

## MONOKLONAL ANTİKORLARIN ÜRETİMİ VE KULLANIMI

Dr.A. Zeki ŞENGİL \*, Dr. Bülent BAYSAL \*\*

### ÖZET

Normal antikor yapan B lenfoblastlar ve uygun myeloma hücrelerinin füzyonu ile; tek tip antikor yapma niteliğinde, sürekli üreyen hücrelerin çoğaltılması tekniği Köhler ve Milstein tarafından 1975'de başarılmıştır. Doku kültürü ortamında üreyebilen bu hücrelere "hibridoma" denmiştir.

Monoklonal antikorlar ve hibridoma teknolojisi halen spesifik yüzey markerleri ile hücre tiplerinin ayrılmasında, lenfoid ve myeloid malignitelerin tesbitinde, doku tiplendirimlerinde kullanılmakta olup, yakın bir gelecekte de tümör spesifik antikorlara sitotoksik ilaçlar bağlanarak tümör tedavisinde (Sihirli Kurşun) yaygın olarak kullanılabilir.

### SUMMARY

#### *The Production and Use of Monoclonal Antibody*

The technic for the production of immortal clones of cells making single antibody specificities by fusing normal antibody-forming B lymphoblasts with an appropriate myeloma cells are achieved by Köhler and Milstein in 1975. These cells so called "hibridomas" are selected out in a tissue culture medium.

Monoclonal antibody and hibridoma technology are used in the separation of individual cell types with specific surface markers, diagnosis of lymphoid and myeloid malignancies, tissue typing. And also will be used in tumour therapy (magic bullet) with cytotoxic agents coupled to antitumour-specific antibodies.

### GİRİŞ

Tüm canlılar kendi kalıtsal yapılarına yabancılaşma özelliği taşıyan molekülleri (antijenleri) tanıyan ve bunlara karşı göstererek organizmayı koruyan "immün sisteme" sahiptir. Antijenler tarafından uyarılan immün sistem özgül immün cevap verir.

Antikorlar humoral immüniteden sorumlu moleküllerdir. Immünglobülin yapısındadırlar, plazma hücreleri (B lenfoblastlar) tarafından sentezlenerek dolaşıma salınırlar ve vücudun her tarafına yayılarak etki gösterirler (1).

Immünglobülinlerin (Ig) her antijene ayrı ayrı bağlandıkları hipervariabl bölge son derece çeşitlilik gösterir. Yaklaşık 100-120 amino asidin çeşitli kombinasyonlarının oluşturduğu bu bölgeye göre, bir fare tipinin antikor hafızasının 10 milyon ile 50 milyon ( $1.5 \times 10^7$ ) arasında olabileceği tahmin edilmektedir. Bir tek antijenik determinanta karşı 1000 ile 8000 arasında farklı antikor tanımlanmış, fakat bunların yalnız 5-10 çeşidi her zaman ayrılabilmiştir. Bunlar, antikor sentezleyen birden fazla B lenfoblastın ürettiği karışık (poliklonal) antikorlardır. Bu durumda verilen antijenik determinantlara karşı oluşan spesifik antikorları yeterli miktarda elde edip saflaştırmak ve primer yapılarını incelemek mümkün olmamaktadır (2).

Multipl myelomada ise, plazma hücrelerinden birisinin malign proliferasyonu ile

\* S.Ü.T.F. Mikr. ve Kln. Mikr. A.B.D., Uzm. Dr.

\*\* S.Ü.T.F. Mikr. ve Kln. Mikr. A.B.D., Doç. Dr.

(monoklonu) tek tip Ig ve myeloma (M) proteini üretilir. Üretilen Ig fonksiyonel olarak antikor niteliği taşımaz, ancak çok miktarda salgılanır. Hastalının plazma ve idrarlarında çok miktarlarda biriken protein ise Ig'in hafif zincir niteliğini taşımaktadır (1).

