

## DERLEME

# MONOKLONAL ANTİKOR TEKNOLOJİSİ'NİN DÜNÜ, BUGÜNÜ VE GELECEĞİ

## YESTERDAY, TODAY AND THE FUTURE OF MONOCLONAL ANTIBODY TECHNOLOGY

<sup>1</sup>S.Mert Selimoğlu, <sup>2</sup>Murat Kasap, <sup>2</sup>Gürler Akpınar, <sup>3</sup>Aynur Karadenizli

## ÖZET

20. yy başlarında Paul Erlich "sihirli mermi" (magic bullet) teorisini öne sürdüğünde elinde yalnızca Emil von Behring ile Kitasato Shibasaburō'nın hümorale immünitenin varlığına dair yapmış oldukları çalışmanın verileri mevcuttu. O günlerde antikorların varlığına dair hiçbir somut veri bulunmamaktaydı. Teoriye göre "eğer spesifik bir patojene özgü bir bileşik geliştirilebilirse, bu yolla söz konusu patojene toksin de gönderilebilirdi". Bu bağlamda 80'lerden günümüze monoklonal antikor geliştirme teknolojisi alanında geldiğimiz nokta değerlendirildiğinde, Paul Erlich'in o yıllarda prensip olarak öne sürdüğü savaşım stratejisini hayata geçirebilecek teknolojinin ötesine geçmeye başladığımız söylenebilir. İlk yıllarda tamamı ile fare antikorlarının üretimi ile başlayan süreç, aynı yıllarda temelleri atılan rekombinant DNA teknolojisinin de yardımı ile büyük bir hızla gelişim göstermiştir. Günümüzde, proteomiks ve biyoinformatik alanlarının da söz konusu alanda varlık göstermeleri ile farklı organizmalarda bulunan daha uzun yarı-ömürlü antikorların insan zincirli versiyonlarından, çok fonksiyonlu antikorlara; toksin konjuge edilmiş antikor formlarından, radikal sayılabilecek tasarımlara kadar Paul Erlich'in hayallerinin çok ötesinde "sihirli mermiler" üretebilmekteyiz. Üstelik ürettiğimiz bu mermiler tamamı ile hedefine özgüdür. Ancak bütün bu gelişmelere rağmen, güncel antikor geliştirme tekniklerinin getirdiği bazı kısıtlar nedeni ile olası salgınlarda yeterince hızlı davranamamakta; kanser vakalarında ise halen büyük ölçüde konvansiyonel silahlarımızı başvurmak zorunda kalmaktayız. Neyse ki söz konusu alandaki hızlı gelişim ve günümüzde mevcut olan teknolojik olanaklar nedeni ile monoklonal antikor teknolojisinin çeyrek asırda kat ettiği yolun çok daha fazlasını önümüzdeki 10-20 yıl içinde kat etmesi beklenmektedir. Bu bağlamda, günümüz dünya ilaç pazarındaki payı %25'ten fazla olan protein bazlı biyoteknolojik ilaçların, yakın bir gelecekte kimyasal olarak sentezlenen konvansiyonel terapötiklerin yerini alarak pazarın büyük çoğunluğuna hakim olması beklenmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Monoklonal antikor, hibridoma, faj gösterim, transgenik fare, protein tabanlı ilaçlar

## ABSTRACT

When Paul Erlich postulated the idea of "magic bullet" in the early part of 20th century, he only had the findings of a research, regarding the presence of humoral immunity, performed by Emil von Behring and Kitasato Shibasaburo.. There was no concrete data about the presence of antibodies in those days. According to the idea, "if a compound could be made that selectively targeted a disease-causing organism, then a toxin for that organism could be delivered along with the agent of selectivity". If the point in the technology of monoclonal antibody generation that we have reached from '80s to present is considered, it can be claimed that we have started to go beyond the technology realizing the fighting strategy principally proposed by Paul Erlich at those times. The period starting with the production of fully murine antibodies in the first years exhibited a fast-growing trend with the help of recombinant DNA technology established around the same years. Today, we can generate various "magic bullets", being so much beyond what Paul Erlich might dream, with the contributions of fields such as proteomics and bioinformatics. Those range from human-chained antibodies found in different species with longer half-life to multifunctional antibody forms, and from toxin-conjugated antibodies to novel designs, which may be considered as radical. Furthermore, the bullets that we can produce are completely target-specific. In spite of all these developments, we cannot take actions sufficiently fast due to some constraints of recent antibody development techniques. In cancer cases, we are still mostly obliged to resort to our conventional guns. Fortunately, monoclonal antibody technology is expected to make much more progress within 10-20 years than it has made in the past quarter-century because of rapid progress in the field and current technological capabilities. Thus, protein-based biotechnological drugs, of which current global market share is more than 25%, are expected to substitute most chemical-based conventional therapeutics and dominate most of the market in the near future.

**Keywords:** Monoclonal antibody, hybridoma, phage display, transgenic mouse, protein-based drugs

## Giriş

Günümüz dünyasında bilinen anlamdaki antikorların yapı ve fonksiyonlarına dair bilgiler ancak 1950'lerden sonra belirginleşmeye başlamıştır. Bu tarihten günümüze kadar edinilen bilgiler değerlendirildiğinde genel olarak antikorlar, hümorale immünitenin en etkili bileşenleri olarak bilinmektedir. İnsanda genel olarak 5 çeşit antikor bulunmaktadır. Bunlar immünoglobülin A (alfa), D (delta), E (epsilon), G (gama), M (mü) olarak adlandırılır. Bunlar arasında immünoglobülin G (IgG), kanda ve hücre dışı sıvıda bulunan temel antikor tipi olup, vücut dokularının enfeksiyonunun kontrol altında tutulmasını sağlamaktadır. IgG işlevini birkaç yolla gerçekleştirmektedir. Öncelikle patojenlerin, IgG'nin neden olduğu aglütinasyon ile birbirlerine bağlanması söz konusudur. Bunun yanı sıra, opsonizasyon olarak bilinen süreç ile IgG kaplı patojen yüzeyleri fagositik immün hücrelerini aktive etmektedir. IgG'ler komplement sisteminin

klasik yolağını aktive etmekte ve toksinlere bağlanarak nötralize olmalarını sağlamaktadır. Antikora bağlı hücreler sitotoksitede ve sitozolde bulunan işaretlenmiş viriyonların imha edilmesini sağlayan hücre içi antikor yardımcı proteoliz mekanizmasında da önemli rol oynarlar<sup>1,2</sup>. Tüm bunların yanı sıra, IgG yaklaşık 22 günlük yarı ömrü ile kanda kalış süresi en uzun olan antikor tipidir. Bu özelliğini erişkinlerde de mevcut olan ve albümini de bağlayabilme yetisi olan neonatal Fc reseptörü adı verilen reseptöre borçludur. Bu reseptör aracılığı ile kandaki yarı ömrü önemli ölçüde arttırılmaktadır<sup>3</sup>. Antikorların terapötik amaçla kullanımı, varlıklarının kanıtlanmış olduğu ilk yıllara kadar uzanmaktadır. Bu amaçla spesifik bir antijen ile immünize edilen bir hayvanın poliklonal antikor içeren serumu toplanarak saflaştırılması ve terapötik amaçlı olarak kullanımı denenmiştir. Ancak bu durum hayvan proteinleri ile kontaminasyon (özellikle virüs ya da prion

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD  
<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD  
DEKART Proteomiks  
Laboratuvarı

<sup>3</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Geliş  
24.11.2015

Kabul  
27.12.2015

Sorumlu Yazar  
S. Mert SELİMOĞLU,  
Kocaeli Üniversitesi Tıp  
Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü

Tel:  
+90555 748 07 92  
e-posta:  
mertselimoglu@hotmail.com

transmisyonu gibi) problemlerine ve mevcut serumdaki istenilen antikor titresinin oldukça düşük kalmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra, poliklonal antikor havuzunun birçok epitopu tanıyabilen antikorları içermesi nedeni ile non-spesifik pek çok reaksiyona sebebiyet vermektedir, ki bu durum poliklonal antikorların kullanımının önünde duran en büyük problemdir.

