

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

免疫磁性乳膠顆粒的製備與臨床應用

Preparation and clinical application of immuno-magnetic latex

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-300

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：林東燦 執行機構及單位名稱

一、中文摘要

在最近十年內，周邊造血幹細胞的移植，廣泛地應用於癌症的治療。異體移植可以用來解決不同的血液疾病，自體移植對於高劑量化療的病患，可以加速病患骨髓的回復，防止感染或出血的併發症發生。但是自體移植總有癌細胞污染之疑慮，而異體移植亦有移植物抗宿主病的難題。所以，選取 CD34+細胞作為移植可能可以避免上述兩項移植的缺點而達到更好的效果。在一般商業化選取 CD34+細胞是利用磁場分離(magnetic cells sorting)。但是 MACS 所使用的帶有 anti-CD34 單株抗體的免疫磁性乳膠顆粒是非常貴的。每處理一次約需 20 萬台幣。我們嘗試利用我們自製的免疫磁性乳膠顆粒上的 COOH 官能基鍵結 anti-CD34 單株抗體，去做相同純化的療程。我們相信自製的免疫磁性乳膠顆粒會較便宜，病人也能夠負擔得起。我們希望此技術能夠進行，而且期待可以推廣至其他負向選取 (negative selection)，例如接枝 anti-CD4 或 anti-CD8 去移除 CD4+ 細胞或 CD8+細胞，用來治療一些自體免疫方面的疾病。

關鍵詞：

CD34+細胞，磁場分離，磁性乳膠顆粒

Abstract

Peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) is widely used in

this decade for cancer treatment. Allogeneic setting can be used for various blood diseases and autologous setting may be benefit for solid tumors as a rescue after high-dose chemotherapy to accelerate the bone marrow recovery and prevent the infections or bleeding complications. But, possibility of tumor cells contamination is a pitfall of autologous PBSCT while increased incidence of graft vs. host disease may decrease the successful rate in allogeneic PBSCT. So, CD34+ cells selection will solve the above problems. The commonly used and commercially available method of CD34+ cells selection is magnetic cells sorting. But the beads with anti-CD34+ monoclonal antibodies are rather expensive. It needs 200,000 NT per procedure. So, We try to bind anti-CD34 to our homemade magnetic beads using -COOH bounding in order to do the same purging procedure. We do believe the homemade price will be rather cheap and can be afforded by patients themselves. We hope this technique will work and it can be expanded to other negative selection such as anti-CD34 or anti-CD8 to remove CD4+ or CD8+ cells in order to treat some antoimmune diseases.

Keywords: CD34+ cells, magnetic cells sorting, magnetic beads

二、緣由與目的

早期的周邊造血幹細胞只是合併自體骨髓移植使用以確保病人接受足夠的幹細胞移植而加速血球及血小板的恢復速度。但周邊造血幹細胞合併自體移植對於病人而言除了可以加速病人移植後的造血速度以減少病人的住院日數外，還可以減少病人移植後血小板或紅血球輸血的數量以減少病人醫療費用的支出和其他的併發症發生（如感染）。因此近年來周邊造血幹細胞移植被廣泛的應用到臨床腫瘤治療上，目前雖然已有相當多的資料支持周邊造血幹細胞移植應用在惡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、乳癌等病人當作高劑量化學治療的支持療法。¹

由於對周邊造血幹細胞研究的進步，臨床上可以收集到足夠數量和功能的造血幹細胞以應用於病人身上當作高劑量化療後來加速病人移植後造血幹細胞植入的時效，因此可以預期將來除了對於自體周邊造血幹細胞移植應用的範圍會更加開展外，異體周邊造血幹細胞的移植在可避免捐贈者全身麻醉的危險和恐懼感及疼痛的壓力下，恐怕在不久的將來如能有效地排除因內含較高比率的 T 細胞淋巴球所導致的較高比率移植物抗宿主病的問題時即有可能取代異體骨髓移植在當今對血液惡性腫瘤疾病治療所扮演的角色²⁻⁴。利用對於周邊造血幹細胞生物學研究的突破，除了可以將病人體內 CD34+細胞分離出而在實驗室內加以擴增培養以作為多次或重複高劑量化學治療後救援性支持療法的使用外，尚可以利用目前最新的基因嵌合技術發展出基因治療移植術，以改善目前有些令人感到挫折的癌症病人的治療結果。¹ 諸多證據顯示愈來愈高的高劑量化學治療並不能根除所有的惡性細胞，以造血幹細胞移植來治療多種血液惡性疾病過程中，發現移植物對抗腫瘤效應(Graft vs. Tumor

