Thesis Title Development of High Efficiency Hybridoma Technology for Production of Monoclonal Antibodies

Author Miss Napaporn Apiratmateekul

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Watchara Kasinrerk Advisor

Assoc. Prof. Dr. Chatchai Tayapiwatana Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Sawitree Chiampanichayakul Co-advisor

ABSTRACT

Monoclonal Antibody (mAb) is a glycoprotein that specifically reacts to its recognized antigen. MAbs, therefore, become essential tools for biological researches, development of diagnostic kits and therapeutic agents. Hybridoma technique is the standard method for production of mAbs. In this study, we aimed to improve the efficiency of conventional hybridoma technique for mAbs production. In this thesis, four study approaches were carried out.

First, we determined the method for preparation of conditioned medium for promoting growth of the hybridomas after cell fusion and during single cell cloning. The conditioned media generated in this study were derived from BW5147 mouse thymoma cells. It was found that both non-PMA- and PMA-induced conditioned media could support hybridoma single cell cloning and be effectively employed for generation of hybridomas secreting various mAbs. The use of this home-made conditioned medium can lower the cost of the production of mAbs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Second, we developed techniques to enhance cell fusion efficiency and increase high numbers of hybridoma produced antibody of interest. By the standard hybridoma technique, fusing of spleen cells and myeloma cells are randomly occurred. The failure to control cell fusion, therefore, affects the yield of the generated hybridomas and results in very low number of hybridoma producing mAb of interest. In this study, we have developed technique for improving the conventional hybridoma technique. The developed techniques include pre-B cells and pre-antigen specific B cells isolation strategies. By the pre-B cells isolation technique, B cells were firstly isolated from spleen cells using anti-immunoglobulins magnetic beads and Magnetic Cell Sorting System (MACS). The isolated B cells, instead of total spleen cells, were used as cell fusion partners. By this technique, hybridoma producing antibody against interested antigen could be generated. The major advantage of this technique is that the fibroblast overgrow in the post-fusion plates were dramatically reduced. For pre-antigen specific B cells isolation technique, the method for isolation of antigen specific B cells out from the immunized spleen cells, using immunomagnetic separation procedure, was developed. B cells expressing antibody of interest were then used as fusion partner. Hybridoma producing mAb of interest were effectively produced. Both pre-isolation of B cell and antigen-specific B cell strategy are potentially valuable for enhance efficiency of mAb production.

Third, we modified the hybridoma technique to generate the mAbs having a specific isotype. As the standard hybridoma technique it is not always straightforward to obtain mAbs that have a specific isotype, in this study, a modified the hybridoma technique for producing mAbs carrying desire isotype was established. The B cells carrying IgM or IgG from spleen cells of the immunized mice were isolated by

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

MACS and used to generate hybridoma cells by the standard hybridoma technique. With the isolated IgM^+ cells, a large number of hybridomas were IgM producing cells and IgM mAbs specific to the antigen of interest were obtained. With the isolated IgG^+ cells, the generated hybridomas produced IgG antibody and no IgM producing hybridoma was generated. A large number of IgG mAbs specific to antigen of interest could be produced. The results indicate that the generated hybridomas produce corresponding antibody isotypes as expressed on the surface of their starting cells. This developed technique will be very useful for production of desired mAbs having a specific isotype.

Lastly, by standard hybridoma technique, *in vivo* immunization is the routine procedure for induction of antibody responses. In this study, we established and optimized conditions of *in vitro* immunization for B cell activation and applied for production of mAb in our laboratory. We demonstrated here the possibility of using *vitro* immunization for production of antibody *in vitro*. The established methods could be employed for production of both polyclonal and monoclonal antibody. This method is simple and less time consuming for production of antibody of interest.

Taken together, in this thesis, we have developed several techniques for effective production of hybridomas and mAb. We have 1) produced home-made conditioned medium for effectively support growth of hybridomas, 2) modified hybridoma techniques designed as pre-isolation of B cell strategy and pre-antigen specific B cell strategy for enhancing efficiency of mAb production, 3) also established the method for production of mAbs having a desired isotype, and 4) optimized the conditions of *in vitro* immunization to produce polyclonal and monoclonal antibodies in our laboratory.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคโนโลยีไฮบริโดมาประสิทธิภาพสูงเพื่อการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี

ผู้เขียน นางสาว นภาพร อภิรัฐเมธีกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. วัชระ กสิณฤกษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. สาวิตรี เจียมพานิชยกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โมโนโคลนอล แอนติบอดี เป็นสารไกลโคโปรตีนที่ทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับแอนติเจน จากคุณสมบัติพิเศษนี้ทำให้โมโนโคลนอล แอนติบอดีถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำคัญในงานวิจัยทางชีววิทยา ใช้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยและพัฒนาเป็นยาเพื่อการรักษาโรค วิธีไฮบริโดมานับเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยมีเป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีไฮบริโดมาในการผลิตโมโนโคลนอล แอนติบอดี โดยได้ทำการศึกษาวิจัยใน 4 หัวข้อ ได้แก่

หัวข้อที่หนึ่ง ผู้วิจัยศึกษาถึงการผลิต conditioned medium สำหรับส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ไฮบริโดมาภายหลังการเชื่อมเซลล์และในระหว่างการทำ single cell cloning โดย conditioned media ที่ผลิตขึ้นในการศึกษานี้ได้มาจากเซลล์ BW5147 mouse thymoma ผลการศึกษาพบว่า conditioned medium ทั้งที่ผลิตขึ้นจากการกระตุ้นด้วยสาร PMA และไม่ได้กระตุ้นด้วยสารใดๆ สามารถสนับสนุนการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาในระหว่างการทำ single cell cloning ได้ และยังสามารถใช้ในการผลิตไฮบริโดมาเพื่อสร้างแอนติบอดีได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ conditioned medium ที่ผลิตขึ้นเองนี้จะช่วยลดต้นทุนการผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีลงได้

