บทที่ 3 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. สารพิษจากทะเล (marine toxins) และการได้รับพิษจากอาหารทะเล (marine intoxication)

ทะเลเป็นแหล่งอาหารตามธรรมชาติที่สำคัญของประชากรโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่เป็นเกาะและประเทศที่มีประชากรอาศัยอยู่ตามแนวชายฝั่งทะเลเป็นจำนวนมาก เช่น ญี่ปุ่น ไต้หวัน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ จีน บังคลาเทศ อินเดีย ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ประเทศแถบทะเลคาริบเบียน มหาสมุทรแปซิฟิก สแกนดิเนเวีย เป็นต้น นอกจากนี้ อาหารทะเลยังมีรสชาดอร่อย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ในประชากรบางกลุ่มอาหารจากทะเลเป็นแหล่งโปรตีนเพียงแหล่งเดียวของประชากรในชุมชนนั้นๆ ในขณะที่ในบางประเทศหรือแถบที่อยู่ห่างจากชายฝั่งทะเลออกไปก็มีการซื้ออาหารทะเลแช่แข็งไปบริโภค นอกจากนี้นักท่องเที่ยวยังนิยมเดินทางเข้าไปท่องเที่ยวตามหมู่เกาะและชายทะเลและชอบบริโภคอาหารทะเลอีกด้วย อาหารทะเลมีหลายชนิด เช่นปลาต่างๆ ทั้งปลาที่ชอบหาอาหารตามผิวน้ำและตามแนวปะการังและปลาน้ำลึก ปลาหมึก ออคตาปุส กุ้ง ปู แมงดาทะเล ปลากระเบน shellfish เช่น หอยชนิดต่างๆ (mollusks และ bivalves) และ สาหร่ายต่างๆ หรือแม้แต่ปลาฉลาม อย่างไรก็ดี อาหารทะเลบางชนิดมีเชื้อโรค (pathogens) และ/หรือสารพิษ (marine toxins) สะสมอยู่ซึ่งเมื่อคนบริโภคเข้าไปก็เกิดความเจ็บป่วยได้ เพราะได้รับเชื้อโรค เช่น *Vibrio* spp. และ/หรือสารพิษจากทะเล (marine toxins) เช่นจากไข่แมงดาทะเล เนื้อปลาปักเป้า เป็นต้น (Suvapepun, 1984; Hwang *et al.*, 1995; Arakawa *et al.*, 2010) ความรุนแรงของความเจ็บป่วยจากการได้รับ marine toxins แตกต่างกันไปจากอาการเพียงเล็กน้อยเช่น คัน เป็นลมพิษ ไปจนถึงเป็นอัมพาต การหายใจล้มเหลว และเสียชีวิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษและปริมาณของสารพิษที่ได้รับ

2. สารพิษ Tetrodotoxin (TTX)

การได้รับสารพิษชนิด Tetrodotoxins (TTX) เกิดจากการกิน (ingestion) TTX ที่สะสมอยู่ในสัตว์ทะเลต่างๆ (Arakawa *et al.*, 2010) TTX ถูกพบเป็นครั้งแรกในปลาปักเป้า (Puffer fish) (Yokoo, 1950) การได้รับสารพิษ TTX ทำให้เกิดอาการป่วยรุนแรงจนอาจเสียชีวิตได้ และพบว่ามีอุบัติการณ์สูงในเอเชีย เช่นญี่ปุ่น ไต้หวัน ฮ่องกง จีน ประเทศไทย สิงคโปร์ มาเลเซีย ฟิจิ ออสเตรเลีย ปาปัวนิวกินี บังคลาเทศ และในแถบอื่น เช่น สหรัฐอเมริกา (Reddy and Hayes, 1989; Lange 1990; Hasan *et al.*, 2008) โดยพบในประเทศญี่ปุ่นบ่อยกว่าที่อื่น (Fukiya and Matsumura, 1992; Yang *et al.*, 1995; Hamano *et al.*, 1996; Tanner *et al.*, 1996) เนื่องจากชาวญี่ปุ่นนิยมบริโภคปลา Fugu เช่น Torafugu (*Takifugu rubripes*), Higanfugu (*Takifugu padalis*) ที่มีสารพิษนี้สะสมอยู่ แม้ว่าในปัจจุบันประเทศญี่ปุ่นจะได้ออกกฎหมายอนุญาตให้เฉพาะผู้ที่มีใบรับรอง (certificate) ว่าชำนาญในการชำแหละปลา Fugu เท่านั้นที่จะสามารถชำแหละเพื่อจำหน่ายและบริโภคได้ แต่ก็ยังมีผู้เสียชีวิตเพราะกินปลา Fugu ที่ลักลอบชำแหละโดยผู้ขาดประสบการณ์อยู่เนืองๆ ในประเทศไทยมีรายงานผู้

