

MONOKLONAL ANTİKORLAR

Müjgân İzgür*

K.Serdar Diker*

Monoclonal Antibodies

Summary: *Monoclonal antibodies are homogeneous populations of identical antibody molecules. Monoclonal antibody technology is a form of genetic engineering resulting in the production of specific antibodies by specialized tissue culture lines. The production of these antibodies through cell hybridization permits the dissection of complex antibody responses into their individual components.*

The two biological components essential for the creation of hybrid cells are antibody-producing spleen cells from immunized mice or rats and tumor cell lines of lymphoid origin called myelomas. Single antibody-forming cells from immunized rodents are fused with myeloma cells to create hybridomas with properties of both parent cell types. These hybridomas produce the single type of antibody molecule that they inherited from the normal antibody-forming cell parent. Hybrid cells derived in this way can produce unlimited quantities of specific antibody in tissue culture or when grown in vivo as ascites tumors. It is possible to produce monoclonal antibodies to any antigen by appropriate selection techniques. Monoclonal antibodies have wide application in many areas of human and veterinary medicine and biological science.

Özet: *Monoklonal antikorlar hibrid hücreler tarafından üretilen homojen antikor topluluklarıdır. Bu antikorlar, bağışıklanmış fare veya ratlardan elde edilen dalak hücreleri ile myeloma adı verilen lenfoid tümör hücrelerinden geliştirilen melez hücreler tarafından üretilirler. Her iki tip hücrenin özelliklerini taşıyan hibridomalar, doku kültürlerinde veya ascites tümörlerinde çok miktarda monoklonal antikor oluştururlar. Monoklonal antikorlar, enfeksiyöz etkenlerin ve hücre yüzeyi antijenlerinin teşhisi ve immunoterapi alanlarında kullanılmaktadırlar.*

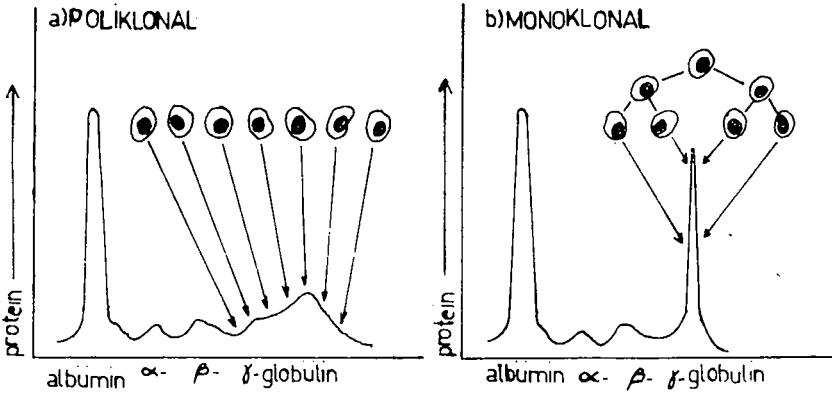
Giriş

Organizmaya antijenik bir maddenin injeksiyonundan sonra, B-lenfositlerinin farklılaşması ile ortaya çıkan plazma hücreleri, bu

* Dr., A.Ü.Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

antijene karşı özgül (spesifik) antikorlar üretirler. Antikor işlevi gören immunoglobulinler, serum proteinlerinin gamma-globulin fraksiyonunda yer alırlar. Bir immunoglobulin molekülünün yaklaşık 100 amino asitten ibaret olan antijen bağlanma ucu, bu amino asitlerin değişik yerleşim kombinasyonlarına bağlı olarak 10^6 - 10^7 antijeni tanıma yeteneğine sahiptir (17). Antijen molekülünün yapısında bulunan farklı antijenik determinantlara karşı oluşan antikorlar, birden çok B-lenfosit kümesinden (klon) köken aldıkları için heterojenik özelliktedirler ve poliklonal antikorlar şeklinde de tanımlanabilirler. Elektroforez yöntemi ile incelenen bağışık serumdaki poliklonal antikorların heterojenik dağılımı Şekil 1a'da gösterilmiştir.