effect)才是降低復發率的真正重要的免疫機制⁵。慢性骨髓性白血病移植後復發的病患，再輸入大量原來捐贈者的淋巴球，藉著移植物對抗腫瘤效應，百分之七十五的患者會再次完全緩解，雖然百分之八十會發生急性移植物抗宿主疾病。目前臨床幹細胞移植應用趨向採用較緩的調理療法，先成功植入異體造血幹細胞，作好移植物抗宿主疾病預防措施後，再大量植入捐贈者淋巴球，營造出有效的移植物對抗腫瘤效應，藉此根除所有的惡性細胞，此作法除了可望提高治癒率之外，更因採用較緩和的調理療法可減輕臨床多種嚴重併發症的發生，降低死亡率⁶。

人體移植所需要的造血幹細胞數目究要多少方能達到成功的植入截至目前為止仍未確定，但許多的研究證據指出造血系統的重建速度與所輸入的造血幹細胞數量成直接相關性，一般標準的動員人體體內的造血幹細胞所使用方法為 G-CSF 每天每公斤皮下注射 10-15 毫克其間視是否合併化學治療而不同，單獨使用為 5-7 天，合併化療則需 10-14 天，視化療的強度而不同，至於 GM-CSF 與 G-CSF 的使用方法和效率相當，但前者的副作用較大。至於一些新問世的造血細胞生長因子目前的資料則顯示似乎可以與 G-CSF 合併達到加成作用而改善造血幹細胞收集的效率⁷。

自體移植總有癌細胞污染之疑慮，而異體移植亦有移植物抗宿主病的難題。所以，選取 CD34+細胞作為移植可能可以避免上述兩項移植的缺點而達到更好的效果。至於在眾多分離 CD34+ 方式中，只有 Magnetic cell sorting (MACS)的所得到的純度和產率是較高的⁸。

臨床上對於收取造血幹細胞的方式通常係以較新型的連續性血液細胞分離機，如 Cobe Spectra 或 Fenwall CS3000 等機器進

行白血球分離術，一般施行原則大約在 3-4 小時內分離病人或捐贈者 10-20 公升血液即可得到所要的細胞數。血球分離過程當中病人或捐贈者僅會一些輕微的不適症狀如低血鈣、低血壓、以及冷顫感等。

在上述的最佳分離方式中所需的材料為包覆磁性材料之免疫乳膠顆粒，初步先合成磁性乳膠顆粒，再利用 E.D.C.活化磁性乳膠顆粒上 COOH 官能基，再和免疫球蛋白（例如 anti-CD34 antibody）上 NH₂ 鍵結，再利用 MACS 分離技術，分離出 CD34+ 細胞。有鑑於國外所可買到免疫磁性乳膠顆粒極為昂貴（每處理一次約需 20 萬台幣），故亟思自製自產之免疫磁性乳膠顆粒以便宜價錢供應國內病患使用，以造福癌症病患。

三、實驗方法

(一) 製備磁性乳膠顆粒

以共沈法來合成 Fe₃O₄ 的磁性流體 取 FeCl₃·6H₂O, FeCl₂·4H₂O, 氨水攪拌反應 6 分鐘，放在加熱板上加速沈澱，吸掉上層澄清液，再加入月桂酸，以 90 反應 4 分鐘，加二次水至 1L。

第一步：以甲基丙烯酸甲酯（methyl methacrylate, MMA），磁性流體，以無乳化劑乳化聚合合成包覆磁性粒子的種子。

第二步：以第一步反應的乳膠顆粒為種子，再加入不同比例的親水性甲基丙烯酸（Methyl acrylic acid, MAA）與拒水性甲基丙烯酸甲酯的單體，已無乳化劑種子乳化聚合，合成表面具官能基（COOH）的磁性高分子乳膠顆粒。

將第二步聚合完之磁性乳膠顆粒，以（分子量 8000-10000）透析袋透析一星期，並天換水，以除去未反應單體。

將透析完之磁性乳膠顆粒烘乾，並利用超導量子干涉磁量儀（SQUID）測量磁性乳膠顆粒之磁滯曲線。

將透析完之磁性乳膠顆粒烘乾，並利用 BET 測量磁性乳膠顆粒之表面積。

將透析完之磁性乳膠顆粒，利用導電度滴定方式，測量磁性乳膠顆粒表面（COOH）官能基的含量。

(二) 接枝 streptavidin

透析過的磁性乳膠顆粒，取定量磁性乳膠顆粒固含量 10%、偶合劑 E.D.C 10mg/mL, NHS 100nM, 溶於 MES buffer 50 mM, 反應 30min 進行羧酸基 COOH 的活化。

將活化完的磁性乳膠顆粒，離心，倒掉上層澄清液，以 pH=6.1 之 MES buffer 50mM 再懸浮，再離心，倒掉上層澄清液。

將活化完的磁性乳膠顆粒，再懸浮於 50mM MES buffer，並加入 streptavidin 100μg/mL，反應 1 hr。

將反應完之磁性乳膠顆粒，離心，並倒掉上層澄清液，以 pH=6.1 之 MES buffer 50mM 再懸浮，再離心，重複上述步驟，再懸浮於 PBS，再滴入 0.02% 的 NaN₃，保存於 4 環境下。

(三) 檢測接枝情形

鍵結 streptavidin 的磁性乳膠顆粒以 light scattering 測量接枝前後粒徑的差異。

鍵結 streptavidin 的磁性乳膠顆粒以 Zeta potential 測量接枝前後，磁性乳膠顆粒所帶的表面電位。

(四) 臨床病理之應用

取適量的經白血球分離術之檢體，加入 biotin-antiCD34 抗體反應 1 小時，將我們所製備的表面鍵結 streptavidin 的磁性乳膠顆粒先利用 AB 型血清 blocking 再加入，利用 MACS column positive 選取 CD34+ 細胞，利用流式細胞儀分析。

經過固定後，利用掃描式電子顯微鏡觀察細胞表面接上乳膠顆粒的情形。

四、結果與討論

(一) 製備磁性乳膠顆粒

本實驗所合成的磁性乳膠顆粒，採兩步驟無乳化劑乳化聚合反應所得。其穿透式電子顯微鏡，如圖一。由圖一可知磁性乳膠顆粒粒徑約 100nm，而且內部包覆 Fe₃O₄ 磁性粒子(在圖一中，黑色部分)。

實驗中因為需要藉由磁場分離，而且當磁場消失時，磁性乳膠顆粒必須沒有磁性，才易於取出，所以所合成之磁性乳膠顆粒必須沒有磁滯現象，如圖二。當外加磁場為零時，殘留磁化量也是零。

本實驗所製備之磁性乳膠顆粒之表面積以及表面-COOH 官能基，如表一所示。本實驗表面積是由 BET 所測量。磁性乳膠顆粒之表面-COOH 官能基，是由電導度計以 0.1 N NaOH 滴定測量，得一轉折點，此轉折點為當量點。如果 COOH 官能基在第二步聚合反應時被包埋在裡面時，會造成表面官能基滴定的誤差。

(二) 檢測接枝情形

接枝 streptavidin 前、後之磁性乳膠顆粒，其 light scattering 分析如圖三和圖四。在接枝前，所測得的磁性乳膠顆粒，其粒徑約 193nm 比電子顯微鏡下分析的還要大，原因是因為 light scattering 所測量的為磁性乳膠顆粒澎潤時的粒徑；穿透式電子顯微鏡所測量的為乾燥時的粒徑。當接枝 streptavidin 後之免疫磁性乳膠顆粒，其粒徑分佈變得比較寬廣。