ได้รับพิษ TTX ทั้งแบบประปราย (sporadic) และแบบ focal outbreak เนื่องจากกินปลาทะเล สัตว์ทะเล ปลาน้ำจืด ที่มีสารพิษ ในปัจจุบันห้ามจำหน่ายปลาปักเป้าในราชอาณาจักรไทย (Laobhripatr *et al.*, 1990; Saitanu *et al.*, 1991; Kongsuwan *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2000 และ ราชกิจจานุเบกษา 99 ตอน 189) แบคทีเรียหลาย species ผลิต Tetrodotoxins (TTX) (Narita *et al.*, 1987; Nogushi *et al.*, 1987; Yotsu *et al.*, 1987; Simidu *et al.*, 1987, 1990) โดยพบเป็นครั้งแรกว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. สามารถผลิต TTX ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง (culture medium) ที่ผสม 3% NaCl และ 1% polypeptone (Yasumoto *et al.*, 1986) ต่อมาพบว่าแบคทีเรียอื่นๆ ก็สามารถผลิต TTX ได้ เช่น *Vibrio alginolyticus, Alteromonas tetraodonis, Shewanella alga, S. putrefaciens Microbacterium arabinogalactanolyticum* และ *Serratia marcescens* (Noguchi *et al.*, 1986, 1987; Yasumoto *et al*, 1986; Yotsu *et al*, 1987; Narita *et al.*, 1987; Shimidu et al., 1987; Kongsuwan *et al.*, 1988, Lee *et al.*, 2000; Miyasawa *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2004) ในธรรมชาติ TTX สะสมอยู่ในสาหร่ายทะเลพวก Blue-green algae เช่น Dinoflagellates และสะสมในปลาปักเป้าหลาย species ที่กินสาหร่ายเหล่านี้ (Kao, 1966; Narita *et al.*, 1981; Kungsuwan *et al.*, 1987; Nogushi *et al.*, 1989; Matsumura *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1995) เช่น ปลาพวก *Tetraodontiformes* ใน Family *Tetraodontidae* ซึ่งครอบคลุมปลาปักเป้าใน genus *Tetraodon* และปลาคางคก (Toadfish) (Kaku *et al.*, 1995; Hwang *et al.*, 1995) เนื้อเยื่อต่างๆ ของปลาเหล่านี้มีปริมาณของสารพิษในระดับแตกต่างกันและมีมากใน ตับ รังไข่ ลำไส้ เนื้อและหนังปลา นอกจากนี้ปลาปักเป้าน้ำจืดหลายชนิดก็มี tetrodotoxins ด้วย (Zaman *et al.*, 1997; Kungsuwan *et al.*, 1997) และยังสามารถพบ tetrodotoxins ใน invertebrates ต่างๆ เช่น xanthid crabs (Arakawa *et al.*, 1994, 1995) แมงดาทะเล (horse-shoe crab) (Kungsuwan *et al.*, 1987) โดยเฉพาะในไข่ของแมงดาทะเล (Tsai *et al.*, 1995; Kanchanapongkul *et al.*, 1996, 2001; Llewellyn *et al.*, 2002) ปูพวก *Atergatis flaridus* ปลาดาว *Astropecten* spp. (Maruyama *et al.*, 1984), blue-ringed octopus (*Octapus floridus*; *O. maculosus*) (Sheumack *et al.*, 1978) (แต่การได้รับ tetrodotoxin จากการถูก blue-ringed octopus กัดถือเป็น envenomation ไม่ใช่ intoxication) และหนอนบางชนิดด้วย เช่น flatworm (*Planocera multitentaculata*) (Miyazawa *et al.*, 1986) และใน vertebrates หลายชนิด เช่น goby (*Gobius crineger*) (Nogushi and Hashimmoto, 1973), goby (*Yongeichthys nebulosis*) (Chen *et al.*, 2002), newt (*Taricha* spp.) (Brown and Mosher, 1963) และ กบ (*Atelopus* spp.) (Kim *et al.*, 1975)

Tetrodotoxins และ analogs ละลายน้ำได้ดี (highly hydrophilic) เป็น hapten (มีเฉพาะ B cell epitope) มีโครงสร้างของโมเลกุลเป็น heterocyclic guanidine (MW ~320 Da) ออกฤทธิ์ด้วยการ block Na^+ channel conductance ของ neuronal cell membrane (Catterall, 1985; Oda *et al.*, 1989) สารพิษ TTX แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยคือในระดับนาโนกรัมก็เป็นอันตรายร้ายแรงได้ โดยสารพิษจะอุด outer pore ของ Na^+ channel ทำให้ monovalent cation ชนิดนี้ไม่สามารถผ่าน pore เข้าไปใน