1975 yılında Köhler ve Milstein somatik hücre füzyonu tekniğinden yararlanarak, antikor yapabilen fakat kısa ömürlü olan B lenfoblastlarla sonsuz üreme ve tek tip Ig sentezleme özelliği olan belirli myeloma hücrelerinin füzyonu sonucu SÜREKLİ OLARAK TEK TIP ANTİKOR (MONOKLONAL ANTİKOR) ÜRETEN HİBRİD HÜCRE HATTI'ni elde etmeyi başardılar. Bu olay fantastik, utopik teknoloji devrini açarken kendilerine de 1984 yılı nobel tip ödülünü kazandırmıştır (3, 4).

Monoklonal antikor adını verdiğimiz; istenilen antijene veya bir antijenik determinantına karşı spesifitesi olan ve yüksek titrede saf antikor sentezleyen, tek bir hibrid hücreden köken alan ve devamlı üreme potansiyeline sahip hücre popülasyonunun (monoklon) sentezlediği antikorların elde edilmesinde çeşitli terimler ve işlemler kullanılmaktadır (5, 7).

#### Hücre Füzyonu:

Füzyon eritme, birleştirme anlamındadır. İki ayrı hücrenin uygun ortamda birleştirilip bazı ortak özelliklerini bir araya getirmektir. Monoklonal antikor (MonAb) sentezleyecek hücreleri elde etmek için füzyona sokulan hücrelerde çeşitli özellikler vardır (Tablo: 1).

**B Lenfoblastlar:** Elde edilecek MonAb'un spesifik olacağı antijenle immünize edilmiş canlının dalak hücre süspansiyonundan elde edilir. İmmünizasyon sonucu uyarılan B lenfositlerin herbiri çeşitli antijenik determinantlara karşı özgül antikor sentezlemek üzere blast hale geçerler. Lenfoblastların canlıda poliklonal çoğalmaları nedeniyle serumdaki antikorlar da poliklonal antikor niteliğindedir. Bu hücreler, hücre kültüründe üreyemezler ya da çok kısa süre için canlı kalırlar. Herbir lenfoblastın uzun süre çoğalması sağlanarak, bunlardan tek tip antikor elde edilir (3, 6-9).

**Myeloma Hücreler:** İyi bir myeloma hattı sürekli ve kolay üreyebilmeli, süratli üreyen hibritler oluşturmalı, yüksek konsantrasyonda Ig sentezlemeli, kendine ait antikor sentezi yapmamalı, HAT (Hipoksantin+Aminopterin+Timidin) ortamında yalnız başına üreyememesi için HGPRT (Hipoksantin Quanın Phospho Ribozil Transferaz) veya TK (Timidin Kinaz) enzimi defekti olmalıdır. Bu özellikleri taşıyan insan orijinli iyi bir myeloma hattı hemüz kullanılamamıştır. en çok fare ve rat hücreleri kullanılmaktadır (3, 9, 10).

**Hibrid Hücreler:** İmünize edilmiş B lenfoblast ve mutant myeloma hücrelerinden füzyon işlemi ile elde edilen melez hücrelerdir. Hibrid hücreler aynı türden veya ayrı türden canlı hücreleri arasındaki füzyonlarla elde edilebilir. Bu hücreler füzyon sırasında iki atasal hücreye ait kromozomlardan bir kısmını kaybettikleri gibi, her iki hücreye ait kromozomların pek çoğunu korurlar. Füzyonda uzak türden hücreler kullanıldığı zaman kromozom kaybı daha fazla olmaktadır. Hibrid hücreler B lenfoblastlardan aldığı özellikle HGPRT enzimine sahiptir ve HAT ortamında üreyebilirler (8, 11, 12).

