1E4-1C2 เป็นโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นจากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วย human liver HSPGs สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวแยกจากผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ได้แก่ AML, CML (blast crisis) และ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์เม็ดเลือดขาวคนปกติ นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งชนิดก้อนที่ทดสอบ ได้แก่ HepG2, B16F1, Hela, KB1, SW1353, MCF-7 และ HT-29) แอนติบอดีสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดเพาะเลี้ยง HL-60 และ K562 และเซลล์มะเร็งชนิดก้อน HepG2 อย่างมีนัยสำคัญและเป็นไปตามขนาดความเข้มข้นที่ใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (anti-HIV p24 mAb, IgG1 isotype control) การศึกษายังชี้ให้เห็นว่าการยับยั้งในหลอดทดลองน่าจะเป็นผลจากการเหนี่ยวนำเซลล์เข้าสู่กระบวนการอะพอพโตสิสส่งผลให้วัฏจักรของเซลล์หยุดอยู่ที่ระยะ Sub-G1 โดยพบปริมาณ DNA สูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีแอนติบอดีเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ผลของแอนติบอดีเป็นไปตามขนาดที่ใช้และแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ caspase-8 ภายในเซลล์สูงขึ้นในสภาวะที่มีแอนติบอดี 1E4-1C2 โมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีซึ่งตรวจพบบนผิวเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML และเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงชนิดก้อน มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 45-200 kD โดยประมาณ การศึกษาในสัตว์ทดลองที่ได้รับการปลูกเซลล์มะเร็ง พบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับการฉีดด้วยแอนติบอดี 1E4-1C2 ทุกวันๆ ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 วันหลังการปลูกเซลล์มะเร็ง มีขนาดของก้อนมะเร็งเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การตรวจสอบชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin/Eosin ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ยังพบข้อมูลที่น่าสนใจ คือ การสร้างหลอดเลือดใหม่หล่อเลี้ยงก้อนมะเร็งในหนูทดลองมีจำนวนน้อยกว่า และขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงอาจกล่าวได้ว่า โมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดีน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่เมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง

ผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 80 kD ที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี พบว่าประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่ามีโปรตีนสำคัญสองชนิดที่น่าสนใจ คือ โปรตีนในกลุ่ม heat shock protein และ Minichromosome maintenance protein 7 (MCM-7) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในเซลล์มะเร็ง และมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเพิ่มดีเอ็นเอในระยะแบ่งตัว จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจว่า โมเลกุลที่จำเพาะต่อแอนติบอดี 1E4-1C2 น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่เหมือนหรือคล้าย หรือ อาจมีบางส่วนที่สามารถปฏิสัมพันธ์กับ human liver HSPGs จึงสามารถตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ 1E4-1C2 และส่งผลต่อกระบวนการเพิ่มดีเอ็นเอ และการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในสภาวะที่มีแอนติบอดี

Abstract 230913

1E4-1C is monoclonal antibody raised against human liver HSPGs. It was shown to specific reacted with membrane molecule expressed on leukemic cells such as AML, some of CML (blast crisis) and ALL as well as HL-60 and K 562 cell lines. It also reacts with various solid tumor cell lines tested (HepG2, B16F1, Hela, KB1, SW1353, MCF-7 and HT-29). Present studies demonstrated that 1E4-1C2 inhibited proliferation of both HL-60, K 562 and AML isolated from patients. The inhibition effect was also found in HepG2, human adenocarcinoma cells. The effect was in dose dependent manner and differed significantly from isotype control at 48-hour cultivation. The mechanism of antibody was studied and the data showed the interference in cell cycle together with an induction of apoptosis of cell tested. The activity of intracellular caspase-8 was confirmed to be increased when cells were cultured in the presence of 1E4-1C2 mAb. Immunprecipitation of cells expressed 1E4-1C2 mAb specific molecules showed molecular weight ranged from 45-200 kD. Xenograft of HepG2 cells was studied in athymic nude mice. At day 4 after implantation, test group was subcutaneously injected with 1E4-1C2 mAb compared to control groups (IgG1 isotype and PBS control) daily for 4 days. Tumor was observed daily. After euthanization, tumors were removed, weighed and measured for diameter of mass. The results showed that tumor volume in tested group were significant smaller compared to control groups. Hematoxylin/Eosin staining of tumor section also showed less in number and smaller in size of neovasculaization. All data demonstrated that not only induction of apoptosis *in vitro*, 1E4-1C2 mAb specific molecule may play an important role in angiogenesis *in vivo*. Amino acid sequence analysis showed that proteins of approximate 80 kD reacted with 1E4-1C2 may be heat shock protein and/or minichromosome maintenance protein 7 (MCM-7) that plays role in DNA replication and highly expresses in malignant cells.

Taken together, it may be reported that 1E4-1C2 mAb specific molecule may have sequence homology to heat shock protein and/or MCM-7. In another way, it may be reacted with one or both of two molecules so they could be demonstrated in immunoprecipitation using 1E4-1C2 mAb. Moreover, this specific molecule may involve in neovascularization as well as interference of DNA replication in malignant cells.