

İnsan Rekombinant Nano-Antikor Yapılarından Kanser Tanısı ve Tedavisine Yönelik Etken Madde Geliştirilmesi

Nurşah ERSEZEN¹, Bertan Koray BALCIOĞLU², Aylin ÖZDEMİRBAHADIR², Melis DENİZCİ ÖNCÜ², Hasan Ümit ÖZTÜRK², Müge SERHATLI², Filiz KAYA², Hilal YAZICI², Berrin ERDAĞ³

Öz

Bu çalışmada, faj gösterim teknolojisi ile yüksek çeşitliliğe sahip saf insan ağır zincir değişken bölge (VH) nano-antikor kütüphanesi oluşturulması ve buradan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü'ne (EGFR) spesifik yapıların seçiliminin gerçekleştirilerek kanser tanı ve tedavisinde kullanılabilecek aday moleküllerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, sağlıklı insan periferik kanından izole edilen total RNA'dan cDNA sentezi yapıp, bu kalıp üzerinden insan VH antikor genlerine spesifik primerler kullanılarak VH antikor genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılmıştır. Antikor kütüphanesi fajmid vektöre klonlandıktan sonra *Escherichia coli* (*E. coli*) amber supresör TG1 bakterilerine transforme edilmiştir. Enfektif fajların oluşumu sağlandıktan sonra faj eldesi yapıp EGFR'ye afinite gösteren yapılar biyopanning döngüleri ile seçilmiştir. 3 biyopanning döngüsü sonrasında rastlantısal olarak seçilen 60 farklı klonun antikor geni içerip içermediği PZR ile kontrol edilmiştir. Antikor geni tespit edilen 34 adet klonun EGFR'ye bağlanma afiniteleri faj-ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Değerlendirilen klonlardan 6 tanesinin EGFR'ye bağlanma afinitelerinin negatif kontrol olan BSA proteinine kıyasla 2 kattan fazla olduğu; 1 klonun ise 1.8 kat fazla olduğu görülmüştür. İleriki çalışmalarda burada belirlenen klonların karakterizasyonlarına devam edilmesi ve nano-antikor yapılarının üretimlerinin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Monoklonal antikorlar, Nano-antikorlar, Faj gösterim teknolojisi, Epidermal büyüme faktörü reseptörü

Development of an Active Substance from Human Recombinant Nano-Antibody Constructs For the Diagnosis and Treatment of Cancers

Abstract

In this study, construction of high diversity naive human heavy chain variable region (VH) nano-antibody library with phage display technology and the selection of specific structures against to Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) were aimed for the development of candidate

¹Gebze Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

²TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

³İstanbul Aydın Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yazışma Adresi: Dr. Berrin ERDAĞ, İstanbul Aydın Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Florya Yerleşkesi, Beşyol Mah. İnönü Cad.No:38Sefaköy-Küçükçekmece/İSTANBUL e-posta: berrinerdag@aydin.edu.tr, ORCID ID: 0000-0003-2241-1540

Geliş Tarihi: 28 Temmuz 2020 - Kabul Tarihi: 8 Ekim 2020

DOI: 10.17932/IAU.TFK.2018.008/tfk_v03i3002

molecules in cancer diagnosis and treatment. For this purpose, RNA isolation was done from healthy human peripheral blood cells and cDNA was synthesized. From this template, VH antibody genes were amplified by PCR using primers specific to human VH antibody genes. Antibody library was cloned into the phagemid vector and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) amber suppressor TG1 strain. After the formation of infective phages, they were rescued and selection of EGFR-specific constructs was performed with biopanning cycles. After 3 rounds of biopanning, randomly selected 60 clones were controlled by PCR whether the presence of antibody gene. 34 clones which have antibody gene were controlled by phage-ELISA for the determination of their specificity against to EGFR. As a result, EGFR binding affinities in 6 clones were more than 2-fold and in 1 clone was more than 1.8 fold when compared to the negative control, BSA protein. In the further studies, characterization of these selected clones and expressions of nano-antibody molecules will be performed.

Key Words: Monoclonal antibodies (Mabs), Nano-antibodies, Phage display technology, Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Giriş

Monoklonal antikorlar tek bir B hücre klonu tarafından oluşturulan, hedefledikleri yapıya bağlanarak hedefin bloklanmasını veya çeşitli mekanizmalarla elimine edilmesini sağlayan etkili moleküllerdir (1,2). Hedef yapıya karşı yüksek spesifite ve afinite göstermeleri dolayısıyla etkinin sağlıklı hücreler yerine sadece hedef alınan hastalıklı hücrelerde görülmesini sağlarlar, bu sayede düşük yan etki gösterirler. Bu sebeple kanser gibi birçok hastalıkta avantaj sağlamaktadırlar ve günümüzde tanı, tedavi, biyogörüntüleme gibi çeşitli amaçlarla kullanılabilirler (1,3). Günümüzde monoklonal etken maddeli ilaçlar çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (4). İlk olarak geliştirilen fare kökenli antikorların insanlarda immün reaksiyona sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu sebeple zaman içerisinde oluşturulan antikorların fare kökeni azaltılarak insanlaştırılması hatta tamamen insan kökenli antikorların geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır (4,5).

