‌گردد. سلول هیبرید توانایی تولید ایمونوگلوبولین را از لنفوسیت B و قدرت تکثیر و حیات بی‌پایان را از سلول میلوما کسب می‌نماید. روش تولید سلولهای هیبرید (Hybridoma) یعنی گروههای سلولی که از امتزاج (هستهٔ یک سلول میلومایی با لنفوسیت‌های B که قبلاً با آنتی‌ژن حساس شده است) دو تیپ سلولی مختلف در خارج از بدن موجود زنده in - vitro بوجود می‌آید، بوسیله Milstein در سال ۱۹۷۵بررسی گردیده و نامبردگان کاندیدای دریافت جایزه نوبل (Nobel prizer) شدند.

با این روش مهم در مدت کوتاه می‌توان مقدار زیادی آنتی‌بادی (مولکولهای ایمونوگلوبولین) تولید نمود، که از نظر شیمیایی، فیزیکی و ایمونولوژیکی کاملاً همگن(Homogeneous) می‌باشند. هم اکنون در آزمایشگاههای معتبر ایمونولوژی از آنتی‌بادیهای مونوکلونال آماده

شده (تجارتی) با استفاده از روشهای سرولوژیکی اختصاصی مانند ELISA,IFAT و RIA برای تشخیص (Immunodiagnosis) آنتی‌ژنهای سلولی و محلول تشخیص تفکیکی ، (Immunoidentification) آنها و درمان بعضی از بیماریهای (Immunotherapy) استفاده می‌شود.

تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال

سلولهای دورگه(Hybrid) را می‌توان بوسیله آمیزش یک سلول منفرد از لنفوسیتهای طحال یک حیوان (موش یا رتRat) ایمن شده با یک سلول میلوما، (Myeloma cell) تهیه نمود. این سلولها دقیقاً برابر صفات منتقله از والدین مثل تومور بدخیم اولیه مغز استخوان و یا تومورهای خوش‌خیم نسوج (Lymphomas)، سلولهای سرطانی تولید می‌کنند. ردیف سلولی توموری دارای دو ویژگی مهم و مشخص می‌باشد، عدم توانایی تولید ایمونوگلوبولین و فقدان فعالیت آنزیمی هیپوکسانتین فسفوریبوسل تر انسفراز (Hypoxanthine Transferase = HPRT Phosphoribocyl). برای ادغام‌هستهٔ دو سلول، از مواد محرکی استفاده می‌شود که سبب الحاق غشایی دو سلول و نفوذ مواد هسته‌ای آنها به یکدیگر می‌شوند. یکی از این مواد محرک پلی‌اتیلن گلیکول (= Polyethylene glycool PEC) است که سلولهای طحالی و سلولهای میلوما در مجاورت با آن سریعاً با هم ترکیب می‌شوند. البته ترکیب ممکن است با آرامی و خودبه‌خود صورت گیرد و در بعضی موارد نیز از ویروس Sendai و یا از میدان الکتریکی (Electrofusion) برای آمیزش مواد هسته‌ای استفاده می‌شود. حاصل این واکنش شامل سه گروه سلولی هیبریدما، سلولهای طحالی و سلولهای میلوما می‌باشند. سلولهای هیبرید دارای ژنوم (کل ماده ژنتیکی که در سلول مادر وجود دارد) ترکیب شده سلولهای مادر است و نهایتاً کروموزومهایی (Chromosomes) تولید می‌کنند که حالت دیپلوئید (Diploid) دارند.