接接 streptavidin 前、後之磁性乳膠顆粒，其 zeta potential 分析如圖五。由圖五可以知道未接枝 streptavidin 之磁性乳膠顆粒，其表面電位皆為負值，因為 COOH 官能基所造成的影響。接枝 streptavidin 之磁性乳膠顆粒，其表面電位在低於 pH =3 呈正值，因為 streptavidin 其等電位點 (isoelectric point pI~5)，所以造成低 pH 值時，表面電位為正，也間接證明 streptavidin

有鍵結至磁性乳膠顆粒表面。

(三) 臨床病理檢驗

檢體經過磁性免疫乳膠顆粒的處理前、後之流式細胞儀分析圖如圖六和圖七。由圖六和圖七比較可知檢體經磁性免疫乳膠顆粒的處理，可以提高 CD34+ 細胞的濃度。但是還不是很理想，其原因可能為我們分離細胞所用的抗體和流式細胞儀分析時所使用抗體為同一株(Qbend10)，部分細胞中表面抗原，可能被分離細胞所用的抗體佔據，造成數值降低。

檢體經過磁性免疫乳膠顆粒的處理前、後之掃描式電子顯微鏡圖如圖八和圖九。由圖九，可以觀察到磁性免疫乳膠顆粒鍵結在細胞表面，且粒徑約 100nm。

五、計畫成果自評

本計畫所合成表面鍵結 streptavidin 之磁性乳膠顆粒，只要改變 biotin-抗體，可以應用到其它的細胞分離。

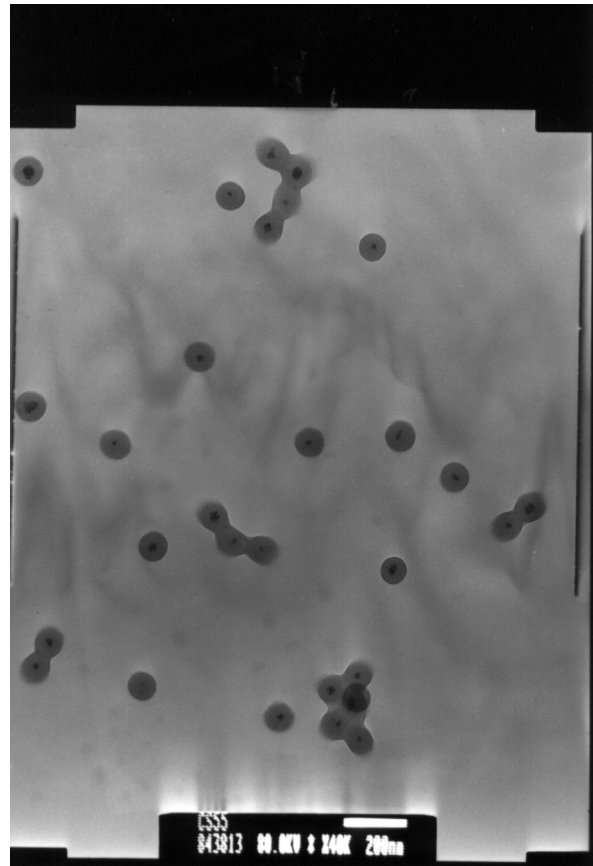
本計畫要以便宜的價格應用於臨床醫療，需自行製備抗體。

我們其以融合瘤技術製備大量 anti-CD34 抗體，以增加鍵結，來提高分離細胞之產率。

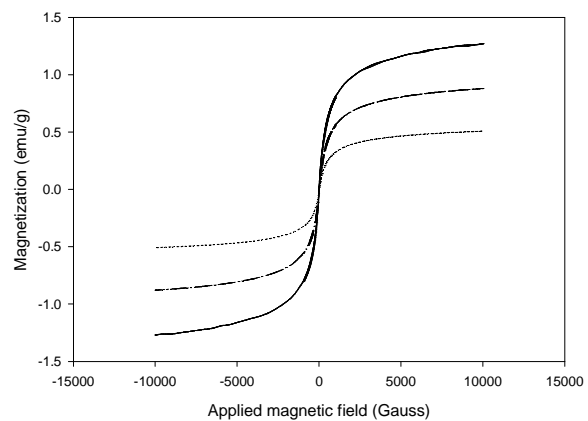
六、參考文獻

- (1) Martin-Henao, G. A.; Picon, M.; Amill, B.; Querol, S.; Gonzalez, J. R.; Martinez, C.; Martino, R.; Ferra, C.; Brunet, S.; Granena, A.; Sierra, J.; Garcia, J. *Transfusion* **2000**, *40*, 35-43.
- (2) Link, H.; Arseniev, L.; Bahre, O.; Kadar, J. G.; Diedrich, H.; Poliwoda, H. **1996**, *87*, 4903-4909.
- (3) Lemoli, R. M.; Fortuna, A.; Motta, M. R.; Rizzi, S.; Giudice, V.; Nannetti, A.; Martinelli, G.; Cavo, M.; Amabile, M.; Mangianti, S.;

- Fogli, M.; Conte, R.; Tura, S. **1996**, 87, 1625-1634.