Antikor mühendisliğinin gelişmesi zaman içerisinde bütün bir IgG yapısının yerine bu yapıdan daha avantajlı olabilecek, scFv, Fab, nanobody, diabody gibi daha küçük boyutta farklı formatların oluşturulabilmesini sağlamıştır (6). Nanobodyler (VHH), kamelidlerde (devegillerde) doğal olarak

oluşan HCAB ağır zincir antikorlarının antijen tanımadan sorumlu olan değişken bölgeleridir ve spesifik antijene bağlanma için gerekli potansiyele sahip en küçük ve fonksiyonel birimdir. Yaklaşık olarak 12-15 kDa büyüklüğünde, 4 nm uzunluğunda ve 2.5 nm çapındadırlar (7-9). Oldukça küçük boyutlu olmalarına ek olarak, yüksek stabilite ve çözünürlüğe sahip olmaları ve mikrobiyal sistemlerde, faj gösterim teknolojisi gibi yöntemlerle kolayca üretilmelerini dolayısıyla avantajlara sahiptirler. Bunlara ek olarak, etkili ve esnek antijen tanıma bölgelerine sahip olmaları konvansiyonel IgG antikorlarının nüfuz edemediği bölgelere etki etmelerine olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar VHH yapılarının insan VH3 gen ailesiyle %80'nin üzerinde benzerliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur ve bu durum VHH'lerin tedavi amaçlı uygulamalarının insanlarda düşük immünojenisite riski gösterebileceğini desteklemektedir (8-11). VHH yapılarının çoklu birimler halinde üretilmesi veya farklı yapıları hedefleyen VHH'lerin füzyon edilmesi de sağlanabilmektedir. Bunun yanında, VHH'ler ilaç taşıyan nanopartiküllerle konjugasyon veya Fc antikor bölgesi ile füzyon yapılabilmektedir. Bu yollarla tedavi etkinliğinin artırılması sağlanabilmektedir (10,12-14).

Monoklonal antikor geliştirmede sıklıkla

yararlanılan bir yöntem olan faj gösterim teknolojisi, (poli) peptid yapılarının filamentöz bakteriyofaj yüzeyinde sunulmasını sağlayan bir tekniktir. Faj fenotipinin doğrudan enkapsüle haldeki faj genotipine bağlı olmasına dayanan bu teknik ilk olarak 1985 yılında George P. Smith'in, yabancı DNA fragmanlarını filamentöz bakteriyofajın pIII kılıf proteinini kodlayan gen III bölgesine füzyon etmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sayede enfektif virion oluşumu engellenmeksizin, yabancı DNA'nın kodladığı (poli) peptid yapısı filamentöz fajın yüzeyinde sunulmaktadır (15). Faj gösterim teknolojisiyle, antikor genlerini kodlayan (poli) peptid yapılarının kapsid yapısında sunulmasının ardından, spesifik bir hedefe karşı seçilimi ve çoğaltılmasıyla, yüksek afinite ve aviditeye sahip, belirli bir hedef moleküle spesifik yapıların seçilimi sağlanabilmekte ve immünizasyon gerekmeksizin antikor geliştirilmesi sağlanabilmektedir (16,17). Diğer bir deyişle, immün sistemin *in vitro* ortamda taklit edilmesi olarak düşünülebilecek faj gösterim teknolojisi ile immün sistemin B hücrelerinin yüzeyinde sunulan her biri farklı özellikteki antikorların bakteriyofaj yüzeyinde sunulması ve yine immün sisteme benzer şekilde belirli bir hedefe bağlanan fajların seçilimi sağlanabilmektedir. Sonrasında, istenen hedefe spesifik antikorların çözünümlük olarak üretimi gerçekleştirilir (18).

Geleneksel kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları, kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermekte ve hasta üzerinde birçok yan etkiye sebep olabilmektedir. Buna karşın monoklonal antikorlar kanser hücrelerinde gözlenen farklılıkları hedef alarak; sağlıklı hücreler yerine sadece kanser hücrelerine etki etmektedirler. Monoklonal antikorlar, çoğunlukla kanser hücrelerinde aşırı anlatımı bulunan protein ve reseptör gibi yapıları hedef alarak inaktive eder ve bu sayede kanser hücrelerinin büyümesini engelleyerek anti-kanser etki göstermiş olurlar. Monoklonal

antikorlar, hücre dışındaki molekülleri hedef alabileceği gibi; hücre içindeki moleküllere karşı da oluşturulabilmektedir (19,20).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR, HER1, ErbB1), ErbB tirozin kinaz reseptörleri ailesine ait bir transmembran glikoproteinidir ve EGF ailesine ait peptid büyüme faktörlerinin bağlanmasıyla aktive olmaktadır (21-23). EGFR aktivasyonu proliferasyon, canlılık, farklılaşma, migrasyon, anjiyogenez, gen ekspresyonu, apoptoz inhibisyonu, adezyon ve metastazda önemli olan birçok hücreyel yolağın ve transkripsiyon faktörünün aktive edilmesinde görev alır ve yapılan çalışmalar EGFR'nin birçok kanser türünde mutasyona uğradığını veya normalden fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Bu sebeple, kanser tedavisi ve tanısı açısından büyük öneme sahiptir ve günümüzde EGFR hedefli monoklonal antikor geliştirilmesi üzerine yoğun şekilde çalışmalar mevcuttur (21,24).

Bu çalışmada, faj gösterim teknolojisiyle saf insan VH antikor kütüphanesi oluşturulması ve bu kütüphane içerisinden EGFR'ye spesifik yapıların seçilerek kanser tedavisinde kullanılmak üzere anti-EGFR nano-antikoru geliştirilmesi hedeflenmiştir. EGFR'ye karşı geliştirilen birçok IgG formatında antikor olmasına ve birçok kamelid kökenli VHH nanobody çalışmaları olmasına karşın bu çalışma ile geliştirilmesi planlanan insan nano-antikor yapılarıyla insan nano-antikorlarının kanser tanı ve tedavisindeki potansiyellerinin araştırılması ve diğer antikor formatlarıyla karşılaştırmalı analizlerinin gerçekleştirilebilmesi sağlanabilecektir. Ayrıca bu çalışmada immünizasyon olmaksızın oluşturulan antikor kütüphanesinin saf olması dolayısıyla bu kütüphanenin ileride birçok farklı hedefe karşı nanobody temelli antikor geliştirilmesinde de kullanılabilmesi mümkün olacaktır.

Gereç ve Yöntem

Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Antikor genlerinin oluşturulmasında kaynak olarak insan periferel kan örneği kullanılmıştır. İnsan periferel kan örneği EDTA'lı tüpe alındıktan hemen sonra total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Quick-RNA Whole Blood Kiti (Zymo Research, Irvine, ABD) kullanılmıştır. İzolasyon kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Sonrasında elde edilen RNA üzerinden cDNA sentezi Super Script III First Strand Sentez Sistemi (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İnsan Ağır Zincir Antikor Kütüphanesinin Oluşturulması

İnsan VH antikor genlerinin çoğaltılması amacıyla cDNA kalıp olarak kullanılarak, farklı VH gen ailelerine spesifik primerler ile PZR döngüleri gerçekleştirilmiştir. Antikor genleri oluşturulduktan sonra pürifikasyonları sağlanmıştır. Antikor genlerinin vektöre klonlanabilmesi için, oluşturulan antikor genleri kalıp DNA olarak kullanılarak ilk aşamada kullanılan ileri primer dizilerine *SfiI*, geri primer dizilerine ise *NotI* restriksiyon enzim kesim bölgesi eklenmiş primerler ile tekrar PZR döngüleri gerçekleştirilmiştir. Enzim olarak tüp başına 1 U/ μ L GoTaq polimeraz enzimi (Promega, Wisconsin, ABD) kullanılmıştır. Kalıp DNA'lar tüp başına 100 ng olarak kullanılmıştır. PZR'de öncelikle 94°C 2 dk. başlangıç denatürasyonu yapılmış, sonra denatürasyon 94°C 1 dk., birleşme kullanılan primerlere uygun sıcaklıkta 2 dk., uzama 72°C 2 dk. olarak 30 döngü yapılmış ve son uzama olarak 72°C 10 dk. ile tamamlanmıştır. %1.2'lik agaroz jelde kontrol edilen örnekler daha sonra 4 farklı set halinde (6900, 6901, 6902, 6903) bir araya getirilmiş, *SfiI* ve *NotI* enzimleri ile kesilip pCANTAB6 fajmid vektörüne klonlanmıştır. Ligasyonda T4 DNA ligaz enzimi (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılmış ve vektör: DNA molar oranı 1:6 olarak uygulanmıştır. Rekombinant fajların üretimi amacıyla, vektöre klonlanan

antikor kütüphanelerinin *E. coli* amber supresör TG1 bakteri suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiş ve bu kütüphaneleri içeren bakteriler bir araya getirilerek 100 μ g/mL ampisilin varlığında Luria-Bertani (LB) besiyeri içerisinde kültür edilmiştir. Daha sonra bu bakteri kültürü faj eldesi işlemlerinde kullanılmıştır.

Enfektif Fajların Elde Edilmesi

Antikor kütüphanesini içeren bakteriler 100 μ g/mL ampisilin içeren maya özütü-tripton (2xTY) besiyeri ortamında 37°C'de 220 rpm'de çalkalanarak optik dansite 600 (OD600) değeri 0.5-0.8 oluncaya kadar büyütülmüştür. OD beklenen değere ulaştığında bu kültürden belirli bir miktarda alınarak 100 μ g/mL ampisilin ve %2 glikoz içeren taze 2xTY besiyeri ortamına inoküle edilmiştir ve enfektif faj oluşumunu sağlamak amacıyla 10^9 pfu M13K07 yardımcı fajı ilave edilmiştir. Kültür, 37°C'de 45 dk. çalkalanmaksızın ve 45 dk. 220 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. Süre sonunda bakteriler 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek çöktürülmüş, pellet 100 μ g/mL ampisilin ve 50 μ g/mL kanamisin içeren taze 2xTY besiyeri ile çözülüp gece boyu 37°C'de çalkalanarak büyütülmüştür. Süre sonunda kültür 8000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendikten sonra süpernatant temiz bir tüpe alınıp üzerine $\frac{1}{4}$ hacimde PEG-6000/2.5 M NaCl eklenerek 2 saat buz içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde 8000 rpm 4°C'de 40 dk. santrifüj edildikten sonra pellet steril su ile çözülmüş ve 12000 rpm'de 10 dk. tekrar santrifüj edilip süpernatant temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra $\frac{1}{4}$ hacimde PEG-6000/2.5 M NaCl eklenerek 45 dk. buz içerisinde inkübe edilmiştir. Süre sonunda 12000 rpm'de 30 dk. 4°C'de santrifüj yapılarak elde edilen pellet 1 mL steril 0.01 M fosfat tamponlu salin (PBS) ile çözülüp, ependorfa alınarak 13000 rpm'de 2 dk. santrifüj edilerek kalıntılar uzaklaştırıldıktan sonra fajları içeren sıvı faz temiz bir tüpe alınmıştır. Elde edilen fajların konsantrasyonu seri dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Faj Titrasyonu