مرگ طبیعی سلولهای طحال (SP Spleenocytes - ecnocytes) و کشته شدن زنجیره سلولی میتوما در محیط HAT هیپوکانتین(HIypoxanthine)،آمینوپترین (Aminopterin) و تمیدین (Thymidine) منجر به انتخاب و ادامه حیات سلولهای هیبرید می‌شود. سلولهای HPRT از هیپوکسانتین برای تولید پورین(Porien) نمی‌توانند استفاده کند و آمینوپترین سنتز پورین و پیریمیدین را مسدود می‌کند و سبب مرگ سلول می‌شود. هر سلول هیبرید بفاصله ۴۸-۲۴ ساعت رشد و بدو سلول تقسیم می‌شود و بسرعت توده‌های سلولی تشکیل می‌دهند که به آنها اصطلاحاً کلون(Clones) گفته می‌شود. مایع روی کلونها با ایجاد رقتها محدود و با استفاده از تکنیک‌های سرولوژیکی ELISAو یا IFAT و RIA از نظر تولید آنتی‌بادی آزمایش می‌شود. تشکیل مجدد کلونها برای اطمینان از مونوکلونال بودن آنها ،

برای رشد تعداد زیادی از سلولها و تولید آنتی‌بادی مونوکلونال صورت می‌گیرد. برای اطمینان از اختصاصی بودن آنتی‌بادی تولیدی ، مطالعات گسترده سرولوژیکی و ایمونوشیمی (**Chimoimmunity**) انجام می‌گیرد. بمنظورتولید مقدار زیاد آنتی‌بادی، از محیط کشت سلولی و یا با تلقیح سلولهای هیبرید بدرون پرده صفاق موش سینژنیک (**Syngeneic**) و استفاده از مایع آسیت(**Ascit fluid**) آن عمل می‌شود.

غالباً برای تکثیر سلول هیبرید از میزبانی استفاده می‌شود که سلولهای میلومایی از آن گرفته شده است.(مثلاً در صورت استفاده از سلولهای میلومایی موش **Balb/c** بهتر است که سلول هیبرید را نیز به داخل صفاق همان نژاد از موش **Balb/c**(**in-vivo**) تزریق نمود.)

هیبریدها در محیط کشت بصورت ادامه‌دار رشد می‌کنند بطوریکه در هر میلی‌لیتر محیط ۱۰۰-۱۰ میکروگرم آنتی‌بادی تولید می‌شود. برای استفاده بیشتر، ذخیره و نگهداری سلولها در نیتروژن مایع صورت می‌گیرد.(شکل ۱)

روش تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال

تکنیک تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال نسبتاً پیچیده و شامل مراحل مختلفی است. در این مقاله روش عملی و تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر علیه آنتی‌ژنهای کرمی که در دوره فرصت مطالعاتی در بخش بیومدیکال دانشگاه جمزکوک استرالیا انجام داده‌ام به اختصار شرح داده می‌شود.

۱ - *تهیه آنتی‌ژن*

آنتی‌ژن مورد نیاز برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال معمولاً از مراکز بهداشتی درمانی ، کشتارگاهاو یا از آنتی‌ژن آماده شده در آزمایشگاه که در شرایط ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود تهیه می‌گردد.

۲ - *آماده کردن آنتی‌ژن برای آزمایش*

نمونه آنتی‌ژن(گرم) بهمراه بافر **PBS** PH=۷/۲ در مجاورت نیتروژن مایع در برودت ۱۷۶- درجه سانتیگراد کاملاً متلاشی می‌شود این نمونه بعداً درون لوله‌های اپندرف انتقال و با عمل سانتریفوژ به دو فاز مایع و رسوب تقسیم می‌گردد. فازمایع با سمپلرهای میکروتایتر در لوله‌های اپندرف توزیع و در شرایط ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

۳- *آماده کردن آنتی‌ژن برای تزریق به حیوان:*

به یک لوله از آنتی‌ژن آماده شده در مجاورت **PBS** ادجونت کامل فروند (**Completed Adjuvant Freund's**(**FCA**)) اضافه می‌گردد. پس از یکنواخت کردن مخلوط ، محلول آماده تزریق به حیوان آزمایشگاهی می‌باشد.

۴- *آماده کردن حیوان حساس آزمایشگاهی :*

در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی تعدادی حیوان(مثلاً موش) برای تزریق آنتی‌ژن و آزمایش و کنترل آن مشخص کرده و در قفس جداگانه‌ای که قبلاً به این منظور آماده به وسایل آبخوری و دانخوری مجهز شده‌اند قرار داده

می‌شوند.