เซลล์ประสาทได้ ซึ่ง channels เหล่านี้ควบคุมการ generate action potential และ peripheral nerve excitability เป็นผลให้ไม่สามารถ conduct nerve impulse ได้ (Narahashi *et al.*, 1967; Lipkind and Fozzard, 1994) เมื่อได้รับ tetrodotoxins กลุ่มอาการต่างๆ จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรง (Catterall 1985; Ahmed 1991; Kao 1993) โดยความรุนแรงขึ้นอยู่กับปริมาณที่กินเข้าไป อาการเริ่มแรกคือ ชาที่บริเวณรอบปาก และขาอ่อนแรง ในรายที่เป็นน้อยอาจมีเพียงอาการชาและอาการของระบบทางเดินอาหารร่วมด้วย คือคลื่นไส้ อาเจียน และอาการเหล่านี้จะหายไปได้เองภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง สำหรับคนที่มีอาการรุนแรงปานกลางจะมีอาการอ่อนแรงของขาและกล้ามเนื้อที่ใบหน้า เดินโซเซ ขาพันกัน และขาด reflex ในรายที่ผู้ที่มีอาการรุนแรงมาก จะเกิดอาการอ่อนเปลี้ยของกล้ามเนื้อทั่วร่างกาย (flaccid paralysis) ระบบหายใจล้มเหลว ม่านตาเบิกกว้าง แต่ผู้ป่วยจะรู้สึกตัวตลอดเวลาทำให้เกิดความเครียดมากเนื่องจากไม่สามารถตอบสนอง (respond) ได้ ในรายที่อาการรุนแรงจนเสียชีวิตในเวลาต่อมามักพบว่ามีกลุ่มอาการของหัวใจและระบบไหลเวียนของเลือดร่วมด้วย เช่น bradycardia, hypotension ไม่มีชีพจร ระบบหายใจล้มเหลว และโคมา ในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงเหล่านี้ อาการอ่อนเปลี้ยของกล้ามเนื้อทั่วร่างกายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียงไม่ถึงหนึ่งชั่วโมงหลังกินพิษและ ถึงแก่ความตาย ในรายที่มีอาการรุนแรงปานกลางอาการอ่อนเปลี้ยของกล้ามเนื้อจะเกิดขึ้นภายในเวลาประมาณ 90 นาทีหลังได้รับพิษ และจะหายไปภายในประมาณ 5 วัน

การวินิจฉัย Tetrodotoxin poisoning ใช้ดูจากอาการของผู้ที่กินปลาหรืออาหารทะเลที่สงสัยว่ามีพิษและการตรวจหา tetrodotoxin ในปลาหรืออาหารทะเล ในปัสสาวะ หรือในซีรัมของผู้ป่วยด้วยวิธี gas chromatography (Suenaga and Kotoku, 1980), high performance liquid chromatography (HPLC) (Yasumoto and Michishita, 1985; O'Leary *et al.*, 2004), liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) (Horie *et al.*, 2002) และ/หรือ HPLC และ tandem mass spectrometry (Akaki and Hatano, 2006) วิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ยุ่งยากมาก รวมทั้งระดับของ tetrodotoxin ในซีรัมลดลงอย่างรวดเร็วและอาจตรวจไม่พบหลังได้รับพิษแล้ว 12-24 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากช่วงเวลานี้ไปแล้วต้องใช้ตัวอย่างปัสสาวะ เพราะอาจจะยังตรวจพบ TTX ได้ในปัสสาวะหลังจากกินสารพิษ ซึ่งปกติจะพบอยู่นานถึง 5 วัน นอกจากนี้มีการใช้ monoclonal antibody (Kawatsu *et al.*, 1997) ทำ affinity chermatography เพื่อ isolate TTX จากตัวอย่างปัสสาวะก่อนนำมาตรวจด้วยวิธี HPLC พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจได้ (Kawatsu *et al.*, 1999)

การรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ใช้วิธีเฝ้าดูอาการอย่างใกล้ชิดและรักษาตามอาการโดยแก้ไขความผิดปกติทั้งระบบประสาท ระบบหายใจ และระบบไหลเวียนของเลือดของผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤติ ในปัจจุบันยังไม่มี ยา toxin antidote หรือ immunotherapeutic antibodies ที่ลบล้างพิษของ TTX ได้โดยเฉพาะ