Faj veriminin belirlenmesi amacıyla, elde edilen faj stoğundan 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmış ve hazırlanan her bir dilüsyondan 10 µL alınarak, minimal plate'te büyütülmüş OD600 değeri 0.5 olan 100 µL TG1 bakterisi ile bir araya getirildikten sonra 30 dk. 37°C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir dilüsyon 100 µg/mL ampisilin içeren LB agarplate'e yayma yöntemi ile ekildikten sonra plateler 37°C'de gece boyu büyütülmeye bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan koloniler sayılarak faj konsantrasyonu belirlenmiştir.

Biyopanning Döngüleri

Konsantrasyonu belirlenen faj stoğundan EGFR'ye spesifik olan nano-antikor yapılarının seçilimi amacıyla biyopanning döngüleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Nunc Maxisorp immüno plateler 1 µg EGFR (Peprotech, ABD) içeren 0.1 M NaHCO₃ ile kaplanarak gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün kuyular 3 kere PBS ile yıkandıktan sonra %1 Bovin Serum Albumin (BSA) içeren 0.01 MPBS eklenerek 2 saat 37°C'de bloklanmıştır. Süre sonunda tüpler 3 kere PBS ile yıkandıktan sonra bloklama tamponu ile seyreltilen fajlar 1×10^{10} pfu olacak şekilde tüpe eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk. boyunca çalkalanarak 90 dk. çalkalamadan inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Tüpler 60 kere %0.1 Tween-20 içeren TPBS ile, 60 kere PBS ile yıkandıktan sonra OD600 değeri 0.5-0.8 olan TG1 bakterileri eklenerek 37°C'de 30 dk. inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda, biyopanningden elde edilen faj çıktısının belirlenmesi amacıyla alınan örnekler ampisilin içeren LB agar platelere yayım yapılarak 37°C'de gece boyu büyütülmüştür. Kuyuda kalan enfekte olmuş bakteriler ise 100 µg/mL ampisilin içeren 2xTY besiyerine alınarak gece boyu 37°C'de 220 rpm'de çalkalanarak büyütülmüş ve sonraki biyopanning döngüsüne girmek üzere yardımcı faj ile amplifikasyonları sağlanmıştır.

Koloni PZR

3. biyopanning döngüsü sonrasında rastlantısal olarak seçilen 60 koloni PZR ile antikor geninin varlığı açısından kontrol edilmiştir. Bu amaçla steril su içeren tüplere inoküle edilen koloniler 95°C'ye ısıtılmış termal blokta 3 dk. bekletildikten sonra tüpler 13000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatantlar PZR'de kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Koloni PZR'de, vektörün çoklu klonlama bölgesinin uç kısımlarına spesifik olan 459 ve 458 primerleri kullanılmıştır. Enzim olarak 1 U/µL MyTaq polimeraz (Bioline, ABD) kullanılmıştır. PZR döngüleri, denatürasyon 94°C 1 dk., birleşme 55°C 2 dk., uzama 72°C'de 2 dk. olacak şekilde 30 döngü ve son uzama 72°C'de 10 dk. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Faj-ELISA

Panning döngüleri sonrası platelerdeki kolonilerin, EGFR'ye bağlanma afinitelerini belirleyebilmek amacıyla faj-ELISA gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, incelenecek koloniler ampisilin varlığında LB besiyerinde gece boyu büyütüldükten sonra başlangıç hacminin 1/100'i oranında alınıp 100 µg/mL ampisilin ve %2 glikoz içeren 2xTY besiyerine inoküle edilmiştir. 30°C'de 220 rpm'de büyütülen bakteriler, OD600 değeri 0.5'e ulaşıncaya 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Pelletler tekrar ampisilin ve glikoz içeren taze 2xTY besiyerinde çözüldükten sonra 2×10^9 pfu M13K07 yardımcı fajı eklenerek 37°C'de 220 rpm'de 1 saat büyütülmeye devam edilmiştir. Süre sonunda aynı koşullarda santrifüj yapıldıktan sonra pellet 100 µg/mL ampisilin ve 50 µg/mL kanamisin içeren 2xTY besiyerinde çözüldükten sonra 30°C'de 250 rpm'de çalkalanarak gece boyu büyütülmüştür. Ertesi gün kültür 8000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant faj-ELISA'da kullanılmıştır. ELISA'da kullanılacak Nunc Maxisorp plate kuyuları 100 ng/kuyu EGFR içeren 0.1 M NaHCO₃ kaplama tamponu ile kaplanarak, gece boyu 4°C'de bekletilmiştir. Rekombinant fajların, bloklamada kullanılacak