- (4) Bensinger, W. I.; Buckner, C. D.; ShannonDorcy, K.; Rowley, S.; Appelbaum, F. R.; Benyunes, M.; Clift, R.; Martin, P.; Demirer, T.; Storb, R.; Lee, M.; Schiller, G. **1996**, 88, 4132-4138.
- (5) UrbanoIspizua, A.; Rozman, C.; Martinez, C.; Marin, P.; Briones, J.; Rovira, M.; Feliz, P.; Viguria, M. C.; Merino, A.; Sierra, J.; Mazzara, R.; Carreras, E.; Montserrat, E. **1997**, 89, 3967-3973.
- (6) Giralt, S.; Estey, E.; Albitar, M.; vanBesien, K.; Rondon, G.; Anderlini, P.; Obrien, S.; Khouri, I.; Gajewski, J.; Mehra, R.; Claxton, D.; Andersson, B.; Beran, M.; Przepioraka, D.; Koller, C.; Kornblau, S.; Korbling, M.; Keating, M.; Kantarjian, H.; Champlin, R. **1997**, 89, 4531-4536.
- (7) Denning-Kendall, P. A.; Horsley, H.; Donaldson, C.; Bradley, B.; Hows, J. *M. Br J Haematol* **1999**, 105, 780-785.
- (8) de Wynter, E. A.; Coutinho, L. H.; Pei, X.; Marsh, J. C.; Hows, J.; Luft, T.; Testa, N. G. *Stem Cells* **1995**, 13, 524-532.



圖一 磁性乳膠顆粒之穿透式電子顯微鏡圖



圖二 磁性乳膠顆粒之磁滯曲線

表一 不同比例之磁性乳膠顆粒表面官能基

磁性乳膠顆粒	Surface Area (m ² /g)	表面官能基 (mole/g)	表面官能基 (mole/m ²)
CS55	29.0214	8.36*10 ⁻⁵	2.88*10 ⁻⁶
CS73	34.5178	4.00*10 ⁻⁵	1.16*10 ⁻⁶
0.5CS55	21.3440	5.44*10 ⁻⁵	2.55*10 ⁻⁶
0.5CS73	28.2603	2.62*10 ⁻⁵	9.27*10 ⁻⁷



AUTOSIZER

Size Report

1/2cs55 before

Sample

Record Number: data
 Filename: .
 File Path: .
 Sample RI: 2.20, Abs:0.00
 Dispersant RI: 1.33
 Disp. Viscosity (cP): 0.890
 Date (DMY): 13/09/02
 Time: 13:10:30

