



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KANSER TANI VE TEDAVİSİNDE KULLANILMAK
ÜZERE ANTI-PD-L1-scFv ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ**

Cansu BABAHAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

ANKARA

2023

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER TANI VE TEDAVİSİNDE KULLANILMAK
ÜZERE ANTI-PD-L1-scFv ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ**

Cansu BABAHAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
21L0230015 proje numarası ve TÜBİTAK'ın 216S570 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Kanser Tanı ve Tedavisinde Anti-PD-L1-scFv Antikor Geliştirilmesi**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı Soyadı: Cansu Babahan

Tarih: 07/02/2023

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalında Cansu Babahan tarafından hazırlanan “Kanser Tanı ve Tedavisinde Kullanılmak Üzere Anti-PD-L1-scFv Antikor Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.02.2023

Prof. Dr. Hakan AKBULUT
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Mehmet Ali Nahit
Şendur
Ankara Yıldırım Beyazıt
Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Berna SAVAŞ
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez Hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Kanser ve İmmün Sistem	1
1.2.1. Antijen Sunumu ve T Hücre Aktivasyonu	2
1.2.2. T Hücre İmmün Kontrol Noktaları	4
1.2.3. Kanser Hücrelerinin İmmün Sistemden Kaçış Mekanizmaları	4
1.3. Kanser Tedavi Yöntemleri	5
1.3.1. Kanser İmmünoterapisi	7
1.3.1.1. İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri	8
1.4. Monoklonal Antikorlar	9
1.4.1. Antikor Yapısı	10
1.4.2. Rekombinant Antikor (rAb)	14
1.4.2.1. Antijen Bağlama Fragmenti (Fab)	16
1.4.2.2. Tek Zincir Antikor Değişken Fragmenti (scFv)	16
1.4.2.3. Tek Domain Antikorlar (sdAb)	17
1.5. Monoklonal Antikor Geliştirme Yöntemleri	18
1.5.1. Hibridoma Teknolojisi	18
1.5.2. Faj Gösterim Teknolojisi	20
1.5.2.1. Bakteriyofaj	21
1.5.2.2. Faj Görüntüleme Kullarılan Antikor Formatları	23
1.5.2.3. Antikor Kütüphane Çeşitleri	23
1.5.2.4. İmmün Kütüphanelerin Oluşturulması ve Çoğaltılması	26
1.5.2.5. Antikor Faj Kütüphanelerinin Afinite Seçimi (Biopanning)	29
1.6. Rekombinant Antikor Ekspresyon Sistemleri	32
2. GEREÇ ve YÖNTEM	35
2.1. Kullanılan Materyaller	35
2.2. PD-L1 Antijenine Spesifik scFv Antikor Kütüphanesinin Oluşturulması	36
2.2.1. Fare PD-L1 Antijeni ile Sıçan İmmünizasyonu	36
2.2.2. Dalak Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu	37
2.2.3. 5'-RACE Yöntemi ile İmmünglobülin VH ve VL Bölgelerinin Spesifik Primerlerle Çoğaltılması	38
2.2.4. Overlap Extension PCR Yöntemi ile İmmünglobulin VH ve VL Bölgelerinin scFv Formatında Birleştirilmesi	41
2.2.5. Anti-PD-L1-scFv Antikor Kütüphanesinin Oluşturulması	42
2.3. Faj Gösterim Teknolojisi	43

2.3.1. Fajemid Vektörün Çoğaltılması ve Restriksiyon Enzimler ile Kesimi	43
2.3.2. Rekombinant Anti-PD-L1-scFv Fajemid Vektörünün Oluşturulması ve Faj-Kompetan TG-1 Hücrelerine Transformasyonu	44
2.3.3. Rekombinant Anti-PD-L1-scFv Antikor Kütüphanesinin Çoğaltılması	45
2.3.4. Helper Faj Stoğunun Hazırlanması ve Titrasyonu	46
2.3.5. Anti-PD-L1-scFv Antikor Faj Kütüphanesinin Oluşturulması ve Çoğaltılması	49
2.3.6. Anti-PD-L1-scFv Antikor Faj Kütüphanesinin Afinite Seçimi (Biopanning)	51
2.3.7. PD-L1 Antijene Bağlanan Anti-PD-L1-scFv Fajlarının Poliklonal ve Monoklonal Faj ELISA ile Tanımlanması	53
2.3.8. Anti-PD-L1-scFv Antikor Pozitif Örneklerinin Doğrulanması	56
2.4. Anti-PD-L1-scFv-His Antikorumun Ekspresyonu	57
2.4.1. Anti-PD-L1-scFv-His Antikor Geninin Oluşturulması ve Taşıyıcı Plazmid ile Ekspresyon Plazmidine Klonlanması	57
2.4.2. Anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss plazmidinin HEK293 Hücrelerine Transfeksiyonu	60
2.5. İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi (IMAC) Yöntemi ile Anti-PD-L1-scFv-His Antikorumun Saflaştırılması	60
2.6. Anti-PD-L1-scFv-His Antikorumun PD-L1 Ligand Bağlama Özelliklerinin Test Edilmesi	62
2.7. Anti-PD-L1-scFv Antikorumun In Vivo Etkinliğinin Test Edilmesi	63
2.8. İstatistiksel Yöntem	64
3. BULGULAR	65
3.1. PD-L1 Antijeni ile Rat İmmünizasyonu Sonucu Oluşan Serum Antikor Titre Tayini	65
3.2. Dalak Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA Örneğinin Kalite Kontrolü	66
3.3. 5'-RACE PCR Yöntemi ile Rat İmmunoglobulin Moleküllerinin Ağır (VH) ve Hafif (VL) Domainlerinin Çoğaltılması	67
3.4. Overlap Extension PCR Yöntemi ile Bağlantı Bölgesi Eklenen VH ve VL İmmünglobulin Genlerinin Birleştirilmesi ve Çoğaltılması	69
3.5. pADL20c Fajemid Vektörün Kesim Enzimleri ile Doğrulanması	69
3.6. Rekombinant Anti-PD-L1-scFv Antikor Kütüphanesinin Doğrulanması	70
3.7. İyi Ayrılmış M13 Helper Faj Plaklarının Elde Edilmesi	71
3.8. M13 Helper Fajının Kesim Enzimleri ile Doğrulanması	72
3.9. Helper Faj Titrasyon Analizi	72
3.10. Anti-PD-L1-scFv Antikor Faj Kütüphanesi Titrasyon Analizi	73
3.11. Anti-PD-L1-scFv Antikor Faj Kütüphanesi Afinite Seçim (Biopanning) Ürünlerinin Kontrolü	74
3.12. Poliklonal Faj ELISA Analizi	76
3.13. Monoklonal Faj ELISA Analizi	76
3.14. Monoklonal Faj ELISA Pozitif Plazmid Örneklerinin PCR ile Kontrolü	78
3.15. Anti-PD-L1-scFv Genine 6xHis-Tag Eklenerek Taşıyıcı Plazmidine ve Ekspresyon Plazmidine Klonlanması	78
3.16. HEK293 Hücrelerinde Anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss Pozitif Master Hücre Elde Edilmesi	81

3.17. Ni-NTA Saflaştırma Kiti ile Elde Edilen Anti-PD-L1-scFv-His Antikorumun Doğrulanması	82
3.18. Anti-PD-L1-scFv Antikorumun PD-L1 Ligand Bağlama Analizi	83
3.19. Anti-PD-L1-scFv Antikorumun In Vivo Etkinlik Analizi	83
4. TARTIŞMA	86
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
ÖZET	90
SUMMARY	92
KAYNAKLAR	94
EKLER	100
EK-1: Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Kararı	100
ÖZGEÇMİŞ	102



ÖNSÖZ

İmmünoterapi seçeneklerinden biri olan immün kontrol noktası (PD-1/PD-L1) inhibitörleri, günümüzde birçok ileri evre kanser türlerinin tedavisinde etkili ve kalıcı sonuçlar sağladığı için kanser tedavisinde büyük bir öneme sahiptir. Ancak bu tedavilerin her hasta grubunda etkili olamaması ve immün ilişkili yan etki potansiyelinin yüksek olması nedeniyle çeşitli tanı ve tedavi alternatifleri üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisi ve faj gösterim yöntemi ile üretilen anti-PD-L1-scFv antikorunun PD-L1 proteinine spesifik olduğu ve PD-L1 pozitif fare tümör modelinde etkili sonuçlar sağladığı gösterilmiştir. Üretilen bu antikorun kanser hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunu saptayabilme ve diğer anti-kanser tedavi seçenekleri ile kombine edilebilme potansiyeli olduğu için yeni immünoterapi tanı ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 21L0230015 proje numarası ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun 216S570 proje numarası ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimime başladığımdan beri bana desteğini, anlayışını, sabrını ve bilgisini esirgemeyen ve bugünkü ben olmama büyük katkısı olan değerli danışmanım ve hocam Prof. Dr. Hakan Akbulut'a en büyük minnet ve saygıyla teşekkür ederim.

Bu süreci birlikte atlattığımız, desteğini, sevgisini ve iyi niyetini hep üzerimde hissettiğim Samira Abdi Hakiki'ye yürekten teşekkür ederim.

Birlikte çalıştığımız, benzer aşama ve sıkıntılardan geçtiğimiz Tümör Biyolojisi Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

En önemlisi de stresli süreçlerimde beni içtenlikle dinleyip destek olan, arada mesafe olsa bile hiç yokmuş gibi hissettiren biricik ailem annem Nazire Babahan, babam Mehmet Emin Babahan, ablam Derya Ergun, ailemize iyi ki katılan eniştem Mustafa Ergun, bana teyzelik duygusunu tattıran canım Defne'm ve kardeşim Ahmet Babahan'a ayrı ayrı hiç tükenmeyecek sevgimle teşekkür ederim.

Bu tezi bana güçlü bir kadın olmayı öğreten, her daim arkamda olan ve beni benden çok düşünen canım annem Nazire Babahan'a ithaf ediyorum...

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADCP	Antibody Dependent Cellular Phagocytosis
APC	Antigen Presenting Cell
BHK	Baby Hamster Kidney
bp	Base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CHO	Chinese Hamster Ovary
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity
CDR	Complementarity Determining Regions
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CH	Constant region of the heavy chain
CL	Constant region of the light chain
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
dk	Dakika
dNTP	Deoxynucleoside triphosphates
DNA	Deoxyribonucleic Acid
°C	Derece santigrat
DMSO	Dimetil sülfoksit
D	Diversity
dsDNA	Double strand DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
E. coli	Escherichia coli
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable

xg	G kuvveti
GC	Guanine Cytosine
HF	High Fidelity
His	Histidine
HRP	Horseradish Peroxidase
HEK293	Human Embryonic Kidney 293
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IHC	Immunohistochemistry
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
ITSM	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Ig	İmmünglobulin
J	Joining
κ	Kappa
kDa	kilodalton
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
λ	Lamda
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
LB	Luria Bertani
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger RNA
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
mAb	Monoclonal antibody
ng	Nanogram
nm	Nanometre

Ni-NTA	Nickel-charged Nitriloacetic acid
ORF	Open Reading Frame
OD	Optical density
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline/Tween
PEG	Polietilen glikol
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potential hydrogen
PD-1	Programmed cell death protein 1
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
rAb	Recombinant antibody
RHK	Renal hücreli karsinom
Rpm	Revolutions per minute
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RIN	RNA Integrity Number
sn	Saniye
SHP-2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2
sdAb	Single domain antibody
ssDNA	Single strand DNA
scFv	Single-chain fragment variable
NaCl	Sodyum klorür
TCR	T cell receptor
TMB	Tetrametilbenzidin
TEA	Triethylamine
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocytes
U	Unit
V	Variable
VH	Variable domain of heavy chain
VL	Variable domain of light chain
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	T hücre aktivasyon ve düzenleme mekanizmaları	3
Şekil 1.2.	Kanser immünoterapi stratejileri	8
Şekil 1.3.	Bir antikorun yapısı ve bileşenleri	12
Şekil 1.4.	Antikor repertuarının oluşmasında rol alan immünglobulin genleri ve gen düzenleme mekanizmaları	14
Şekil 1.5.	Rekombinant antikor format örnekleri	16
Şekil 1.6.	Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretim basamakları	19
Şekil 1.7.	Filamentöz M13 fajının yaşam döngüsü	22
Şekil 1.8.	Faj gösterim antikor kütüphane tasarım türleri	26
Şekil 1.9.	İmmün kütüphane kaynaklı scFv faj antikor kütüphanesi oluşum basamakları	29
Şekil 1.10.	scFv-görüntüleyen fajın ve faj görüntüleme basamaklarının şematik gösterimi	32
Şekil 2.1.	İmmünizasyon takvimi	37
Şekil 2.2.	5'-RACE Yöntem Basamakları	40
Şekil 2.3.	İmmünglobülin VH ve VL bölgelerini birleştiren Overlap Extension PCR özet şeması	42
Şekil 2.4.	pADL20c fajemid vektörünün yapısı	44
Şekil 2.5.	Rekombinant DNA teknolojisi aşamaları	45
Şekil 2.6.	Anti-PD-L1-scFv antikorunun eksprese ve saflaştırılması için dizisine eklenmesi gereken bileşenler	57
Şekil 2.7.	Anti-PD-L1-scFv-His geninin pJET1.2/blunt vektörüne klonlanma şeması	58
Şekil 2.8.	Anti-PD-L1-scFv-His geninin pFuse2ss-CLIg-ratK ekspresyon plazmidine klonlanma şeması	59
Şekil 3.1.	İzole edilen total RNA örneğinin agaroz jel elektroforezi	66
Şekil 3.2.	İzole edilen total RNA örneğinin Bioanalyzer cihazı ile RIN değerinin belirlenmesi	67
Şekil 3.3.	5'-RACE PCR ile çoğaltılan rat immünglobulin hafif (VL) ve ağır (VH) domainleri	68
Şekil 3.4.	Linker bağlantı bölgesi eklenen VL ve VH immünoglobulin molekülleri	68
Şekil 3.5.	Linker bağlantı bölgesinden bağlanan VH+VL molekülleri ve bu aşamada uygulanan PCR koşulları	69