#### Klonlama:

Üreme potansiyeli gösteren hibrid hücre topluluklarından hazırlanan yeni bir süspansiyonla herbir hücrenin yalnız başına üremesinin sağlanmasıdır. Hibrid hücre topluluğundaki hücreler sayısınca klonlar elde edilir. Tek klonlama yetmediği zaman üreyen hücrelerden yeniden klonlamalar yapılır. Bu hücreler antijenin tek bir determinantına karşı antikor üreten (MonAb) hücreler olur (3, 5, 7, 13, 14).

Yapılan çalışmaların sonunda birtakım özellikler aranır:

- 1-Sürekli hücre üretmesi olmalıdır.
- 2-İmmünglobülin sentezi yapılmalıdır.
- 3-Tek tip antikor sentezlemelidir (IgG veya IgM ve diğerleri gibi)
- 4-Özgül antikor yapmalıdır.

Bu amaca yönelik yapılacak monoklonal antikor üretim tekniği şöyledir:

1-Çalışılacak olan canlı türünün seçimi: Köhler e Milstein'in orijinal çalışmaları dahil olmak üzere en çok kullanılan faredir. Daha çok Balb/c fareleri kullanılır.

2-İmmünizasyon: Fareler istenen antijenik molaküle karşı uygun bir aşılama prosedürü ile bağışık hale getirilir. Bir hafta aralarla iki ya da üç immünizasyon önerilir. Yetersiz immünizasyon kadar aşırı immünizasyon da sonucu olumsuz etkiler.

3-Lenfoblast süspansiyonunun hazırlanması: İmmünizasyon sonucunda farelerin dalakları steril olarak çıkartılır ve süspansiyonu yapılır. Bunlar B hücresi ihtiva ederler. İmmünizasyon sonucu ne kadar çok B lenfoblast hücresi oluşmuşsa başarı o kadar yüksektir. Bu lenfoblastlar HGPRT enzimi yapabilmelidirler.

4-Myeloma hücre hattı seçilir: Myeloma hücrelerinin yukarıda sözü edilen özellikleri taşıması gerekir. Özellikle HGPRT veya TK enzimi defekti olmalıdır. HGPRT defekti olan myeloma hücreleri bir pürin analogu olan 8-Azoguanin'e dirençlidirler.  $10^6$  kadar myeloma hücrelerinin oluşturduğu ortama 20 ug/ml 8-azoguanin ilave edilirse yaklaşık 20 klonluk hücre elde edilebilir. Aynı şekilde TK enzimi defekti olan hücreler de, bir pirimidin analogu olan 5-bromodeoksiüridin'e dirençlidirler. ortalama 30 ug/ml ilave edildiği zaman defeksiz hücreler çoğalamaz, TK defekti olanlar tesbit edilip ayrılabilir. Bunlar HAT ortamında yalnız başına üreyemezler. Bu defektlerini füzyona girdikleri B lenfoblastlardan giderirler. Bunun için Balb/c farelerden sağlanan X63, SP2/0 ve ratlardan elde edilen YB2/30 hücre hatları en çok kullanılanlardır.

5-Füzyon: Buna hibridizasyon işlemi de denir. Bu aşamada B lenfoblastlar mutant myeloma hücreleri ile füzyona sokulur. Füzyon işlemi HAT besi ortamında yapılır. Buradaki aminopterin DNA sentezinde, ana nükleik asit sentezini bloke eden bir inhibitördür. Bu ana yol bloke edildiği için normal hücreler yan yollardan, yani hipoksantin veya timidinden yararlanarak nükleik asit sentezini yapabilirler. Buna karşılık HGPRT enzimi defekti olan mutant myeloma hücreleri aminopterinli ortamda üreyemez. B lenfoblastların ömürleri de kısa olduğu için, HAT ortamında ancak; sürekli üreme özelliğini myeloma hücrelerinden, HGPRT enzim genini B lenfoblastlardan almış olan hibrid hücreler üreyebilir.