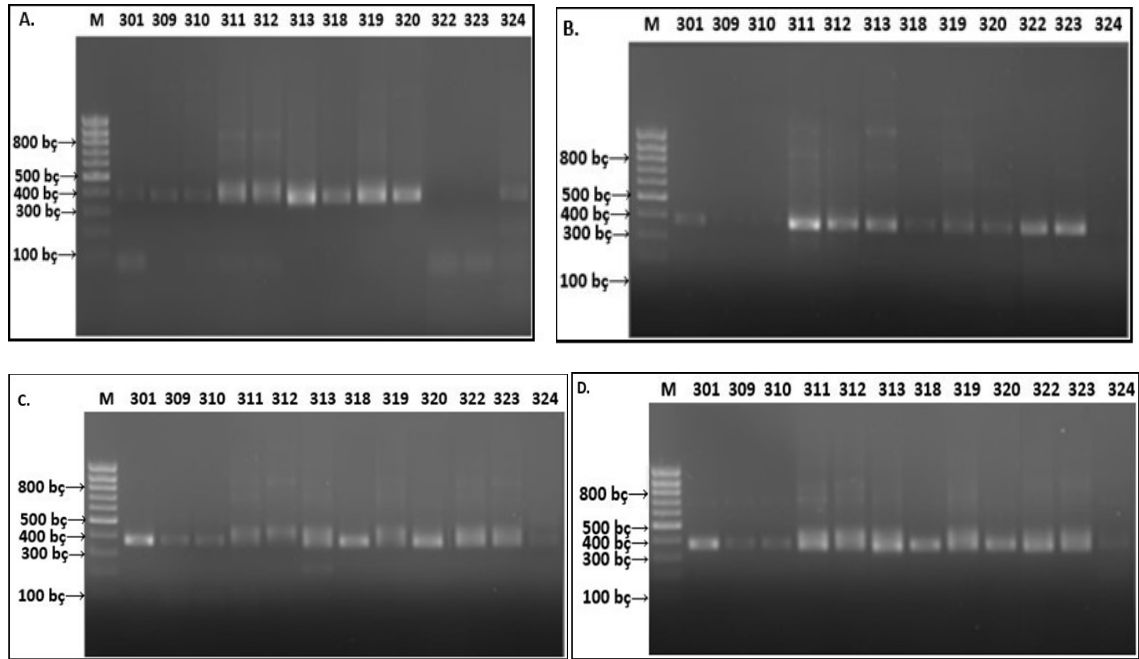
olan BSA proteinine bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amacıyla eşit miktarda kuyu %1 BSA içeren kaplama tamponuyla kaplanmıştır. Ertesi gün kaplama tamponu döküldükten sonra kuyular 1 kere PBS ile yıkayıp, %1 BSA içeren bloklama tamponu eklenerek oda sıcaklığında 2 saat bloklama yapılmıştır. Süre sonunda kuyular 3 kere %0.1 Tween-20 içeren PBS ile, 3 kere de PBS ile yıkama yapıldıktan sonra faj süspansiyonları bloklama tamponuyla seyreltilerek kuyulara eklenmiş 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Kuyular 5 kere TPBS ile 5 kere PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyuya bloklama tamponu içerisinde 1:5000 oranda seyreltilmiş anti-M13 HRP konjugatından (GE Healthcare, Illinois, ABD) eklenerek, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında 3 kere TPBS, 3 kere PBS yıkaması yapılarak, renk reaksiyonunun oluşması için her kuyuya

ABTS eklenmiş ve plate 1 saat ışıktan korunarak bekletildikten sonra ELISA plate okuyucusunda (Biotek, Vermont, ABD) 405 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. ELISA’da negatif kontrol olarak fajların büyütüldüğü besiyeri kullanılmıştır. Tüm örnekler 3 tekrarlı olarak kontrol edilmiştir.

Bulgular

İnsan Ağır Zincir (VH) Antikor Genlerinin Oluşturulması

İnsan VH antikor genlerinin oluşturulması için gerçekleştirilen PZR döngüleri sonucunda yaklaşık olarak 350-400 baz çifti büyüklüğünde olan insan VH antikor gen parçalarının oluşturulduğu görülmüştür. Bazı örneklerde antikor gen fragmanlarına ek olarak, spesifik olmayan smear benzeri kirlilikler görülmüştür. Antikor genlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 1’de gösterilmektedir.



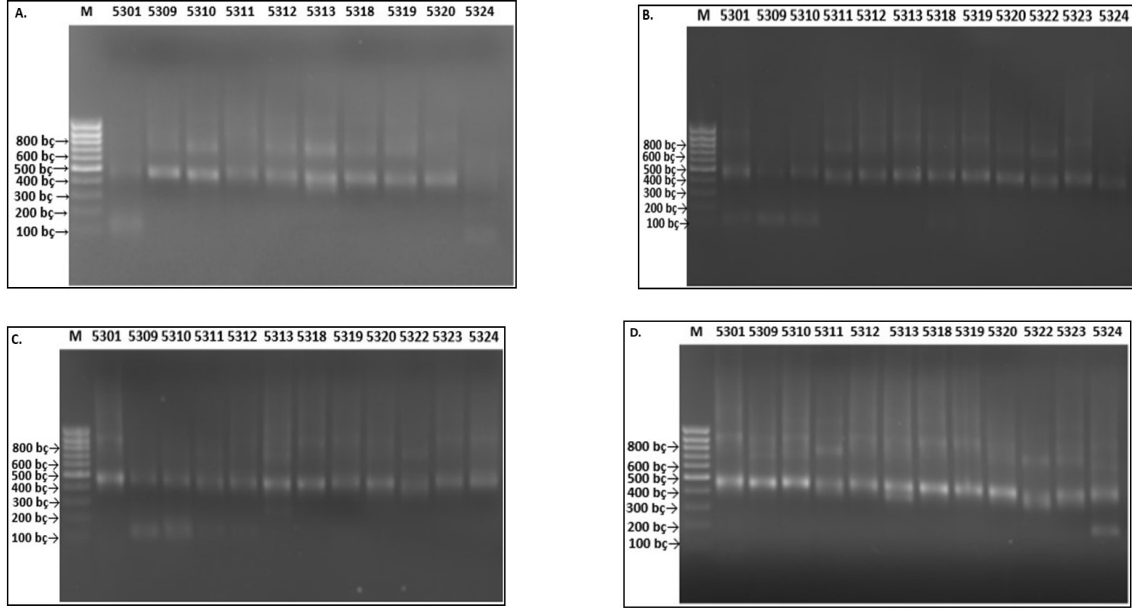
Şekil 1: (A.) 900, (B.) 901, (C.) 902 ve (D.) 903 geri primerleri ile ileri primer kombinasyonlarının PZR görüntüleri