۵- تزریق آنتی‌ژن به موش

موش با تزریق یک آنتی‌ژن ایمن می‌شود تا آنتی‌بادی تولید کند. حیوان با تولید آنتی‌بادیهای مختلف بر علیه آنتی‌ژن تزریق شده واکنش نشان می‌دهد به این منظور آنتی‌ژن آماده شده بصورت داخل صفاقی به موشها تزریق می‌شود بفاصله دو هفته تزریق دوم انجام می‌گیرد. در روز بیست و هشتم موشهای تزریق شده از نظر تولید آنتی‌بادی کنترل می‌شود.

۶- ارزشیابی تولید آنتی‌بادی در موشهای تزریق شده

موشهایی که به آنها آنتی‌ژن تزریق شده است با خراش انتهای دم، نمونه خون تهیه و از خون آماده شده بهمراه بافر **PBS** محلول **Supernatant** درست می‌شود که احتمالاً حاوی آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن تزریق شده می‌باشد. سپس نمونه خون هر یک از موشها بطور جداگانه از نظر میزان تولید آنتی‌بادی برای انتخاب موش مورد نظر با یکی از روشها. **ELISA.IFAT**و **RIA** ارزشیابی می‌شود.

۷- تهیه سوسپانسیون سلولی

سوسپانسیون سلولی معمولاً از طحال و یا از سلولهای غدد لنفاوی تهیه می‌شود.

طحال موش که دارای پلاسما سلهای تولید کننده آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن تزریق شده است در شرایط استریل از بدن موش خارج می‌گردد. عضو خارج شده را درون کیسه پلاستیکی مخصوص (**Stomaker bag**) قرار داده، محتوی کیسه با دستگاه **Stomcah machine** خرد می‌شود تا لنفوسیتهای آن آزاد گردند. از آنجا که تعداد کمتری از لنفوسیتهای طحال در مقابل آنتی‌ژن واکنش نشان می‌دهند لازم است تعداد زیادی از سلولهای طحال ($1\text{-}3x10^8$) و سلولهای میلوما تهیه گردند تا شانس تماس بین سلولهای طحال تولید کننده آنتی‌بادی و سلولهای میلوما را افزایش دهند.

۸- آماده کردن سلولهای میلوما

سلولهای میلوما که در شرایط ازت مایع (۱۷۶- درجه سانتیگراد) نگهداری می‌شوند از انجماد خارج می‌گردند. در جریان این مرحله ۷۰-۶۰ درصد سلولهای میلوما از بین میروند ولی باقیمانده سلولها برای رشد و ادامه کار کافی است. بهر حال تعداد سلولهای میلوما باید در حدود ($1\text{-}10x10^7$) سلول در محیط باشد. برای این کار لوله محتوی سلول میلوما سانتریفوژ می‌شود و به رسوب محیط، **RPMI** اضافه می‌گردد. رسوب یکنواخت شده بترتیب در فلاسکهای کوچک و بزرگ و در مجاورت محیط مغزی کشت داده می‌شود. فلاسکهای آماده شده کشت سلولی در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ گاز **CO2** قرار می‌گیرند تا رشد و تکثیر سلولی ادامه پیدا بکند.