Herhangi bir antijen ile uyarılan öncül (prekürsör) bir B-lenfosit seçilerek bu hücrenin üremesi ve antikor oluşturan bir plazma hücresine değişimi sağlanır ise, bu antijene karşı "monoklonal antikorlar" adı verilen, tek tip antikorların homojen olarak üretimi sağlanır. Yüksek özgüllükteki bu tip antikorların elde edilmesi, Köhler ve Milstein'in (6) somatik hücre melezlemesi (hibridizasyon) ile myeloma hücreleri ve B-lenfositlerini birleştiren çalışmaları ile gerçekleşmiştir. Myeloma; tek bir B-hücrelerinden köken alan ve serumda tek tip bir antikorun çok miktarda bulunması ile karakterize neoplastik bir hastalıktır. Monoklonal antikorlar, antijen molekülünün sadece belirli antijenik determinantlarına karşı oluştukları için çok spesifiklerdir. Elektroforez yöntemi ile incelenen myelomalı bir serumdaki monoklonal antikorların homojenik özellikleri Şekil 1b'de gösterilmiştir (17).



Şekil 1. Bir antijene karşı oluşan, (a) poliklonal, (b) monoklonal antikorların serumdaki elektroforetik görünümü.

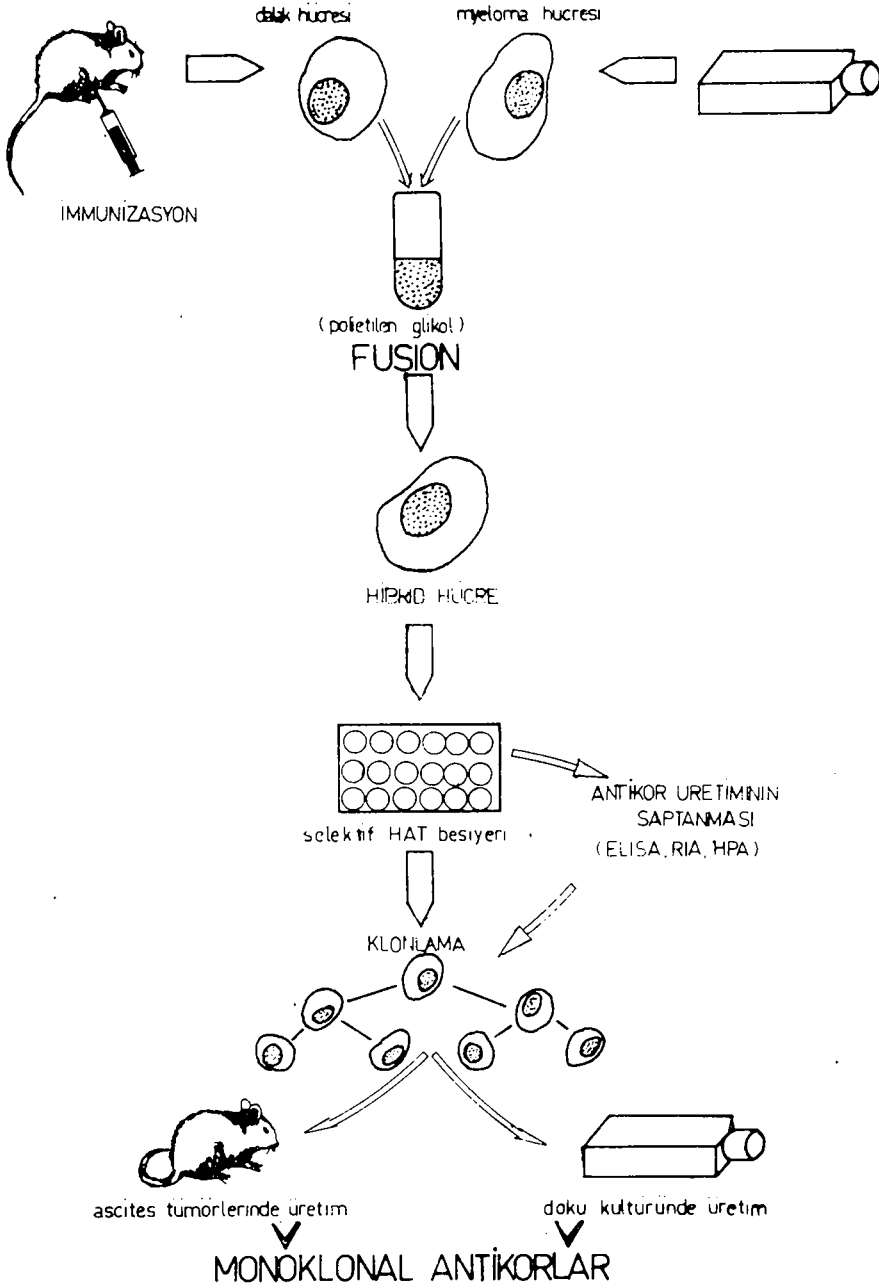
The patterns obtained from electrophoresis of (a) normal antiserum and (b) serum with myeloma.