Şekil 3.6.	pADL20c vektörünün NheI ve ECORI kesim enzimleri ile doğrulanması	70
Şekil 3.7.	Plazmid izolasyonundan sonra SfiI kesimi yapılarak ligasyonu doğrulanan anti-PD-L1-scFv ürünü	71
Şekil 3.8.	İyi ayrılmış M13 helper faj plaklarının görüntüsü	71
Şekil 3.9.	M13 fajının BamHI ve HindIII ile kesimi	72
Şekil 3.10.	M13 Helper faj titrasyon plakları	73
Şekil 3.11.	Anti-PD-L1-scFv antikör faj kütüphane titrasyon sonuçları	74
Şekil 3.12.	Birinci afinite seçim ürünleri	75
Şekil 3.13.	İkinci afinite seçim ürünleri	75
Şekil 3.14.	Üçüncü afinite seçim ürünleri	76
Şekil 3.15.	Monoklonal faj ELISA pozitif plazmid örneklerinin PCR'ından elde edilen PD-L1-scFv örnekleri	78
Şekil 3.16.	Kesim enzim bölgeleri ve 6X Histidin etiketi içeren anti-PD-L1-scFv-His ürünü	79
Şekil 3.17.	pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmış anti-PD-L1-scFv-His ürününün XhoI/XbaI enzimleri ile doğrulanması	79
Şekil 3.18.	Anti-PD-L1-scFv-His taşıyan pJET1.2/blunt plazmidini (A) ile pFUSE2ss-ratK ekspresyon plazmidinin (B) ECORI ve XhoI ile kesimi	80
Şekil 3.19.	pFUSEss vektörüne klonlanmış anti-PD-L1-scFv-His ürününün ECOR/XhoI enzimleri ile doğrulanması	81
Şekil 3.20.	pFUSE2ss-scFvPDL1 ifade plazmidini transfekte edilen HEK293 hücrelerinden master hücre eldesi için pozitif klon seçilmesi	82
Şekil 3.21.	Anti-His Tag antikörü ile doğrulanan yaklaşık 28 kDa büyüklüğündeki anti-PD-L1-scFv-His antikörü	82
Şekil 3.22.	Anti-PD-L1-scFv antikörünün farklı dilüsyonlarda PD-L1 antijeni ve BSA proteinine bağlanma absorbanlarının oranlanması	83
Şekil 3.23.	4T1 tümör modeline uygulanan tedavi gruplarının sağkalım eğrileri	84
Şekil 3.24.	4T1 tümör modeline uygulanan tedavi gruplarında izlenen tümör büyüme eğrileri	85

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Faj gösterim yönteminde kullanılan solüsyon içerikleri	36
Çizelge 2.1.	Dalak hücrelerinden immünglobulin VH ve VL domainlerinin çoğaltılması için tasarlanan primerler	39
Çizelge 2.2.	İmmünglobulin VH ve VL domainlerini birleştirmede kullanılacak bağlantı bölgesine spesifik tasarlanan primerler	40
Çizelge 3.1.	Rat serumlarında anti-PD-L1 antikor titresinin belirlenmesi amacıyla yapılan ELISA sonuçları	65
Çizelge 3.2.	Poliklonal faj ELISA absorbans sonuçları	76
Çizelge 3.3.	Monoklonal faj ELISA absorbans sonuçları	77
Çizelge 3.4.	4T1 tümör modeline uygulanan tedavi gruplarının medyan sağ kalım süreleri (*Log Rank Mantel-Cox)	84

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, Türkiye dahil olmak üzere tüm dünyanın en önde gelen ölüm nedenlerinden biri olup, 2020 yılında küresel ölçekte tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir (Ferlay ve ark., 2021). Küresel kanser yükünün 2040 yılında, 2020'ye göre %47 artışla 28,4 milyon vaka olması beklendiğinden (Sung ve ark., 2021) kanserin erken teşhis ve tedavisi büyük önem taşımaktadır.

1.2. Kanser ve İmmün Sistem

İnsan vücudundaki hayati sistemlerden biri ve ana işlevi vücudu bulaşıcı ajanlardan ve patojenlerden korumak olan immün sistem, doğal bağışıklık ve adaptif (kazanılmış) bağışıklık olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Doğal bağışıklık, yabancı istilasını önleyen fiziksel bir bariyer olarak işlev görmektedir ve yabancı moleküllerin vücuda girişinin engellenemediği durumda, ikinci savunma hattı olan adaptif bağışıklık devreye girmektedir (Angela Chiew Wen ve ark., 2016).

Vücudun adaptif immün yanıtlarından sorumlu iki temel lenfosit grubundan biri olan B hücreleri dolaşımdaki antijeni doğal olarak tanıyıp yanıt olarak koruyucu antikörlerin salgılanmasını sağlarken, T hücreleri antijen sunumu sürecinde rol alarak, hücre içinde parçalanıp hücre yüzey Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) moleküllerine yüklenen peptit antijenleri tanır (LeBien ve Tedder, 2008). Farklı efektör mekanizmalara sahip iki ana T hücre sınıfı, CD4 veya CD8 yardımcı reseptörün ifadesine göre sınıflandırılmaktadır. CD4⁺ T hücreleri, MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla antijeni algılar ve kemotaktik, pro-inflamatuvar ve immün koruyucu özelliklere sahip sitokinler üreterek immün sistemin adaptif kolunu yönetir. CD8⁺ T hücreleri ise, MHC sınıf I molekülleri aracılığıyla antijeni algılar ve enfekte

veya neoplastik hücreleri doğrudan öldüren sitotoksik reaksiyonları yürütür (van den Broek ve ark., 2018).

Kanser, transforme hücrelerde evrensel epigenetik değişikliklere yol açan genetik mutasyonların birikmesi sonucu meydana gelmektedir. Bu genetik ve epigenetik değişiklikler, potansiyel olarak tümörün ortadan kaldırılabilmesi için immün sistem tarafından tanınabilen neoantijenlerin oluşmasına yol açabilir (Kinker ve ark., 2021).

1.2.1. Antijen Sunumu ve T Hücre Aktivasyonu

CD8⁺ T hücrelerinin neoantijenlere karşı aktivasyonu ve proliferasyonu için, eşsiz bir klona spesifik hücre yüzey protein kompleksi olan ve antijenleri spesifik olarak tanıyan T hücre reseptörünün (TCR) neoantijen uyarımı dışında, erken sinyal iletiminde gerekli olan fosforilasyon olaylarının meydana gelebilmesi için ko-stimülasyon adı verilen ek bir sinyale ihtiyaç vardır. Antijen sunan hücrelerde eksprese edilen polimorfik olmayan yüzey protein CD28 ve aile üyeleri, T hücreleri üzerindeki en güçlü ko-stimülatör reseptörlerdir.

Aktivasyondan önce, antijen sunan hücreler (APC'ler), üzerinde bir TCR eksprese eden T hücresi ile temasa hazırlanmak için antijeni MHC moleküllerine yüklerken, aynı zamanda gerekli yardımcı uyarıcı ligandlar olan B7-1 ve B7-2'yi sağlar. İnhibitör molekül sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4), antijenle karşılaşmamış naif T hücrelerinde hücre içi veziküller içerisinde bulunurken, düzenleyici T (Treg) hücrelerinin yüzeyinde yapısal olarak eksprese edilir. Yardımcı uyarıcı reseptör CD28 hem naif T hücreleri hem de Treg hücrelerinin ikisinde de eksprese edilmektedir. Aktivasyondan hemen sonra, genellikle lenfoid dokuda T hücreleri, CD28'in B7-1/B7-2'ye ve TCR'lerin APC'ler tarafından sunulan antijenlere bağlanması sonucu aktive olur. Ayrıca aktive olan T hücrelerinin yüzeyinde CTLA-4 eksprese olmaya başlar. Periferik dokulardaki T hücreleri, programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1)'i mRNA seviyesinde yükseltir. Aktivasyondan sonra, lenfoid dokuda,

1.2.2. T Hücre İmmün Kontrol Noktaları

Bölüm 1.2.1’de anlatılan T hücre aktivasyon sürecinde de görüldüğü üzere, T hücre aktivasyonunun evrimsel olarak korunan ve immün yanıtların dengede tutulması ile hiperaktivasyonun düzenlenmesini sağlayan birkaç negatif düzenleyicisi vardır. Bu T hücre immün kontrol noktası moleküllerinin en etkili örnekleri CTLA-4 ve PD-1/PD-L1’dir. Bu moleküller, fonksiyonel olarak birbirlerini tamamlayıcı olup biyolojik etkilerini T hücre ömrü boyunca vücudun farklı bölgelerinde ve farklı zamanlarda gösterirler. Böylece, vücudu patojenlerden ve neoplaziden etkili bir şekilde korurken, T hücre yanıtlarının self-toleransı korumasını sağlayarak otoimmün hastalıkların oluşmasını önler (He ve Xu, 2020).

1.2.3. Kanser Hücrelerinin İmmün Sistemden Kaçış Mekanizmaları

Kanser ve immün sistem arasında 'kanser immün düzenlenmesi' olarak adlandırılan immün yanıtların bir taraftan tümör hücrelerini ortadan kaldırabilirken diğer taraftan tümör gelişimini teşvik edebildiği dinamik ve sürekli gelişen bir etkileşim söz konusudur.

İmmün sistem-kanser etkileşim sürecinin genellikle eliminasyon, denge ve kaçış olarak adlandırılan üç aşamadan oluştuğu kabul edilir. Eliminasyon aşamasında, genellikle karsinogenezin ilk aşamalarında, immün sistem yeni oluşan kanser hücrelerini agresif bir şekilde yok eder. Tüm kanser hücrelerinin ortadan kaldırılamadığı durumda immün sistemin tümör büyümesini kontrol ettiği ancak tamamen ortadan kaldıramadığı bir denge fazının oluşmasına neden olabilir. Bu aşamada tümörlerin bir dereceye kadar immün sistem kaçtığı kabul edilir ve bu süreç tümör hücrelerinin daha az immünojenik hale gelmesini sağlayacak veya lokalize bir immünsupresif durumu tetikleyecek mutasyonların birikmesine neden olarak kanser hücrelerinin immün gözetimden daha fazla kaçınmasını tetikleyebilir (Waldman ve ark., 2020).

Tümör hücreleri immün sistemden kaçabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Tümörler, T hücrelerini tümör mikro çevresine girişini engelleyerek veya tümöre başarılı bir şekilde göç eden T hücrelerini immünesupresif faktörler ile etkisiz hale getirerek hücrel immün yanıtlardan kaçmaya çalışabilir (Spranger ve Gajewski, 2018). Tümör mikro çevresinde, tümöre spesifik antijenlerin ekspresyon kaybı ve/veya immün sistemin antijeni tanması ile ilgili genlerdeki mutasyonların birikmesi ile tümör hücreleri immünojenitelerini kademeli olarak azalttığı için immün sistemden kaçabilir. Özellikle, MHC I ekspresyonunun kaybı, T hücre sitotoksik yanıtlardan kaçmaya çalışan tümörler tarafından oldukça yaygın kullanılan bir mekanizmadır (Mpakali ve Stratikos, 2021). Tümör hücreleri, ayrıca immün sistemin homeostazında rol oynayan immün kontrol noktaları olan PD-1/PD-L1'in etkileşimini kullanarak anti-tümör immün yanıtlardan kaçabilir. PD-L1'in melanom, over, akciğer, kolon ve böbrek karsinomları dahil birçok farklı tümörde eksprese olduğu gösterilmiştir. Tümör hücrelerinin yanı sıra, makrofajlar, dendritik hücreler, aktive T hücreleri ve kanser ile ilişkili fibroblastlar gibi tümör mikro çevresindeki diğer bazı hücreler de PD-L1'i eksprese ederek tümör büyümesini destekleyen immünesupresif bir mikro çevrenin oluşmasına katkıda bulunabilir. Bu şekilde PD-1/PD-L1'in tümör mikro çevresindeki artan etkileşimi, T hücrelerinin işlev bozukluğuna, tükenmesine, apoptozuna ve nötralizasyonuna neden olmaktadır (Akinleye ve Rasool, 2019). Tümör hücrelerindeki bu kaçış mekanizmasının anlaşılmasıyla, PD-1/PD-L1 sinyalinin inhibe edilmesi yoluyla düzensiz tümör mikro çevresinin normale çevrilme stratejisi üzerinde çalışılmış ve immün kontrol noktası inhibitörleri geliştirilmiştir.

1.3. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser gelişimi sırasında hücreler genel bir büyüme kontrolü kaybı ile paralel çeşitli moleküler özellikler kazanarak oldukça heterojen ve kompleks bir hücre topluluğu oluşturur. Bu topluluktaki hücre gruplarının anti-tümör tedavilere karşı verdikleri yanıtlar farklılık gösterdiğinden kanser tedavi süreci zorlaşmakta ve karmaşık hale gelmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinde, cerrahi, radyasyon tedavisi, kriyoterapi ve ısı veya kimyasal ablasyon gibi lokalize tedaviler ve/veya sistemik tedaviler (örn. kemoterapi, hormon tedavisi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi) kullanılmaktadır (Debela ve ark., 2021). Ancak tüm bu tedavi yöntemlerine rağmen istenilen başarı oranına henüz ulaşamamıştır.

Geleneksel tedavi yöntemleri olarak adlandırılan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi ile erken evrede tanı konulan hastalarda genellikle %60'ların üzerinde şifa sağlanabilirken, ileri evrelerdeki hastalarda şifa oranı %5'in altında kalmaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde en sık kullanılan kemoterapi ajanları tümör hücrelerine spesifik olmayıp, hızlı çoğalan diğer normal dokuları (kemik iliği, saç ve sindirim sistemi mukozası) da etkilemesinden dolayı ciddi sitotoksitenin oluşmasına neden olmaktadır (Akkın ve ark., 2021).

Tümör hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen reseptörlerin varlığının keşfedilmesi yeni tedavi seçeneklerinin kanser hücrelerine yönlendirilmesine yol açmış ve böylece kemoterapi ajanlarının toksisitesinde bir azalma sağlanmıştır (Padma, 2015). Bu kapsamda üretilen hedefe yönelik tedaviler olan monoklonal antikolar ve tirozin kinaz inhibitörleri, tümör hücrelerinin büyüüp gelişebilmek için tümör mikro çevresini oluşturan diğer hücrelerle etkileşime girdiği çeşitli sinyal yollarını hedef alarak (hücre döngüsünün durdurulması, apoptozun indüklenmesi, proliferasyonun engellenmesi vb.) kanserin büyümesini ve yayılmasını engellemeyi amaçlamaktadır. Bu ilaçlar, kanser tedavisinde başlangıçta büyük umutlar doğurmuş olmasına karşın rutin kullanımla birlikte gastrointestinal stromal tümörlerde ve kronik myeloid lösemide imatinib, böbrek tümörlerinde sunitinib, meme kanserinde trastuzumab, kolorektal kanserde cetuximab, non-Hodgkin lenfomada rituximab gibi birkaç ilacın dışında başarı öyküsü olarak görülebilecek etkinliğe sahip ilaçlar geliştirilememiştir (Pottier ve ark., 2020; Zahavi ve Weiner, 2020).

1.3.1. Kanser İmmünoterapisi

Kanser immünoterapisi, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması için vücudun immün sistemini hedef almakta ve monoklonal antikorlar/immün kontrol noktası inhibitörleri, adoptif T hücre tedavisi, sitokin tedavisi, kanser aşuları ve onkolitik virüs tedavisi stratejilerinden oluşmaktadır (Sharma ve ark., 2022).

Adoptif T hücre tedavisinde tümör dokusuna karşı T hücre sayısının, spesifitesinin ve reaktivitesinin artırılması amaçlanır. Bunun için hastadan alınan T hücreleri laboratuvar ortamında çoğaltılabilir veya spesifik tümör antijenlerine yönelik bir kimerik antijen reseptörü (CAR) ya da TCR eksprese etmesi için genetik olarak değiştirilebilir. Bu amaçla, B hücreli akut lenfoblastik lösemi için Kymriah, diffüz büyük B hücreli lenfoma için Yescarta ve nükseden veya dirençli manto hücreli lenfoma tedavisi için Brexucabtagene autoleucel (brexu-cel) gibi CD19-hedefli CAR T hücre ürünleri FDA tarafından onaylanmıştır (Kirtane ve ark., 2021). Onkolitik virüsler, normal dokuya herhangi bir zararlı etkisi olmadan, seçici olarak kanser hücrelerini hedef alarak ortadan kaldıracak genetiği değiştirilmiş virüslerdir. Modifiye bir herpes simplex virüsü olan Talimogene laherparepvec (T-VEC) melanomlu hastaların alt gruplarının kullanımında onay almıştır (Santos Apolonio ve ark., 2021). Dendritik hücreler veya dendritik hücreleri aktive eden adjuvanlar ile tümör antijenlerinin kombinasyonu olan kanser aşuları, hastanın adaptif immün sistemini spesifik tümör antijenlerine karşı uyararak tümörlerin gerilemesini ve güçlü bir anti tümör hafızası oluşturmayı amaçlar. Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserli hastalarda onaylanan dendritik hücre bazlı bir aşı olan sipuleucel-T dışında piyasada onaylı başka kanser aşısı bulunmamaktadır (Saxena ve ark., 2021). Sitokinler, otokrin ve parakrin sinyaller yoluyla bir haberci gibi davranarak doğal ve adaptif immünitinin düzenlenmesinde etkili bir rol oynadıkları için anti tümör efektör fonksiyonların kazanılmasında önemlidirler. CD4⁺ T hücrelerini T yardımcı tip 1 efektör hücrelerine dönüştüren ve MHC sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu arttıran IFN α , çeşitli kanser türlerinin tedavisinde onay almıştır. T hücre yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunan IL-2 ise metastatik melanom ve metastatik

atezolizumab, üçlü negatif meme kanseri ve metastatik KHDAK tedavisinde onay almıştır (Reddy ve ark., 2020). Durvalumab ve avelumab gibi diğer anti-PD-L1 antikolar, ileri KHDAK, ürotelyal kanser ve Merkel hücreli karsinomun tedavisinde onay almışlardır (You ve ark., 2020).

İmmün kontrol noktası inhibitörleri kanserin gerilemesinde kalıcı sonuçlar sağlasa da hastaların büyük çoğunluğu bu tedavilere yanıt vermemekte veya ilk yanıt döneminden sonrasında nüks meydana gelmektedir (Mpakali ve Stratikos, 2021). Bu nedenle tedavi etkinliğini artıracak farklı tasarlanmış tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Ayrıca ilaçların immün ilişkili yan etkilere sahip olması ve yüksek tedavi maliyetleri de düşünüldüğünde immün kontrol noktası inhibitörlerinden yarar sağlayacak hastaların seçimi için prediktif biyobelirteçlerin tanımlanması önemlidir. Klinik çalışmalarda tümör dokusunda immünohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu olduğu gösterilen hastalarda daha yüksek oranda tedavi yanıtı elde edildiği saptanmıştır (Reck ve ark., 2016; Taube ve ark., 2014; Topalian ve ark., 2012). Bu nedenle tümörlerdeki PD-L1 ekspresyonunun, bu molekülü hedefleyen tedavilerin yanıtlarında prediktif bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir. Günümüzde kullanılan PD-L1 immünohistokimya (IHC) analizinde farklı firmaların platformları kullanılabileceğinden farklı antikolar, farklı analiz sistemleri ve hem aynı hastada primer ve metastatik lezyonlar arasındaki hem de aynı tümör lezyonunun seri kesitleri arasındaki PD-L1 ekspresyonunun heterojenliği gibi çeşitli kısıtlılıklar mevcuttur (Patel ve Kurzrock, 2015; You ve ark., 2020). Bu nedenle tümörlerdeki PD-L1 ekspresyon seviyesinin daha doğru oranlarda saptanabilmesi için alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

1.4. Monoklonal Antikolar

Monoklonal antikolar 1970'lerin ortalarından bugüne, biyomedikal, toksikoloji, biyofarmasötik araştırma ve biyolojik bilimler alanlarında keşif ve gelişmelere öncülük etmiştir. Günümüzde klinik uygulamalar için 80'den fazla mAb onaylanmış olup, çok daha fazlasının klinik öncesi ve klinik çalışmaları devam

etmektedir (Kaplon ve ark., 2020). Biyofarmasötik ürünlerin en önemli sınıflarından biri haline gelen ve dünyada en çok satılan 10 ilaçtan altısı olan bu mAb'ların küresel pazar değeri 2018 yılında 115 milyar dolar olup, bu miktarın 2025'e kadar yaklaşık 300 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Lu ve ark., 2020).

1.4.1. Antikor Yapısı

İmmünglobulin (Ig) olarak bir antikor, vücudun patojenlerle karşılaştıktan sonra yanıt olarak adaptif immün sistemin humoral bileşenini oluşturan ve farklılaşmış B lenfositleri tarafından üretilen bir glikoproteindir (Z. Wang ve ark., 2022). İnsanlar IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olarak adlandırılan beş farklı Ig izotipi üretir. Bunlar arasında IgG serumda en yaygın bulunan izotip olup, izotipler arasında en uzun serum yarı ömrüne sahiptir (Schroeder ve Cavacini, 2010). En önemlisi de IgG, terapötik uygulamalar konusu ile en ilişkili sınıftır.

Moleküler ağırlığı yaklaşık 150 kDa olan Y şeklindeki bir IgG, tetramerik bir yapı oluşturmak üzere birbirlerine kovalent disülfid bağları ile bağlanmış iki büyük ağır (H) zincir (Igh) ve iki hafif (L) zincirden (IgL veya Igλ) meydana gelir. Molekül içerisinde her bir hafif zincir genellikle bir N-terminal değişken alan (VL) ile bir sabit alandan (CLκ veya CLλ) oluşurken, IgG1'in her bir ağır zinciri, N-terminal değişken alandan (VH) ve onu takip eden üç sabit bölgeden (CH1-CH3) oluşur.

Fonksiyonel olarak bakıldığında bu izotip, antijene spesifik olarak bağlanan ve antijenin inhibe veya nötralize edilmesinden sorumlu ağır zincir (VH) ve hafif zincir (VL) değişken alanlarını içeren iki özdeş fragmente (antijen bağlanma fragmenti, Fab) ve çeşitli Fc reseptörlerine ve kompleman proteinlere bağlanarak efektör fonksiyonlara ve uzun serum yarı ömrüne aracılık eden kristalize edilebilen fragmente (Fc) sahiptir (Lu ve ark., 2018). Fc bölgesi olarak da isimlendirilen bu sabit bölge, mAb'ın sınıfını ve fonksiyonunu, antikora bağımlı hücre sitotoksitesisi (ADCC), antikora bağımlı hücrel fagositoz (ADCP) ve komplemana bağımlı

sitotoksiste (CDC) dahil olmak üzere antikorların efektör fonksiyonlarını belirlemektedir (Stanfield ve Wilson, 2014).

Her bir Fab fragmenti, ağır zincirin VH-CH1 bölgesinden ve tüm hafif zincirden (VL-CL κ veya λ) oluşan bir heterodimerdir. Fab bölgesi içerisinde, VH ve VL paratop olarak adlandırılan antijen bağlanma bölgesi bulunur. Bu paratop, sırasıyla ağır zincir ve hafif zincirin değişken alanının üç hiper-değişken halkasından oluşur. Bu hiper-değişken halkalar tamamlayıcılık belirleyici bölgeler (CDR'ler) olarak adlandırılmakta ve halka uzunluğu ve amino asit kompozisyonu açısından olağanüstü değişkenlik sunmaktadır. Genel olarak, bu CDR'ler antijen tarafından gösterilen spesifik epitopu tespit eder ve mikrobun ya da enfekte olmuş hücrenin immün sistem tarafından tanınip nötralizasyonunun başlaması için etiketler (Ahmad ve ark., 2012).

Antikorlar iki özdeş Fab kolu içerdiğinden, antijen bağlanması bivalent ve monospesiftir. İki özdeş hedefin eş zamanlı olarak bivalent bağlanması, her iki Fab kolunu ve Fc kısmı birbirine bağlayan ve yeterli esnekliğe aracılık eden menteşe bölgesi tarafından sağlanır (Thouvenin ve ark., 1997) **Şekil 1.3**'de bir antikorun yapısı ve bileşenleri gösterilmektedir.

Antijen reseptör rekombinasyon işlemi olan V(D)J rekombinasyonu sırasında, her gen grubundaki bir gen, başka bir gruptaki bir gen ile birleştirilir. IgH rekombinasyon işleminde, bir D geni bir J geni ile birleştirildikten sonra elde edilen DJ geni, ağır zincirin değişken alanını kodlayan fonksiyonel VH ekzonunu oluşturmak için bir V geni ile birleştirilir. Hafif zincir rekombinasyon işleminde ise, Igk veya Igl gen bölgelerinde bir J geninin, bir V geni ile birleştirilmesiyle fonksiyonel hafif zincir değişken alan (VL) oluşturulur. Her gen bölgesinde V(D)J rekombinasyonu sırasında yaratılan VJ veya VDJ elementlerinden oluşan değişken bölge ekzonu daha sonra RNA uç birleştirme (splicing) yoluyla bir sabit (C) bölgesine kaynaştırılır. İşlem rastgele olduğundan, olası VDJ veya VJ genlerinin sayısı sırasıyla V, D ve J genlerinin veya V ve J genlerinin sayısının çarpımıdır. Toplam çeşitlilik ise, VDJ-Igλ VJ kombinasyonları ile VDJ-Igκ VJ kombinasyonlarının toplamıdır. Bir antikor, bir ağır zincir molekülünün (IgH) ve bir hafif zincirin Igk veya Igl zincir moleküllerinden biri ile oluşturduğu dimerdir (Little ve ark., 2015).