Poliklonal antikor tedavisinin mevcut sakıncaları nedeni ile monoklonal (yalnızca bir epitopa özgü) bir antikor molekülünün geliştirilmesi bir zaruret halini almıştır. Bu amaçla Georges Köhler ve César Milstein<sup>4</sup> tarafından 1975 yılında yapılan somatik hücre füzyonu çalışması bir devrim niteliği taşımaktadır. Her ne kadar kısaca “antikor üretme yeteneği olmayan sınırsız ömürlü miyeloma hücreleri ile antikor üretme yeteneği olan kısa ömürlü B-lenfosit hücrelerinin birleştirilmesi” olarak açıklansa da; özünde akıllıca tasarlanmış deneysel bir metot yatmaktadır.

### Hibridoma Teknolojisi

Somatik hücre füzyonu tekniği ile geliştirilen hibridoma hücreleri stabil olarak IgG antikor salgılaya yetisindedir. İlk zamanlarda, elde edilen hibridomaların fareye intra-peritoneal yolla enjeksiyonu ile monoklonal antikor üretimi *in-vivo* ortamda gerçekleştirilmiştir. Ancak üretilen antikorların fare proteinleri ile kontamine oluşu, büyük ölçekli üretimdeki etik sorunlar, buna karşın hücre kültürü çalışmalarındaki olumlu gelişmeler, kültürde kullanılan malzemelerin kalitelerinin artarak fiyatlarının düşmesi gibi nedenlerle, kısa zaman sonra *in-vivo* üretimin yerini *in-vitro* üretim almaya başlamıştır.

Hibridoma geliştirmede kullanılan hücre hatları arasında miyeloma hücre hattı *in-vitro* kültürde oldukça ileri pasaj seviyelerine kadar üretilebilmektedir. Ayrıca diğer memeli hücrelerine nazaran daha hızlı büyüme özelliğine sahiptirler. Ancak stabil yapıda antikor üretme yeteneğine sahip değildirler. Bu nedenle, füzyon amacı ile kullanılacak olan miyeloma hücre hatlarının antikor üretme yeteneğini tamamen kaybetmiş olduklarından emin olunması gerekmektedir. Hücre bankalarında bu amaçla kullanıma sunulmuş çeşitli hücre hatları mevcuttur. Öte yandan B-lenfositler, kendisine karşı antikor geliştirilmek istenen ajan ile immünize edilmiş fare (sıklıkla, Balb-c) dalağının mekanik parçalama sonrası kültüre alınması ile elde edilmektedir. İmmünizasyon aşaması, uzun süreli immün yanıt ve buna bağlı IgG oluşturulabilmesi amacı ile belli bir düzende birkaç seferlik enjeksiyonlar ile gerçekleştirilmektedir. Füzyon aşamasında dalaktan izole edilerek kültüre alınan B-lenfositlerin yaşam ömürleri kültürde yaklaşık olarak bir hafta ile sınırlıdır.

Hibridoma hücrelerinin elde edilmesi için kullanılan Köhler ve Milstein'in metodu temel olarak; ikincil pürin nükleotit sentez yolağı baskılanmış miyeloma hücreleri ile kültürde sınırlı ömre sahip B-lenfositlerin birleştirilmesi ve birincil sentez yolağını baskılayacak kültür ortamında yalnızca hibrit hücrelerinin hayatta kalmasının sağlanması esasına dayanmaktadır. Buna göre birinci işlem basamağında; miyeloma hücreleri öncelikle 8-azaguanin (sıklıkla bu ajan tercih edilmektedir) içeren besiyerinde yaklaşık 1 hafta süre

ile muamele edilir. Bu sayede kurtarma (sekonder) pürin sentezi yolağında rol alan HGPRT enziminin sentezlendiği gen bölgesi mutasyona uğrayarak, HGPRT enziminin doğru sentezlenememesine yol açar. Böylelikle, ikinci işlem basamağında *de novo* (birincil) pürin sentezi yolağının da hasara uğratılması ile birleşemeyen hücrelerin ölmeleri sağlanacaktır.

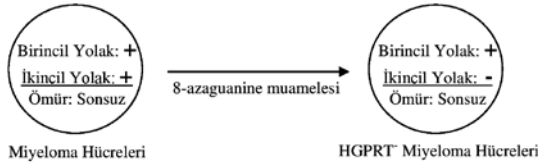
İkinci işlem basamağında, öncelikle sekonder yolağı bloke olmuş sınırsız ömürlü miyeloma hücreleri ile her iki yolağı da aktif olan sınırlı ömre sahip B hücreleri füzyon ile birleştirilir. Bu amaçla genelde kimyasal füzyon veya elektrofüzyon metotları kullanılmaktadır. Kimyasal metotta, iki hücre hattının da aynı tüpte toplanmasının ardından ortama PEG (polietilen glikol) ilave edilir ve böylelikle hücre membranlarında gözenekler oluşturulur. Bu yolla iki hücrenin de birbiri içerisine geçişi sağlanmaktadır. Elektrofüzyonda ise aynı kurgu elektrik akımı kullanılarak sağlanmaktadır. Kıyaslandığında, uygulayıcıdan daha bağımsız ve optimize edilmiş verilere dayalı olması nedeni ile elektrofüzyon metodunun daha başarılı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle somatik hücre füzyonu amacı ile daha ziyade elektrofüzyon tercih edilmektedir. Füzyon aşamasından sonra hücreler HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) seçimi aşaması için kültüre alınırlar. Bu aşamada mutajen ajan olarak sıklıkla aminopterin kullanılmasına karşın, aminopterin yerine metotrekzate ya da azaserin de tercih edilebilmektedir. HAT seleksiyonunda kullanılan mutajen, hücrelerin *de novo* pürin sentezi yolağını bloke ederek, onları ikincil yolağı kullanmaya yönlendirmektedir. Bu sayede, işlemin birinci basamağında ikincil yolağı bloke edilmiş olan miyeloma hücreleri ölürler. Seleksiyon amacı ile gerçekleştirilen kültürasyonun yaklaşık bir hafta kadar sürdürülmesi nedeni ile *in-vitro*'da zaten sınırlı yaşam ömrüne sahip olan B-lenfositler de doğal olarak ölürler. Geriye yalnızca ikincil yolağı kullanabilen birleşmiş hibridoma hücreleri kalır (Çizim-1)<sup>5</sup>.

HAT seleksiyonu süresince besiyerinde kullanılan hipoksantin, pürin türevi olarak; timidin ise, pirimidin türevi olarak DNA sentezinin desteklenmesi amacı ile kullanılan ajanlardır. Bu kapsamda sürdürülen yaklaşık bir haftalık kültürasyon sonrasında hücreler mitojeni barındırmayan ancak yine DNA sentezini teşvik edici HT besiyerine alınırırlar. Hayatta kalan hücreler olan hibridoma hücrelerinin gelişimi için ise HT besiyerinin bir süre daha destekleyici olarak kullanılmasına devam edilir.