۹- آمیزش سلولهای طحال با سلولهای میلوما

این مرحله در حقیقت حساسترین بخش تولید

مـنوکلونال آنتی‌بادی است. بـا تـوجه بـه اینکه سـلولهای طـحال در کشت سـلولی بـرای مـدت طولانی نمی‌توانند زنده بمانند، بنابراین آنها باید با سلولهای میلوما کـه فـناناپذیر هستند و بـرای مدت طولانی زنده می‌مانند و رشد و تکثیر پیدا می‌کنند ترکیب شوند. تـرکیب مـمکن است بین سلول طحال با سـلول طـحال، سـلول مـیلوما بـا سلول میلوما و سلول طحال با سلول میلوما انجام گیرد. سلولهای تـوموری بـعلت نـقص در تـولید آنزیم **HPRT** در محیط غنی از **HAT** نمی‌توانند زنده بمانند بنابرایـن سـلولهای مـیلومای تـرکیب نشده در برخورد با آنزیم سمی سوبسترا از بین می‌روند؛ سلولهای لنفاوی تولید کننده آنتی‌بادیها نیز که با سـلول مـیلوما تـرکیب نشـده‌انـد پس از چندین بار تکـثیر در مـحیط خـارج بـعلت کـوتاه بودن دوره زندگی از بین خواهند رفت. بهر حال تنها سلولهای هیبریدمای واقعی در محیط **HAT** زنده می‌مانند و ادامه حیات مـی‌دهند و بـوسیله توانایی رشد نامحدودشان شناخته می‌شوند.

برای انجام عمل فیوژن، امولسیون سلولی داخل کیسه تا نصف لوله‌های مخروطی شکـل اضـافه مـی‌شود، بـقیه لوله‌هـا نـیز بـا سـلول مـیلوما پـر می‌گردد.

پس از اضافه کردن بافر **PBS**، لوله‌ها سـه مـرتبه سـانتریفوژ مـی‌شوند. بـه رسـوب بـاقیمانده در مرحله سوم و در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد آب گرم، محلول پلی‌اتیلن‌گلیکول ۵۰٪ (**PEG 400**) اضافه می‌گردد. بـفاصله زمـانی کـمتری و در دو مرحله با اضافه کردن **RPMI - 1640** کـه دارای ۱۰٪ **FBS** (**Fetal bovine Serum**)(سرم جنین گاوی) است حجم امولسیون سـلولی امـولسیون سلولی داخـل لوله‌هـا بـه ۲۰ سـانتی‌متر مکـعب افزایش داده می‌شوند. پس از سـانتیریفوژ کـردن لوله‌هـا، رسـوب سـلولی بـاقیمانده در مـحیط انـتخابی (**Selective Media**) غـنی از **HAT** و بهمراه **RPMI** و **FBS** کشت داده می‌شود.

مـحتوی لوله‌هـا بـوسیله سـمپلرهای ۲۰۰ میکرولیتری استریل، در پلیتهای میکروتایتر، تـه پهن تـوزیع مـی‌گردد. پـلیتهای کشت سـلولی در شرایط اتو ۳۷ درجه سانتیگراد و در مجاورت ۵٪ گاز کربنیک (CO_2) و رطـوبت، ۵-۴ روز بـاقی می‌ماند. پس از این مدت برای کنترل و مشـاهده رشد سلولی، پلیتها در زیر مـیکروسکوپ مـورد مطالعه قرار می‌گیرند. تعداد هیبریدهایی که پس از ۶-۲ هـفته در مـحیط **HAT** بـاقی مـی‌مانند ممکن است در حدود ۵۰۰-۱۵۰ سلول بـاشد. مرحله فیوژن باید خیلی سریع، با مـلایمت و در شرایط کاملاً استریل انجام گیرد،(نمودار ۱).

۱۰- *آزمایش پلیتها از نظر تولید آنتی‌بادی*

در این مرحله محیط **Supernatant** مـوجود در حفره‌های پلیت که در آن سلولهای هیبریدما رشد می‌کنند از نظر تولید آنتی‌بادی مطلوب آزمـایش می‌شود. معمولاً در مراحل اول تولید آنتی‌بادی، تعداد زیادی از خطوط سلولی هیبریدما آزمایش می‌گردند. با توجه باینکه صدها سلول **B** وجـود دارد و هـر سـلول **B** فـقط یک نـوع آنتی‌بادی

اختصاصی تولید می‌کند، بنابراین آنتی‌بادی باید به اندازه کافی اختصاصی باشد تا تنها با آنتی‌ژن آزمایش شده در حیوان تلاقی بکند.

۱۱ - *تشکیل کلون با عمل جداکردن سلولها*

وقتی که یک سلول هیبرید تولید کننده آنتی‌بادی مناسب انتخاب شد. سلولهای هیبریدمای حاصل از آن خط سلولی را، بمقدار زیاد به محیط مصنوعی کشت سلولی در خارج از بدن (**in-vitro**) و یا به پرده صفاق تعداد زیادی موش (**in-vivo**) انتقال می‌دهند. در محیطهای کشت سلولی و یا در مایع آسیت (**Ascites**) در اثر رشد و تکثیر سلولها، مقدار زیادی آنتی‌بادی ترشح می‌شود. در طول زندگی یک موش، مایع آسیت را ممکن است چندین بار از بدن آن خارج کرد. تکثیر سلول هیبرما، در محیط کشت سلولی ادامه پیدا می‌کند و یا برای استفاده‌های بیشتر در شرایط انجماد نگهداری می‌شود. در نهایت تمام سلولهایی که از یک سلول هیبرید مشتق شده‌اند و یک نوع مولکول آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن مورد نظر تولید می‌کنند مونوکلونال آنتی‌بادی گفته می‌شود.

استفاده از آنتی‌بادیهای مونوکلونال

هم اکنون آنتی‌بادیهای مونوکلونال با ویژگیهای متفاوت، با موفقیت بصورت تجارتی تولید می‌شوند و برای مشخص کردن آنتی‌ژن عفونتهای مختلف، در دسترس مراکز تحقیقاتی ، تشخیصی و مراکز بهداشتی درمانی قرار می‌گیرند. یکی از نتایج عمده این نوع آنتی‌بادیها تشخیص و تفکیک عوامل بیماریزای عفونی در زمان کوتاه است که با حذف مراحل کشت ، رنگ‌آمیزی و یا تست‌های بیوشیمیایی صورت می‌گیرد. پیش‌بینی می‌شود با توجه به استفاده روز افزون از آنتی‌بادیهای مونوکلونال در تشخیص ، تحقیق و درمان خیلی از بیماریها توسعه آن در آینده وسیع‌تر و ادامه‌دار خواهد بود.

۱ - *استفاده‌های تشخیصی*

تشخیص عوامل بیماریزای عفونی در محیط خارج.

تشخیص در بدن موجود زنده یا کانونی با آنتی‌بادیهای استاندارد (برای مثال رادیواکتیو)، تخمین اختصاصی متاستازهای سرطانی ارگانهای ، عوامل عفونی رسپتورهای هورمونی ، رسپتورهای عصبی و غیره. بعنوان استاندارد کردن آنتی‌بادیهای تشخیصی قابل دسترس بمقادیر نامحدود در سرتاسر جهان.

بعنوان استاندارد کردن پادتنها برای تایپنگ نسوج یا پیوند اعضاء .

۲ - *استفاده‌های تحقیقی*

تجزیه ساده تعیین کننده‌های آنتی‌ژنیکی یک کمپلکس آنتی‌ژنی.

تمیز دادن تحت تایپهای سلولی، برای مثال تحت تایپهای لنفوسیت T .

۳ - *استفاده‌های درمانی*

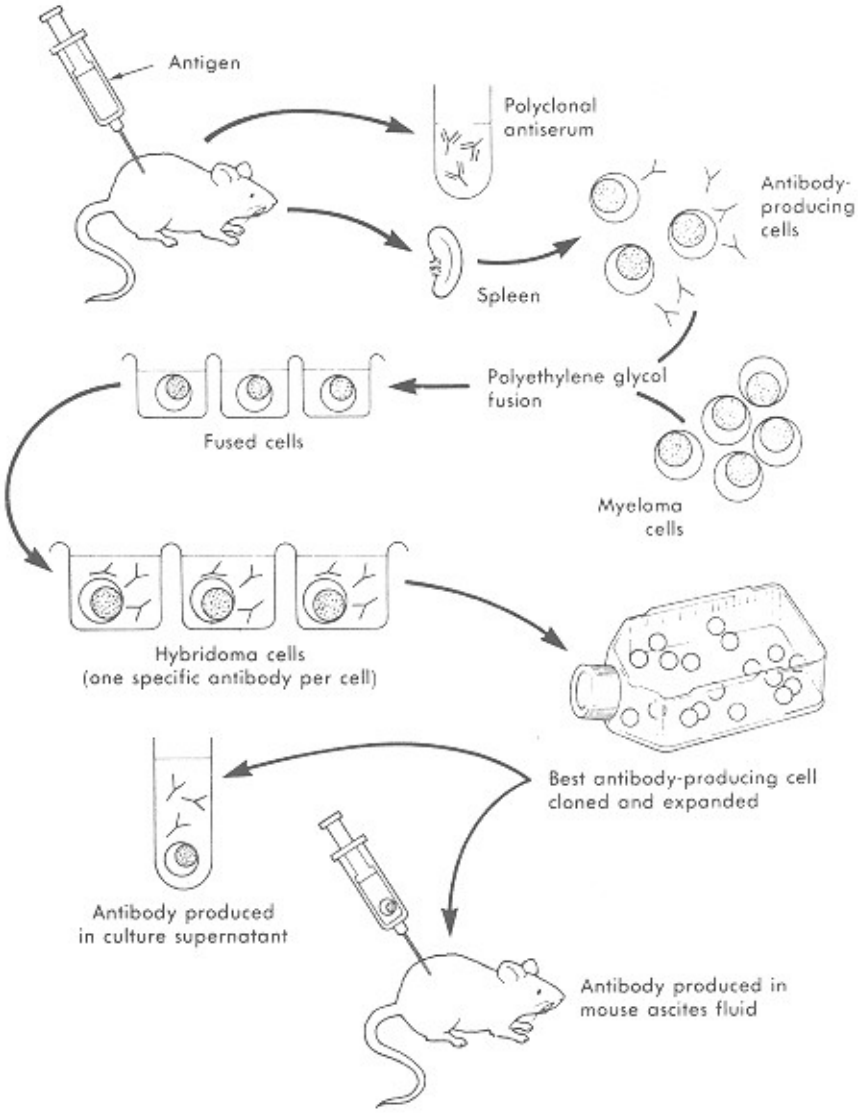
ایجاد ایمنی غیر فعال کاملاً اختصاصی بر علیه عوامل عفونی، داروهای سمی ، سرطانها.