3. Therapeutic antibodies

แอนติบอดีเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างเฉพาะเจาะจง ภายในร่างกาย แอนติบอดีอาจอยู่บนผิวของ B lymphocytes (B cells) หรือจับอยู่บนเซลล์ชนิดอื่น เช่น mast cells, basophils, phagocytic cells, natural killer cells (NK) หรืออยู่ในของเหลวภายในร่างกาย (body fluids) ต่างๆ เช่น พลาสมา น้ำตา น้ำนม หรือในเยื่อเมือก (mucus) และสารคัดหลั่ง (secretions) ของระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ แอนติบอดีที่อยู่บนผิวของ B lymphocytes กำหนดความเฉพาะของ B cells นั้นๆ ว่ามีความสามารถในการสร้างแอนติบอดีที่มีความเฉพาะต่อเอพิโทป (epitope) ใด และ B lymphocyte แต่ละเซลล์จะสามารถผลิตแอนติบอดีต่อเอพิโทปเพียงเอพิโทปเดียวเท่านั้น เมื่อมีแอนติเจน (antigen) เข้ามาในร่างกายเอพิโทปของโมเลกุลแอนติเจนจะเป็นตัวเลือกจับกับแอนติบอดีบนผิวของ B cell (Clonal selection theory) เป็นผลให้ B lymphocyte เซลล์นั้นๆ (ภายใต้อิทธิพลของซัยโตไคน์และ T cells) เพิ่มจำนวนและผลิตแอนติบอดีเฉพาะต่อเอพิโทปนั้นๆ ออกมาเป็นจำนวนมาก แอนติบอดีที่ผลิตออกมาจะทำหน้าที่จับกับแอนติเจนอย่างเฉพาะเจาะจงเพื่อลบล้างพิษหรือเพื่อกำจัดแอนติเจนออกไปจากร่างกาย แอนติบอดีทุกโมเลกุลมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกันคือประกอบด้วยสาย polypeptides 4 สาย สองสายมีความเหมือนกันมีจำนวนกรดอะมิโน และ น้ำหนักโมเลกุลมากกว่าอีกสองสาย เรียกว่า heavy chains หรือ H chains ส่วนอีกสองสายที่เหมือนกันและสั้นกว่า H chains และมีจำนวนกรดอะมิโนน้อยกว่า เรียกว่า light chains หรือ L chains โดย polypeptides ทั้ง 4 สายจับกันด้วย disulfide bonds คือ L chain แต่ละสายจับกับ H chain แต่ละสาย (ยกเว้น IgA บาง subclass ที่ light chains 2 สายจับกันเองและไม่จับกับ H chain) และ H chains ทั้งสองสายก็จับกันเองด้วย disulfide bonds เช่นกัน โดยปลายด้าน amino (N)-terminus ของ polypeptides ทุกสายชี้ไปทิศทางเดียวกัน และปลาย carboxy (C)-terminus ของทุกสายก็ชี้ไปทางเดียวกัน ปลายด้าน N ของแต่ละ H และ L chains ช่วยกันจับกับเอพิโทปบนแอนติเจน เรียกส่วนที่จับกับเอพิโทปว่า paratope หรือ antigen binding site ซึ่งเป็นส่วนที่ชนิดของกรดอะมิโนมีความผันแปร (varies) มากเพื่อให้จับกับเอพิโทปแต่ละชนิดได้อย่างจำเพาะ เรียกส่วนนี้ของโมเลกุลของแอนติบอดีว่า variable region หรือ Fv และเรียกส่วน variable ของ H chain และ L chain ว่า VH และ VL ตามลำดับ อีกส่วนหนึ่งของโมเลกุลเรียกว่า constant region เพราะชนิดของกรดอะมิโนในแต่ละโมเลกุลที่เป็นชนิด (class หรือ subclass เดียวกัน) ไม่แตกต่างกันมาก เมื่อเทียบกับ variable region จึงถูกเรียกว่า constant region ส่วนของ H chains สองสายที่จับกันเองและไม่มีส่วนของ L chains เรียกว่า ส่วน Fc ซึ่งประกอบด้วย immunoglobulin domains จำนวน 2-3 domains แล้วแต่ชนิดของ immunoglobulin ได้แก่ CH2, CH3 (และ CH4 ซึ่งพบใน IgM และ IgE เท่านั้น) ส่วน Fc นี้ไม่จับเอพิโทปแต่มีบทบาทอย่างอื่น เช่น กระตุ้นระบบคอมพลีเมนท์ จับกับฟาโกซัยท์ (phagocytes) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของฟาโกซัยโตซีส (phagocytosis) คือเป็น opsonin เป็นต้น ส่วนของ L

chain ที่มีกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่เรียกว่า constant L chain domain หรือ CL domain ส่วนของ H chain ที่มีกรดอะมิโนค่อนข้างคงที่และอยู่ถัดจาก VH มาทางปลาย C และก่อนถึง Fc เรียกว่า CH1 domain โดย CH1 และ CL ทำหน้าที่ stabilize รูปร่าง (conformation) ของ Fv

โดยปกติแอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อมีแอนติเจน เช่น เชื้อโรคเข้ามาในร่างกายจะประกอบด้วยแอนติบอดีที่มีความเฉพาะต่อส่วนต่างๆ ของเชื้อโรคอย่างหลากหลาย กล่าวคือเป็น heterogeneous pool หรือ polyclonal antibodies ทั้งนี้เพราะเชื้อโรคแต่ละชนิดมักมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีส่วนประกอบต่างๆ ที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีได้หลายส่วน [แต่ละส่วนเรียกว่าเอพิโทป (epitopes)] ดังนั้นเอพิโทปหลายเอพิโทปจึงกระตุ้น B cells หลายเซลล์ให้เพิ่มจำนวนเป็นหลาย clones ซึ่งแต่ละ clone จะสร้าง monoclonal antibodies (MAb) ซึ่งมีความเฉพาะต่อเอพิโทปของเชื้อโรคเพียงเอพิโทปเดียว แต่เมื่อ monoclonal antibodies เหล่านี้ออกมารวมกันอยู่ในของเหลวภายในร่างกาย เช่นใน พลาสมา ก็จะผสมรวมกันเป็น polyclonal antibodies (PAb) และมีความเฉพาะต่อเอพิโทปต่างๆ ของเชื้อโรค ชนิดนั้นๆ

เป็นที่ทราบดีว่าแอนติบอดีเป็นปัจจัยสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันที่ต่อสู้เชื้อโรคและกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกาย ได้มีการนำเอาแอนติบอดีมาใช้รักษาโรคต่างๆ มาช้านาน เช่น ใช้รักษาผู้ป่วยบาดทะยัก โดยใช้ซีรัมของผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันบาดทะยัก ใช้ซีรัมของผู้ที่หายป่วยจากโรคหัดเพื่อป้องกันเด็กที่สัมผัสเชื้อหัดไม่ให้เกิดอาการของโรคหัด (intervention of disease) การให้อิมมูนกลอบูลินส์ที่เฉพาะต่อไวรัสพิษสุนัขบ้าแก่ผู้ที่ถูกสุนัขบ้ากัดโดยเฉพาะบริเวณใกล้สมองเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเข้าสมองร่วมกับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า (combined passive-active immunization) เป็นต้น ในระยะแรกของการใช้แอนติบอดีเพื่อการรักษาหรือป้องกันไม่ให้เกิดอาการป่วยแม้ได้รับเชื้อโรคมาแล้ว (intervention) ดังกล่าว ได้ใช้แอนติบอดีจากมนุษย์ด้วยกันเองคือจากผู้ที่เคยเป็นโรคและหายป่วย (convalescing) หรือได้รับวัคซีน (immunized) แต่เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอและขัดกับจริยธรรม จึงได้มีการพัฒนาผลิตแอนติบอดีเฉพาะต่อเชื้อโรคหรือสารพิษต่างๆ ในสัตว์ เช่น การผลิตเซรุ่มแก้พิษงูในม้า การผลิตเซรุ่มสำหรับป้องกับโรคพิษสุนัขบ้าในแกะ เป็นต้น อย่างไรก็ดีเป็นที่ทราบว่าผู้ที่ได้รับการรักษาหรือ intervention ด้วยแอนติบอดีจากสัตว์จำเป็นต้องได้รับในปริมาณมากเพื่อให้เพียงพอสำหรับการยับยั้งเชื้อโรคหรือสารพิษและเพื่อให้แอนติบอดีคงอยู่ในระดับที่มีประสิทธิภาพเพียงพอเป็นเวลานานจนผู้ป่วยผ่านพ้นระยะวิกฤติของโรคไปได้ เนื่องจากแอนติบอดีจากสัตว์เป็นโมเลกุลแปลกปลอมในมนุษย์จึงถูกร่างกายมนุษย์กำจัดออกไปอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ต้องให้แอนติบอดีปริมาณมากแก่ผู้ป่วย การได้รับแอนติบอดีของสัตว์ในปริมาณมาก ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นก่อให้เกิดผลเสียคือผู้ป่วยส่วนใหญ่แพ้โปรตีนจากสัตว์ เกิดสภาวะภูมิไวเกิน ชนิด immediate type เช่นเป็นลมพิษ คัน และ/หรือ

anaphylaxis หรือ สร้าง anti-isotype response ซึ่ง form immune complexes และทำให้เกิดกลุ่มอาการ serum sickness ที่ทำให้ข้อกระดูกอักเสบ ไตอักเสบ และอาจเกิดไตวายได้

นอกจากนี้การผลิตแอนติบอดีจากสัตว์ยังมีข้อจำกัดอีกหลายประการ เช่น

1) พลาสมาของสัตว์ที่ถูกฉีดกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี มักมีปริมาณของ specific antibody ที่ต้องการต่ำและมี non-specific proteins (serum proteins) ปนเปื้อนในปริมาณสูง

2) ต้องใช้เวลาในการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นเวลานาน (prolonged immunization)