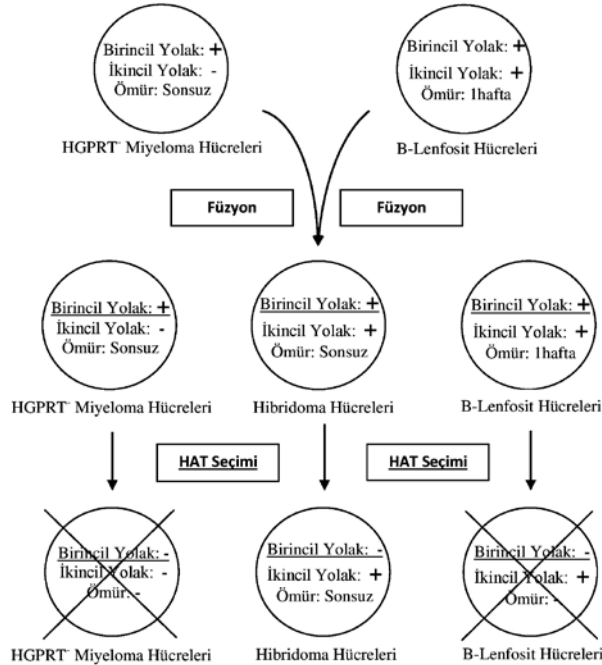
#### a. Fare Antikorları

Oldukça umut vadeden ve konvansiyonel yöntem olarak da anılan somatik hücre füzyonu tekniği ile geliştirilen hibridomalardan üretilen antikorların terapötik olarak kullanımları sırasında önemli problemler ile karşılaşılmiştir. Bu amaçla yapılan denemelerde hayvan deneylerini başarı ile tamamlayan fare kökenli antikorlar, insan denemelerinde HAMA (insan anti-fare antikor) adı verilen immün yanıtın gelişmesine neden olmuştur. Ancak sebep oldukları immün yanıtı rağmen ilk dönemlerde fare kökenli antikorların kullanımı ile geliştirilen antikorlardan birkaçı terapötik olarak kullanıma sunulmuştur. Bunlar arasında halen kullanımda olan

## 1. Basamak:



## 2. Basamak:

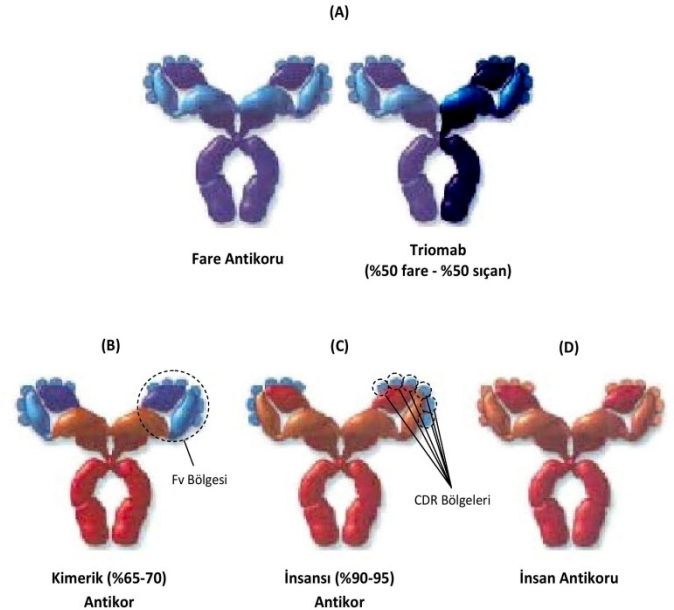


**Çizim-1.** Hibridoma oluşturma basamakları (Greenfield, E.A.<sup>5</sup>'ten uyarlanmıştır).

2 adet ürün bulunmaktadır (Çizelge-1)<sup>6</sup>. Bunlardan catumaxomab (Removab) quadroma oluşturularak üretilmiş olup, sahip olduğu üçlü fonksiyon nedeni ile Triomab (üçlü antikor) olarak adlandırılmaktadır. Söz konusu quadroma oluşturma işlemi fare + fare hibridoması ile sıçan + sıçan hibridomasının füzyonu esasına dayanmaktadır (Çizim-2A)<sup>7</sup>. Bu şekilde elde edilen nihai hücre hattı (quadroma) tamamı ile fare ve tamamı ile sıçan protein zincirlerine sahip antikorları sentezleyebildiği gibi, aynı zamanda yarısı fare + yarısı sıçan protein zincirlerine sahip antikorları (triomab'ları) da sentezleyebilmektedir<sup>8</sup>. Triomab'lar aslen konvansiyonel yöntem ile üretilen ve bu nedenle de bütüncül yapıda olan ilk ve tek bispesifik (iki farklı moleküle özgül olan) antikorlardır. Bu kapsamda, catumaxomab'ın sıçan kökenli Fab kolu sitotoksik T-hücrelerinin CD3 yüzey antijenine bağlanarak T-hücre aktivasyonunu sağlarken, fare kökenli diğer kolu EpCAM (epitel hücre adezyon molekülü) kolon kanseri yüzey antijenine bağlanmaktadır (Çizim-3)<sup>9</sup>. Her ne kadar söz konusu antikor Fab bölgelerinin ayrı epitoplara özgül olması nedeni ile bispesifik olarak ifade edilse de, mevcut bütüncül yapısından ötürü Fc kolu ile antikora bağlı hücrel sitotoksiste mekanizmasını da aktive etmektedir. Bu nedenle de nihai yapısından ötürü Triomab olarak adlandırılmaktadır.

## b. Kimerik Antikorlar

HAMA yanıtı probleminin “kısmi” çözümü, hibridoma teknolojisi ile hemen hemen paralel zamanda gelişim gösteren rekombinant DNA teknolojisinden gelmiştir. Buna göre, fareye üretilen bütüncül yapıdaki antikorun antijeni tanıma bölgesini de içeren Fv bölgesine ait gen zinciri ile insanda bulunan antikorların immün sistem tarafından tanınan ve her IgG'de aynı yapıda olan Fc bölgesini kodlayan gen zinciri birleştirilerek, gen aktarımı sonrasında sentezletirilmiştir (Çizim-3). Sonuçta %30-35 oranında fare kökenli, %65-70 oranında insan kökenli kimerik antikorlar elde edilmiştir (Çizim-2b). Ancak kısmi rekombinasyon ile sağlanan bu iyileştirme, sorunun çözümüne de yine aynı oranda kısmi katkı sağlamıştır. Bu şekilde kimerize edilen (kısmi olarak insanlaştırılan) antikorlar ilaç pazarına sunulmuş ve başarılı terapilere imkân vermiş olsalar da, uygulandığı hastaların bu antikorlara karşı HAMA'ya kıyasla daha seyrek de olsa HACA (insan anti-kimerik antikoru) yanıtı geliştirebildikleri saptanmıştır. Bu durum, kimerik antikor kullanımı ile gelişebilen immün yanıtın, elde edilen bütüncül yapıdaki antikorun ne kadarının insan dışı kökenden geldiği ile doğru orantılı olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ancak güncel bulgulara göre hipersensitivite ve immün yanıtın gelişmesine, tedavi edilmekte olan hastalığın niteliği ve immün baskılayıcı ilaçların birlikte alınmasının da etki edebildiği saptanmıştır<sup>10</sup>. Bu şekilde üretilerek piyasaya sunulmuş ve halen kullanımda olan 9 adet ürün mevcuttur (Çizelge-1)<sup>6</sup>



**Çizim-2.** Bütüncül yapıdaki monoklonal antikor çeşitleri (Candaş, D.<sup>7</sup>'den uyarlanmıştır).

Çizelge-1. Dünya genelinde piyasaya sunulan monoklonal antikörler (Ecker, D.M. ve diğ.<sup>61</sup>dan derlenmiştir).