بعنوان حامل پیوند کووالان داروها بر علیه

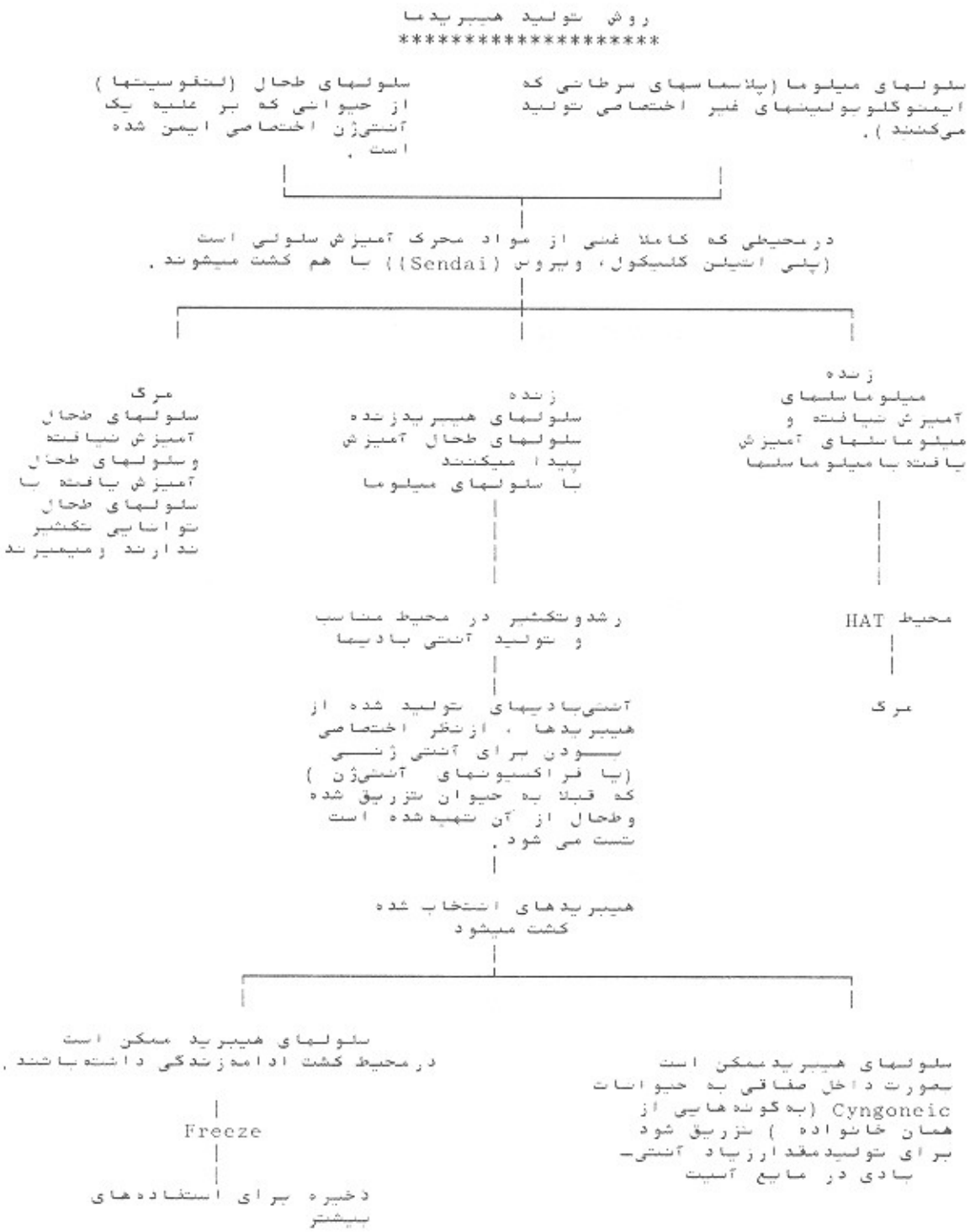
پاتوژنها.

بعنوان حامل مواد سمی (ایمونوتوکسینها) که با دقت می‌تواند روی سلولهای سرطانی قرار گیرد.

بعنوان سم یا اسیر کننده‌های ویروسی در خارج از گردش خون بیماران .



شکل شماره ۱: تولید منوکلونال آنتی‌بادی، اقتباس از کتاب میکروبیولوژی ***Baron,E.J. and Finegold, S.M.1990***



نمودار ۱: روش تولید سلول هیبریدما،اقتباس از کتاب میکروبیولوژی *Boyd, R.F. and Hoerl B.G. 1991*

منابع و مآخذ

1. Baron . E.J. and Finegold . S.M.(1990). Diagnostic Microbiology, 8 th, edi. the C.V. Mosby Company.st. Louis . Baltimore , Philadelphia, Torento, P, 134.

2. Boyd. R.F. and Hoerl B.G.(1991). Basic Medical microbiology, 4 th, edi. Printed in the united ststes of America.

3. Stites D.P,. stobo J.D. and Wells J.V.(1987). Basic and clinical Immunology. 6 th . edi. Appleton and Lange. Norwalk, Camecticut/Los .Altos, California. pp:280-282.

۴- رویت ، ایوان، پروستوف، جاتان. میل، دیوید. ترجمه ملک گودرزی، ب. یزدانی، ش.«ایمونولوژی»، انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، ص ۴۲۹.

۵- رضایی پور،کاردوست . ر .« سرولوژی ، ایمونولوژی و ایمنوشیمی آزمایشگاهی»، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی . (۱۳۶۹) صفحات ۱۹۲-۱۷۰.

۶- عطائیان، علی ، «کارهای انجام شده در فرصت مطالعاتی در بخش بیومدیکال دانشگاه جمزکوک استرالیا» براهنمایی پروفسور **Copeman D.B**، ۱۹۹۴ .