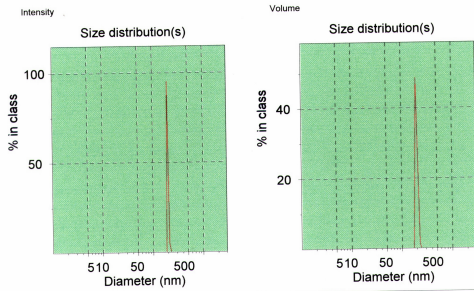
System

Instrument Type: Autosizer 4700
 Temperature (°C): 25.0
 Count rate (Kcps): 18.0
 Cell Type: ZET5110
 Detector Angle (deg): 90.00
 Wavelength (nm): 488.0

Result

Quality Factor: Pass
 Z Average Mean(nm): 185.3
 Polydispersity: 0.06

Intensity Mean (nm): 193.2
 Volume Mean (nm): 193.6
 Analysis Mode: Auto:CONTIN



Malvern Instruments Ltd, Malvern UK +44 1684 892456

圖三 磁性乳膠顆粒經 light scattering 分析圖



AUTOSIZER

Size Report

1/2cs55

Sample

Record Number: data
 Filename: .
 File Path: .
 Sample RI: 2.20, Abs:0.00
 Dispersant RI: 1.33
 Disp. Viscosity (cP): 0.890
 Date (DMY): 13/09/02
 Time: 11:53:55

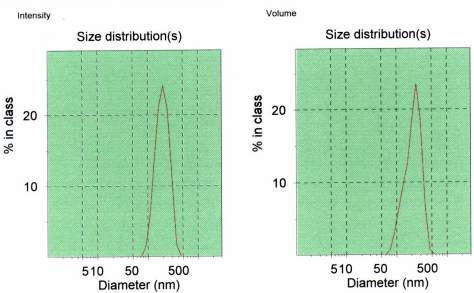
System

Instrument Type: Autosizer 4700
 Temperature (°C): 25.0
 Count rate (Kcps): 188.6
 Cell Type: ZET5110
 Detector Angle (deg): 90.00
 Wavelength (nm): 488.0

Result

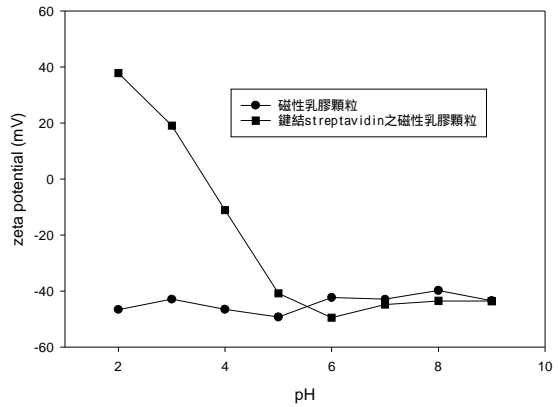
Quality Factor: Pass
 Z Average Mean(nm): 178.9
 Polydispersity: 0.10