Ticari İsim	Etki Alanı*	Türü*	Uluslararası İsim	Formu
Removab	Tümör (-tu-)	<b>Fare Antikoru (-omab)</b>	<i>catumaxomab</i> **	Bütüncül yapıda, üç fonksiyonlu
Zevalin			<i>ibritumomab tiuxetan</i>	Bütüncül yapıda, Y-90 ile konjuge
Adcetris	Tümör (-tu-)	<b>Kimerik Antikör (-ximab)</b>	<i>brentuximab vedotin</i>	Antikor-ilaç konjugatı, MMAE ile konjuge.
Erbitux			<i>cetuximab</i>	
Rituxan			<i>rituximab</i>	
Sylvant			<i>siltuximab</i>	
Remicade	İmmün Sistem (-li-)		<i>infliximab</i>	Remicade biyobenzeri
Inflectra			<i>infliximab</i>	Remicade biyobenzeri
Remsima			<i>infliximab</i>	Remicade biyobenzeri
Simulect	Dolaşım sistemi (-ci-)		<i>basiliximab</i>	Fab formunda (Şekil-2), bütüncül yapıdaki antikörün papain ile kesilmiş.
ReoPro			<i>abciximab</i>	
Gazyva	Tümör (-tu-)		<b>İnsansı Antikör (-zumab)</b>	<i>obinutuzumab</i>
Herceptin		<i>trastuzumab</i>		
Kadcyla		<i>ado-trastuzumab emtansine</i>		Antikor-ilaç konjugatı, DM1 ile konjuge
Lemtrada		<i>alemtuzumab</i>		
Perjeta		<i>pertuzumab</i>		
Actemra	İmmün Sistem (-li-)	<i>tocilizumab</i>		
Cimzia		<i>certolizumab pegol</i>		Fab formunda (Şekil-2), polietilenglikol ile konjuge
Entyvio		<i>vedolizumab</i>		
Keytruda		<i>pembrolizumab</i>		
Soliris		<i>eculizumab</i>		
Tysabri		<i>natalizumab</i>		
Xolair		<i>omalizumab</i>		
Avastin	Dolaşım sistemi (-ci-)	<i>bevacizumab</i>		
Lucentis	Anti-anjiyojenik (-anibi-)	<i>ranibizumab</i>	Fab formunda (Şekil-2), mikrobiyal fermentasyon ile üretilmiş	
Synagis	Anti-viral (-vi-)	<i>palivizumab</i>		
Arzerra	Tümör (-tu(m)-)	<b>İnsan Antikoru (-umab)</b>	<i>ofatumumab</i>	
Vectibix			<i>panitumumab</i>	
Benlysta	İmmün Sistem (-li(m)-)		<i>belimumab</i>	
Simponi			<i>golimumab</i>	
Humira			<i>adalimumab</i>	
Yervoy			<i>ipilimumab</i>	
Abthrax	Dolaşım sistemi (-c(ir)-)		<i>raxibacumab</i>	
Cyramza			<i>ramucirumab</i>	
Ilaris	İnterlökin (-ki(n)-)		<i>canakinumab</i>	
Stelara			<i>ustekinumab</i>	
Prolia	Kemik (-os-)	<i>denosumab</i>	Her iki ürün de aynı zincir yapısındaki antikörleri içermektedir	
Xgeva				

\*: Parantez içerisinde verilenler "uluslararası isimlendirme"de kullanılan ekleri belirtmektedir.

\*\*: catumaxomab fare/sıçan hibridi olarak üretilmiştir. Bu nedenle isimlendirmesi farklı yapılmıştır

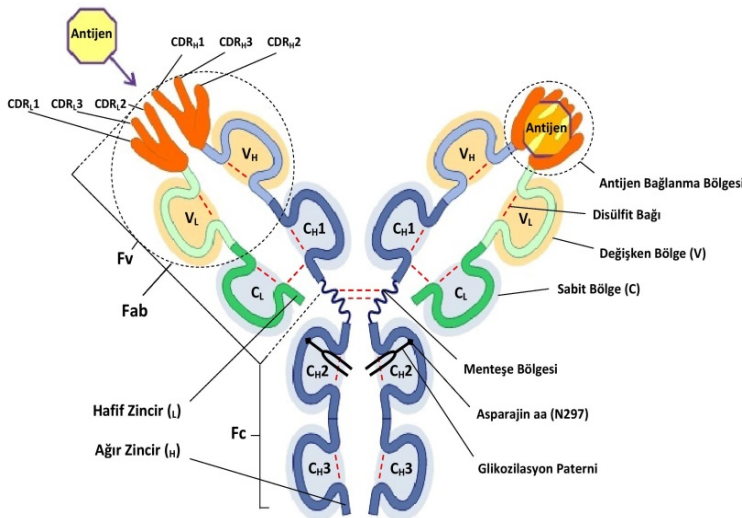


### c. İnsansı Antikorlar

Kimerizasyon oranının immünojenite ile doğru orantılı olduğunun fark edilmesi üzerine araştırmacılar hümanizasyon yüzdesini arttırabilecekleri çalışmalara yönelmişlerdir. Bu bağlamda, antikorların her iki Fab kolundaki ağır ve hafif zincirlerin uç kısımlarında bulunan CDR (tamamlayıcılık belirleme bölgesi) isimli üç parçalı yapıların fare kökenli antikorun gen zincirinden kopyalanılarak, insan kökenli antikorun gen zincirine eklenmesi ile yalnızca %5-10'luk kısmı fare kökenli olan insan antikorları geliştirilmiştir (Çizim-2C, Çizim-3). CDR bölgeleri, özellikle de ağır zincire ait olanları, epitopa bağlanmada başlıca rolü üstlenmektedir. Bu nedenle CDR bölgelerinin kopyalanması kimi antikorlarda yalnızca ağır zincir ile sınırlı tutulurken, kimi zaman hem ağır hem de hafif zincirlerin birlikte kopya edilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde insanlaştırma amacı ile yapılan işleme CDR graflama adı verilmektedir. Beklendiği üzere, bu şekilde elde edilen antikorlar nedeni ile gelişebilen immün yanıt oldukça düşük seviyede kalmakta ve bu nedenle söz konusu antikorlar tanı ve tedavi amacı ile yaygın biçimde kullanılmaktadır (Çizim-1). Ancak sahip olukları fare kökenli protein zincirleri nedeni ile bu antikorların da zaman içerisinde giderek artan seviyelerde immün yanıtı sebep olmaları beklenmektedir<sup>11</sup>. Bu nedenle daha ziyade bütünü ile insan kökenli monoklonal antikorların geliştirilmesine çalışılmaktadır.

### D. İnsan Antikorları

Günümüzde geliştirilmekte olan antikorlar tamamı ile insan protein zincirleri içerecek şekilde geliştirilmektedir (Çizim-2d). Bu amaçla kullanılan teknikler arasında popüler olan faj-gösterim ve transgenik fare ile üretim teknikleri endüstriyel amaçla kullanımda olan en popüler iki tekniktir.