Antikor genlerinin fajmid vektöre klonlanabilmesi amacıyla ilk aşamada elde edilen her bir antikor geni kalıp olarak

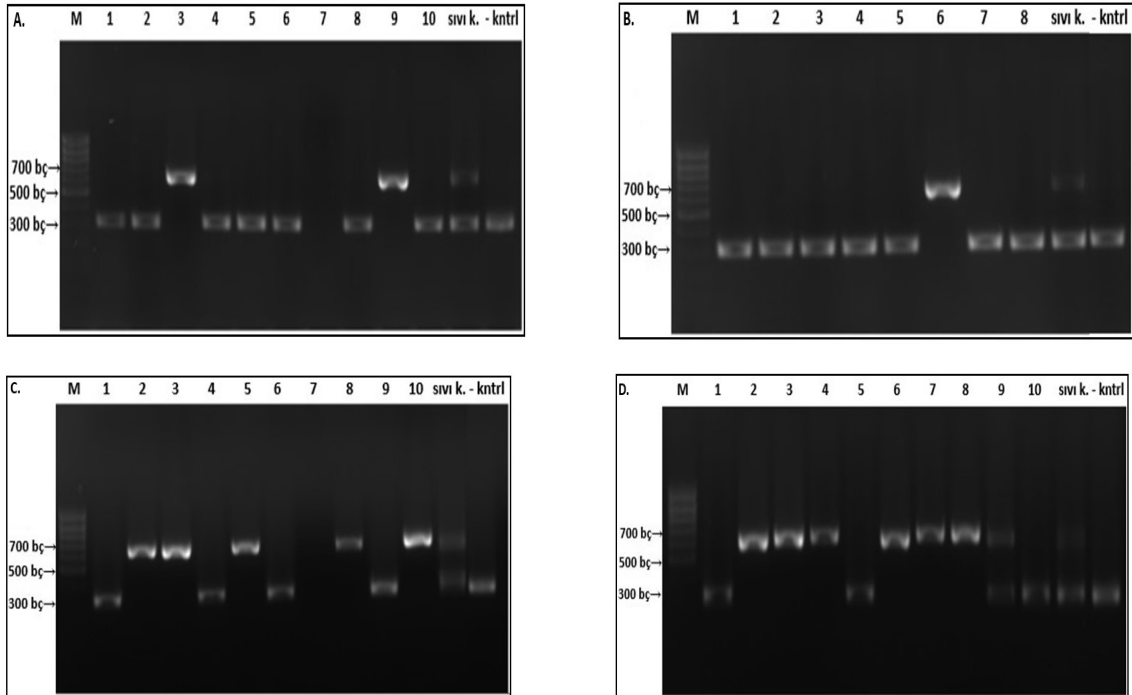
kullanılarak, ilk PZR döngülerinde kullanılan primerlerin SfiI/NotI restriksiyon enzim dizisi eklenmiş olan versiyonlarıyla gerçekleştirilen

PZR döngüleri sonucunda yaklaşık olarak 400-500 baz çifti büyüklüğünde, ilk PZR setlerinden daha büyük olan bantlar gözlenmiştir. Bu

örneklerin bazılarında da smear benzeri yapılar görülmüştür. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2: (A.) 6900, (B.) 6901, (C.) 6902 ve (D.) 6903 geri primerleri ile ileri primer kombinasyonlarının PZR görüntüleri



Şekil 3: (A.) 6900, (B.) 6901, (C.) 6902 ve (D.) 6903 kütüphanelerinin TG1 bakterilerine transformasyonu sonrası koloni PZR görüntüleri

Antikor Kütüphanesinin Vektöre Klonlanması ve Bakterilere Transformasyonu

Bant izolasyonu ile elde edilmiş 4 farklı antikor geni seti pCANTAB6 fajmid vektörüne klonlanıp, *E. coli* TG1 bakterilerine transforme edildikten sonra platerlerden rastlantısal olarak seçilen transformant koloniler koloni PZR ile kontrol edilmiştir. Koloni PZR ile kontrol edilen kolonilerden bazılarındaki yaklaşık olarak 600-700 baz çifti büyüklüğünde olan antikor gen parçaları görülmüştür. Burada, kullanılan primerlerin vektöre spesifik diziler olmaları dolayısıyla PZR ürünleri uç kısımlarında vektörden gelen dizileri içermekte, dolayısıyla boyut artmış olmaktadır. Bazı kolonilerde ise yaklaşık olarak 300 baz çifti büyüklüğünde bantlar görülmüştür. Bu bantlar vektörün çoklu klonlama bölgesinden kaynaklanmakta, dolayısıyla antikor geni içermeyen kolonileri göstermektedir. Transformasyon sonrası gece boyu büyütülen sıvı kültürlerin ise bir havuz olmaları nedeniyle hem antikor geni içeren bantlara hem de sadece vektör

dizisi içeren bantlara sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanında bazı örneklerde hiçbir bant görülemedi. Agaroz jel görüntüleri Şekil 3'te gösterilmektedir.