3) ได้แอนติบอดีที่ต้องการในปริมาณจำกัดจากสัตว์แต่ละตัว ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาตรของพลาสมาที่ได้จากเลือดของสัตว์ในการ bleed แต่ละครั้ง จึงมักผลิตได้ไม่เพียงพอกับปริมาณที่ต้องการ หรือต้องใช้สัตว์ตัวใหญ่ เช่นม้า แกะ แพะ ซึ่งต้องมีบริเวณกว้างในการเลี้ยงดู มีสัตวบาลที่ดีเพื่อไม่ให้สัตว์เกิดความเจ็บป่วยที่อาจนำโรคมาถึงผู้เลี้ยงและผู้ได้รับการรักษาด้วยแอนติบอดีจากสัตว์เหล่านี้

4) คุณภาพของแอนติบอดีผันแปรไม่แน่นอนจากสัตว์แต่ละตัวและจากการ immunize แต่ละครั้ง

5) ไม่สามารถใช้สารพิษที่ immunogenic dose มีปริมาณสูงกว่า toxic dose หรือ non-immunogenic molecules ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ หรือต้องมีการ modify โมเลกุลเสียก่อน เช่นต้องทำสารพิษเป็นท๊อกซอยด์ หรือนำไป conjugate กับ T cell epitope ในกรณีที่เป็น hapten ซึ่งบ่อยครั้งทำให้ immunogenicity เสียไป

6) การผลิตแอนติบอดีในร่างกายมีความจำกัดตามธรรมชาติคือระบบภูมิคุ้มกันมี immune regulation และ feedback mechanisms ต่างๆ ที่บางครั้งควบคุมได้ยาก

ในปี ค.ศ. 1975 Kohler และ Milstein ได้พัฒนาเทคนิคไฮบริโดมา (hybridoma technology) ซึ่งทำให้สามารถผลิตแอนติบอดีที่จับจำเพาะต่อเอพิโทปใดเอพิโทปหนึ่งได้ในปริมาณที่ไม่จำกัด และเป็น homogeneous monoconal antibody โดยการเลี้ยง specific hybridoma ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เทคนิคไฮบริโดมาช่วยให้ข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณและระยะเวลาของการผลิตแอนติบอดีในสัตว์เพื่อการรักษาหรือ intervene โรคหมดไป กล่าวคือนอกเหนือจากผลิตแอนติบอดีจาก established hybridoma clone ได้โดยไม่จำกัดปริมาณแล้วยังสามารถผลิตแอนติบอดีได้ทันทีที่ต้องการโดยไม่ต้องเสียเวลา immunize สัตว์ แต่เป็นเพียงนำ hybridoma clone ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ แอนติบอดีที่ได้จาก hybridoma มักจะมีความเฉพาะต่อแอนติเจนเป้าหมายโดยไม่มีการปนเปื้อนด้วย non-specific serum proteins ทั้งนี้เพราะในปัจจุบันสามารถเลี้ยง hybridoma ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปลอดซีรัม (serum-free medium) ได้ นอกจากการใช้ monoclonal antibodies (MAb) ในการรักษา

และ intervene โรคต่างๆ แล้ว MAb ยังได้มีบทบาทสำคัญในการศึกษาวิจัยทั้งในสาขาชีวเวชศาสตร์และชีววิทยาสาขาอื่นๆ เช่น การวิจัยทางด้านการเกษตร เป็นต้น

อย่างไรก็ดีการรักษาหรือการแทรกแซงไม่ให้ผู้ที่ได้รับเชื้อหรือพิษมาแล้วเกิดอาการเจ็บป่วย (disease intervention) ด้วย monoclonal antibodies ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากหนูไมซ์ (mice) แม้จะผลิตได้มากพอตามต้องการจากการเลี้ยง established hybridoma clones ดังกล่าวแล้ว แต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดที่ผู้ได้รับแอนติบอดีมักสร้าง human anti-mouse isotypic antibodies (HAMA) ซึ่งนอกจากจะทำให้ MAb ถูกกำจัดออกไปจากร่างกายของคนอย่างรวดเร็วแล้ว ยัง sensitize ร่างกายผู้ป่วยจนมักก่อให้เกิดสภาวะภูมิไวเกิน ดังกล่าวข้างต้นด้วย ทั้งนี้เพราะ mouse antibodies เป็นสิ่งแปลกปลอมในร่างกายมนุษย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วน constant region (Fc, CH1 และ CL) ของโมเลกุลของแอนติบอดี