Çizim-3. Antikor anatomisi

(<http://www.novimmune.com/science/antibodies.html>)<sup>9</sup> dan uyarlanmıştır.

### a. Faj Gösterim Tekniği

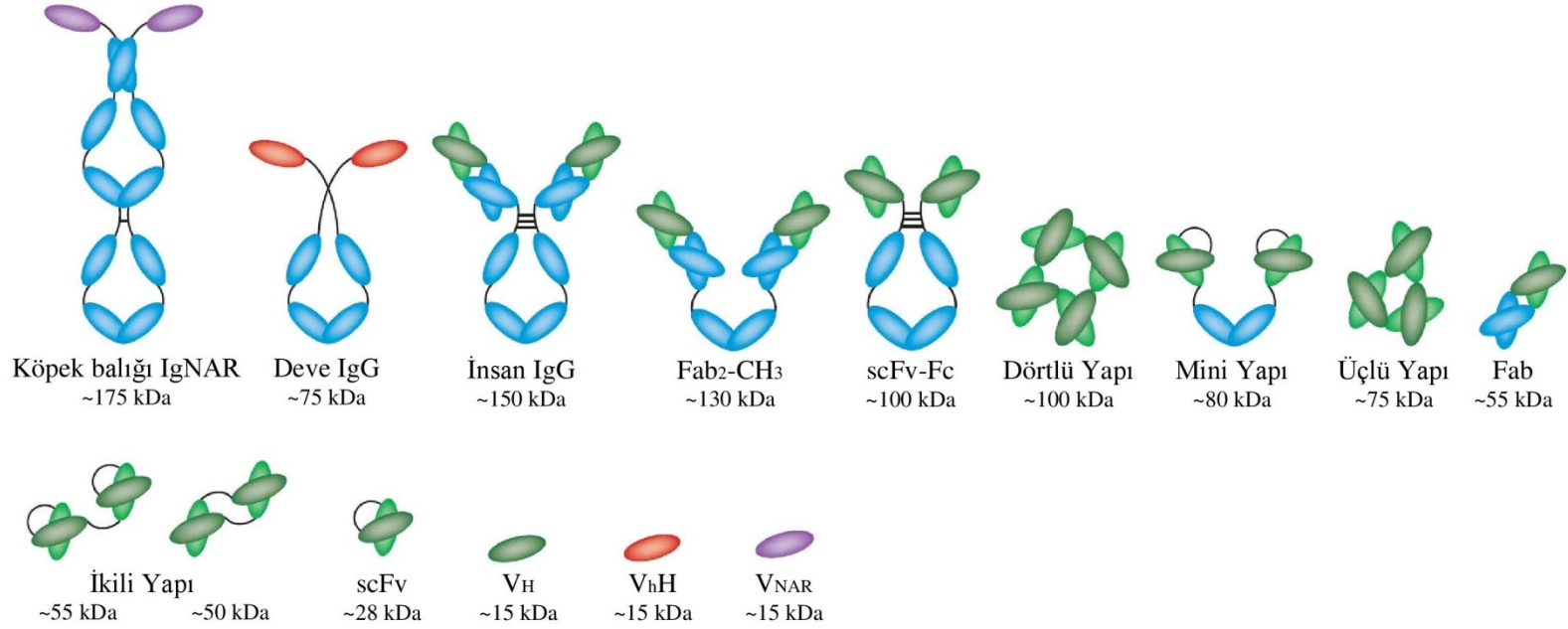
Bu teknik, mevcut monoklonal antikor geliştirme yöntemleri arasında en popüler olanı olarak öne çıkmaktadır. Farklı özelliklere sahip rekombinant antikorların geliştirilmesine (Çizim-4)<sup>12-14</sup> ve bunların insan kökenli protein zincirleri kullanılarak üretilmesine imkân sağlaması gibi pek çok avantajı mevcuttur. Temel olarak yönlendirilmiş evrim prensibine dayanmaktadır. Buna göre, somatik mutasyon sonucu antikor geliştirilmek istenen antijene özgül hale gelmiş ve en iyi bağlanabilen M13 bakteri fajının seçilimi yapılarak, bağlanmayı sağlayan protein zincirinin rekombinant DNA teknolojisi yöntemleri ile üretimi gerçekleştirilmektedir.

Teknik kapsamında, öncelikle insan B-hücresinde mevcut olan V<sub>H</sub> ve V<sub>L</sub> protein zincirlerini kodlayan gen çerçevesinin PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltımı yapılır. Kopya edilen gen bölgesi, rekombinant antikorun (scFv veya V<sub>H</sub> formunda) M13 bakteri fajının pIII yüzey antijeninin önüne denk gelecek şekilde sentezlenebilmesi amacı ile pIII yüzey proteini gen bölgesinin önüne entegre edilir (Çizim-5)<sup>15</sup>. Bu şekilde hazırlanan bakteri fajı ile *Escherichia coli* suşu enfekte edilerek fajların çoğaltılması sağlanır. Çoğaltılan fajlar, ilk seleksiyon aşaması için çip veya 96 kuyucuklu plak yüzeyine tutturulmuş haldeki antijenlerin üzerine eklenir (Çizim-6a)<sup>16</sup>. Bu aşamada antijene bağlanabilen fajlar bağlanırken, bağlanamayanlar yapılan yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Sonraki aşamada, faja spesifik ve ışığa yapabilen bir konjugata sahip sekonder antikor ile kuyucuk yüzeyine muamele edilir. Ardından gerçekleştirilen son yıkama işleminden sonra bağlanan antikorların varlığının spektrofotometrik olarak tespit edilebilmesi için sekonder antikora bağlı konjugatın ışığa yapması sağlanır ve hemen ardından ölçüm yapılır. Alınan sonuçlara göre pozitif olduğu belirlenen kuyulardaki fajlar tripsinizasyon işlemi ile toplanır ve *E.coli*'de çoğaltımı yapılır (Çizim-6a). Birinci seleksiyon sonucunda elde edilen pozitif kuyulardan toplanan fajlar için seleksiyon işlemi aynı şekilde iki sefer daha yapılır (toplamda 3 kez yapılması tavsiye edilmektedir). Bu şekilde gerçekleştirilen ikincil ve üçüncül seleksiyon basamakları, elde edilecek antikorun affinitesinin olgunlaştırılması için yapılmaktadır. Böylelikle nihai olarak elde edilecek olan antikorun yüksek bağlanma yetisinde olması sağlanmış olur. Bağlanma bölgesi faj gösterim tekniği ile elde edilen antikorun ilgili gen zincirine ulaşıldıktan sonra, söz konusu gen zincirinin uygun ekspresyon kasetine sahip plazmit vektörüne klonlaması yapılır. Elde edilen plazmit, tasarımı yapılan nihai antikor formuna göre (bütüncül, mini yapı, scFv vb.) bakteri (sıklıkla *E.coli*), maya (sıklıkla *Pichia pastoris*) veya memeli (sıklıkla CHO) hücrelerine aktarılır (Çizim-6a). Böylelikle yüksek özgüllük ve affiniteye sahip olacak şekilde geliştirilen antikorun tanı ve/veya tedavi amacı ile kullanılmak üzere üretimi gerçekleştirilmiş olur.