Monoklonal Antikor Üretim Tekniği

Monoklonal antikorlar, iki tip ana hücreden geliştirilen melez (hibrid) hücreler tarafından üretilirler. İşlevleri antikor üretimi olan B-lenfositleri ile neoplastik myeloma hücrelerinin hibridizasyonu sonucu ortaya çıkan melezler, her iki ana hücre tipinin özelliklerini taşırlar. Hibridomalar ana lenfosit hücresinin sentezlediği antikorun aynısını oluşturabilir ve ana myeloma hücresi gibi in vitro olarak üreyebilirler. Monoklonal antikor üretimini sağlayan teknik; rodentlerin immunizasyonu, somatik hücre melezlemesi (fusion işlemi), hibrid hücrelerin antikor aktivitesinin belirlenmesi, antikor üreten hücrelerin kümelendirilmesi (klonlama) ve bu hücrelerin seri şekilde üretilmesi gibi aşamaları içermektedir (Şekil 2) (2, 8, 16).

Myeloma hücre hatları: Monoklonal antikor üretimi fare ve ratların B-lenfositli myeloma tümörlerinden elde edilen hücre hatlarının geliştirilmesi ile mümkün olmuştur (6). İn vivo yolla kolaylıkla oluşturulabilen myelomalardan elde edilen bu hücreler in vitro olarak da üreyebilmektedirler. Bir pürin metabolizması enzimi olan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz enziminden yoksun olan bu hücreler, hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT) içeren kültürlerde üreyemezler. Ayrıca myeloma hücreleri kendi immunoglobulinlerini sentezleme yeteneğini kaybetmişlerdir. Monoklonal antikor üretiminde, fare ve rat myeloma hücreleri kullanılmaktadır. Rat myeloma hücreleri, daha büyük olmaları ve daha kolay kaynaşmaları (fusion) nedeniyle fare myeloma hücrelerine tercih edilirler. Ayrıca, fare myelomaları ile insan ve diğer türlerin B-lenfositlerinden elde edilen melez hücreler, in vitro kültürlerde kromozomlarını ve antikor sentezleme yeteneklerini kaybederler. Fare myeloma ve rat lenfosit melezleri, rat-rat ve fare-fare hibridleri kadar dayanıklıdırlar. Hibridizasyon çalışmalarında en çok Balb/C farelerinden elde edilen X63, SP2/O ve ratlardan elde edilen YB2/30 hücre hatları kullanılmaktadır (3).

Bağışıklama (İmmunizasyon): Monoklonal antikor üretimi için gerekli olan immunizasyon protokolü, normalde antiserum elde edilmesinde kullanılan yol ile aynıdır. Fakat monoklonal antikor üretiminde bağışıklama işlemi için saf antijen kullanmak zorunlu değildir; saflaştırma işlemi kontrol aşamasında yapılır. Kuvvetli antijenler, melezleme çalışmasından 4 gün önce tek doz şeklinde; zayıf antijenler ise, sonuncu injeksiyon hücre melezlemesinden 4 gün önce olacak



Şekil 2. Monoklonal antikor üretim tekniği.
The production of monoclonal antibodies.

şekilde aralıklı birkaç injeksiyon ile, B-lenfositlerinin elde edileceği deneme hayvanlarına verilir (2).

Kaynaştırma (Fusion) işlemi: İki ayrı hücrenin birleştirilme işlemi olan fusion, monoklonal antikor üretiminin en önemli aşamasıdır. Son antijen injeksiyonundan 3-4 gün sonra, bağışık kılınmış fare veya ratın dalağında lenfosit süspansiyonu hazırlanır (6). Bu hücreler, myeloma hücreleri ile polietilen glikol bulunan bir test tüpünde birkaç dakika bekletilirler. Standart bir fusion için ortamda 1×10^8 lenfosit ve 2×10^7 myeloma hücrelerinin bulunması gereklidir. Hücreler mikrotitrasyon kapları içindeki kültür vasatında 37°C de inkübe edilirler. Bundan sonra, hibridleri selektif olarak üretmek için hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) vasatı kullanılır. Kaynaşmamış parental myeloma hücreleri HAT besiyerinde üreyemezler. Normal lenfositler de, in vitro üreme yeteneklerinin olmaması nedeniyle kısa sürede ölürler. Bu durumda, HAT besiyerinde sadece hibrid hücreler üreyebilmektedirler. Bu hibridler, HAT besiyerinde üreyebilme özelliklerini hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz enzimine sahip olan ana lenfosit hücrelerinden, in vitro üreyebilme özelliklerini ise ana myeloma hücrelerinden almışlardır (8).