Tüm B hücre reseptör zincirlerinin ilk iki CDR bölgesi (CDR1 ve CDR2) germ hattı V genleri tarafından tamamen kodlanırken hem VH hem de VL'lerdeki CDR3'lerin kodlama dizileri somatik olarak yaratılır. İmmünglobulinlerin VH alanını kodlayan VDJ rekombinasyonu sırasında, ağır zincir CDR3 (CDR-H3) bölgesinde VH/DH ve DH/JH segmentleri arasında P-nükleotit veya N-nükleotit aracılı ekleme ve ekzonükleaz aracılı nükleotit kaybı ile, her bir B hücre klonu için spesifik olması sağlanarak CDR3 çeşitliliği önemli ölçüde arttırılır (D'Angelo ve ark., 2018). Büyük çeşitlilik potansiyeli nedeniyle CDR-H3, bir antikor molekülünün bağlanma aktivitesi ve özgüllük kazandırmadaki en önemli bileşeni olarak kabul edilmektedir (Lemke, 2018). **Şekil 1.4'**de, A'da her bir Ig zincirindeki antijen reseptör gen bölgeleri, bu genlerin uzunlukları (nt), segment sayıları (n) ve hangi kromozomda bulunduğu, B'de hafif zincir ve ağır zincirdeki V(D)J genlerinin yeniden düzenlenmesi ve ağır zincirin CDR3 bölgesindeki somatik hipermutasyon ile çeşitlendirilmiş bir antikor molekülü gösterilmektedir.

antikorlar, sentetik genler kullanılarak in vitro üretilen monoklonal antikorlar olup geleneksel antikorlara kıyasla spesifite ve düşük immünojenite avantajlarına sahiptir. Özet olarak, antikorun ağır ve hafif zincirlerinin izole edilerek bir ekspresyon vektörüne dahil edildikten sonra ortaya çıkan plazmidlerin bir konakçı ifade sistemine transfekte edilmesi ve ifade edilmesi sağlanır. Bu teknoloji sayesinde antikor üretim süresi yöntemine bağlı olarak yaklaşık bir-iki aya indirilmektedir. Ortaya çıkan rekombinant antikorlar, geleneksel olarak üretilen monoklonal antikorların uygulandığı alanların çoğunda kullanılabilir.

Antikordlarda değişkenlik esas olarak antijenlerin bağlandığı V bölgesinden (Y ucunun iki kolu) kaynaklanmaktadır. Bu nedenle V bölgesinin bağlanma özelliklerinden yararlanmak için rekombinant DNA teknolojisi ile fragment antijen bağlama (Fab), domain antikorlar, tek zincir fragment değişkeni (scFv), diabody, tetrabody, minibody ve tek zincir fragment antijen bağlama (scFab) gibi çeşitli antikor formatları geliştirilmiştir (Holliger ve Hudson, 2005). Antikor fragmentleri sitotoksik proteinler, radyonüklidler veya ilaçlar gibi çeşitli toksinler ile birleştirilerek immüntoksinler olarak kullanılabilir. Oluşturulan bu immüntoksinler böylece taşıdıkları ajanlarını antijen sunan hücrelere sunarak immün sistemin tümöre karşı aktivasyonunu sağlayabilir (Ahmad ve ark., 2012). Rekombinant antikorlar, saflaştırma veya immüno-presipitasyon için etiketler (örn. 6X Histidin), kimyasal alanı arttırmak için konjugasyon bölgeleri veya antijen tanıma belirleyicilerini haritalamak için mutajenez dahil olmak üzere ek işlevselliklere sahip olacak şekilde tasarlanabilir (Basu ve ark., 2019). **Şekil 1.5**'te rekombinant antikor formlarına örnekler verilmiştir.

arttırılması amaçlanır. scFv'nin haptin, protein, karbohidrat, reseptör, tümör antijeni ve virüsler gibi çeşitli antijenlere başarılı bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir (Ahmad ve ark., 2012).

scFv antikorlarının kanser teşhis ve tedavisinde tam bir antikor yapısına kıyasla çeşitli avantajları vardır. Molekül ağırlığının düşük olması nedeniyle tam antikorlara göre tümörlere ve diğer dokulara daha hızlı ve eşit bir şekilde nüfuz etmesi, hem tümör tedavisinde hem de görüntüleme kullanıma potansiyelini arttırır (Drees ve ark., 2014; Yokota ve ark., 1992). Kandan daha hızlı temizlendiğinden diğer ilaçlar ve radyonüklidler ile birleştirilebilir, böylece hem tedavinin ulaştırılması hem de sağlıklı dokuların ilaca maruziyetinin azaltılması sağlanır (Oriuchi ve ark., 2005). Ayrıca scFv antikorunun böbrekler tarafından alınmadığı ve tümörlere etkili bir şekilde lokalize olduğu gösterilmiştir. Fc kısmının bulunmaması da scFv fragmentlerinin immün sistemi uyarma potansiyelini azaltmakta ve bu da otoimmün yan etkiler açısından ana antikorlara göre bir üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca scFv antikoru haptinler, proteinler ve patojenler gibi çeşitli antijenlere bağlanabildiğinden başta immünohistokimya ve ELISA olmak üzere birçok yöntemde teşhis amaçlı kullanılabilir. scFv antikorunun bir floresan proteini ile birleştirilmesi sonucu antijen tayininin floresans ölçümü ile yapılması sağlanarak ELISA'dan daha hızlı ve basit bir teknikler oluşturulabilir (Ahmad ve ark., 2012).

1.4.2.3. Tek Domain Antikorlar (sdAb)

Domain antikorlar 11-15 kDa ağırlığında olup, sadece VH veya VL domaininden oluştuğu için, VH ve VL'den oluşan tam bir değişken bölgedeki olası altı CDR'den yalnızca üçüne sahiptir. Domain antikorlar, daha küçük boyutlarından dolayı tam uzunluktaki IgG'ye kıyasla dokuya verimli bir şekilde nüfuz edebilir ve ayrıca boyutu ve katlanması nedeniyle konvansiyonel antikorlara göre üretimleri daha kolaydır. Ayrıca, herhangi bir kuarterner yapıdan yoksun olduğundan üretimi ve stabilitesi, zor koşullarda kullanılmasına olanak sağlar. İyileştirilmiş ısı stabilitesi antikorların soğuk zincir olmadan kolayca taşınmasına izin vereceğinden, özellikle

sınırlı kaynaklara sahip bölgelerde bulaşıcı hastalıkların sahada teşhisine yönelik teşhis kiti geliştirmeye olanak tanır (Angela Chiew Wen ve ark., 2016).

1.5. Monoklonal Antikor Geliştirme Yöntemleri

Monoklonal antikor bazlı ürünlerin belirli bir antijene karşı üstün spesifite sergilemesi onları hastalıkların teşhis ve tedavisi dahil birçok uygulamada kullanılması için ideal bir araç haline getirir. Teşhis uygulamaları biyokimyasal analiz ve görüntülemeye dayanır. Biyokimyasal analizler, hormonal, doku ve hücre ürünlerinin tespitini sağlayan ELISA gibi bir dizi immünolojik testleri içerir. Görüntüleme ise hastalıkların teşhisi için radyoaktif olarak işaretlenmiş mAb'lar kullanılarak gerçekleştirilir. Terapötik mAb'lar kanser tedavisi, kemik iliği ve organ nakli, otoimmün hastalıklar, kalp ve damar hastalıkları ve çeşitli bulaşıcı hastalıkların tedavisi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılabilir. Tedavide mAb'lar doğrudan terapötik maddeler olarak kullanılabilir gibi hedefleme maddeleri olarak da kullanılabilirler (Saeed ve ark., 2017).

Monoklonal antikorlar hibridoma teknolojisi veya rekombinant antikor kütüphanelerinin afinite seçimi yoluyla geliştirilmektedir.

1.5.1. Hibridoma Teknolojisi

Köhler ve Milstein tarafından 1975 yılında keşfedilen hibridoma teknolojisi, tüm dünyada spesifik antikorlar üretmenin klasik bir yoludur. Özet olarak, deney hayvanlarının hedef antijen ile immünize edilmesinden sonra serum antikor titresi, ELISA ile belirlenir. Alınan dalaktan izole edilen B hücreleri hibridoma hücreleri üretmek için miyeloma hücreleri ile kaynaştırılır. Elde edilen hibridoma hücrelerinin yüksek verimlilikte taranması için hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) seçim besiyerini içeren 96 kuyulu plaklarda kültür edilir. ELISA yöntemi ile istenen antikorları üreten hibridoma hücreleri tarandıktan sonra, spesifik mAb'ları en iyi

1.5.2. Faj Gösterim Teknolojisi

Faj gösterim teknolojisinin 1985'te George P. Smith tarafından keşfi ve 1990'ların başlarında John McCafferty ve Sir. Gregory Winter'in bu teknolojiyi antikor üretiminde kullanmaları sayesinde, günümüze kadar kanser dahil çeşitli hastalıkların araştırma, tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere 70'den fazla faj kaynaklı antikorun üretimi yapılmış olup, bunların 14 tanesi klinik olarak onaylanmıştır (Alfaleh ve ark., 2020). Birçok onaylanmış antikor ilacı ve klinik deneylere giren terapötik antikorların büyük bir çoğunluğu büyük faj gösterim kütüphanelerinden veya faj gösterim yoluyla hümanizasyondan kaynaklı türetilen insan antikorlarıdır. Bu teknoloji aracılığıyla elde edilen terapötik antikorlar, en çok satan yirmi biyoteknoloji ilacının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (Barderas ve Benito-Peña, 2019). Kimyada ve biyofarmasötiklerin geliştirilmesinde devrim yarattıkları için, 2018 Nobel Kimya Ödülü'nün yarısı 'peptitlerin ve antikorların faj gösterimi' başlığı ile George P. Smith ve Sir Gregory Winter'a verilmiştir (Barderas ve Benito-Peña, 2019). Antikor görüntüleme teknolojilerinde faj, bakteri, maya, memeli ve ribozomal gibi çeşitli gösterim teknolojileri mevcuttur ancak, bu platformlar içerisinde en çeşitli ve en fazla klon (10^{11}) içeren kütüphaneler faj gösterim yöntemi ile oluşturulmaktadır (Valldorf ve ark., 2022). Faj gösterimi, Ff filamentöz faj kullanarak antikor üretimine yönelik daha hızlı ve uygun maliyetli bir çözüm sağlar. Genel olarak rAb üretimi, sentetik veya saf Fab, scFv veya nanokorların faj gösterim vektörlerine klonlanmasıyla bir antikor kütüphanesinin oluşturulması, panning işlemi yoluyla spesifik antijenlere karşı faj gösteren antikorların seçimi ve zenginleştirilmesi, monospesifik antikorların taranması ve antikorların ekspresyon sistemleri yoluyla rekombinant antikor üretimi adımlarını içerir (Saw ve Song, 2019).

Hibridoma antikor üretiminin neden olduğu kısıtlılıkların çoğu, rekombinant antikor kütüphanelerinin afinite seçimi (biopanning) yoluyla çözülmektedir. İnsan antikor faj görüntüleme kütüphaneleri gibi teknolojiler sayesinde, tamamen hümanize edilmiş antikorların tümü insan antikor genleri tarafından kodlandığı için fare türevli antikorların heterolog protein içeriği azaltılmış olur. Bu teknik sayesinde antikor gibi

yabancı bir protein, pIII kaplama protein genine kaynaşırken ve yüzeyinde sergilenirken düzgün bir şekilde katlanma ve antijenlere bağlanma yeteneğini korur.

İstenmeyen epitoplara karşı seçimin olmaması biopanning yaklaşımın özellikle güçlü bir avantajıdır. Tüm süreç in vitro yapıldığından, sıcaklık, tampon koşulları, antijen ligand konsantrasyonları kolayca kontrol edilebilir. Uygun seçim koşullarıyla, hayvan immünizasyonunun hibridoma yaklaşımına kıyasla antijenin rekombinant biopanning yoluyla değiştirilme şansı çok daha düşüktür. Rekombinant antikor kütüphanesi kullanmanın diğer bir avantajı, biopanning işlemindeki antikorların, DNA dizileme yoluyla kolaylıkla karakterize edilebilmesidir. Antikoron dizisi belirlendikten sonra rekombinant ifade sistemlerinde kolaylıkla üretilebilir (Basu ve ark., 2019).

1.5.2.1. Bakteriyofaj

Doğada her yerde bulunan ve insanlara zararsız olan bakteriyofajlar, replikasyon için konakçı bakteri hücrelerini kullanan olağanüstü sağlam ve kararlı virüs parçacıklarıdır. Fajlar, dört ila yüzlerce gen içeren RNA veya DNA genomunu içerisine alan bir protein kılıfından oluşur. Faj kaplama proteinlerinin peptitleri, proteinleri veya antikorları göstermek için kolayca konjuge edilebilmesi veya genetik olarak tasarlanabilmesi nedeniyle faj gösteriminde seçim için bakteriyofajların doğal replikasyon döngüsünden yararlanılmaktadır (Smith ve Petrenko, 1997).