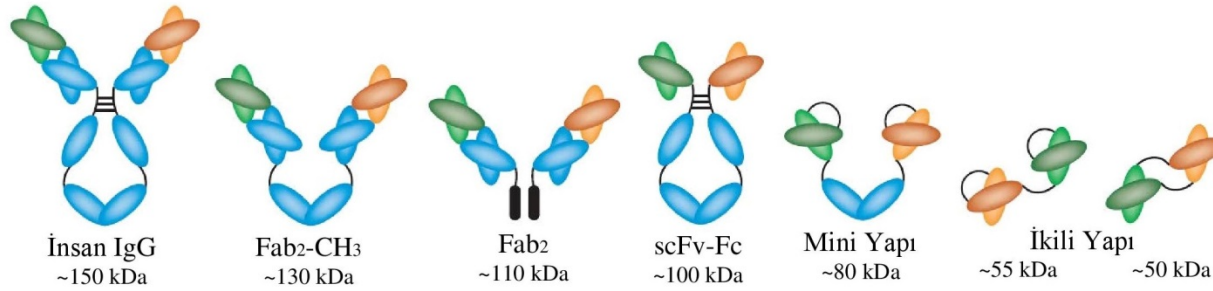
### b. Transgenik Fare Tekniği

Transgenik fare tekniği temel olarak fare embriyonik kök hücrelerine insan immüoglobülin (Ig) genlerinin aktarılması esasına dayanmaktadır. Bu yolla elde edilmiş ve insan antikor salgılayan özelliğine sahip farelerin immünizasyonu

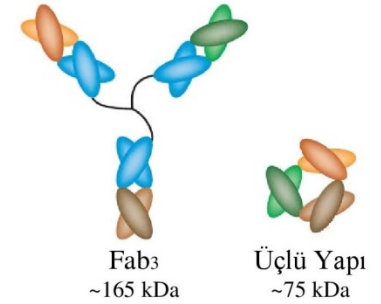
### Monospesifik Antikorlar



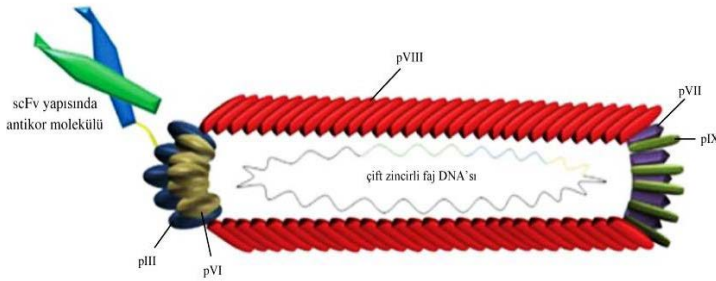
### Bispesifik Antikorlar



### Trispesifik Antikorlar

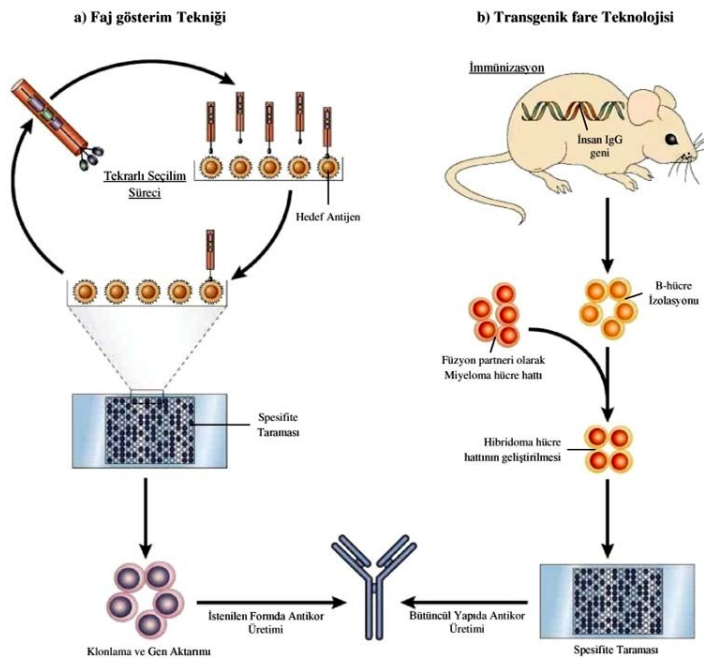


**Çizim-4.** Faj gösterim tekniği ve recombinant DNA teknolojisi yöntemleri ile üretilebilen antikor tipleri. scFv: Tek zincirden oluşan Fv bölgesi antikor; V<sub>H</sub>: İnsan Fv bölgesi ağır zinciri; V<sub>h</sub>H: Deve Fv bölgesi ağır zinciri; V<sub>NAR</sub>: Köpek balığı Fv bölgesi ağır zinciridir<sup>12-14</sup>.



**Çizim-5:** ScFv molekülü taşıyan M13 bakteri fajı (Kierny ve diğ.<sup>15</sup>, ten derlenmiştir).

sonrasında gerçekleştirilen işlemlerin tamamı klasik hibridoma geliştirme tekniği ile bire bir aynıdır. Bu yöntemle geliştirilen antikorlar tamamı ile bütüncül yapıda insan antikor niteliğindedir (Çizim-2, Çizim-6b). Söz konusu tekniğin klasik yöntemden ayrılan en büyük özelliği, günümüz rekombinant DNA teknolojisi metotları ve gen aktarım teknikleri ile kombine edilmiş olmasıdır. Buna göre, öncelikle *in-vitro* kültürü yapılan embriyonik kök hücre hatlarından birindeki fare Ig-ağır zinciri ile Ig-hafif zincirlerine ait ilgili genler inaktive edilir. Bu şekilde geliştirilen hattın elde edilen embriyolar *in-vivo*'da gelişim sürecine alınarak ID (fare immünooglobülini üretemeyen) fare ırkı elde edilir. Bu çalışmaya paralel olarak, başka bir embriyonik kök hücre hattının Ig gen bölgesine aynı zamanda insan Ig'leri de sentezleyebilmesi için insan Ig geni zincirleri eklenir. Bu şekilde geliştirilen hattın elde edilen embriyolar da *in-vivo*'da gelişim sürecine alınırlar ve böylelikle hem insan, hem de fare Ig'ni sentezleyebilen bir ırk da elde edilmiş olur. Sonuçta, elde edilen iki fare ırkının birbirleri arasında çiftleştirilmesi ile her iki ırkın da özelliklerini taşıyan bireylerin yanında, yalnızca insan Ig zincirlerini sentezleyebilen bir ırk da oluşturulmuş olur (Çizim-7)<sup>16,17</sup>.