Antikor üretiminin kontrolü: Standart bir fusion denemesi için, mikrotitrasyon kabındaki 400 çukurun herbirine 0.2 ml hücre karışımı konur (1). Her çukur 1-5 hibrid hücre içerebilir ve bu hibridler değişik oranlarda ürerler. Hızlı üreyen melez hücreler 10 gün içinde gözle görülebilen koloniler oluştururlar. Yavaş üreyen hücrelerin bu duruma gelmeleri ise 3-4 haftalık bir zaman alır. Bu üreme dönemi sırasında, HAT içeren besiyeri düzenli olarak yenilenmelidir.

Fusion işleminden sonra oluşan hibridlerin tümünün antikor sentezleme yeteneğinde olup olmadıkları bilinmemektedir. Bu nedenle, kullanılan antijene karşı hibridomalar tarafından üretilen antikorlar, hücrelerin ürettiği besiyerinin üst sıvısında aranılır (17). Fusion işlemi rastgele olduğundan, antikor sentezleyen hibridlerin oranı % 1-50 arasında değişir. Antikorların üst sıvıdaki varlıklarının 2-3 gün gibi kısa bir sürede kontrol edilmesi iki yönden önem taşımaktadır. Mikrotitrasyon kabının çukurlarında hızla üreyen melez hücreler metabolizma artıklarının çoğalması nedeniyle ölebilirler. Diğer yönden, antikor üretmeyen hücreler hızla çoğalarak, antikor üretenleri baskılayabilirler. Üst sıvıdaki antikorların belirlenmesi amacıyla kullanılan antijenin özelliğine göre, radyoimmunoassay, ELİSA ve hemolitik plak deneyi gibi duyarlı testlerden yararlanılmaktadır (13).

Hibridlerin kümelenendirilmesi (klonlama), saklanması ve fazla miktarda üretilmesi: Üst sıvısında antikor bulunan çukurlardaki melez hücreler, monoklonal antikor üreten hücre hatlarını elde etmek için kümelenendirilirler. Kümelenendirme işlemi, mikrotitrasyon kaplarında sınırlı sulandırma ile veya yumuşak agar üzerinde üretilerek yapılır (8).

Kümelenendirilmiş hibrid hücre hatları, DMSO (Dimetil sülfooksit) içinde sıvı nitrojenle dondurulup saklanırlar ve gerektiğinde tekrar kullanılabilirler (2).

Elde edilen hibrid hücre hatları in vitro olarak, 1 ml besiyerinde 10–100 mikrogram monoklonal antikor oluşturabilirler (1). Bu antikorlar, ortamdaki metabolizma artıklarından biyokimyasal yöntemlerle ayrılırlar. Hibrid hücre hatları, in vivo olarak, fare ve ratların karın boşluklarında ascites tümörleri oluşturma özelliğine sahiptirler. Hibrid hücrelerden köken alan bu tümörler büyük miktarlarda monoklonal antikor sentezleyebilirler. Böyle bir deneme hayvanından toplanan ascites sıvısının 1 ml'sinde 5–20 mg miktarında monoklonal antikor bulunabilir (17). Hibrid hücreler ile üretimde kullanılan rodentlerin doku uyumu iyi ise bu hücreler daha kolay üreme olanağına sahip olurlar.

Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

Monoklonal antikorlar normal antiserumların yararlandığı bütün alanlarda kullanılabilirler. Ayrıca, çok yüksek özgüllükleri ve fazla miktarda elde edilebilmeleri nedeniyle daha üstün özelliklere sahiptirler. Monoklonal antikorların uygulama alanları, kullanılan antijenlere göre 3 grupta toplanabilir. Bunlar, infeksiyöz hastalık oluşturan etkenler, hücre yüzeyi antijenleri ile proteinler ve küçük moleküllerdir (1).