HAT ortamında yapılan füzyon işlemi ise kısaca şöyledir:

a-Dalak süspansiyon hücrelerinden yaklaşık  $10^8$  hücre ile myeloma hücrelerinden  $2 \times 10^7$  hücre, içinde iki hücrenin birleşmesini kolaylaştıracak Polietilen Glikol (PEG)'ün %25-50'lik solusyonundan (veya inaktive Sendai Virüsünden) 0.5-1 ml bulunan tüp içerisinde bir araya getirilir. 60-90 saniyelik bir süre tutulur.

b-Tüp içinde birleşme sağlandıktan sonra buna HAT besi yeri ilave edilerek, hafifce karıştırılır, plastik pleytlerin gözlerine mikropleytlerle 0.2 ml olacak şekilde dağıtılır. Üzeri kapatılıp %4 CO<sub>2</sub>'li rutubetli ortamda etüve kaldırılır. Üreme yeteneğindeki hibrid hücreler 10-12 günde yavaş yavaş gelişip 3-4 haftada gözle

görülebilir klonlar meydana getirirler.

c-Antikor tesbiti: Hibrit hücrelerin üreme yanında, yeteri kadar antikor sentezlemesi de gerekir. Bunun için hücrelerin ürediği yerlerde üst sıvıdan ELISA, RIA, IFA gibi serolojik tekniklerle antikor sentez durumları incelenir ve uygun olanlar seçilir. Bu aşamada esas istediğimiz antijene uygun Ig sentezinin olup olmadığını tesbittir. Ancak bu antikorlar yine de antijenik determinantlara karşı poliklonal niteliktedir. Bunun tek bir antijenik determinanta ait özellikte olması için "hücre kültürü klonlama yöntemi" kullanılır.

6-Klonlama: Bu işlem için üreme olan kuyucuklardaki hibrid hücre topluluklarından yeniden bir hücre süspansiyonu hazırlanır. Ayrı bir pleyte, çukurcukların herbirine bir hücre isabet edecek şekilde ekimler yapılır ve üremeye bırakılır. Yani tek bir hücreden yeni hücelere benzer populasyonlar (Klonlar) elde edilir. Hergün üreme kontrol edilir. Üreme olursa bu, bir myeloma hücresi ile bir B lenfoblastın birleşmesi sonucu üreyen hibrid hücelere aittir. Bu istenilen antijene ya da antijenik tederminanta karşı çok özgül antikor sentezler. Diğer taraftan bir başka kuyucuktaki üreme aynı antijenin farklı tederminantına özgül olabilir. Tek klonlama yetmediği zaman yeni üreyen hücrelerden tekrar klonlamalar yapılabilir.

Böylece, istenilen antijene veya antijenik determinanta karşı spesifitesi olan, yüksek titrede saf Ig sentezleyen tek bir hibrid hücreden köken alan ve devamlı üreme potansiyeline sahip hücre populasyonu (monoklon) ve bunların sentezlediği antikorlar (monoklonal antikorlar) elde edilmiş olur.

7-Saklama: Hibridoma hücrelerinin ürettiği MonAb'lar karakterize edilir; özgüllüğü, titresi, bağlanma kapasitesi, dayanıklılığı, saklama koşulları, Ig tipi, monoklonalite derecesi, antijenik determinantın biyokimyasal yapısı gibi özellikler saptanır. Saklamaya alınır. Hücreler sıvı nitrojende dondurularak, elde edilen saf antikorlar da liyofilize edilerek saklanabilir. İçine koruyucular ilave edilmelidir.

8-Yeniden üretme işlemi: Gerektiğinde bu hücrelerin donmuş stoğundan süspansiyonlar yapılarak tekrar üretilebilir. Bunun için, hücre kültürü şişeleri içinde, aynı tarzda seyreltilerek çok fazla oranda antikor üretilebileceği gibi, farelerin intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturulan ascites tümörlerinde de üretilebilir. Şişelerde üretilen hücrelerden kültür sıvısının 1 ml'sinde yaklaşık 10-1000 ugr antikor elde edilmesine karşılık, Farelerin peritoneal sıvılarından 5,20 mg/ml saf Ig elde edilebilir (2, 3, 5-7, 9), (Şekil: 1).

#### Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

MonAb'lar hastalıkların teşhisinden tedavisine, kompleks molekülleri saflaştırmaktan doku tiplendirimlerine kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Kullanım alanları özellik arzeden durumlarda daha da artacaktır. MonAb'ların en çok kullanıldığı genel alanlar kısaca Tablo: 2'de verilmiştir (1, 15-22).

TABLO 1

Monoklonal Antikor Üretiminde Kullanılan Hücreler ve Genel Özellikleri.

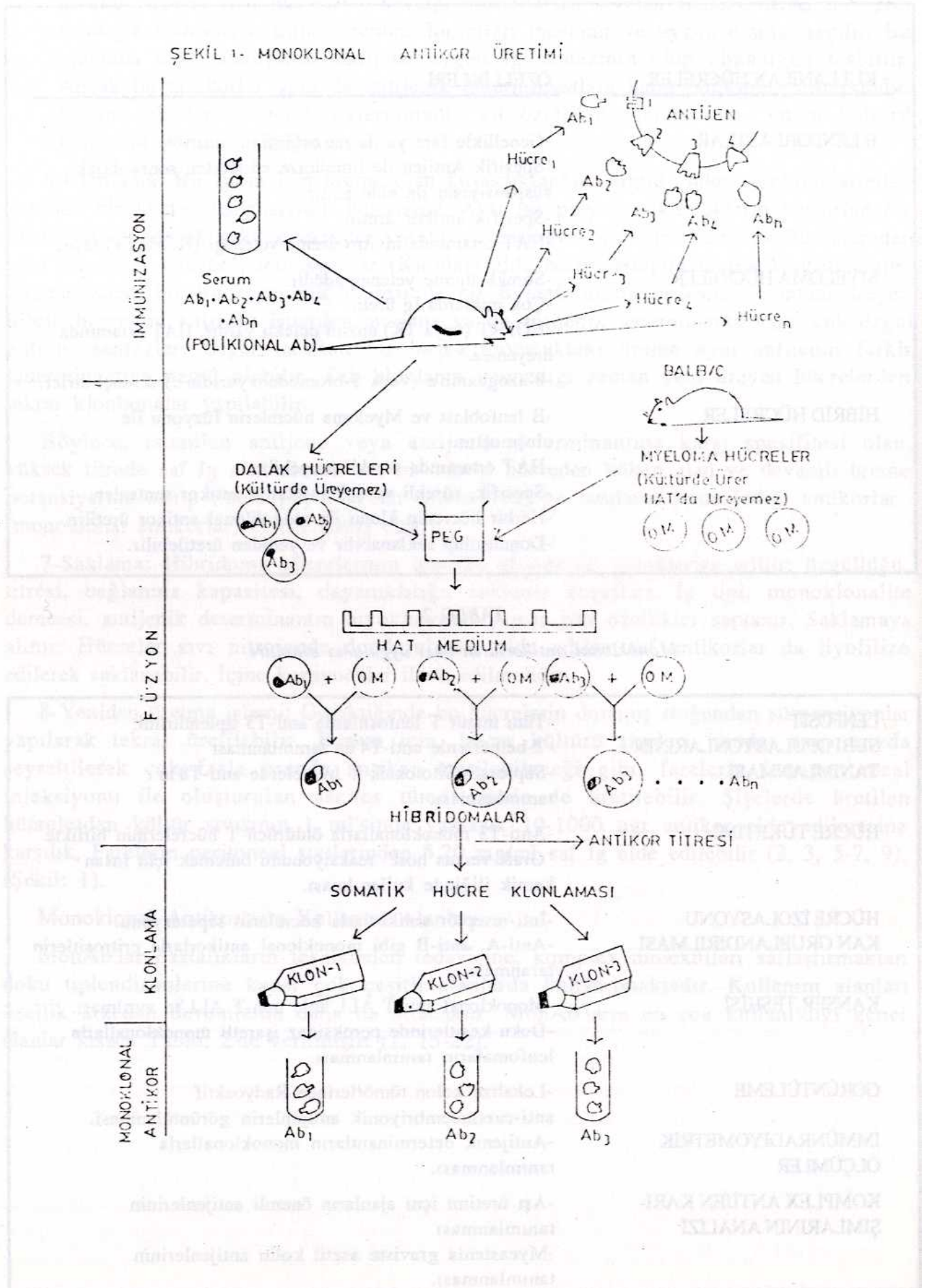
KULLANILAN HÜCRELER	ÖZELLİKLERİ
B LENFOBLASTLAR	<ul style="list-style-type: none"><li>-Genellikle fare ya da rat orijinlidir.</li><li>-Spesifik Antijen ile immünize edildikten sonra dalak süspansiyonu ile elde edilir.</li><li>-Spesifik antikor üretir.</li><li>-HAT ortamında invitro üreme yeteneği (HGPRT+) taşır.</li></ul>
MYELOMA HÜCRELER	<ul style="list-style-type: none"><li>-Sürekli üreme yeteneğindedir.</li><li>-Çok miktarda Ig üretir.</li><li>-HGPRT (veya TK) enzim defekti vardır. HAT ortamında üreyemez.</li><li>-8-azoguanin'e (veya 5-bromodeoxyuridin'e) dirençlidirler.</li></ul>
HİBRİD HÜCRELER	<ul style="list-style-type: none"><li>-B lenfoblast ve Myeloma hücrelerin füzyonu ile oluşmuştur.</li><li>-HAT ortamında sürekli üreyebilir.</li><li>-Spesifik, sürekli ve çok miktarda antikor sentezler.</li><li>-Herbir hücrenin klonu ile monoklonal antikor üretilir.</li><li>-Dondurulup saklanabilir ve yeniden üretilir.</li></ul>