M13 filamentöz (Ff), Fd ve Fl fajları, üretimlerinin hızlı ve ekonomik olmasını sağlayan kültür kolaylığı ve hızlı amplifikasyonları nedeniyle farklı antikor formatlarının gösteriminde en yaygın kullanılan *E. coli* fajlarıdır. Filamentöz bakteriyofajlar konakçılarının yüzeyinde eksprese edilen F pilusu ile bir faj kaplama proteini arasındaki etkileşim yoluyla yalnızca *E.coli* suşlarını enfekte eder (Jasna Rakonjac ve ark., 2011). M13, beş kaplama proteinini (pIII, pVIII, pVI, pVII ve pIX) kodlayan dokuz gen ve altı adet montaj ve replikasyon proteininden oluşan dairesel tek sarmallı bir DNA (ssDNA) genomu (6407 baz) içeren esnek, silindirik şekilli bir

sistemlerinin çoğu, pIII'ün yapısal esnekliği ve büyük proteinleri fonksiyonunu kaybetmeden gösterme yeteneğinden dolayı pIII-antikor füzyon proteinlerine dayalıdır (Barderas ve Benito-Peña, 2019; Kehoe ve Kay, 2005; J. Rakonjac ve ark., 2011).

1.5.2.2. Faj Görüntülemeye Kullanılan Antikor Formatları

Bir teşhis platformunda kullanılacak herhangi bir antikor için temel husus, esas olarak antikorun hedef antijene karşı özgüllüğü ve afinitesidir. Kompleks yapıları nedeniyle tam uzunluktaki IgG'leri, prokaryotik görüntüleme sistemleri veya daha düşük ökaryotları kullanan görüntüleme teknolojileri kullanarak görüntülemek genellikle zordur (Hust ve Dübel, 2004; Valldorf ve ark., 2022). Bu nedenle, antikorların fajlar üzerinde başarılı bir şekilde gösterilmesi için scFv'ler ve Fab'lar gibi afinite özelliklerini koruyan daha küçük, tek değerlikli antikor fragmentleri tercih edilmektedir (Angela Chiew Wen ve ark., 2016). Ayrıca bu fragmentler, genel terapötik antikor olarak kullanılan IgG formatına kolayca dönüştürülebilmektedir. Fab'ların scFv'lere göre ekspresyon verimlerinin daha az olması Fab'ların fajlardaki gösteriminin daha düşük seviyelerde meydana gelmesine neden olmaktadır. Ayrıca, küçük scFv'lerin bir bağlayıcı yardımıyla VH ve VL domainin bağlanması ile oluşan tek polipeptit bileşimi, *E. coli*'de üretimi ve katlanmayı kolaylaştırmaya yardımcı olur (Kirsch ve ark., 2005). Bu *E. coli*'de daha iyi ifade de faj yüzeyinde antikor repertuarının verimli bir şekilde sunulmasını sağlamaktadır. Bu nedenle daha saf ve kararlı kütüphanelerin oluşturulmasında scFv'ler daha sık tercih edilmektedir (Ledsgaard ve ark., 2022).

1.5.2.3. Antikor Kütüphane Çeşitleri

Faj görüntüleme teknolojisi ile antikor izolasyonu için, öncelikle bir antikor kütüphanesinin hazırlanması gerekir. Bu, bakteriyofajların yüzeyinde sunulacak bir antikor klon kütüphanesi oluşturmak için ilk basamaktır.

Genel olarak, saf, sentetik, yarı-sentetik ve immün kütüphane olmak üzere dört ana antikör kütüphane türü vardır. Her kütüphanenin, belirli uygulamalar için tercih edilmesini sağlayan kendine özgü bir özelliği vardır. Evrensel kütüphaneler olarak da adlandırılan saf ve sentetik kütüphanelerde hemen hemen her antijene özgü antikörlerin izolasyonu yapılabilir (Almagro ve ark., 2019; Willats, 2002).

Saf antikör kütüphanelerinde elde edilen V-jeni repertuarı, immünize edilmemiş veya sağlıklı donörlerin IgM izotipinden meydana gelir. Saf bir kütüphanenin temel özelliği, repertuarın tarafsız doğasıdır. Yani, sağlıklı donörlerin antikör repertuarının donörlerin immün yanıtını çarpıtabilecek herhangi bir enfeksiyon türüne önceden maruz kalmadığı veya enfeksiyon kapmadığı anlamına gelir. Bu tür kütüphanelerin ayırt edici özelliklerinden biri kombinasyonel doğalarına dayanarak, kütüphane yapımı sırasında ağır ve hafif zincirlerin rastgele birleştirilmesidir. Bu sayede self, immünojenik olmayan veya toksik maddeler gibi çok sayıda hedefe karşı monoklonal antikör tanımlaması için geniş repertuvara sahip olur (Lerner, 2016; Willats, 2002). Bu nedenle, saf kütüphaneler, haptenler, yabancı ve self-antijenlere karşı seçimde kullanılabilirliğinden teşhis için kullanışlıdır. Ancak saf kütüphaneler, repertuarının çok büyük olması nedeniyle çok sayıda donöre ve dolayısıyla çok sayıda ligasyon ve transformasyon deney basamağına ihtiyaç olması, saf repertuarın gerçek doğasını etkileyebilecek geçmiş enfeksiyon hafıza hücrelerinin varlığı gibi bilinmeyen ve kontrol edilemeyen içeriklerin fazla olması, hibridomadan veya immünize kütüphanelerden elde edilmiş antikörlerin aksine afinite olgunlaşma süreçlerinden geçmeyen repertuar nedeniyle orta derece afiniteli antikörlerin elde edilmesi gibi dezavantajlara sahiptir (Angela Chiew Wen ve ark., 2016).

Sentetik stratejiler, kütüphanelerin işlevselliğini en üst düzeye çıkarmaya yöneliktir.

Sentetik bir kütüphane oluşturmak için, düzenlenmemiş ve randomize V-jeni segmentleri, PCR ile sentetik olarak ex vivo birleştirilir. Ancak, saf kütüphanelerden farklı olarak sentetik kütüphaneler için genetik dizi, lokal değişkenlik ve genel çeşitlilik üzerinde özelleştirme yapılabilir (Sidhu ve Fellouse, 2006). Yarı-sentetik ve

sentetik kütüphaneler arasındaki temel fark, çeşitliliğin kaynağıdır. Yarı-sentetik kütüphanelerde, çeşitlilik büyük ölçüde CDR'yi kodlayan genlerin izole edildiği doğal kaynaklardan elde edilir (Nilvebrant ve Sidhu, 2018). Bu CDR genleri daha sonra antikor omurgasını kodlayan sabit bir çerçeve dizisine eklenir (Lim ve ark., 2014). Çeşitlilik, antikorların in vivo olgunlaşma süreçlerinden yararlandığı için hala doğaldır.

İmmün kütüphane repertuarı, immünize edilmiş veya hastalık bulaşmış donörlerin V-geninden meydana geldiğinden bir antijene veya belirli bir hastalığa spesifik antijenlerin oluşturduğu bir koleksiyona özgüdür (Lim ve ark., 2014). Bu, saf ve sentetik kütüphaneler ile karşılaştırıldığında kütüphane kullanımını sınırlamaktadır. Ancak V-genleri, hedef antijene maruz kalan donörlerden toplandığı için bu tür kütüphaneler kullanılarak daha yüksek afiniteli hedef antijene spesifik antikorların izolasyonu mümkün olmaktadır. Bu tür antikor kütüphaneleri esas olarak, afinite olgunlaşmasına katkıda bulunan in vivo somatik hipermutasyon sayesinde yüksek klonal çeşitliliğe sahip iyi afiniteli antikorlar üretir. Bu tür kütüphanelerin önündeki en büyük engel, her farklı hastalığı incelemek için yeni bir kütüphane oluşturma ihtiyacıdır (Hairul Bahara ve ark., 2013; Valldorf ve ark., 2022). İmmün kütüphanelerin oluşturulması insanlarla sınırlı olmayıp fare veya sıçan gibi hayvanlarda da gerçekleştirilebilmektedir. Hayvanların hedef antijen ile immünize edilmesi sonucu spesifik hedef proteine karşı bir antikor klon kütüphanesi meydana gelir. Bu, geleneksel hibridoma teknolojisinden çok farklı olmasa da bununla birlikte bir rekombinant versiyona dönüştürme, üretim ve aynı zamanda modifikasyon için kolay ölçeklendirmeye izin vermektedir. İmmün kütüphaneler, tanısal biyobelirteçlere karşı antikor geliştirmede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Freund's adjuvanları, immünojenlerin yağ içinde su emülsiyonlarını üretmek için kullanılabilir. Yağ içinde su emülsiyonlarındaki antijenler, antijenin yavaş salımından dolayı yüksek ve uzun süreli antikor tepkilerini uyarır. Complete Freund's Adjuvant (CFA), metabolize edilemeyen yağlar içerisinde ısı ile inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis*'ten oluşur. Bu mikobakteriler, makrofajları ve diğer hücreleri enjeksiyon bölgesine çekerek immün yanıtı artırır. CFA içerisinde antijen enjeksiyonu, mikobakteriyel bileşenlerden yoksun ve T helper 2 ağırlıklı bir yanıtı neden olan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) içerisinde antijen enjeksiyonuna göre, T helper 1 ağırlıklı bir yanıtı neden olduğu için enjeksiyon bölgesinde daha yoğun bir inflamatuvar reaksiyonun oluşmasını tetikler. Bu nedenle, çoğu uygulamalarda ilk immünizasyonda CFA, sonraki immünizasyonlarda ise IFA tercih edilmektedir (Apostólico Jde ve ark., 2016).

İmmün kütüphanelerden belli bir antijene karşı immünizasyon sonucu elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerin (PBMC'lerin) RNA izolasyonunun ardından, oligo (dt) primer veya rastgele (random) primerler kullanılarak ters-transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla cDNA sentezlenir. cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu olan RACE PCR, dizisinin yalnızca bir kısmının bulunduğu mRNA'lar için tam uzunlukta cDNA'ları hızlı bir şekilde elde etmek ve tamamen dizilenmiş genlerin alternatif 5' veya 3' uçlarını belirlemek için kullanışlı bir yöntemdir (Scotto-Lavino ve ark., 2006). Bu yöntem sayesinde, kompleks hücresel mRNA karışımları içerisinde, dizinin bilinen kısımları ile cDNA uçlarına eklenen spesifik olmayan etiketler arasında kalan bölgelerin çoğaltılması sağlanır. Transkriptlerin 5' uçları, transkripsiyon başlatma bölgeleri ve lokal cis-etkili güçlendirici elemanların yaklaşık konumları hakkında önemli bilgiler sağladığı için 5' uçlarının biraz daha kesin oluşturulması önem taşımaktadır.

Tür konsensus sekansına göre tasarlanmış ve V-gen ailelerinin korunmuş bölgesine veya sabit alana bağlanan tanımlanmış PCR primer setleri, cDNA havuzlarından belirli bir immünglobülin repertuarındaki ağır zincir ve hafif zincire karşılık gelen bölge (VH ve VL; sırasıyla VH, CH, VL ve CL) genlerini çoğaltmak için kullanılır. Böylece belirli bir bireydeki tüm antikor spesifiteleri ortaya çıkarılmış

olur (Hairul Bahara ve ark., 2013). Daha sonra scFv veya Fab, overlap extension PCR yöntemi ile birleştirilerek oluşturulur ve çoğaltılır (Valldorf ve ark., 2022). Çoğaltılmış scFv veya Fab gen fragmentleri, sırasıyla scFv ve Fab kütüphane üretimi için uygun bir fajemid içerisine eklenir. VH ve VL PCR ürünlerini eksprese eden fajemid vektörler, pIII kaplama protein geninin açık okuma çerçevesi (ORF) bölgesine bağlanır. Buradaki antikor: pIII füzyonunun ifadesi, faj replikasyonu ve faj protein üretiminden bağımsızdır. Tek sarmallı DNA replikasyonu ve bunun faj partiküllerine paketlenmesi için bir morfojenik sinyal eklenir. Rekombinant fajemidler, antikor fragmentlerinin rekombinasyonu için uygun bir ortam sağlayarak uygun bakterilere (örn., XL1-Blue, TG1 ve ER2537) aktarılır (Tohidkia ve ark., 2012). Konsantre stabilize bakteriyel TG-1 hücreleri olan Faj kompetan TG-1 hücreleri, titrelerini kaybetmeden birden fazla dondurma-çözülme döngüsüne girebilmektedir ve transdüksiyona hazır büyük hacimlerde hücreler oluşturmak için hızlıca genişletilebildiği için kompleks ve çeşitli faj gösterim kütüphanelerinin yüksek verimlilik ile oluşturulmasını sağlamaktadır.