**Çizim-6.** Popüler antikor üretim teknikleri (Brekke ve Sandlie<sup>16</sup>, dan derlenmiştir).

## Gelecekte Kullanılmaya Aday Teknikler

### a. İnsan-insan Hibridomaları

#### Ölümsüz ve Stabil İnsan B-lenfosit Hücre Hattı

İnsan B-lenfositlerinin ölümsüzleştirilebilmesi üzerine yapılan ilk çalışmalardan itibaren hasta bireylerden elde edilen B-lenfositlerin Epstein-Barr virüsü (EBV) ile ölümsüzleştirilmesi yöntemi üzerinde durulmaktadır<sup>11</sup>. Bu amaçla yüksek miktarda B-lenfosit ihtiyacı duyulur. Bunlar bademcik başta olmak üzere lenfatik dokulardan veya sıklıkla periferik kan mononükleer hücrelerinden temin edilmektedir. Ancak bu yolla elde edilen hücre hatlarının düşük seviyelerde antikor salgıladıkları ve EBV'nin daha ziyade antikor salgılamaya yetisi düşük olan hücre klonlarını enfekte ederek onların ölümsüz olmalarını sağlayabildiği tespit edilmiştir. Sonrasında yapılan çalışmalarda, EBV transformasyonu ve klonlaması esnasında kültüre CpG oligonükleotidi olan, toll-benzeri reseptör (TLR) 9 agonisti ilave edilmesi ile görece çok daha başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır<sup>18</sup>. Bu kapsamda, SARS enfeksiyonuna maruz kalarak, kurtulan bir hastadan 35 ayrı antikor izole edilebilmiştir<sup>11</sup>. Bu teknik sayesinde ayrıca aşağıda daha detaylı olarak bahsi geçen RT-PCR (ters transkriptaz ile polimeraz zincir reaksiyonu) ile ilgilenilen antikora ait Fv protein zincirine (Çizim-3) ulaşılması işlemi daha kolay uygulanabilir bir hal almıştır<sup>19</sup>. Bununla beraber, söz konusu ölümsüzleştirme, fiilen hücrelerin ancak füzyon sürecine kadar geçen zaman içerisindeki karakterizasyon vb. prosedürler süresince yaşayabilmelerini ve stabil olarak antikor salgılayabilmelerini mümkün kılacak bir süre ile sınırlıdır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, ölümsüzleştirilmiş B-lenfositlerin kullanımı ile salgıladığı antikorunu önceden karakterize edilmiş olan hibridomaların geliştirilebilmesi teknik açıdan mümkün olsa da, ölümsüz B-lenfositlerin kullanımı ile endüstriyel ölçekte monoklonal antikor üretimi henüz arzu edilen bir hayalden öteye geçmemektedir.

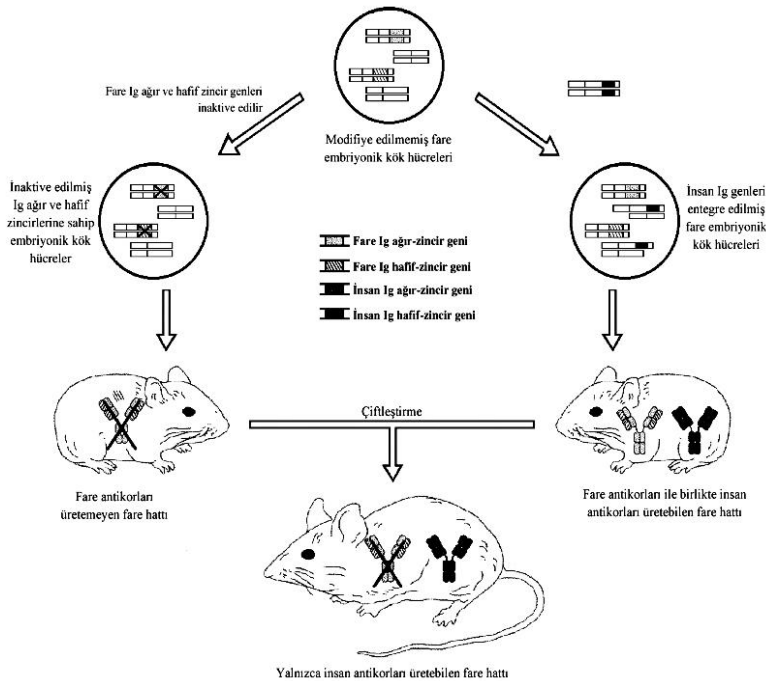
#### Ölümsüz İnsan Miyeloma Hücre Hattı

İlk zamanlarda ölümsüz nitelikte farklı fare miyeloma hücre hatları geliştirilmiş olsa da, ölümsüz yapıdaki insan miyeloma hücre hatlarının geliştirilmesi zaman almıştır. Bu kapsamda geliştirilen hücre hatları (U-226, SK-007, GM1500, RPMI 8226, LICR-LON-Hmy2, Karpas 707 vb.) arasında en güncel olanı Karpas ve diğ.<sup>20</sup> tarafından geliştirilen Karpas 707'dir. Söz konusu hat, EBV ile transforme edilmiş B-lenfositler ile uyumlu şekilde hibridize edilebilmesi için ouabain'e dirençli ve etkin bir HAT seleksiyonu için ise HAT-duyarlı olarak geliştirilmiştir. Söz konusu hücre hattının EBV ile transforme edilmiş hücrelerden, bademcik ve kan lenfosit hücrelerine kadar farklı hücreler ile birleştirilerek stabil biçimde antikor salgılamaya yetisine sahip hibritler oluşturabildikleri ve bunların uzun süreli ve yeterli seviyelerde antikor salgılayabildikleri rapor edilmiştir<sup>11</sup>. Ancak farklı kaynaklar tarafından yapılan bağımsız çalışmalarda başarılı sonuçların elde edilebildiği durumların oldukça nadir olduğu ifade edilmektedir<sup>19</sup>.



### b. Akış Sitometrisi ile Hücre Sınıflandırması ve Tek-tip Hücre ile RT-PCR

Söz konusu teknik ile “insan B-lenfositlerinin ölümsüzleştirilmesi tekniği”nde olduğu gibi etik nedenlerden ötürü ya aktif şekilde immünize olmuş hastaya ait B-hücreleri, ya da aşılama sonrası yanıt geliştiren bir hastaya ait B-hücreleri kullanılabilir. Bu bağlamda, öncelikle hastanın sahip olduğu immün repertuarına ulaşılmaya çalışılmakta, sonrasında ise akış sitometrisi (flow cytometry) ile ilgilenilen antijene özgü antikoru sentezleyen B-hücre klonlarına ulaşılmaktadır. Ardından, ilgili antijene karşı yüksek özgüllük ile bağlanabilen antikoru sentezleyen hücre ekstraktına antikorun Fv bölgesini (Çizim-3) içerecek şekilde sentezlenen primerler ile RT-PCR kurularak bağlanma bölgesine ait gen zincirine ve onun kodladığı protein zincirine ulaşılmaktadır<sup>21</sup>. Son basamakta ise CHO (çin hamster ovaryumu) hücreleri veya benzeri bir konak kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi yöntemleri ile ilgilenilen antijene yüksek özgüllük ile bağlanabilen bütüncül yapıdaki antikorun üretimi gerçekleştirilebilmektedir<sup>11</sup>.



Çizim-7. Transjenik fare üretim metodu (Jakobovits<sup>17</sup>, den uyarlanmıştır).