Intensity Mean (nm): 196.9
 Volume Mean (nm): 217.6
 Analysis Mode: Auto:CONTIN



Malvern Instruments Ltd, Malvern UK +44 1684 892456

圖四 鍵結 streptavidin 之磁性乳膠顆粒以 light scattering 分析圖

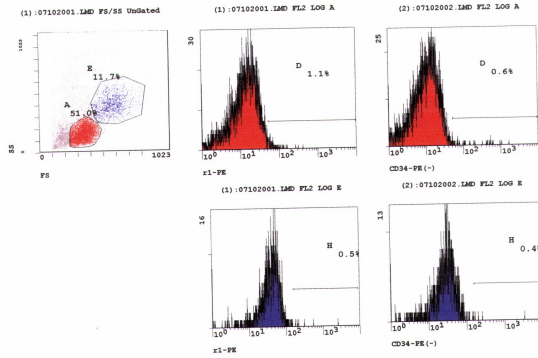


圖五 鍵結 streptavidin 前、後之磁性乳膠顆粒經 zeta potential 分析圖

ExpoMFA: E:\07102001.LMD

Protocol : BMTmfa
 Acq Date : 07-10-2002

Analysis Date : 10/08/02
 Analysis Time : 13:35:18

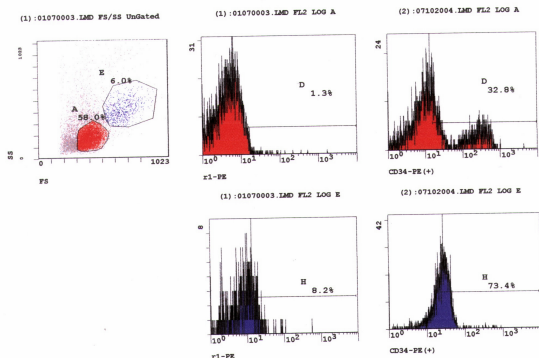


圖六 檢體未經免疫乳膠顆粒處理之流式細胞分析儀圖譜

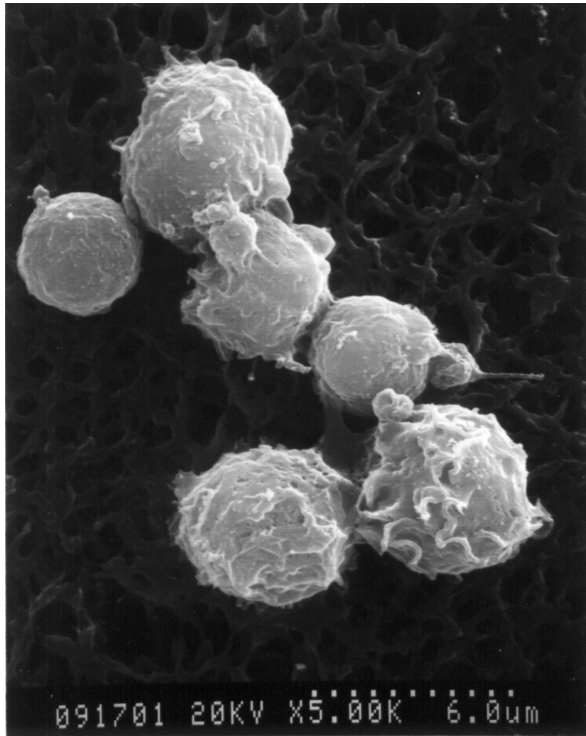
ExpoMFA: E:\07102004.LMD

Protocol : BMTmfa
 Acq Date : 07-10-2002

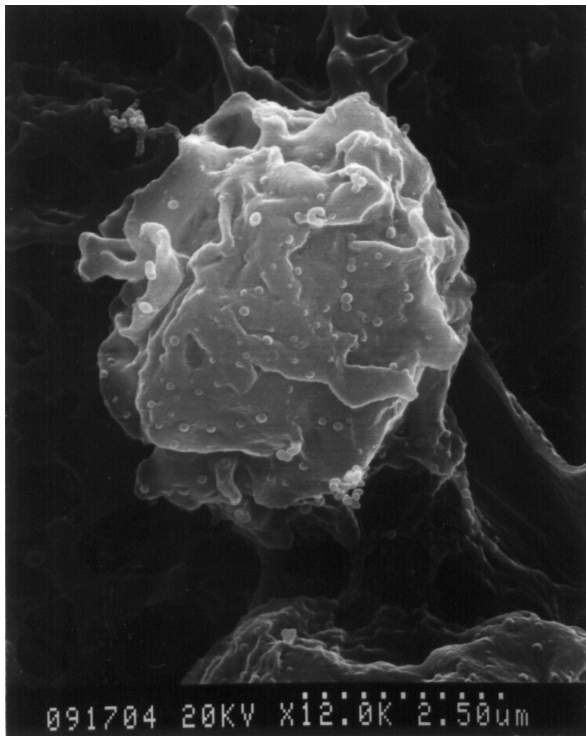
Analysis Date : 07/10/02
 Analysis Time : 16:12:29



圖七 檢體經免疫磁性乳膠顆粒處理之流式細胞分析儀圖譜



圖八檢體未經免疫乳膠顆粒處理之掃描式電子顯微鏡圖



圖九檢體經免疫乳膠顆粒處理之掃描式電子顯微鏡圖