Fajemid vektör, pIII geni ve orijin replikasyonu dışında bakteriyofajları kodlayan diğer tüm genlerden yoksundur. Bu nedenle içerisinde bir fajemidi barındıran *E. coli*'nin faj replikasyonu için gerekli tüm kaplama proteinlerinin sentezini başlatabilmesi ve sonuçta pIII-antikor füzyonlarını gösteren fonksiyonel faj partiküllerini oluşturabilmesi için ayrıca bir yardımcı faj ile enfekte edilmesi gerekmektedir. Fab ve scFv gibi fragmentlerin genini barındıran rekombinant fajemidin elde edilmesi için, rekombinant fajemidi barındıran bakteriler, M13KO7 veya VCSM13 gibi yardımcı fajlar ile enfekte edilir (Hammers ve Stanley, 2014). En sık kullanılan yardımcı faj, bir kanamisin direnç geni ile *E. coli*'de genomun bir plazmid gibi replike olmasını sağlayan P15A replikasyon orijini içeren ve M13'ün bir türevi olan M13KO7'dir. Bu fajlar, bakteriyofajların M13 sınıfına ait olup antikor-değişken domainlerin sergilenmesi için iyi adapte olmuştur. Bu enfeksiyon sonucunda, her fajın ilgili genotipler olarak içinde spesifik nükleotit dizilerini içeren vektöre sahipken, bir fenotip olarak yüzeyinde benzersiz bir antikor fragmenti eksprese ettiği bir faj kütüphanesi meydana gelir (Bashir ve Paeshuyse, 2020). Bir antikor faj kütüphanesi, antikor değişken gen klonlanmasının sonucu olarak kaplama

seçimine geçilir. Biopanning olarak adlandırılan bu faj seçim yöntemi, hedefe en yüksek afinite ile bağlanan molekülleri izole eden bir afinite seçim işlemidir.

Faj görüntüleme teknolojisi ile başarılı bir antikor tasarımı için, ilk kritik aşama en uygun antijen sunum stratejisini belirlemektir. Antijeni katı bir yüzey üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak sabitlemek, en yaygın kullanılan antijen sunum stratejisidir. Doğrudan immobilizasyonda, antijenler pasif adsorpsiyon ile nitroselülöz membranlar, polistiren tüp veya plakalar, manyetik boncuklar, mikrotitre plakalar veya kolon matriksleri gibi yüksek protein bağlama kapasitesine sahip katı yüzeyler üzerine immobilize edilebilirler (Willats, 2002). Dolaylı immobilizasyonda ise antijen yüzeye bir yakalama molekülü aracılığıyla sabitlenir. Bu amaçla en çok streptavidin/neutravidin ve biyotin arasındaki güçlü bağlanmadan yararlanır. Yüzey streptavidin/neutravidin ile kaplanır, ardından antijen bir bağlayıcı ve etiket aracılığıyla biyotin ile birleştirilir. Bu şekilde antijenin yüzeye dolaylı ancak kararlı bir şekilde tutunması sağlanır. Seçimler ayrıca, hedefi eksprese eden primer hücre hatları veya rekombinant hücreler kullanılarak da yapılabilmektedir, bu durum faj görüntüleme teknolojisinin oldukça esnek olduğunu açıkça göstermektedir. Geleneksel olarak, tercih edilen yöntem, antijenleri polistiren immünotüp ve polistiren immünoplaka gibi katı destekler üzerinde immobilize etmek veya kaplamaktır. Tüm afinite seçim stratejileri arasındaki en büyük fark, antijenlerin kaplandığı immobilizasyon yüzeyidir. Bunun dışında, başarılı bir seçim süreci için yıkama, elüsyon ve zenginleştirme adımları gibi parametreler optimize edilebilir.

İlk aşama olan hedef antijenin katı bir yüzey üzerine immobilize edilmesinden sonra, sığır serum albümini (BSA), süt veya kazein gibi bloke edici ajanlar, katı yüzeye spesifik olmayan faj bağlanmalarını engellemek için kullanılır. İkinci aşama antikor sergileyen faj kütüphanesinin belirli bir süre immobilize edilen hedef antijen ile inkübe edildiği 'hedef yakalama aşaması'dır. Üçüncü aşama, bağlanmamış veya hedefe spesifik olmayan fajların uzaklaştırılması için yoğun yıkama adımlarının yapıldığı 'bağlanmamış veya spesifik olmayan fajların uzaklaştırılması'dır. Daha yüksek afiniteli faj klonlarının izole edilebilmesi için her biopanning turunda yıkama basamakları kademeli olarak arttırılır. Dördüncü aşama, düşük pH tamponu ile veya

enzimatik olarak kısa bir inkübasyondan sonra hedefe bağlı fajların ayrıldığı 'elüsyon aşaması'dır. pH elüsyonu için glisin, sitrik asit gibi asidik tamponlar veya alkalın trietilamin (TEA) kullanılabilir. Faj degradasyonunu önlemek ve infektiviteyi korumak için elüsyonu yapılan faj antikorlarının pH'ının nötralize edilmesi çok önemlidir. Son olarak, beşinci adım olan 'enfeksiyon' aşamasında, elüsyonu yapılan antijen bağlayan fajlar, *E.coli*'nin yeniden enfeksiyonu ve amplifikasyonunda kullanılır. Fajemid barındıran *E. coli* hücreleri yalnızca antikor: pIII füzyonunu ifade ettiğinden, fonksiyonel faj partiküllerinin üretimi için yine helper faj enfeksiyonuna ihtiyaç vardır. Bu tekrarlı prosedür, antijen spesifik klonları yüksek oranda zenginleştirmek için genelde 2-5 tur tekrarlanır (Bashir ve Paeshuyse, 2020). Her bir biyopanning turunda, yıkama sayısı arttırılarak ve hedef antijen miktarı azaltılarak antijene yüksek afiniteli fajlar güçlendirilerek izole edilir.

Özetle, 10^{11} sayıya kadar varyant içeren bir kitaplığın taranmasına izin veren yüksek verimli bir antikor kütüphanesi tarama stratejisini temsil eder ve ayrıca immün sistemin afinite olgunlaşması yoluyla spesifik bir antijene karşı antikorları seçtiği işlemin aynısını taklit ederek, $10^6/1$ kadar düşük bir frekansla yüksek afiniteli bağlayıcıların izolasyonunu ve karakterizasyonunu sağlar.

Biopanning işlemi sonunda hedefe yüksek afiniteye sahip pozitif fajların ayrı ayrı tanımlanması için faj ELISA ve DNA dizileme kullanılır (Saw ve Song, 2019).

Birkaç biopanning turundan sonra, her turda izole edilen poliklonal havuz içerisinde spesifik antijene bağlanan faj bağlayıcılarında bir zenginleşme olup olmadığını belirlemek için ELISA analizi yapılır. Poliklonal ELISA sırasıyla, antijenin mikrotitre plakalar üzerine immobilize edilmesini, ardından her turda elde edilen faj havuzlarının çeşitli dilüsyonlarının eklenmesini ve en son olarak bir anti-M13 faj antikorunu kullanılarak spesifik antijene bağlanan fajın saptanmasını içerir. Poliklonal ELISA sonrasında maksimum zenginleşme seviyesi sergileyen bireysel klonlar, ilgili antijene karşı yüksek özgüllüğe sahip bireysel faj izolatlarının belirlenmesi için yeniden ELISA ile analiz edilir. Monoklonal ELISA'da 96 kuyucuklu bir plaka üzerinde son biopanning turundan elde edilen tek koloni hücre gliserol stoğunun

Rekombinant antikorlar için, immünojeniteyi en aza indirmek ve bazı uygulamalar için immünolojik efektör fonksiyonların indüksiyonunu en üst düzeye çıkarmak için insandakine mümkün olduğunca yakın bir glikolizasyon modeline sahip olunması amaçlanır. Ökaryotik hücreler, bakterilere kıyasla tam immünoglobulinler dahil olmak üzere antikorların salgı üretimini arttıran gelişmiş bir katlanma, post-translasyon ve salgılama aracı geliştirmiştir.

Günümüzde memeli hücre hatları, rekombinant antikorların üretimi için en yaygın olarak kullanılan ifade sistemidir. Memelilerde eksprese edilen antikorların glikolizasyon profilleri, in vivo olarak gözlemlenen antikorlarla en tutarlı olanlardır.

Tüm rekombinant protein farmasötiklerinin %60-70'i ve onaylanmış terapötik antikorların %95'i, nispeten yüksek üretim maliyetlerine ve kullanım güçlüğüne rağmen memeli hücre hatlarında üretilmektedir. Bununla birlikte, memeli hücre hatlarında, gelişmiş memeli katlanma, sekresyon ve post-translasyonel araç sayesinde insan vücudundakilerden ayırt edilemeyen antikorların üretimi sağlanabilmektedir. Ayrıca büyük ve karmaşık Ig'lerin salgılanması için oldukça verimli olup, katlanma ve translasyon sonrası kontrol ile birlikte yüksek ürün kalitesi sağladığı için, sonraki basamaklarda yapılacak adımların çaba ve maliyetinin azaltılmasına katkıda bulunur.

Protein ve antikor üretimi için tipik olarak, Çin Hamster Ovaryum (CHO), Bebek Hamster Böbrek (BHK) ve İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) memeli hücre hatları kullanılmakta ve bunlar arasında geçici ve kararlı antikor ifadesi için en çok HEK293 ve CHO hücreleri tercih edilmektedir. CHO hücreleri, biyofarmasötiklerin ticari üretiminde uygulanan en yaygın hücreler olup, HEK293 hücre hatları, plazmid DNA'sı ile çok verimli bir şekilde transfekte edilebildikleri için geçici protein ekspresyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Frenzel ve ark., 2013).

Bu doktora tezinde, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, PD-L1'e karşı rekombinant tek zincirli değişken bölge fragmenti (scFv) antikor üretimi yapılması amaçlandı. Üretilecek özgün anti-PD-L1-scFv antikoru, tam antikor yapısı ile kıyaslandığında molekül ağırlığının düşük olması sayesinde doku penetrasyonunun

daha iyi olması, kandan daha kolay uzaklaştırılması, Fc kısmının bulunmaması sayesinde oto immün yan etkilerin az olması avantajlarına sahip olacaktır. Bu şekilde kanser tedavisinde tek başına terapötik olarak kullanılabilceği gibi, sitotoksik proteinler, radyonüklidler ve ilaçlar gibi çeşitli tedavi kombinasyonları ile birleştirilerek yeni kanser tanı ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Elde edilen anti-PD-L1-scFv antikoruna ayrıca diagnostik olarak başta immünohistokimya ve ELISA olmak üzere birçok yöntemde kullanılabilir.

Kanser tedavisinde immünoterapinin önemli bir yeri olduğu düşünöldüğünde, elde edilecek anti-PD-L1-scFv antikoruna sayesinde hem kanser tedavisinde hem de teşhisinde kullanılabilir çok yönlü kullanıma müsait bir antikor üretimi yapılması amaçlandı.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Materyaller

Kimyasal Maddeler: MgCl₂ (Amresco #0288), IPTG (Novagen #70527), X-Gal (Sigma #B4252), trietilamin (Sigma #90335), TMB substrat tamponu (Thermo #N301), Stop solüsyonu (FineTest #E026), blastisidin (Chemcruz sc-204655), Freund's Complete Adjuvant (Sigma #F5881), Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma #F5506), GeneGlide DNA Transfection Reagent (Biovision #M1080), Cibacron Blue 3GA (Sigma #C1535), Bradford solüsyon (Biorad #500-0205)

Antikorlar ve peptidler: Recombinant Mouse PD-L1 (Novoprotein #CJ88), anti-M13 HRP antikor (Origene #BM5516HRP), anti-His Tag antikor (Biolegend #652504)

Enzimler: 2X Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo #F566), Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB #0491L), SfiI (NEB #R0123S), alkalin fosfataz (NEB #M0290S), T4 DNA Ligase (ThermoFisher #K1422), BamHI (NEB #R0136S), HindIII (NEB #R0104S), ECORI (NEB #R3101S), XhoI (NEB #R0146S)

Serolojik malzemeler: 0,45 µm filtre (Corning #431220), MaxiSorp Startube Nunc-Immuno (Thermo #470319), ELISA plağı (Corning #3590)

Vektörler: pADL20c (Antibody Design #PD0109), pFUSE2ss-CLIg-ratK (Invivogen #pfuse2ss-rtclk)

Kitler: RNEasy Mini Kit (Qiagen #74104), QIAshredder (Qiagen #79654), SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara #634858), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen #28704), GeneJET PCR Purification Kit (Thermo #K0702), GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo #K0502), CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo #K1232), HisPur Ni-NTA Spin Purification Kit (Thermo #88229)

Hücreler: TG-1 hücre (Antibody Design Lab #PC001), OneShot TOP10 (Invitrogen #404010), CM13 Interference-Resistant Helper Phage (ADL #PH020L), HEK293 (ATCC)

Çizelge 2.1.'de faj gösterim yönteminde kullanılan solüsyon içerik ayrıntıları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Faj gösterim yönteminde kullanılan solüsyon içerikleri