1- *İnfeksiyöz etkenler:* Bakteri, virus ve parazitler gibi infeksiyöz etkenlere karşı geliştirilen monoklonal antikorlar bu hastalık etkenlerinin teşhisinde, aşı denemelerinde, aşı üretiminde ve immunoterapi amacıyla kullanılmaktadırlar.

a) *Teşhis:* Çok geniş özgüllüğü, tek örnekliği ve sınırsız kullanım alanları ile monoklonal antikorlar, teşhis amacıyla kullanılmaya çok uygundur. Veteriner hekimler, çok yakın bir gelecekte, influenza ve rinopneumonitis gibi atların solunum yolu patojenlerinden ileri gelen infeksiyonları, ticari kitler halindeki monoklonal antikorları kullanarak ayrılabilirlerdir (1, 4). Miktarı çok az ve küçük an-

tijenlere karşı bile elde edilebilen monoklonal antikolar, alışlagelmiş serolojik testlerle birbirlerinden ayıramayan çok yakın antijenik yapıya sahip mikroorganizma suşlarını da ayırabilmektedir (1). Örneğin, köpek parvo virusunu kedi panleukopeni virusundan ayırabilen monoklonal antikolar üretilmiştir. Monoklonal antikolar kullanılarak influenza virusunun hemagglütinasyon molekülünün antijenik haritası çıkarılmış ve virusun in vitro mutasyon oranı saptanmıştır (18). Bu çalışma, doğal populasyondaki virusların mutasyon oranlarını öğrenmek bakımından önemlidir. Bu metotla, kuduz virusundaki mutasyon oranının, influenza virusundaki kadar sık olduğu saptanmıştır. Kuduz virusunun doğal varyantlarının nadir olduğu düşünüldüğü için, bu sonuç araştırmacılar tarafından sürpriz olarak değerlendirilmiştir. Monoklonal antikolar, ayrıca polio, hepatitis-B, parainfluenza ve herpes viruslarının teşhisinde kullanılmaktadırlar (1, 19). Mikobakteriler, streptokoklar, stafilokoklar ve neisserialar gibi bakterilerin, ekinokoklar gibi parazitlerin ve klamidyaların oluşturdukları infeksiyonlar bu antikolar ile çok hassas olarak teşhis edilebilmektedir (5, 7, 9, 11).

b) *Aşı seçimi ve üretimi*: Monoklonal antikolar, aşı seçimi aşamasında, immun yanıtı en çok uyaran antijenlerin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar (2). Bu işlem, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ölü aşıların hazırlanmasında ilk basamağı oluşturmaktadır. Aşı seçiminde böyle ayrıntılı bir antijenik analizin yapılması, özellikle parazitler infeksiyonlarda önem taşır. Bu amaçla, tripanozomalara, plasmodimlere, schistosomalara ve thelialarına karşı monoklonal antikolar üretilmiştir (1).

c) *Pasif immunoterapi*: Ascites sıvısından çok yoğun olarak elde edilebilen monoklonal antikolar pasif immunoterapi amacıyla da kullanılmaktadırlar (10). Örneğin, nakliye işleminden önce monoklonal antikolar ile pasif immunoterapi uygulanan sığırlarda, seyahat hummasından ileri gelen kayıplar önlenmektedir (1). Normal pasif immunoterapi ile aynı mekanizmaya sahip olan bu yolun avantajı, çok miktarda özgül antikorun sağlanabilmesidir.

2- *Hücre yüzeyi antijenleri*: Bu bölümde yer alan normal ve anormal hücre yüzeyi antijenleri 3 grup içinde incelenebilirler. Bunlar, polimorfik moleküller, değişim antijenleri ve hücresele reseptörlerdir.

a) *Polimorfik moleküller*: Kan grubu antijenleri ve doku yumuşak antijenleri polimorfik moleküllerdir. Bu antijenler hakkındaki bilgiler

sayesinde, klinik organ transplantasyonları ve kan transfüzyonu daha başarılı bir şekilde yapılabilmektedir (15). Ayrıca, kan grubu antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar, sürülerin genetik ayrımında kullanılarak, daha üstün özelliklere sahip sürülerin geliştirilmesini sağlayacaklardır (4). Yine bu antikorlardan, organ transplantasyonu için verici dokuların seçiminde ve doku uyumu antijenlerini yapısının belirlenmesinde yararlanılmaktadır.

b) *Değişim antijenleri*: Değişim antijenleri, bir hücreyi, doku veya organı, diğer hücre, doku ve organlardan ayıran antijenlerdir. Değişim antijenleri kapsamına giren tümöre özgül antijenlere karşı geliştirilen monoklonal antikorlar, immunoterapi amacıyla direk olarak veya sitotoksik ilaçların taşıyıcısı olarak indirek yolla kullanılabilirler (12). Tümöre özgül monoklonal antikorlar, normal doku antijenleri ile kros-reaksiyon vermemektedirler.

c) *Hüresel reseptörler*: Bu grup antijenler içine, hormonlar, ilaçlar ve mikroorganizmalar için tutunma ucunu oluşturan reseptörler girmektedir. Gelecekte, bir hormon reseptörü için özgül monoklonal antikorların injeksiyonu ile hormon aktivitesini artırmaya yönelik klinik uygulamalar yapılabilecektir (13).