TABLO 2

Monoklonal antikorların bazı uygulama alanları

LENFOSİT SUBPOPULASYONLARININ TANIMLANMASI	<ul style="list-style-type: none"><li>-Tüm matür T lenfositlerde anti-T3 tiplendirimi.</li><li>-T-helperlerde anti-T4'ün tanımlanması</li><li>-Süpressör/Sitotoksik T hücrelerde anti-T8'in tanımlanması.</li></ul>
HÜCRE TÜKETİMİ	<ul style="list-style-type: none"><li>-Anti-T3 monoklonallarla öldürücü T hücrelerinin birlikte "Graft versus host" reaksiyonunu önlemek için insan kemik iliğinde kullanılması.</li></ul>
HÜCRE İZOLASYONU KAN GRUPLANDIRILMASI	<ul style="list-style-type: none"><li>-İnti-reseptör antikorlarla hücrelerin seperasyonu.</li><li>-Anti-A, anti-B gibi monoklonal antikorlarla eritrositlerin taranması.</li></ul>
KANSER TEŞHİSİ	<ul style="list-style-type: none"><li>-Monoklonal anti-T ALL'lerle non-T ALL'in ayrılması.</li><li>-Doku kesitlerinde peroksidaz işaretli monoklonallarla lenfomaların tanımlanması.</li></ul>
GÖRÜNTÜLEME	<ul style="list-style-type: none"><li>-Lokale kolon tümörlerinde Radyoaktif anti-carsinoembriyonik antijenlerin görüntülenmesi.</li></ul>
İMMÜN RADİYOMETRİK ÖLÇÜMLER	<ul style="list-style-type: none"><li>-Antijenik determinantların monoklonallarla tanımlanması.</li></ul>
KOMPLEX ANTİJEN KARI- ŞIMLARININ ANALİZİ	<ul style="list-style-type: none"><li>-Aşı üretimi için ajanların önemli antijenlerinin tanımlanması</li><li>-Myeastenya graviste asetil kolin antijenlerinin tanımlanması.</li></ul>