ตั้งแต่ ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา ได้มีการนำเอา recombinant DNA technology มาใช้ในการพัฒนาโครงสร้างโมเลกุลของแอนติบอดีจากหนูไมซ์ กล่าวคือใช้ recombinant DNA technology ในการเปลี่ยนส่วน constant region (Fc) ของ specific murine monoclonal antibodies ให้เป็น Fc ของมนุษย์เพื่อลดความเป็น immunogen และการกระตุ้น anti-mouse isotype response ในคนที่ได้รับ mouse immunoglobulins โดยยังคงความเฉพาะของส่วนที่จับกับแอนติเจนคือ Fab fragments ไว้ เรียกโมเลกุลเหล่านี้ว่า "Chimeric antibodies" และได้มีการใช้ chimeric antibodies ในการรักษาโรคต่างๆ อย่างไรก็ดี chimeric antibodies ยังสามารถกระตุ้นให้เกิด HAMA ในผู้รับได้ เนื่องจากยังมีส่วนที่เป็น mouse protein อยู่ในส่วน CL และ CH1 จึงมีการใช้เฉพาะส่วน VH และ VL โดยนำมาต่อกันด้วยสายเปปไทด์ (peptide linker) ที่เหมาะสม เรียกว่า single chain variable fragments หรือ ScFv อย่างไรก็ดีใน VH และ VL ก็ยังมีส่วนของ immunoglobulin frameworks (FRs) ที่ไม่ใช่ส่วนที่จับกับเอพิโทป (complementarity determining regions; CDRs) ที่ยังกระตุ้นให้เกิด HAMA ได้ ดังนั้นเพื่อลด HAMA ที่เกิดจาก ScFv จึงได้มีการเปลี่ยนส่วนของ FRs ให้เป็น FRs ของมนุษย์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของส่วนที่จับกับเอพิโทป (CDRs) เรียกโมเลกุลของแอนติบอดีเหล่านี้ว่า humanized-antibodies ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพด้านคลินิกของแอนติบอดีที่ใช้กับมนุษย์ humanized-antibodies อาจอยู่ในรูปโครงสร้างของ Fab fragments (monovalent) หรือ single chain Fv molecules ซึ่งประกอบด้วย variable domains ของ H และ L chians ต่อกันด้วยตัวเชื่อม (linker) ที่เหมาะสม ได้มีการใช้ humanized-antibodies ในการรักษาและ intervene โรคหลายโรคด้วยกัน เช่น ใช้ใน cancer immunotherapy ใน transplant rejection ใน inflammatory diseases เป็นต้น humanized-antibodies มักมี affinity ต่อ เอพิโทปสูงเพราะมาจาก monoclonal antibodies ที่ผลิตโดย hybridoma clones ที่มาจากการ immunized หนูไมซ์เป็นระยะเวลานาน (immune mice) คือผ่าน affinity maturation และ somatic hypermutation ใน secondary lymphoid tissue มาแล้ว