3- *Proteinler ve diğer küçük moleküller*: Bu tip antijenlere karşı monoklonal antikor uygulaması klinik alanda olmaktadır. İmmunoglobulin sınıf ve alt sınıflarına karşı üretilen monoklonal antikorlar ticari kitler halinde satılmaya başlanmıştır (14). Ayrıca, dokulardaki ilaç birikimi ve pestisidler ile yarış atlarındaki yasak ilaçlar bile bu yolla rahatlıkla belirlenebilir (1).

Literatür

- 1- **Antczak, F.D.** (1982): *Monoclonal antibodies: technology and potential use*. J.Am.Vet. Med.Ass., 181: 1005-1010.
- 2- **Davis, W.C., McGuire, T.C. and Perryman, L.E.** (1982): *Biomedical and biological application of monoclonal antibody technology in developing countries*. Priorities in Biotechnology Research for International Development. National Academy Press, Washington, D.C.
- 3- **Galfre, G. and Milstein, C.** (1981): *Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures*. Meth.Enzymol., 73: 3-47.
- 4- **Gershwin, L.J.** (1981): *Hybridomas: the production of monoclonal antibodies*. California Vet., 10: 31-33.
- 5- **Hewitt, J., Coates, A.R.M., Mitchison, D.A. and Ivanyi, J.** (1982): *The use of murine monoclonal antibodies without purification of antigen in the serodiagnosis of tuberculosis*. J. Immunol. Meth., 55: 205-211.

- 6- **Köhler, G. and Milstein, C.** (1975): *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.* Nature, 256: 495-497.
- 7- **LaBonardiere, C., Groclaude, J. et Ventura, M.** (1983): *Detection des hybrides sécrétants d'immunoglobines monoclonales par agglutination de Staph. aureus.* Ann. Immunol., 134C: 281-291.
- 8- **Milstein, C.** (1980): *Monoclonal antibodies.* Scientific American, 243: 56.
- 9- **Nowinski, R.C., Tam, M.R., Goldstein, R.C., Strong, L., Kuo, C.C., Corey, L., Stamm, W.E., Handsfield, H.H., Knapp, J.S. and Holmes, K.K.** (1983): *Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans.* Science, 219: 637-644.
- 10- **Pastoret, P.P.** (1982): *Anticorps monoclonaux et perspectives d'application en médecine vétérinaire.* Ann.Rech.Vet., 13: 21-31.
- 11- **Pavlov, H., Hogarth, M., McKenzie, I.F.C. and Cheers, C.** (1982): *In vivo and in vitro effects of monoclonal antibody to ty antigens on immunity to infection.* Cell. Immunol, 71: 127-138.
- 12- **Peng, W.W., Bressler, J.P., Castiglioni, E.T. and Vellis, J.** (1982): *Development of a monoclonal antibody against a tumor associated antigen.* Science, 215: 1102-1104.
- 13- **Schröder, J.** (1980): *Monoclonal antibodies: a new tool for research and immunodiagnosics.* Med.Biol., 58: 140-148.
- 14- **Srikumaran, S., Guidry, A.J. and Goldsby, R.A.** (1982): *Production and characterization of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulin G₂.* Am.J.Vet.Res., 43: 21-25.
- 15- **Thiry, E. et Pastoret, P.P.** (1981): *Les anticorps monoclonaux.* Ann.Med.Vet., 125: 485-493.
- 16- **Üstün, T.B.ve Alkan, Ş.Ş.** (1982): *Hücre mezajleşmesi ve monoklonal antikorlar.* Doğa, 6 C: 89-98.
- 17- **Yelton, D.A. and Scharff, M.D.** (1980): *Monoclonal antibodies.* Amer.Sci., 68: 510-516.
- 18- **Yewdell, J.W., Webster, R.G. and Gerhard, W.U.** (1979): *Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A haemagglutination molecule.* Nature, 279: 246-248.
- 19- **Weiss, R.A.** (1962): *Hybridomas produce viruses as well as antibodies.* Immunol. Today, 3: 292-294.

Tarixi 20.2.1984 günü alınmıştır.