Faj Gösterim Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar			
M9 Minimal Salts		2X YT Besiyeri	
5X M9 minimal salts (Sigma #M6030)	56,4 gr	Tryptone (Amresco #J859)	8 gr
Distile su	1 lt	Yeast Extract (Amresco #J850)	5 gr
M9 Minimal Agar		NaCl (Amresco #0241)	2,5 gr
M9 minimal salts	50 ml	Distile su ile son hacim	500 ml
1M MgSO ₄ .7H ₂ O (Amresco #0662)	500 µl		
Glukoz %20 (w/v) (Amresco #0188)	5 ml	2X YT Agar	
1M CaCl ₂ (Amresco #0556)	25 µl	2X YT Besiyeri	200 ml
Thiamine hydrochloride (Sigma #T1270) (10 µg/ml)	25 µl	Agar	3 gr
Agar (Amresco #J637)	200 ml		
Distile su ile son hacim	250 ml	2X YT TOP Agar	
		2X YT Besiyeri	100 ml
TE Tamponu		Agar	0,6 gr
1M Tris-HCl (pH:7,5)	1 ml		
0,5 M EDTA (pH: 8,0)	200 µl	2X YTAG Besiyeri	
Distile su ile son hacim	100 ml	2X YT Besiyeri	100 ml
		Ampisilin (0,1 mg/µl)	100 µl
Faj ELISA Kaplama Tamponu (0.05 M pH:9,6)		Glukoz %20 (w/v)	5 ml
NaHCO ₃ (Amresco #0865)	1,44 gr		
Na ₂ CO ₃ (Merck #6398)	0,833 gr	2X YTAK Besiyeri	
Distile su ile son hacim	500 ml	2X YT Besiyeri	100 ml
		Ampisilin (0,1 mg/µl)	100 µl
		Kanamisin (250 mg/ml)	20 µl

2.2. PD-L1 Antijenine Spesifik scFv Antikor Kütüphanesinin Oluşturulması

2.2.1. Fare PD-L1 Antijeni ile Sıçan İmmünizasyonu

İki adet 6-8 haftalık dişi Wistar sıçana, **Şekil 2.1**'de gösterildiği gibi, 15 gün aralıklarla intraperitoneal olarak, salin içerisindeki fare PD-L1 proteini ve eşit hacimde

izolasyonu yapıldı. Özetle, pellet halindeki hücreler üzerine liziz tamponu ile vorteks yapıldıktan ve QIAshredder kolonundan geçirildikten sonra homojen hale getirildi ve kit protokolünde belirtildiği gibi, örnekler üzerine sırasıyla %70 etanol, yıkama ve elüsyon tamponları eklenerek total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA örneğinin degrades olup olmadığını kontrolü hem agaroz jelde yürütülerek hem de bioanalyzer cihazı (Agilent) ile analiz edilerek yapıldı.

2.2.3. 5'-RACE Yöntemi ile İmmünglobülin VH ve VL Bölgelerinin Spesifik Primerlerle Çoğaltılması

İzole edilen total RNA örneğinden SMARTer RACE 5'/3' Kit kullanılarak öncelikle 5'-RACE Ready cDNA sentezlendi. RACE PCR kısmına geçildiğinde, üç aşamalı PCR yapılmış olup, ilk PCR reaksiyonunda ticari kittede hazır olarak bulunan ve immünglobulin moleküllerinin 5' ucu için spesifik bağlanma gösteren universal primerler kullanıldı, ikinci PCR reaksiyonunda laboratuvarında dizayn edilen immünglobulin hafif ve ağır zincirlerine spesifik dejenere gen primer setleri kullanılarak antikorun VH ve VL kısımları sentezlendi. PCR; 50 ng PCR-1 ürünü, 25 µl 2X Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 1.5 µl % 100 DMSO, 1 µl (10 µM) forward primer, 1 µl (10 µM) reverse primer, PCR grade su bileşenleri ile 98°C-30 sn; 30 siklus (98°C-20 sn, 68°C-30 sn, 72°C-30sn); 72°C-5 dk koşullarında yapıldı.

Primer tasarımı yapılırken, rat immünglobulin moleküllerinin aminoasit dizisi ile ilgili fazla bilgi olmadığı için öncelikle NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> ve <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> yazılımlarında rat VH ve VL kodlayan bölgeleri araştırıldı. Primer dizaynı yapılacak gen bölgeleri IMGT/GENE-DB veri tabanından da kontrol edildi (<http://www.imgt.org>). Saptanan VH ve VL domain dizileri baz alınarak bunları potansiyel olarak amplifiye edebilecek primerler dizayn edildi, amplifikasyon verimini arttırmak için stop kodon oluşturulmamasına dikkat edilerek bazı bölgelerde dejenere nükleotidler kullanılarak en fazla verimin elde edilebileceği düşünülen

dejenere primer seti oluşturuldu. Tasarlanan dejenere primer setleri **Çizelge 2.1**'de verilmiştir.

Daha sonra, üçüncü PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere, VH ve VL domainlerinin Overlap PCR yöntemi ile birleştirilmesi için birleştirilmesinde kullanılacak bağlantı bölgesine spesifik primerler tasarlanmıştır. Ayrıca bu primerlere, daha sonraki basamaklarda antikor repertuarının fajemid vektöre klonlanabilmesi için gerekli SfiI restriksiyon kesim bölgesi dizisi de dahil edilmiştir. VH ve VL domainlerinin birleştirilmesinde kullanılacak bağlantı bölgesine spesifik primer dizileri **Çizelge 2.2**'de verilmiştir. PCR reaksiyonu, 50 ng PCR-1 ürünü, 25 µl 2X Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 1.5 µl %100 DMSO, 1 µl (10 µM) forward primer, 1 µl (10 µM) reverse primer, PCR grade su bileşenleri ile 98°C-30sn; 2siklus (98°C-15 saniye (sn), 72°C-30sn); 2 siklus (98°C-15sn, 70°C-20sn, 72°C-30sn) 2 siklus (98°C-15sn, 68°C-20sn, 72°C-30sn); 2 siklus (98°C -15sn, 66°C-20sn, 72°C-30sn); 2 siklus (98°C-15sn, 64°C-20sn, 72°C-30sn); 2 siklus (98°C-15sn, 62°C-20sn, 72°C-30sn); 2 siklus (98°C -15sn, 60°C-20sn, 72°C-30sn); 6 siklus (98°C-15sn, 58°C-20sn, 72°C-30sn); 15 siklus (98°C-15sn, 56°C-20sn, 72°C-30sn); 72°C-5dk koşullarında yapıldı.

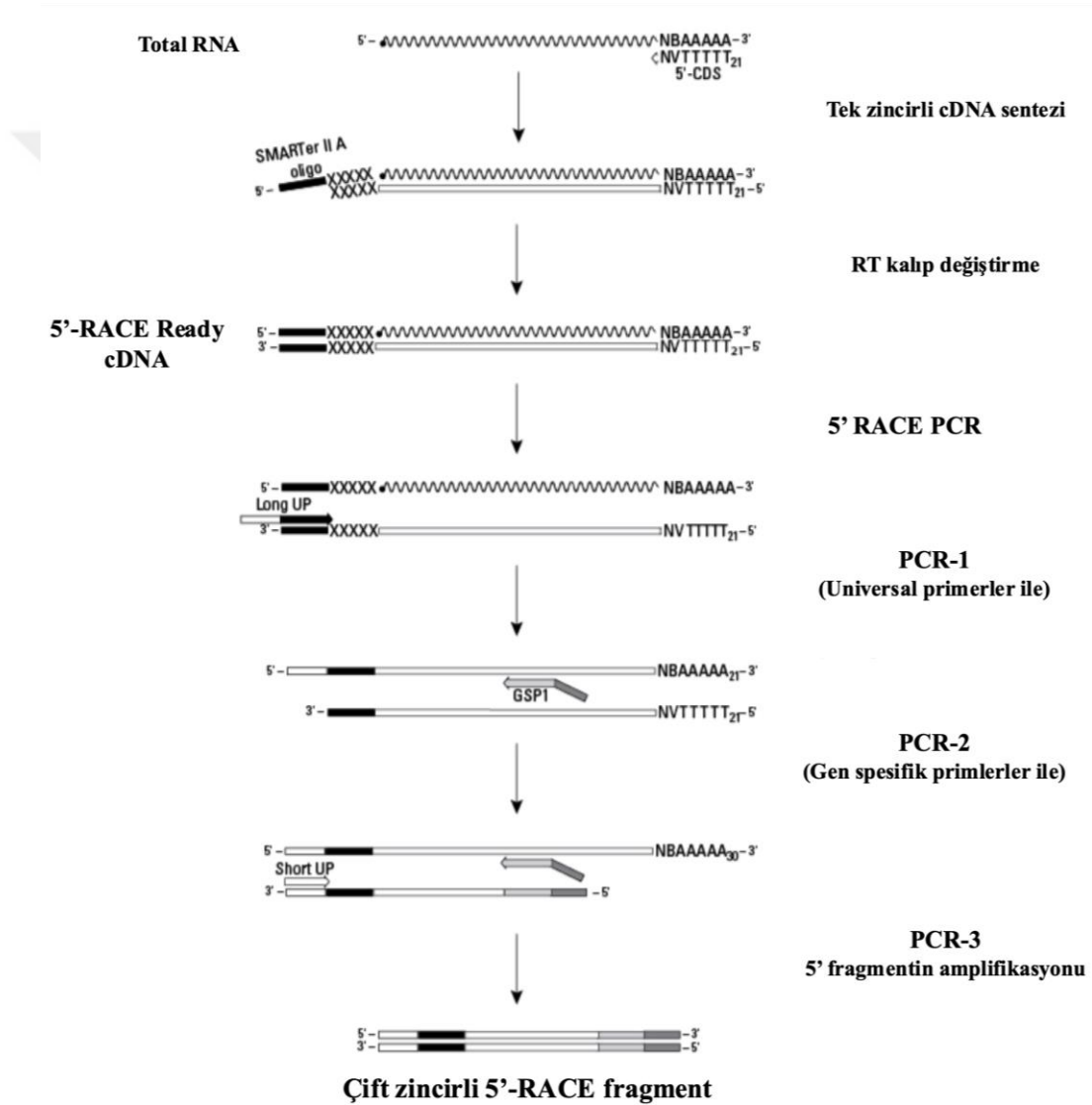
Çizelge 2.1. Dalak hücrelerinden immünglobulin VH ve VL domainlerinin çoğaltılması için tasarlanan primerler

Rat immünglobülin hafif zincir (VL)	
K1	5'-GCRACCSGCSGCCGYTGAGGCAWAYGACTSAGGCAC -3'
K2	5'-GCWACYTGCRGCCGCTSAGRCASACWACWGASGCAC-3'
UPM_L	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
UPM_L2	5'-GGCGGTGGCGTTCTGGTGGAGGTGGATCTCTAATACG ACTCACTATAGGGC-3'
Rat immünglobülin ağır zincir (VH)	
H1	5'-CAWGYCACWGTGACTRGCTSAG - 3'
H2	5'-CASGTSACSGTYACYGRCWCAG - 3'
UPM_H.	5'-AGCCGGCCATGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGC
UPM_H2	5'-ATCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCTAAT

Çizelge 2.2. İmmünglobulin VH ve VL domainlerini birleştirmede kullanılacak bağlantı bölgesine spesifik tasarlanan primerler

aa dizisi	G G G G S G G G S G G G S
Linker	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG
Primer1 (Forward)	GGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG-Vstart
Primer2 (Reverse)	Jend-GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCT

Şekil 2.2’de 5’-RACE yöntemi özetlenmiştir.



Şekil 2.2. 5'-RACE Yöntem Basamakları (SMARTer RACE 5'/3' Kit Takara #634858)

2.2.4. Overlap Extension PCR Yöntemi ile İmmüoglobulin VH ve VL Bölgelerinin scFv Formatında Birleştirilmesi

PD-L1-scFv antikor kütüphanesinin oluşturulma sürecinde, ağır ve hafif zincir değişken bölgelerinin aynı molekülde birleştirilmesi kritik önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan ve iki aşamadan oluşan Overlap PCR reaksiyonunun ilkinde, füzyon için gerekli olan ağır veya hafif zincir geninin tek sarmal formunu üretmek için DNA amplifikasyonu, ikincisinde ise, her iki tek sarmal ürün karışımının tam bir scFv geni oluşturması için birbiri ile örtüşen bir bağlantı bölgesi eklenerek tasarlanan primerler ile birleştirme reaksiyonu yapıldı. Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda, PCR reaksiyonunda tam uzunluk amplifikasyon kalitesini iyileştirmek için yüksek-doğruluk yüksek-işlenebilirliğe sahip Q5 DNA polimeraz kullanıldı. Ayrıca primerlerin bağlanma sıcaklıkları, Touchdown PCR yöntemi ile her bir siklusun primer bağlanma adımında, primerlerin optimal bağlandıkları sıcaklıklara kadar iki derece düşürülerek daha spesifik bağlanmaların oluşturulması sağlandı. Böylece ilk siklularda uygulanan yüksek bağlanma sıcaklıkları sayesinde primerlerin hedef DNA dizilerine daha spesifik olarak bağlanması ile izleyen siklularda optimal bağlanma sıcaklıklarına yaklaşan primelerin spesifik hedeflerine daha duyarlı bir şekilde bağlanması sağlandı.