หัวข้อที่สอง ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเชื่อมเซลล์และเพิ่มจำนวนไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่สนใจ เนื่องจากโดยวิธีไฮบริโดมามาตรฐานการเชื่อมกันระหว่างเซลล์ม้ามและเซลล์ myeloma จะเกิดขึ้นแบบสุ่ม จากการที่นักวิจัยไม่สามารถควบคุมการเชื่อมเซลล์ได้นี้ส่งผลกระทบต่อจำนวนของไฮบริโดมาที่เกิดขึ้นและทำให้ได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่สนใจในปริมาณต่ำ ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีไฮบริโดขึ้นมา 2 รูปแบบ คือเทคนิค pre-B cells isolation และ pre-antigen specific B

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

cells isolation สำหรับเทคนิค pre-B cells isolation นั้น B cells จะถูกแยกออกจากเซลล์ม้าม โดยใช้ anti-immunoglobulins magnetic beads และระบบ Magnetic Cell Sorting System (MACS) จากนั้น B cell ที่แยกได้จะถูกนำไปใช้ในการเชื่อมเซลล์แทนการใช้เซลล์ม้ามทั้งหมด เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้ผลิตไฮบริโดมาที่ผลิตแอนติบอดีที่สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยข้อดีอย่างหนึ่งของเทคนิคนี้คือสามารถลดการเจริญของเซลล์ fibroblast ไปในเพลทหลังจากการเชื่อมเซลล์ลงได้อย่างมาก ในส่วนของเทคนิค pre-antigen specific B cells isolation นั้น ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการแยก B cells ที่มีแอนติบอดีบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่สนใจออกมาจากเซลล์ม้ามโดยอาศัยหลักการของ immunomagnetic separation จากนั้นจึงนำเอา B cells ที่แยกได้มาใช้ในการเชื่อมเซลล์ เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ผลิตไฮบริโดมาที่สร้างโมโนโคนอล แอนติบอดีที่สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ทั้งการแยก B cell และ antigen-specific B cell ก่อนการเชื่อมเซลล์ นับเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีได้

หัวข้อที่สาม ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีไฮบริโดมาเพื่อให้สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ที่ต้องการ เนื่องจากโดยวิธีไฮบริโดมามาตรฐานนั้น โมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตได้มักจะไม่ได้ไอโซไทป์ตรงตามที่ความต้องการ ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับเปลี่ยนกระบวนการทำในวิธีไฮบริโดมามาตรฐานเพื่อให้สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ที่ต้องการ โดยทำการแยก B cells ที่สร้าง IgM หรือ IgG ออกจากเซลล์ม้ามโดยใช้เทคนิค MACS แล้วนำเซลล์ที่แยกได้ไปผลิตไฮบริโดมา ซึ่งพบว่าจากการเชื่อมเซลล์โดยใช้เซลล์ที่แสดงออก IgM บนผิวเซลล์ ไฮบริโดมาส่วนใหญ่ที่ผลิตได้จะเป็นเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีชนิด IgM และโดยวิธีนี้สามารถผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีที่สนใจชนิด IgM ได้ และจากการเชื่อมเซลล์ด้วยเซลล์ที่แสดงออก IgG บนผิวเซลล์ พบว่า ไฮบริโดมาที่ผลิตขึ้นนั้นเป็นเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีชนิด IgG โดยไม่มีไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีชนิด IgM และโดยวิธีนี้สามารถผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีที่สนใจ ชนิด IgG ได้เป็นจำนวนมาก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไฮบริโดมาที่ผลิตได้จะสร้างแอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ที่สอดคล้องกับแอนติบอดีที่แสดงออกบนผิวเซลล์เริ่มต้น ดังนั้นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีประโยชน์อย่างมากสำหรับการผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีที่ต้องการไอโซไทป์ที่เฉพาะเจาะจง

ส่วนสุดท้ายของการศึกษานี้ เนื่องจากโดยวิธีไฮบริโดมามาตรฐานการกระตุ้นให้การสร้างแอนติบอดีจะทำได้โดยวิธี *in vivo* immunization ในการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการกระตุ้น B cells ในระบบ *in vitro* immunization จากการศึกษานี้พบว่าเทคนิค *in vitro* immunization สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีในหลอดทดลองได้ และด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการผลิตทั้งโพลีโคนอล แอนติบอดีและโมโนโคนอล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอนติบอดีได้ วิธีการกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีแบบ *in vitro* immunization นี้ เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถลดระยะเวลาในการผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่สนใจลงได้

จากการศึกษาทั้งหมดในวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคต่างๆ หลายเทคนิคที่ทำให้การผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น 1) ผู้วิจัยได้ผลิต conditioned medium เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของไฮบริโดมาขึ้นมาใช้เอง, 2)ได้พัฒนาเทคนิคไฮบริโดมาโดยอาศัยหลักการการแยก B cells และ antigen-specific B cell ก่อนการเชื่อมเซลล์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดี, 3) ได้พัฒนาวิธีการผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีที่มีไอโซไทป์ที่ตรงกับความต้องการได้อีกด้วย และ 4) ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการกระตุ้น B cells ในหลอดทดลองเพื่อใช้ในการผลิตโพลีโคนอลแอนติบอดีและโมโนโคนอล แอนติบอดี เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมานี้ จะได้นำไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved