

## 7 TANI VE TEDAVİ EDİCİ AJANLARIN ÜRETİMİ

Bugün bir çok tıbbi tanı ve tedavi edici ajan modern biyoteknolojik yöntemler uygulanarak üretilmektedir. Moleküler tanı için, monoklonal antikorlar (mab), hibridizasyon problemleri ve PCR esaslı tanı yöntemleri için primerler üretilmektedir. Tedavi edici ajanlar olarak farklı tipte ve özellikte aşılarda, tedavi amaçlı monoklonal antikorlar (mab) ve genetik olarak manipüle edilmiş terapötik ajanlar üzerine yoğun çalışmalar devam etmektedir. Burada bir örnek olarak tanı ve tedavi amaçlı monoklonal antikorların üretimi ve kullanılması özetlenecektir.

### 7.1 Moleküler Tanı ve Tedavi Edici Ajan Olarak Monoklonal Antikorlar

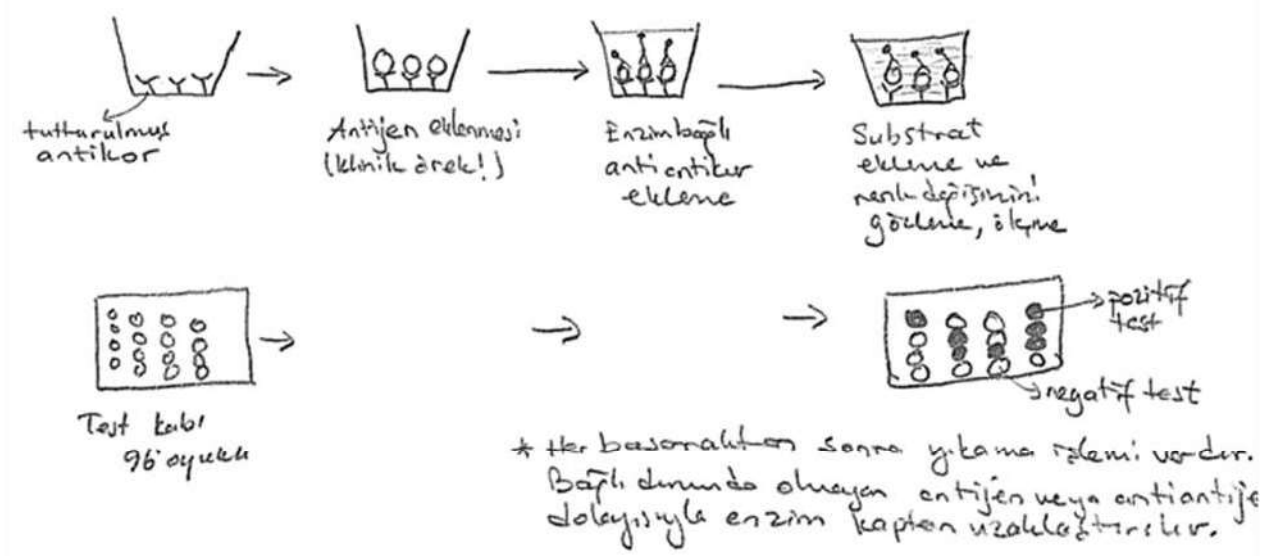
Modern tıp ve tarımdaki başarı, insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde, suda ve toprakta spesifik virüs, bakteri, mantar, parazitler, proteinler ve diğer küçük moleküllerin varlığının belirlenmesine bağlıdır. Sözgelimi, bulaşıcı hastalıkların engellenmesi, kontrolü ve tedavisi hastalığa neden olan patojenik organizmanın erken ve etkili bir tanısına bağlıdır. Bu tanı işlemleri klasik olarak bir seri fizyolojik özelliğin takibiyle gerçekleştirilmektedir. Ancak bazen bu klasik yöntemler ya yeterli olmamakta, yada patojenin tanımlanması için bu yöntemler uygulanabilir olmamaktadır. Böyle durumlarda DNA esaslı ve immünolojik esaslı moleküler tanı ve tarama yöntemleri başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

Kullanışlı bir tanı ve tarama yöntemi spesifik, duyarlı ve basit olmalıdır. Spesifiteği, testin sadece hedef organizma veya molekül için pozitif sonuç vermesidir. Duyarlılık, testin çok küçük miktarlardaki hedef organizma veya molekülü algılayarak pozitif sonuç vermesidir. Basitlik ise testin rutin olarak etkili, kolay ve ucuz bir şekilde uygulanabilirliğini ifade eder.

#### 7.1.1 Moleküler tanı ve taramada monoklonal antikorlar

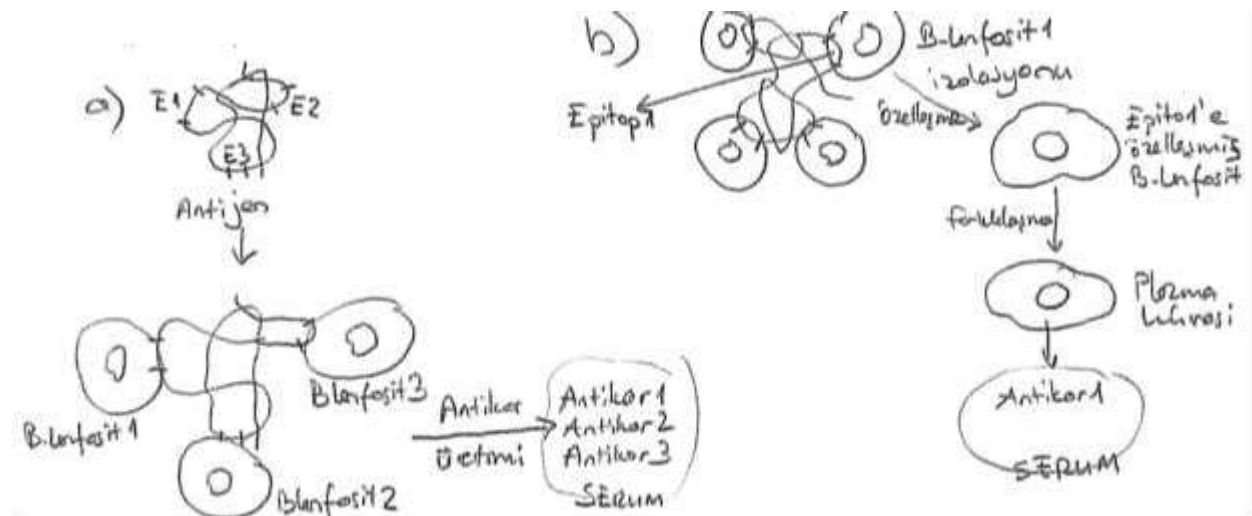
Patojenik bir organizmanın en ideal tanısı sadece o suşa ait bir özelliğin taranması esasına dayanır. Bu patojen için spesifik olan molekül diğer yöntemlerle de taranabilse bile en etkili yöntem ELISA yöntemidir. Yani bir antikor-antijen bağlanması ve bu bağlanmanın gözlemlenebilir hale getirilmesi yöntemidir. Bir antijen tipik olarak bir patojene aitse, bu antijene özgü antikorlar kullanılarak, bir klinik, tarımsal veya çevresel örnekte bu antijenin, dolayısıyla bu patojenin varlığı taranabilir. Spesifik antijen-antikor bağlanmasının belirlendiği test genellikle ELISA'dır (Şekil 7.1). ELISA'da bazen antikor yerine antijen kullanılarak

antikorlar da taranabilmektedir. Burada sadece antikorların kullanılmasıyla antijenlerin taranması incelenecektir.



Şekil 7.1: ELISA testinin temeli.

ELISA testlerinde teoride poliklonal veya monoklonal antikorlar kullanılabilir. Klasik yöntemlerle bir poliklonal antikor eldesi için, bir patojene ait antijenik yapı veya bir molekül saflaştırılarak, steril ortamlarda yetiştirilmiş tavşanlara enjekte edilir. Antijen molekülünün farklı epitopları tavşanın farklı B lenfositleri tarafından tanınır. Bu B lenfositlerin her biri farklı bir antikor üretir. Bu hayvanın serumu (antiserum) ilgili antijene karşı her biri belli bir B-lenfosit tarafından belli bir epitopa karşı üretilen çok sayıda antikor taşır yani **poliklonaldır** (Şekil 7.2a).



Şekil 7.2: a) Bir antijene karşı poliklonal antikor üretimi, b) bir epitopa karşı monoklonal antikor üretimi.

Bir antijen vücuda girdiğinde farklı B lenfositlerin, bu antijene ait farklı epitoplara karşı antikor üretmek üzere özelleştğini biliyoruz. O halde epitoplardan sadece birine karşı antikor üreten B lenfositler izole edilerek hücre kültürlerinde çoğaltılabilir ve bu kültürlerden tek tip antikor üretilebilir (Şekil 7.2b). Bu yolla elde edilen bir antikor preparasyonu **monoklonal** olarak adlandırılır yani antikorlar tek bir epitopu tanımak üzere özelleşmiş tek bir lenfositten köken alan B-hücreleri tarafından üretilen tek tip antikordur. Monoklonal antikorlar moleküler tanı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu uygulamalara Tablo 7.1’de bazı örnekler verilmektedir.

Tablo 7.1: Monoklonal antikorlar kullanılarak taranan bazı moleküller

<p><b>Polipeptit hormonlar</b>                      Koryonik gonadotropin                      Gelişme hormonu (GH)                      Luteinize edici hormon (LH)                      Folikül uyarıcı hormon (FSH)                      Tiroid uyarıcı hormon (TSH)                      Prolaktin</p>	<p><b>Farklı tip hedefler</b>                      Tiroksin                      Vitamin B12                      Ferritin                      Fibrin yıkıcı ürünler                      Tau proteini</p>
<p><b>Tümör işaretleyicileri (markerleri)</b>                      Karsinoembriyonik antijen                      Prostat-spesifik antijen (PSA)                      İnterlökin-2 reseptörü                      Epidermal gelişme faktör reseptörü</p>	<p><b>Enfeksiyon hastalıkları</b>                      Klamidya                      Herpes                      Rubella                      Hepatit B                      Legionella                      HIV</p>
<p><b>Sitokinler</b>                      İnterlökin 1-8                      Koloni uyarıcı faktör</p>	<p><b>Antibiyotik görüntüleme</b>                      Teofilin                      Gentamisin                      Siklosporin</p>

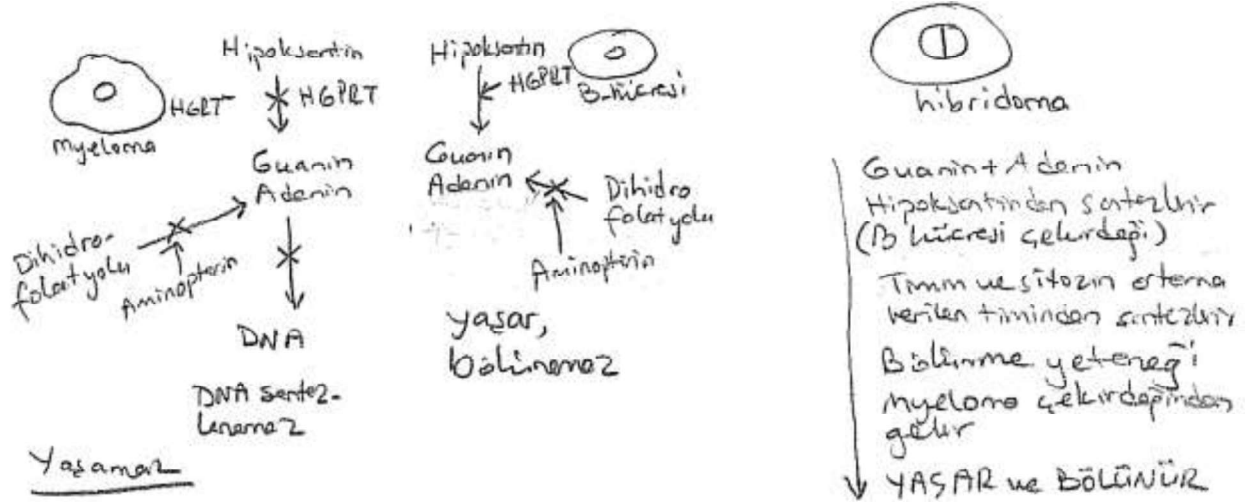
### 7.1.1.1 Monoklonal antikor üretimi

Spesifik antijene karşı antikor üretmek üzere özelleşmiş belli bir B hücresinden oluşacak bütün hücreler aynı tip antikor üretecektir. Yüksek immünojeniteye (bağışık sistemi uyarma şiddeti) sahip bir epitopa karşı etkili antikor üreten bir “B lenfosit hücre hattı” izole edilebilirse ve kültüre alınabilirse, bu hücrelerin ürettiği monoklonal antikorlar (mab) tanı ve tedavi amaçlı kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Ancak burada temel bir zorluk vardır: B hücreleri kültürde ürememektedir ve bölünme sayıları sınırlıdır. Özelleşmiş bu B hücrelerini kültürde üretebilmek için kültürde üreyen diğer bir hücreyle birleştirilmesi (füzyonu) denemiştir. Bu birleşme kanserleşmiş B lenfositlerle (myeloma) gerçekleştirilmiştir. Elde

edilen melez hücreler özelleşmiş B hücresinden gelen karakter nedeniyle tek tip (monoklonal) antikor üretir, myeloma hücresinden gelen karakter nedeniyle sürekli bölünebilir.

Monoklonal antikor elde edilmek istenen antijen saflaştırılarak fareye enjekte edilir. Farede ilgili antijene karşı antikor üretiminin gerçekleştiği belirlenir (ELISA ile!). Bu durumda fare serumundaki antikor poliklonaldır (antikor bir fare antikorudur!). Bu farenin dalak dokusu alınır ve hücrelerine ayrıştırılır. Bu durumda antikor üreten (veya üretmeyen!) B hücreleri serbest durumdadır.

Bu B hücreleriyle birleştirilecek olan myeloma hücreleri hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HGPRT) enzimi bakımından mutanttır. Bu enzim fonksiyonel olmadığında, hücre hipoksantin kullanamaz ve G ve A bazlarını sentezleyemez. Bu durumda ikinci bir metabolik yolla G ve A bazları üretilir: dihidrofolat reduktaz yolu. Bu yol, eğer besin ortamında aminopterin varsa baskılanır (Şekil 7.3)



Şekil 7.3: HAT besin ortamından hibridoma hücrelerinin enzimatik seçim mekanizması.

Fare dalağından elde edilen B hücreleri HGPRT<sup>-</sup> myeloma hücre süspansiyonuna karıştırılır. Ortama % 35 oranında etilenglikol eklenir. Etilenglikol iki hücrenin integre olmasını uyarır. Bu karışım hipoksantin, aminopterin ve timidin içeren besin ortamına (HAT besin ortamı) transfer edilir. Hücreler farklı kombinasyonlarda birleşir veya birleşmeden kalabilir:

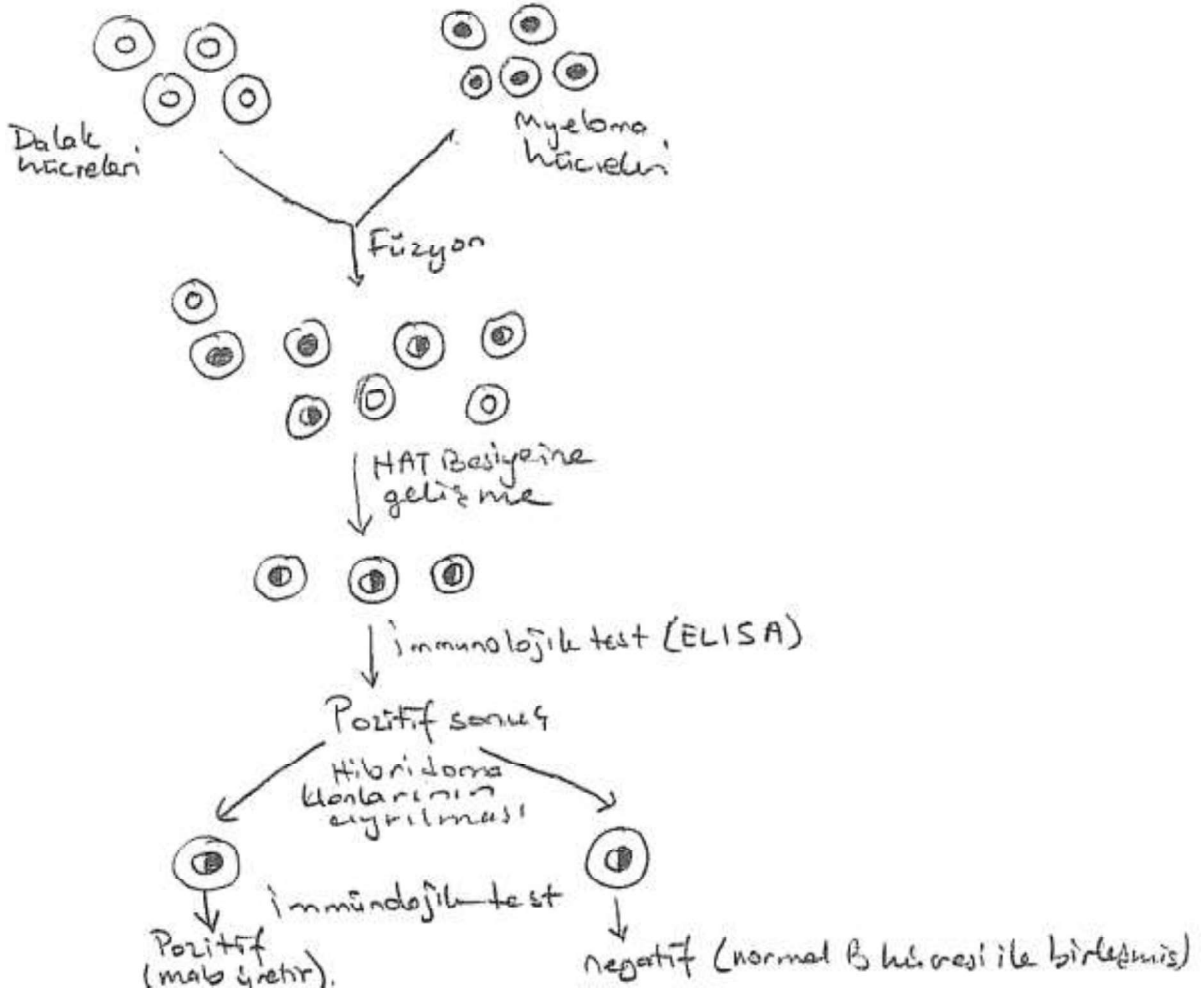
- B hücresi
- B hücresi:B hücresi
- B hücresi: Myeloma hücresi
- Myeloma hücresi:Myeloma hücresi
- Myeloma hücresi

İntegre olmamış B hücreleri ve B hücresi:B hücresi hibritleri besin ortamında bölünemedikleri için varlıklarını sürdüremezler. Myeloma:Myeloma hibritleri ve integre olmamış myeloma hücreleri HGRT- özelliklerinden dolayı hipoksantinden G ve A sentezleyemezler, dihidrofolat yolu besin ortamına eklenen aminopterin tarafından baskılanır, dolayısıyla RNA ve DNA sentezleyemezler ve çoğalamazlar. B hücresi:Myeloma hücresi hibritlerinde B hücreleri tarafından sağlanan HGPRT ile G ve A bazları sentezlenir, myeloma hücresi tarafından sağlanan bölünme yeteneği ile hibrit hücreler bölünme ve üremeye devam ederler. Bu hibritlerde ortama aminopterin eklenmesi nedeniyle primidinler sentezlenemez. Bu olumsuzluk ortama timidin eklenerek ortadan kaldırılmaktadır. Dolayısıyla B hücresi:Myeloma hibritleri ortamda hayatta kalan ve üreyebilen tek hücre tipidir ve bunlar **hibridoma** olarak isimlendirilirler. HAT besin ortamına eklendikten 10-14 gün sonra bu hibrit hücreler ürerler (Şekil 7.4).

Bu aşamadan sonra çok sayıda hibrit hücre arasından istenilen antikoru üreten hibritin seçilmesi gerekir. Hibritleşen bazı B hücreleri antikor üretmeyenlerdir. Antikor üretenler ELISA testi ile belirlenir. Bunun için hibrit süspansiyonu yeterince seyreltildikten sonra mikrotitre deney kapları içine paylaşılır ve üretilir (Şekil 7.4). Diğer bir mikrotitre kabına kendisine karşı mab üretmek istediğimiz antijen tutturulur ve her bir deney oyuğuna sırası bozulmadan bir miktar hücre süspansiyonu eklenir. Eğer bu oyuklardan bazılarında üreyen hücreler istenilen antikoru ürettiyse bu antikor ELISA kabındaki antijenle birleşecektir. Sonra oyuklar yıkanarak bağlanmamış materyal uzaklaştırılır. Oyuklara enzim bağlı anti-antikor eklenir, enzimi substratı eklenerek oyuklardaki renk değişimi gözlemlenir. Renk değiştiren oyuklardaki hibritler istenilen antikorları üretmiştir (muhtemelen poliklonal). Hibritlerin üretildiği orijinal mikrotitre kabındaki doğru oyuk/oyuklardaki hibrit hücreler alınarak çoğaltılır. Ancak ELISA pozitif oyuklarda birden fazla tip hibrit mevcut olabilir, dolayısıyla antikor poliklonal olabilir. Bu nedenle seçilen hibrit hücre gruplarından “tek hücre hatları” oluşturulur. Bunun için hibrit süspansiyonu belli bir hacime tek bir hibrit hücre düşecek şekilde seyreltilerek üretilir ve tekrar ELISA ile test edilir. Bu hücreler tek bir hücreden köken almışlardır, birbirlerinin klonlarıdır ve tek bir epitopa karşı antikor üretirler, yani mab üretirler. Bu tek hücre hibridoma hatlarından her biri sadece bir epitopa karşı tek bir antikor (mab) üretir.

Bu tek hücre hibridoma hatları kullanılarak monoklonal antikorlar üretilir. Bu hibritler oldukça uzun ömürlü olabilmekte ve nispeten büyük miktarlarda mab üretilebilmektedir. Monoklonal antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen bazı moleküler tanı uygulamaları Tablo

7.1'de verilmektedir. Bu yolla oldukça etkili, kolay, basit ve ucuz tanı yapmak mümkün olmaktadır. Sağlık endüstrisinde monoklonal antikorlar çok büyük bir paya sahiptir.

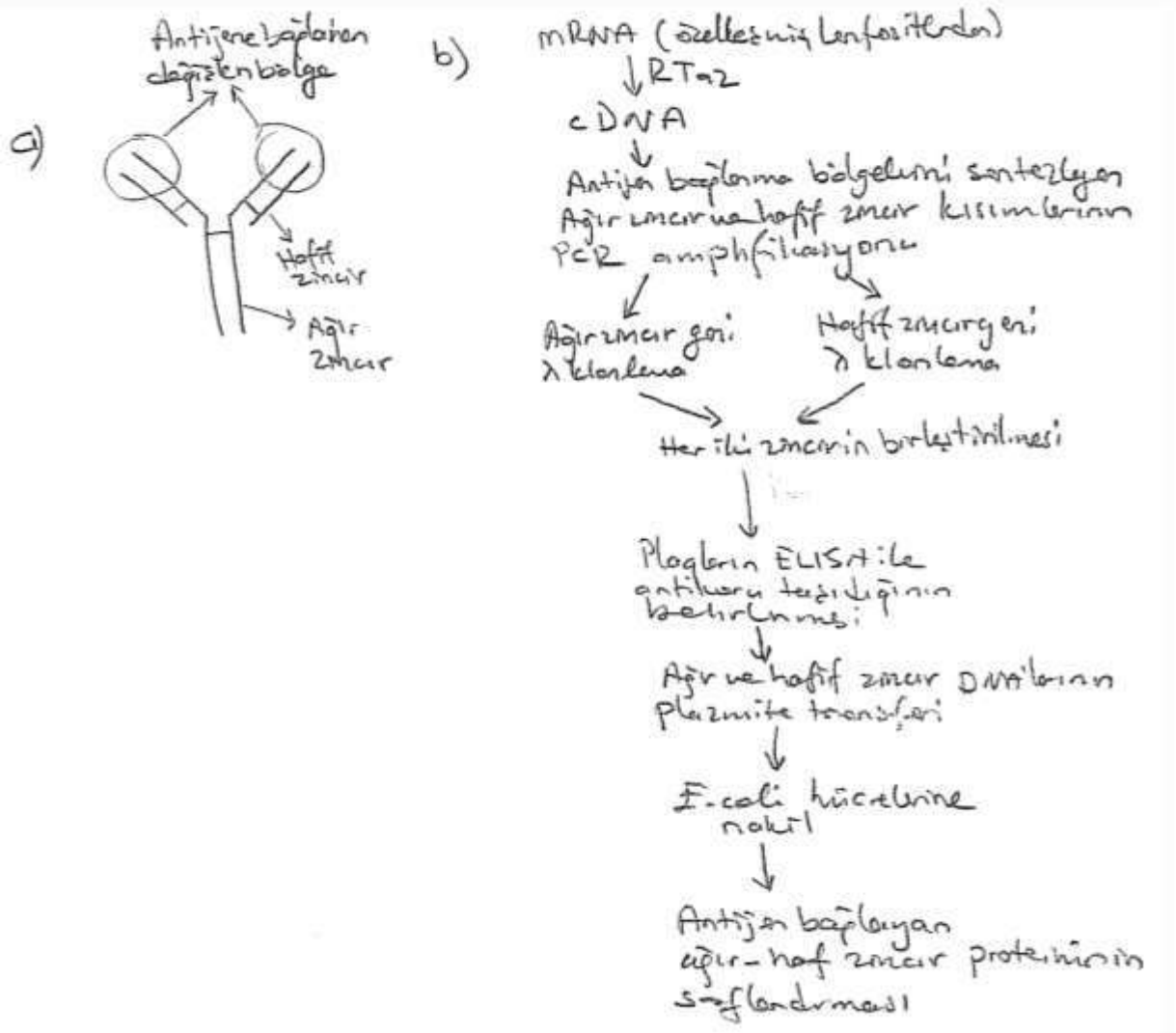


Şekil 7.4: B hücresi:myeloma hibridomalarının oluşturulması ve görüntülenerek izolasyonu.

Hibridoma hücreleri nispeten yavaş ürerler, yüksek bir hücre yoğunluğuna ulaşamazlar ve çoğalmak için kompleks ve pahalı bir besin ortamına ihtiyaç duyarlar. Bu da endüstriyel ölçekte mab üretiminde olumsuz bir durumdur. Hibridoma teknolojisi yerine daha hızlı ve sınırlamasız bir şekilde ve daha ucuz yollardan mab üretimi araştırmaları sürdürülmektedir. Bunlardan biri monoklonal antikorların *Escherichia coli* içinde üretimi çalışmalarıdır.

Antikorlar iki ağır iki hafif zincirden oluşur, ancak bu zincirlerin sadece uç kısımları antijenin epitopuna bağlanmada görev alır (Şekil 7.5a). Dolayısıyla antikorun tamamı değil de epitop için spesifik olan kısmının üretimi tanı kitleri için yeterli olacaktır. Öncelikle farklı lenfositlerden, antikor sentezlemek üzere oluşturulan mRNA'lar kullanılarak cDNA'lar elde edilir. Bu cDNA'lardan PCR amplifikasyonu ile hafif zincirin, epitopu tanıyan bölgesini kodlayan kısmı çoğaltılır (Şekil 7.5b). Daha sonra retraksiyon endonükleazlarla antijenin

antikoru tanıyan bölgeleri  $\lambda$  klonlama vektörlerine ayrı ayrı klonlanır. Sonra klonlanan bu zincirler aynı vektörde birleştirilir. Elde edilen bu vektör *E. coli* hücrelerine transfer edilir ve oluşan plaqlarda antijene bağlanma yeteneği tespit edilir (ELISA). Tespit edilen bu plaqlardan elde edilen  $\lambda$  vektöründen bu gen bölgeleri alınarak plazmit vektörlerine transfer edilir (ekspresyon vektörlerine). Bu ekspresyon vektörleri *E. coli* hücrelerine transfer edildiğinde bu hücreler kullanılarak büyük ölçekte mab üretilebilir.



Şekil 7.5: a) Tipik bir antikor yapısı ve, b) antikorların uç bölgelerinin *E. coli* hücrelerinde üretimi.

İmmünolojik tarama sistemleri duyarlı, spesifik ve ucuzdur. Çok geniş uygulama alanları vardır: antibiyotik testleri, farklı tip kanserlerin taranması, spesifik metabolitlerin taranması, patojen tanımlama ve takibi. Bu yöntemin uygulanabilmesi için temel gereklilik aranan antijenin veya molekülün vücutta ekspresyonunun yapıyor olması ve bunların diğer moleküller tarafından maskelenmiyor olmasıdır. Ancak bazı durumlarda patojene ait

antijenlerin ekspresyonu yapılmayabilir veya çok düşük miktarlarda yapılabilir, yada antijen diğer moleküller tarafından maskelenebilir. Böyle durumlarda immünolojik yöntemler tarama için yetersiz kalır.

İmmünolojik yöntemlerin herhangi bir şekilde yetersiz veya etkisiz kaldığı durumlarda nükleik asit tarama yöntemleri moleküler tanı için kullanılmaktadır. Temel olarak PCR esasına ve nükleik asit problemlerinin kullanımını esasına dayalı yöntemler de, sağlık endüstrisinde hızla yaygınlaşan etkili tarama yöntemleri sağlamaktadır.

### **7.1.2 Moleküler tedavide monoklonal antikolar**

Antikoların tedavi edici ajanlar olarak kullanımında ümit verici araştırmalar vardır. Monoklonal antikolar kullanılarak tedavinin spesifik bir hedefe yönlendirilmesi mümkündür. Bu uygulama ile tedaviden bütün vücut dokularının değil hedef doku ve hücrelerin etkilenmesi sağlanacaktır. Spesifik antikoların muhtemelen toksinlere, bakterilere, virüslere ve belki de kanser hücrelerine bile saldırarak şekilde yönlendirilebilmesi mümkün olabilir. Bir antikor hedef arayan sihirli bir mermi gibi düşünülebilir. Ya saldırgan ajanı doğrudan yok ederler yada bir savaş başlığı veya zehirli bir ok ile donatıldıysa (bir kimyasal-ilaç-bağlandıysa), özel olarak bağlandığı antijeni taşıyan hücreyi yok edecek, diğer hücrelere zarar vermeyecektir. Son gelişmelerle monoklonal antikor üretimi ve antikor yapısının ve fonksiyonunun daha iyi şekilde anlaşılmasıyla farklı tip hastalıklarda antikor kullanımıyla tedavi potansiyelleri daha fazla araştırılmaya başlandı.

Yüz yıl önce difteri toksinine karşı at serumu kullanıldı. Fakat bu uygulamada ikinci ve sonraki kullanımlar riskli olmakta, anafilaktik şok ve ölüme neden olabilmektedir. Bugün hibridoma tekniği ile üretilen monoklonal antikolar potansiyel terapötik ajanlar olarak algılanmaktadır. Ancak fare mab'ları insanda çapraz reaksiyonlar ve alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. İnsanların mab üretiminde kullanılması etik nedenlerden dolayı mümkün olmamasından dolayı fare-insan hibrit mab'ları üretilmeye çalışılmaktadır. Ancak fare genlerinin ürünlerinin insanlar için daima bir problem olmasından dolayı insan genlerinin fareye nakli ile tamamen insan mab'ları üreten transgenik fare oluşturma çalışmaları sürdürülmektedir. Aşağıda antikoların, tedavi edici ajanlar olarak kullanılabileceğini gösteren bazı örnek antikor ve mab uygulamaları verilmektedir.

#### **7.1.2.1 Nakledilen organın reddinin engellenmesi**

1970'lerde pasif aşılama organ reddini engellemek üzere kullanılmıştır. İlk uygulama OKT3 mab'ın organ transplantasyonlarından sonra hastanın bağışıklık sistemini baskılayıcı olarak



kullanımıdır. T-hücreleri bağışıklık sisteminin bir koludur ve organ reddinin oluşmasına neden olur. OKT3 T-hücresi yüzey reseptörü olan CD3'e bağlanır. Bu bağlanma T-hücrelerinin tam fonksiyonunu yapmasını ve dolayısıyla organın reddini engellemektedir. Bu şekilde bağışıklığın baskılanması, ateş, deride kızarıklık gibi yan etkiler oluşturmaya, rağmen oldukça etkilidir.

### 7.1.2.2 Bakteriyel kan enfeksiyonlarının engellenmesi

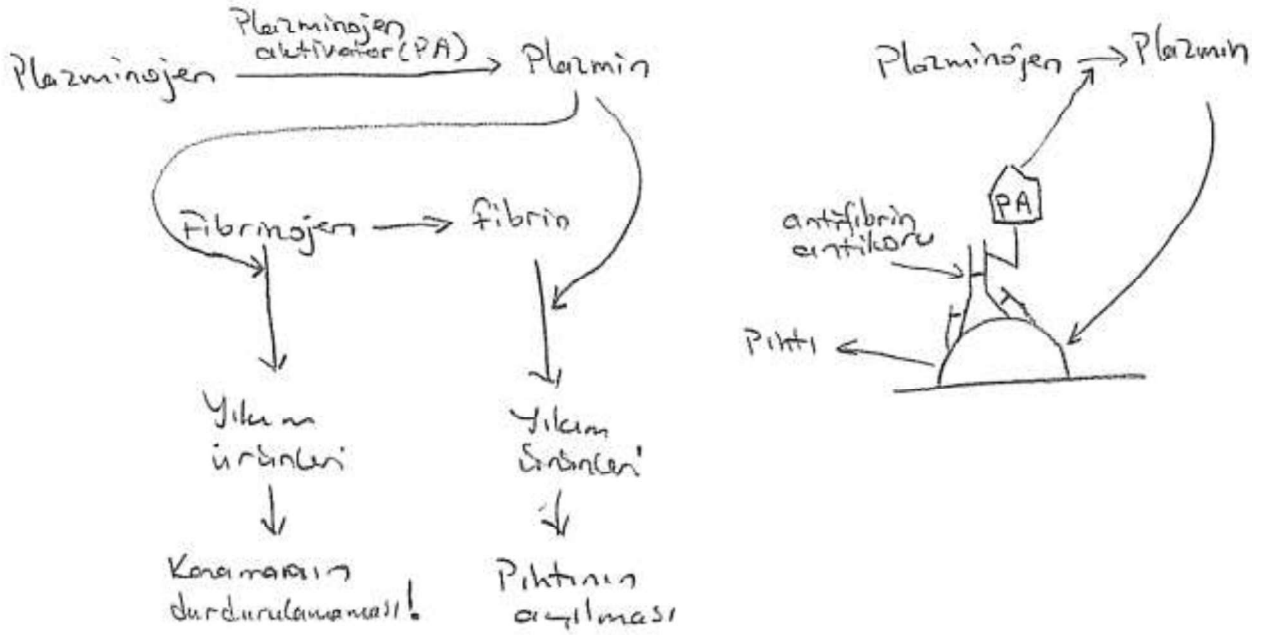
Bakteremia (bakterilerin dolaşım sistemine karışması) Gram negatif bakteriler tarafından oluşturulur. Antibiyotik direnci nedeniyle, ABD'de yılda 24–72 bin kişi bakteremia nedeniyle ölmektedir. Bu vakalarda antibiyotik tedavisi dışında diğer tedavilerin uygulanmasına ihtiyaç vardır.

Bakteremiada LPS (endotoksin!) toksisiteyi sağlar. Çözünmüş durumdaki endotoksin bir bağışık tepki zincirini başlatır: ateş, hücre ölümü, kalp atışında artış, hipertansiyon, olası ölümcül organ tahribatı. Dolayısıyla bakteremiaya karşı bir alternatif tedavi yöntemi, endotoksine karşı bir mab kullanımı olabilir. Spesifik mab, endotoksine bağlanarak nötralize etmektedir. Bazı klinik vakalarda insan ve fare mab'ları kullanılmış ve Gram negatif bakteremia kontrol edilebilmiştir. İnsan mab'ları kullanıldığında herhangi bir yan etki görülmez, fare mab'ları ise küçük oranda yan etki göstermiştir.

### 7.1.2.3 Kimyasallar bağlanmış monoklonal antikorlar

Amerika ve Avrupa'daki doğal ölümlerin ana nedeni serebral ve koroner damarların kan pıhtılarıyla tıkanmasıdır. Doğal olarak pıhtı, fibrin moleküllerinden oluşturulur. Bu pıhtıların açılmasında plazmin görev yapar. Plazmin de bir plazminojen aktivatör (PA) tarafından plazminojenin plazmine dönüştürülmesiyle sağlanır. Plazmin pıhtıya saldırarak parçalanmasına neden olur, damarın açılmasını sağlar. Ancak plazmin kan dolaşımında sadece fibrini parçalamaz aynı zamanda fibrinojeni de parçalar. PA uygulanan hastalarda böylece fibrinojen de parçalandığından, normal pıhtılaşma mekanizması da zarar görür. Bu hasta için riskli bir durumdur.

Deneyel çalışmalarda sadece fibrine etkili bir plazmin uygulaması geliştirilmiştir. Bir “monoklonal antifibrin” antikoruna, PA'ye kimyasal olarak bağlanmış, fibrinojen ve fibrinin birlikte bulunduğu bir deney ortamına eklenmiştir (Şekil 7.6). PA bağlı monoklonal antifibrin molekülleri, deney düzeneğinde sadece fibrini yıkmış fibrinojen seviyesinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Monoklonal antikor kullanılarak PA sadece pıhtı bölgesine yönlendirilmiş, diğer bölgelerdeki plazminojenin yıkımı engellenmiştir.



Şekil 7.6: Pıhtıların açılmasında fibrin moleküllerinin parçalanması mekanizması ve mab'larla hedefe yönlendirme denemeleri.

Gelecekte, bu ve benzeri yöntemlerle ilaçların bütün vücudu etkilemesinin, sadece ilacın belli bir hedefe yönlendirilerek engellenebileceği ümit edilmektedir. Bu alanla ve biyoteknolojik uygulamalarıyla ilgili araştırmalar sürmektedir.