Enfektif Faj Eldesi ve Biyopanning Döngüleri

Enfektif fajların elde edilmesinin ardından EGFR'ye spesifik rekombinant faj yapılarının seçilimi için biyopanning döngüleri gerçekleştirilmiştir. Biyopanning döngüleri 1×10^{10} pfu faj ile gerçekleştirilmiştir ve 3 tur biyopanning döngüsü sonrasında faj çıktısı 1.35×10^5 pfu/mL'ye ulaşmıştır. Faj veriminin beklenen düzeyde olması sebebiyle, panning döngüleri durdurulmuştur. Biyopanning döngülerine ait faj verimleri Tablo 1'de gösterilmiştir. 3. biyopanning sonrasında rastlantısal olarak seçilen 60 koloni PZR ile kontrol edilmiş, 34 koloninin antikor genini içerdiği gösterilmiştir. PZR sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4'te gösterilmektedir.

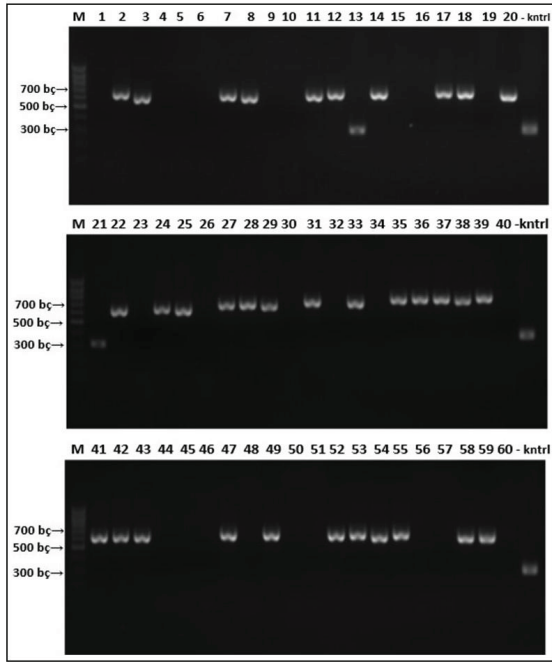
Tablo 1: Biyopanning faj verimleri

Biyopanning döngüsü	Faj girdisi (pfu)	Faj çıktısı (pfu)	Amplifikasyon sonrası (pfu)
			4×10^{11}
1	1×10^{10}	8.9×10^3	3×10^{11}
2	1×10^{10}	1.16×10^4	7.5×10^{11}
3	1×10^{10}	1.35×10^5	1.18×10^{12}

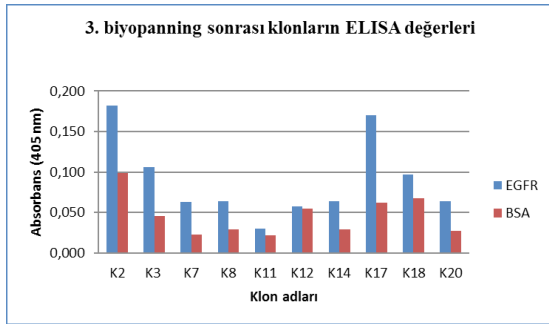
Faj ELISA

Biyopanningden elde edilen ve koloni PZR ile antikor genini taşıdığı tespit edilen 34 klonun EGFR'ye bağlanma afiniteleri faj-ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Değerlendirilen klonların bloklama tamponunda kullanılan BSA proteinine bağlanıp bağlanmadığı da kontrol edilmiştir. Faj-ELISA sonucunda bazı klonların EGFR ve BSA proteinlerine benzer şekilde

bağlandığı görülürken K3, K7, K8, K14, K17, K20 klonlarının BSA'ya kıyasla EGFR'ye bağlanma afinitelerinin 2 kattan fazla olduğu; K2 klonunda ise 1.8 kat olduğu ve EGFR'ye bağlanmada en yüksek absorbanza sahip olduğu görülmüştür. Analiz edilen klonlardan 10 tanesinin EGFR ve BSA'ya bağlanma afinitelerine ait grafik Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 4: 3. Biyopanning döngüsü sonrası koloni PZR