ŞEKİL 1  
Monoklonal Antikor Üretimi



## KAYNAKLAR

1. Roitt I.M.: Essential Immunology, 6. Ed., ELBS Hong Kong pp.: 145-8, 1988.
2. Köhler G., and The EMBO: Hybridoma Techniques, EMBO, SKMB Course Basel, 1980.
3. Köhler G, Milstein C.: Continous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, Nature, 256, 495-7, 1975.
4. Karabiber N., Aktaş F.: Monoklonal Antikorlar. Mikrobiyol. Bült. 21, 232-8, 1987.
5. Tami J.A., Parr M.D., et all: Monoclonal Antibody Technology, Am. J. Hosp. Pharm. 43, 2816-24, 1986.
6. Milstein C.: Monoclonal antibody. Cancer, 49, 1953-7, 1982.
7. Köhler G., Milstein C.: Derivation of Specific Antibody producing Tissue Culture and Tumour Lines By Cell Fusion. Eur. J. İmmunol. 6, 511-9, 1975.
8. Littlefield J.W.: Selection of Hibrids From Matings of Fibroblast In Vitro and Their Pressumed Recombinants, Sciences, 145-70, 1964.
9. Mc Gregar A.K.: Monoclonal Antibodies: Production and Use. BMJ., 183, 1143-4, 1981.
10. Hengardner H., Lugatti A.L., Shreirer M.: Fusion of In vitro Immünised Lymphoid Cells With x63 Ag8. Curr. Topics In Microbiol And Immunol., Vol: 81, pp.: 92-9, 1978.
11. Shulman M., Wilde C.D., Köhler g.: A better Cell Line For Making Hibridomas Secreting Specific Antibodies. Nature, 276, 269-70, 1978.
12. Galfre G., Howe S.C., Milstein C., et all: Antibodies To Major Histocompatibility antigens Produced by Hibrid Cell Lines., Nature, 266, 550-2, 1977.
13. Potter M.: Immunoglobulin Producing Tumours And Myeloma Proteins of Mice. Phsiol. Rev. 52, 631-719, 1972.
14. Shrooder J., austio K., Jarvis J.M., Milstein c.: Kromosome Segregation And Expression of Rat Immunoglobulins In Rat/Mouse Hibrid Myelomas. Immunogenitics, 10, 125-31, 1980.
15. Grossman B.H.: Clinical Application of Monoclonal Antibody Technology. urol. Clin. North Am. 13, 465-74, 1986.
16. Scher B.S., Burke D.C.: A RIA For Human Leucosite interferon Using Monoclonal Antibody. Nature. 285, 446-50, 1980.
17. Voak D., Sacks S., Alderson T., et all.:% Monoclonal Anti-A from Hybrid Myeloma: Evaluation as a Blood Grouping Reagent. Voox. Song., 39, L34-40, 1981.
18. Williams A.F., Galfre G., Milstein C.: Analysis of Cell Surfaces by Xnegenic Myeloa-hybrid Antibodies: differantiation Antigens of Rat Lyphocytes. Cell, 12.663-73, 1977.
19. Bruce S.R.: Monoclonal Antibodies Use In Dedettion And Treatment of Cencer. Post Grad Med., 79, 1, 1986.
20. Miller R.A.: Treatment of B Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-idiotypic Antibodies. New. eng. J. Med., 306, 517-22, 1982.
21. Pelczar M.J., Chan E.C. S., Krieg N.R.: microbiology, 5. Ed. Mc Grawn-Hill internatiol. Editions. pp. 153, 1988.
22. Finegold S.M., Baron E.J.: diagnostic Mycrobiology. 7. Ed. Mosby Comp. pp. 133-5, 1986.