### c. Hibrit Hibridoma (Heterohibridoma)

Hibrit hibridoma (heterohibridoma) hücre hatları, immünize olmuş ya da aşılama sonrası yanıt geliştirmiş bir hastaya ait insan B-lenfosit hücreleri ile önceden geliştirilmiş bir heteromiyeloma hücre hattının füzyonu ile geliştirilmektedir. Bu kapsamda kullanılan heteromiyeloma hücreleri, belirli bir insan hücre hattı (sıklıkla miyeloma hücreleri) ile fare miyeloma hücrelerinin füzyonu sonucunda elde edilmektedir<sup>19</sup>. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda geliştirilen heteromiyeloma hücre hatlarında insan kökenli partner olarak insan miyeloma hücre hatlarının yanı sıra<sup>22-25</sup>, IgA miyeloma hastası bireyden izole edilen kemik iliği mononükleer

hücreleri<sup>26</sup>, nodüler lenfoma hastasından izole edilmiş malign lenfoid hücreleri<sup>27</sup> veya megakaryoblastik lösemi hücreleri<sup>28</sup> de kullanılabilir. Bu alanda yapılan önemli bir çalışmada; sıklıkla hibridoma oluşturmada tercih edilen Sp2 fare miyeloma hücre hattı hücrelerine fare interlökin-6 ve insan telomeraz katalitik alt-ünitesi'ni (TERT) eş zamanlı olarak ekspresyona edebilmesi özelliği kazandırılmıştır. Böylelikle, bu hücrelerin partnerliği ile geliştirilen hibridomalarda bir yandan IL-6 ekspresyonu sayesinde hücre proliferasyonu ve immünooglobülin üretimi stimüle olurken, diğer yandan TERT ekspresyonu sayesinde ölümsüzlükleri garantilenmekte ve uzun süre ile karyotipik stabiliteyi muhafaza edebilmeleri sağlanmaktadır. Bu hattın kullanımı ile geliştirilen Sp2/mIL-6/hTERT heteromiyeloma hattının, *Streptococcus pneumoniae* ile enfekte olmuş hasta dalağından izole edilen B-hücreler ile füzyonu sonucunda etkin şekilde antikor salgılaya yetisine sahip heterohibridoma hattının geliştirilebildiği rapor edilmiştir<sup>19,29</sup>.

### Sonuç

Monoklonal antikor üretim teknolojilerinin miladı olarak kabul edebileceğimiz Milstein ve Köhler'in keşfettikleri metot ile başlayan sürecin, geride bıraktığımız çeyrek asırlık zaman dilimi sonunda tam anlamı ile istenilen noktaya geldiği söylenebilir. Bu bağlamda, piyasada mevcut olan antikorların yerini faj gösterim ve transjenik fare teknolojileri sayesinde hızla bütünü ile insan tabanlı muadilleri alırken, kimyasal olarak sentezlenen klasik ilaçların yerini ise yine söz konusu teknikler ile yeni geliştirilen biyoteknolojik ilaçlar almaya başlamıştır. Günümüz teknolojisi ile gelişmekte olan metotlar bir yandan antikorların elde edilme süresini kısaltma yönünde evrilirken; diğer bir yandan protein mühendisliği ile yapay amino asitlerin kullanımı ve *in-situ* modelleme gibi yaklaşımlar ile bağlanma affinitesi ve spesifitenin artırılmasına yönelik olarak evrilmektedirler. Benzer bir durumun piyasadaki diğer protein tabanlı ilaçlar (insülin, epoetin, vb.) için de geçerli olmasının yanı sıra, monoklonal antikor teknolojisi ile edinilen deneyimler ışığında kandaki yarılanma sürelerinin artırılması için kullanılan kimyasal ajanların yerine (PEG vb.) antikor Fc zincirine bağlı halde üretilen proteinler de yavaş yavaş pazardaki yerlerini almaya başlamıştır. Böylelikle her geçen gün hızla gelişmekte olan monoklonal antikor teknolojisi sayesinde yakın gelecekte daha kısa zamanda, daha spesifik ve daha yüksek affiniteye sahip antikorların geliştirilebilecek olmasının yanı sıra, bu teknolojinin kazanımları üzerine inşa edilmekte olan diğer segmentteki ilaçların da protein tabanlı hale gelerek daha biyoyoumlu, daha uzun süre etkili ve hedeflerine spesifik olmalarını beklemekteyiz.

### Kaynaklar

1. Selimoglu SM ve Elibol M. Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulate hybridoma cells. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010; 30(2): 145-59.
2. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM ve James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *PNAS*. 2010; 107(46): 19985-90.
3. Roopenian DC ve Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7: 715-25.
4. Köhler GJ ve Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517): 495-97.



5. Greenfield EA. Generating Monoclonal Antibodies. İçinde *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2. Baskı, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014; s. 205-207.
6. Ecker DM, Jones SD ve Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*. 2015; 7(1): 9-14.
7. Candaş D. Düşmanlarımızın ürettiği dostlar: monoklonal antikorlar. *Bilim ve Teknik*. 2002; 410: 50-54.
8. Chames P ve Baty D. Bispecific antibodies for cancer therapy. The light at the end of the tunnel?. *MAbs*. 2009; 6(1): 539-47.
9. Diagram of an Antibody, Novimmune. 15 Kasım 2015'te <http://www.novimmune.com/science/antibodies.html> adresinden indirildi. (ulaşıma açık kaynaktır).
10. Nelson AL, Dhimolea E ve Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature Reviews*. 2010; 9: 767-74.
11. Ni J. New Technologies for the Generation of Human Monoclonal Antibody. *Trends in Biopharmaceutical Industry*. 2009; 5(3): 3-12.
12. Frenzel A, Hust M ve Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in Immunology*. 2013; 4(217): 1-20.
13. Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR ve Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies. *Journal of Immunological Methods*. 2001; 248: 47-66.
14. Holliger P ve Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnolog*. 2005; 23(9): 1126-36.
15. Kierny MR, Cunningham TD ve Kay BK. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano Reviews*. 2012; 3: 17240 - <http://dx.doi.org/10.3402/nano.v3i0.17240>
16. Brekke OH ve Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews*. 2003; 2: 52-62.
17. Jakobovits A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995; 6: 561-66.
18. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, Murphy BR, Rappuoli R ve Lanzavecchia A. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature Medicine*. 2004; 10: 871-75.
19. Smith SA ve Crowe JE. Use of human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiology Spectrum*. 2015; 3(1): 1-12.
20. Karpas A, Dremuccheva A ve Czepulkowski BH. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(4): 1799-1804.
21. Dohmen SE, Mulder A, Verhagen OJ, Eijssink C, Dijk MEFv ve Schoot CEvd. Production of recombinant Ig molecules from antigen-selected single B cells and restricted usage of Ig-gene segments by anti-D antibodies. *J Immunol Methods*. 2005; 298(1-2): 9-20.
22. Teng NN, Lam KS, Riera FC ve Kaplan HS. Construction and testing of mouse-human heteromyelomas for human monoclonal antibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983; 80(23): 7308-12.
23. Gorny MK, Xu JY, Karwowska S, Buchbinder A ve Zolla-Pazner S. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. *J Immunol*. 1993; 150(2): 635-43.
24. Gorny MK, Wang XH, Williams C, Volsky B, Revesz K, Witover B, Burda S, Urbanski M, Nyambi P, Krachmarov C, Pinter A, Zolla-Pazner S ve Nadas A. Preferential use of the VHS-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1. *Mol Immunol*. 2009; 46: 917-26.
25. Gorny, MK. Human hybridoma technology. *Antibody Technol J*. 2012; 2: 1-5.
26. Yu X, McGraw PA, House FS ve Crowe JEJ. An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2008; 336: 142-51.
27. da Silva Cardoso M, Siemoneit K, Sturm D, Krone C, Moradpour D ve Kubanek B. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies against hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Med Virol*. 1998; 55: 28-34.
28. Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H ve Saito H. Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1985; 66: 1384-92.
29. Dessain SK, Adekar SP, Stevens JB, Carpenter KA, Skorski ML, Barnoski BL, Goldsby RA ve Weinberg RA. High efficiency creation of human monoclonal antibody-producing hybridomas. *J Immunol Methods*. 2004; 291: 109-22.