Şekil 5: 3. Biyopanning sonrası faj klonlarının ELISA değerleri

Tartışma

Monoklonal antikorlar kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisi ve tanısı için oldukça önem arz etmektedir (1). Ancak yaklaşık 150 kDa büyüklüğünde olmaları, stabilite ve çözünürlüklerindeki problemler IgG formundaki bu antikorların tanı ve tedavideki kullanım potansiyellerini kısıtlayabilmektedir. Bu sebeple zaman içerisinde daha küçük yapıları antikor formatlarının geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır (6). Nanobodyler bu antikor fragmanlarından biridir. Ağır zincir antikorları devgillerde doğal olarak üretilen hafif zincir

içermeyen özgün antikorlardır. Bu yapılarıdaki antijen tanımadan sorumlu en küçük birim olan VHH nanobody yapıları hedef antijene karşı yüksek afinite gösteren ve 15 kDa boyutlarında olan oldukça küçük yapıları dolayısıyla tanı ve tedavi alanlarında yüksek potansiyele sahiptir. IgG yapısındaki antikorlara kıyasla küçük boyutları, yüksek stabilite ve çözünürlüğe sahip olmaları IgG antikorlarına kıyasla avantaj sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar nanobodylerin aşırı koşullara dayanıklı olduğunu hatta denatürasyona uğrasalar bile tekrardan kolayca katlanabildiklerini göstermiştir (8-11). Ayrıca bu yapılar tek birimden oluştuğu ve post-translasyonel modifikasyon içermemeleri dolayısıyla üretim konusunda da IgG antikorlarına karşı avantaj sağlamakta ve mikroorganizmalar kullanılarak kolayca üretilmektedir (8,11). Nanobodylerin bu avantajları dolayısıyla bu çalışmada saf insan VH nano-antikorlarının oluşturulması ve potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda insan VH antikor genleri başarıyla çoğaltılmış ve fajmid vektöre klonlanarak saf insan VH antikor kütüphanesi oluşturulmuştur. Bunun ardından önemli bir kanser hedefi olan EGFR'ye spesifik olan yapıların seçilimi biyopanning döngüleri ile sağlanmıştır. Biyopanning döngüleri sonucunda elde edilen klonların EGFR'ye bağlanma potansiyelleri ELISA metoduyla değerlendirilmiştir. Sonraki çalışmalarda EGFR'ye spesifik olarak bağlandığı belirlenen klonların (K2, K3, K7, K8, K14, K17, K20) karakterizasyonlarının yapılması planlanmaktadır. Buna ek olarak burada oluşturulan insan VH nano-antikor kütüphanesi saf yapıda olması dolayısıyla yüksek çeşitliliğe sahiptir ve ilerleyen çalışmalarda bu kütüphane içerisinde farklı hedef yapılara karşı seçim yapılması da sağlanabilecektir.

*Çalışma kısmi olarak TÜBİTAK 1007 113G100 nolu proje ile desteklenmiştir.

**İnsan periferik kan örneği için GOKAEK 2020/281 nolu etik kurul kararı mevcuttur.

KAYNAKLAR

1. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE. Demystified: Monoclonal antibodies. *Mol Pathol* 2000; 53: 111–117.
2. Rajewsky K. The advent and rise of monoclonal antibodies. *Nature* 2019; 575: 47–49. doi:10.1038/d41586-019-02840-w
3. Suzuki M, Kato C, Kato A. Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. *J Toxicol Pathol* 2015; 28: 133–139. doi:10.1293/tox.2015-0031
4. Mahmuda A, Bande F, Al-Zihiry KJK, et al. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Trop J Pharm Res* 2017; 16: 713–722. doi:10.4314/tjpr.v16i3.29
5. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, et al. Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 220–233. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
6. Erdag B, Balcioglu BK, Ozdemir Bahadır A, et al. Identification of novel neutralizing single-chain antibodies against vascular endothelial growth factor receptor 2. *Biotech and Applied Biochem* 2011; 58; 6: 412-422.
7. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 1993; 363: 446–448. doi:10.1038/363446a0
8. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*. Springer International Publishing 2020; 34: 11–26. doi:10.1007/s40259-019-00392-z
9. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 77: 13–22. doi:10.1007/s00253-007-1142-2
10. Li C, Tang Z, Hu Z, et al. Natural single-domain antibody-nanobody: A novel concept in the antibody field. *J Biomed Nanotechnol* 2018; 14: 1–19. doi:10.1166/jbn.2018.2463
11. Khodabakhsh F, Behdani M, Rami A, et al. Single-Domain Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies. *Int Rev Immunol Taylor & Francis* 2018; 37: 316–322. doi:10.1080/08830185.2018.1526932
12. Chanier T, Chames P. Nanobody Engineering: Toward Next Generation Immunotherapies and Immunoimaging of Cancer. *Antibodies* 2019; 8: 13. doi:10.3390/antib8010013
13. Oliveira S, Schiffelers RM, van der Veeken J, et al. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. *J Control Release Elsevier B.V* 2010; 145: 165–175. doi:10.1016/j.jconrel.2010.03.020
14. Van Der Meel R, Oliveira S, Altintas I, et al. Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment. *J Control Release Elsevier B.V* 2012; 159: 281–289. doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.027
15. GP S. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315–1317.
16. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990; 348: 552–554. doi:10.1038/348552a0
17. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991; 222: 581–597. doi:10.1016/0022-2836(91)90498-U
18. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, et al. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 433–455. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.002245
19. Pento JT. Monoclonal Antibodies for

- the Treatment of Cancer. *Anticancer Res* 2017; 37: 5935–5939. doi:10.21873/anticancer.12040
20. Trenevskaya I, Li D, Banham AH. Therapeutic antibodies against intracellular tumor antigens. *Front Immunol* 2017; 8. doi:10.3389/fimmu.2017.01001
 21. Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366: 2–16. doi:10.1016/j.gene.2005.10.018
 22. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 15–31. doi:10.1517/14728222.2011.648617
 23. Xu MJ, Johnson DE, Grandis JR. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36: 463–473. doi:10.1007/s10555-017-9687-8
 24. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 2018; 12: 3–20. doi:10.1002/1878-0261.12155