ในปี ค.ศ. 1985 G. Smith ได้ประดิษฐ์เทคนิคฟาจดิสเพลย์ (phage display) ขึ้น และได้แสดงให้เห็นว่า เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้ผลิตเปปไทด์ โปรตีน (รวมทั้งแอนติบอดี) หรือโมเลกุลที่ต้องการได้อย่างหลากหลาย และมีประสิทธิภาพโดยไม่จำกัดปริมาณ และทำได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว รวมทั้งใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ เช่น การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของ ligands-protein การหา peptide analogue ศึกษา receptors และ antibody-binding sites และใช้ในการปรับปรุงหรือเปลี่ยนแปลง affinity ของโปรตีนในการจับกับโมเลกุลต่างๆ ได้ด้วย การสร้าง phage display library ก็คือ การสร้างคลังของ bacteriophages (จะขอเรียกว่า phage หรือ ฟาจ) ซึ่งมีเปปไทด์ต่างๆ หรือโปรตีนต่างๆ รวมทั้งโมเลกุลแอนติบอดีปรากฏ (display) อยู่บนผิว (capsid หรือ coat) ของฟาจ โดยแต่ละคลังอาจมีเปปไทด์ หรือแอนติบอดีที่มีความหลากหลายมากถึง 10^{11}-10^{12} ชนิด ฟาจที่ใช้สำหรับสร้างคลังมักใช้ filamentous bacteriophages เช่น M13 โดยเปปไทด์ หรือแอนติบอดีต่างๆ ที่ปรากฏบน capsid ของฟาจจะอยู่ในรูป fusion protein คือ เชื่อมต่ออยู่กับ protein ชื่อ P3 (PIII) ของฟาจ การสร้าง phage display library ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม กล่าวคือ นำ DNA sequences ที่เป็นรหัสพันธุกรรมของเปปไทด์หรือโปรตีนต่างๆ หรือแอนติบอดีมา insert เข้าไปในยีนของฟาจ ซึ่งเมื่อฟาจเหล่านี้เพิ่มจำนวน (replicate) ในโฮสท์ (*E. coli*) ก็จะมีโปรตีนต่างๆ ที่สนใจปรากฏออกมาบนผิวของฟาจร่วมกับโปรตีน PIII ด้วย เช่น เมื่อต้องการสร้างคลังแอนติบอดีของมนุษย์ ก็สามารถนำ DNA sequences ซึ่ง encode VH และ VL chains ของแอนติบอดีที่ร่างกายมนุษย์สามารถผลิตได้ทั้งหมด (antibody repertoire) ซึ่งมีความจำเพาะต่อเอพิโทปต่างๆ มากถึง 10^{11}-10^{12} ชนิดมา insert เข้าไปในจีโนมของ M13 phage ดังนั้น phage library ที่ได้ก็จะประกอบด้วย phage variants ที่มี HuScFv ซึ่งเป็น antibody-binding sites ต่อเอพิโทปต่างๆ อยู่บนผิวของฟาจในคลังและมียีนที่เป็นรหัสของแอนติบอดีเหล่านั้นอยู่ในจีโนมของฟาจด้วย เมื่อต้องการเตรียมแอนติบอดีต่อเอพิโทปใดเอพิโทปหนึ่งก็สามารถนำคลังนี้ไปใช้ได้ทันที โดยนำ phages ที่ display human antibody ที่มี large repertoire ของ epitope diversity ไปจับกับเอพิโทปซึ่งถูกตรึง (immobilized) ไว้บน solid surface เช่น well ใน ELISA plate บน particles ต่างๆ หรือบนเซลล์ เมื่อล้างเอา non-binding phage variants ออกไปแล้ว จะพบว่า ฟาจซึ่งมี HuScFv เฉพาะต่อเอพิโทปจะจับอยู่กับ immobilized epitope เรียกขั้นตอนการคัดเลือกฟาจที่จับจำเพาะกับเอพิโทปนี้ว่า bio-panning เมื่อนำฟาจเหล่านี้ไปเพิ่มจำนวนใน *E. coli* สายพันธุ์พิเศษก็จะได้ soluble human ScFv (HuScFv) ที่ไม่ต่อกับ PIII และสามารถ purify ออกมาจาก *E. coli* proteins อื่นๆ ได้ เมื่อมี phage transfected *E. coli* แล้ว หากต้องการเตรียม HuScFv ก็สามารถทำได้ทันทีโดยการเลี้ยง recombinant *E. coli* เพียงข้ามคืน และเตรียมได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการขึ้นอยู่กับปริมาตรของอาหารเลี้ยงและระบบการเลี้ยง เช่นเมื่อต้องการปริมาตรมากก็ใช้ fermenter โดยไม่ต้องเสียเวลา immunize สัตว์ และเมื่อมี human antibody phage display library แล้วก็สามารถใช้ human antibody phage display library เป็นเครื่องมือในการผลิตแอนติบอดีของมนุษย์เพื่อจุดประสงค์ต่างๆ เช่น ใช้เตรียม

therapeutic antibodies เพื่อรักษาโรคติดเชื้อไวรัส มะเร็ง ออโตอิมมูน การไม่รับกราฟท์ (graft rejection) การอักเสบ โรคภูมิแพ้ ใช้ในการพัฒนาวัคซีน ใช้เป็นเครื่องมือในการวินิจฉัยโรค ใช้ในการศึกษาวิจัย เกี่ยวกับการทำงานและหน้าที่ของโมเลกุลต่างๆ ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ เป็นต้น

แอนติบอดีที่ผลิตจาก human antibody display phage display library เป็นโมเลกุลของมนุษย์โดยสมบูรณ์เพราะมาจากยีนที่เป็นรหัส immunoglobulins ของมนุษย์ การคัดเลือก phage clones ที่ display ScFv เฉพาะต่อเอพิโทปใดแม้จะเป็น hapten หรือ low immunogenic หรือสารพิษที่ฉีดเข้าร่างกายไม่ได้ ก็สามารถทำได้โดย bio-panning ในหลอดทดลอง จึงปลอดจาก *in vivo* immune regulation และ feedback mechanisms แอนติบอดีมีคุณภาพแน่นอนเพราะมาจากฟาจ clone เดิมทุกครั้ง เก็บรักษาทั้ง library และ selected phage clones ได้ง่าย ไม่เปลืองที่เพราะเป็นการเก็บแบคทีเรียธรรมดา ไม่เสี่ยงต่อการติดโรคจากสัตว์ ไม่ต้องมีสัตวบาล ไม่ต้องใช้ tissue culture facilities ข้อดีของ ScFv ก็คือเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก (~25-35 kDa) สามารถแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ดี มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์หรือพิษของสารพิษที่มีโมเลกุลเล็กได้ดีกว่า intact antibody molecules เพราะมีความคล่องตัวกว่าเพราะไม่มีปัญหาเรื่อง orientation ของโมเลกุล