Overlap Extension PCR reaksiyonu, 64 ng VH PCR-2 ürünü, 50 ng VL PCR-2 ürünü, 0.5 µl Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, 10 mM dNTP, 1X Q5 Reaction Buffer, 1X High GC Enhancer, PCR-grade su bileşenleri ile yapılan iki aşamalı PCR A: 98°C-2dk; 15 siklus (98°C-15sn, 72°C-30sn, 72°C-3dk) PCR B: 98°C-30sn; 15 siklus (98°C-15sn, 72°C-3dk); 15 siklus (98°C-15sn, 70°C-20sn, 72°C-3dk); 5 siklus (98°C-15sn, 68°C-20sn, 72°C-3dk); 72°C-5dk koşullarında yapıldı.

2.3. Faj Gösterim Teknolojisi

2.3.1. Fajemid Vektörün Çoğaltılması ve Restriksiyon Enzimler ile Kesimi

Faj gösterim teknolojisinde kullanılmak üzere özellikle seçilen pADL20c fajemid vektörü XL-1 Blue kimyasal kompetent bakteri hücrelerine transformasyonu yapıp ampisilinli LB agar petrilere ekimi yapıp 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üreyen kolonilerden 5 mililitre (ml) ampisilinli YT besiyerine tek koloni ekim yapıp 37°C 150 Rpm’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün üreyen bakteri hücrelerinden ticari kit ile plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra NheI ve ECORI enzimleri ile kesilerek pADL20c’nin doğrulaması yapıldı. Doğrulaması yapılan plazmid örneği büyük hacimde çoğaltıldıktan sonra saflaştırılmış ve Sfi enzimi ile kesildi. Ligasyon ihtimalini arttırmak ve vektörün kesildikten sonra self ligasyonunu önlemek için alkalen fosfataz ile 37°C’de 1 saat inkübe edilerek defosforilasyon işlemi yapıldı. **Şekil 2.4**’te kullanılan fajemid vektörün yapısı ile SfiI kesim bölgeleri gösterilmektedir.

ve buradan 2,5 µl alınarak 50 µl hacimdeki 19 adet elektrokompotent TG-1 tüpüne transfer edildi. Transformasyon sonrası her bir tüpten 10 µl alınarak ayrı bir tüpte birleştirildi (190 µl) ve bu stok da 10^0 - 10^{-7} aralığında dilüe edilerek sekiz ayrı ampisilinli 2X YT agara ekildi. İlk başta 19 ayrı tüpte bulunan transformasyon ürünleri de ayrıca 19 adet ampisilinli 2X YT agara ekildi. Sonuçta 26 adet petri 37 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, oluşturulan ana stok PD-L1-scFv antikor kütüphanesi içerisinde ligasyonun başarılı olduğunun gösterilmesi için, üreme gözlenen petrilerin herhangi dört tanesinden 4 ml ampisilinli 2X YT besiyerine tek koloni ekim yapılarak 37 °C 150 Rpm’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı (Ertesi gün plazmid izolasyonu ve Sfi kesimi ardından %1’lik agaroz jelde yine gözlenen yaklaşık 1200 bp’lik bantlar bu ana stoktaki ligasyonun başarılı olduğunu göstermiştir.). Petrilerde geriye kalan tüm TG-1 kolonileri, üzerlerine 4 ml ampisilinli 2X YT besiyeri eklenerek kazıma yoluyla toplandı ve oda sıcaklığında 5000xg 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildikten sonra pellet üzerine %15 gliserol içeren ampisilinli 2X YT besiyeri eklenerek -80 °C’ye kaldırıldı. Böylece scFv antikor faj kütüphanesinin oluşturulması için gereken stok rekombinant PD-L1-scFv antikor kütüphanesi oluşturuldu.

2.3.4. Helper Faj Stoğunun Hazırlanması ve Titrasyonu

Ticari olarak satın alınan M13 helper fajının faj kütüphanesi oluşturulma adımında kullanılabilmesi için öncelikle bir dizi deney basamağının yapılması gerekmektedir. Bunun için, iyi ayrılmış M13 faj plaklarının elde edilmesi, bu faj plaklarının tek plak ekimi yoluyla saf helper faj ana stoğunun oluşturulması, ana stoğun helper faj olduğunun doğrulanması ve ana stoğun konsantrasyonunun belirlenmesi için titrasyonunun yapılması basamakları sırasıyla yapıldı.

İyi ayrılmış M13 faj plaklarının elde edilmesinde;

(1) kimyasal kompetan TG-1 hücrelerinden 10 µl alınarak M9 minimal agar üzerine çizgi ekim yapıp 37 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(2) ertesi gün üreyen kolonilerden 5 ml steril 2X YT besiyerine tek koloni ekimi yapıp 37 °C 150 Rpm'de yedi saat inkübasyona bırakıldı (OD₆₀₀: 0,5),

(3) üreyen bakteri kültürünün buz üzerinde 20 dk soğutulup +4 °C'ye kaldırıldı,

(4) 5 mM MgCl₂ içeren 2X YT TOP agarın hazırlanıp 47 °C'de bekletildi,

(5) 3. basamakta +4 °C'ye kaldırılan bakteri hücrelerinden sekiz ayrı bakteri tüpüne 100 µl eklendi,

(6) Satın alınan M13 bakteriyofaj stoğun steril 2X YT besiyeri içerisinde 10⁻⁷-10⁻¹⁴ aralığında dilüe edildi,

(7) her bakteriyofaj dilüsyonundan 10 µl alınıp 5. basamaktaki 100 µl bakteri kültürüne eklenerek enfekte edildi,

(8) 4. basamakta hazırlanan 2X YT TOP agar üzerine 266,6 µl IPTG ve 333 µl X-Gal eklenip hemen 7. basamakta enfekte olmuş hücrelerin üzerine 3 ml'şer eklendi

(9) hemen daha önceden hazırlanan ve 37 °C'de bekletilmiş 5mM MgCl₂ içeren 2X YT agar petrilerinin üzerine döküldü,

(10) TOP agarın soğuması ile petrilerin 37 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(11) ertesi gün iyi ayrılmış faj plaklarının elde edildi. Bu plaklar ana stoğun hazırlanmasında tek faj plak ekimi için kullanıldı.

M13 faj ana stoğun hazırlanması için,

(1) TG-1 tek koloni ekim solüsyonundan 100 µl alınıp 5 mM MgCl₂ içeren 2X YT besiyerine eklenip 37 °C 200 Rpm'de 2 saat inkübe edildi,

(2) inkübe edilen kültürün tamamının 5 mM MgCl₂ içeren 45 ml 2X YT besiyeri içerisinde dilüe edilmesi ve bunun 1 ml'sinin bakteri tüpüne alındı,

(3) daha önceden elde edilmiş 10^{-9} oranında dilüe edilmiş M13 faj plağının bulunduğu petriden steril 1 ml şırınga iğne ucu ile bir plak alınarak, daha önceden 1 ml 2X YT besiyeri eklenen bakteri tüpüne daldırıldı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi,

(4) 3. basamaktaki inkübe M13 solüsyonundan 100 µl alınarak, 2. basamakta hazırlanan TG-1 tüpüne eklendi ve 37 °C 180 Rpm'de 5 saat inkübe edilerek enfeksiyonun yapıldı,

(5) enfekte solüsyonun 500 ml 50 µg/ml kanamisin içeren 2X YT besiyerine eklenerek 37 °C 150 Rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı,

(6) ertesi gün üreme gözlenen büyük hacimli enfekte ürünün 10 adet 50 ml'lik santrifüj tüplerine bölündü ve tüpler +4 °C'de 10800xg 15 dk santrifüj edildi,

(7) süpernatanın aspire edilmesinden sonra pelletler üzerine 1,5 ml steril TE tamponunun eklenerek pellet çözdürüldü ve tüm tüpler bir tüpe birleştirildi (bu basamakta M13 fajının kesim enzimleri ile doğrulanması için çözdürülmüş pelletlerden bir kısmı ayrıldı.),

(8) M13 tek zincir DNA'ların 0,45 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve küçük hacimli tüplere bölünerek -30 °C'de stok olarak saklandı.

M13 fajının doğrulanması için, M13 ana stoğunun hazırlanma basamaklarında steril TE tamponu ile çözdürülen pelletlerden plazmid izolasyonunun yapıldı ve plazmid örneklerinin M13 faj genomu içerisinde bulunan BamHI ve HindIII enzimleri ile kesim (500 ng plazmid örneği, 10U BamHI, 10U HindIII, 1X NEBuffer 2.1 ve distile su ile 37 °C 1 saat, 80 °C 20 dk inkübasyon) yapıldı ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Doğrulanana ana stok M13 fajının deneylerde kullanılmadan önce konsantrasyonu belirlendi.

M13 helper faj ana stoğun konsantrasyonunun belirlenmesi için titrasyon deneyinde;

(1) M13 tek zincir DNA stok örneğinin 10^{-7} - 10^{-14} aralığında 2X YT besiyeri içerisinde dilüe edildi,

(2) bu dilüsyonlardan 10 µl alınarak, daha önceden steril bakteri tüpüne 200 µl eklenmiş TG-1 bakteri solüsyonuna (OD_{600} : 0,5) eklenerek enfekte edildi,

(3) enfekte solüsyonun üzerine 47 °C'de ısıtılmış 3 ml 2X YT TOP agar eklendikten hemen sonra 37°C'de bekletilmiş 2X YT agar petrilere üzerine döküldü,

(4) TOP agar soğuduktan sonra petrilere 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı,

(5) ertesi gün petrilere üreyen faj plaklarının kontrolü yapılarak ana M13 faj stoğunun konsantrasyonu belirlendi.

2.3.5. Anti-PD-L1-scFv Antikor Faj Kütüphanesinin Oluşturulması ve Çoğaltılması

Bölüm 2.2.3'te elde edilen rekombinant PD-L1-scFv antikor kütüphanesinin bölüm 2.2.4'te hazırlanan helper faj hücreleri ile enfekte edilmesiyle PD-L1-scFv antikor faj kütüphanesi oluşturuldu. Bunun için;

(1) Bölüm 2.2.3'te hazırlanan gliserol ile dondurulmuş rekombinant PD-L1-scFv antikor kütüphanesinin (PD-L1-scFv+pADL20c taşıyan TG-1 hücrelerinin) 1 ml'si 100 ml 2X YTAG besiyerine eklenip OD_{600} : 0,5 olana kadar 37 °C 190 Rpm'de inkübe edildi,

(2) inkübe edilen hücrelerin üzerine 1/20 oranında (bakteri hücresi/helper faj partikülü) M13 helper faj (Bölüm 2.2.4'te elde edilen) eklenerek 37 °C'de çalkalamasız 30 dk enfekte edilmesi sonrasında 37 °C 180 Rpm'de 30 dk inkübe edildi,

(3) enfekte edilen hücrelerin 2 adet 50 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve oda sıcaklığında 3300xg 10 dk santrifüj edildi,

(4) süpernatanın atılarak pelletler 200 ml 2X YTAK besiyeri içerisinde çözdürüldü ve 37 °C 180 Rpm'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(5) ertesi gün çoğalan faj kütüphanesi 4 adet 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak +4 °C'de 8000xg 10 dk santrifüj edilerek süpernatantlar 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı,

(6) süpernatantların üzerine 1/5 hacimde PEG/NaCl solüsyonu eklendi ve buz üzerinde 1 saat inkübasyonu ile fajlar çöktürüldü,

(7) tüplerin +4 °C'de 10800xg 30 dk santrifüj edilerek süpernatantlar aspire edildi ve pelletler distile su ile çözdürüldü,

(8) çözdürülen pelletler üzerine 1/5 hacim PEG/NaCl eklendi ve buz üzerinde 20 dk inkübe edildi,

(9) tüpler +4 °C'de 10800xg 10 dk santrifüj edilerek süpernatantların aspire edilmesi ile pelletler bir araya toplanarak 2,5 ml steril PBS ile çözdürüldü,

(10) tüpler oda sıcaklığında 11600xg 10 dk santrifüj edilerek bakteri debris uzaklaştırıldı,

(11) sadece fajları içeren süpernatant (bu örnekten 10 µl alınıp faj kütüphanesi titrasyon analizi yapıldı.) (Input-1) biopanningde kullanılmak üzere gün içinde kullanıldı ve geri kalanı %15 gliserol eklenerek -80 °C'ye kaldırıldı.

Faj kütüphanesinin titrasyonun belirlenmesi için;

(1) 10 µl faj kütüphane örneği PBS ile 10^{-7} - 10^{-14} aralığında dilüe edildi,

(2) daha önceden tek koloni ekimi yapılmış TG-1 hücrelerinden 50 µl alınıp 5 ml 2X YT besiyerine ekimi yapıldı ve OD₆₀₀: 0,5 olana kadar 37 °C 180 Rpm'de inkübe edildi,

(3) inkübe bakteriler 8 adet steril bakteri tüpüne 200 µl eklendi,

(4) bakteri hücrelerinin üzerine 10 µl dilüe edilmiş faj kütüphanesi örnekleri eklenerek enfeksiyonun yapıldı,

(5) hemen 37 °C’de bekletilmiş 2X YTAG agar üzerine ekildi ve 37 °C gece boyu inkübasyona bırakıldı,

(6) ertesi gün petrielerde üreyen kolonilerin kontrolü ile faj kütüphanesinin konsantrasyonu belirlendi.

2.3.6. Anti-PD-L1-scFv Antikor Faj Kütüphanesinin Afinite Seçimi (Biopanning)

Bölüm 2.2.5’te çoğaltılan PD-L1-scFv antikor faj kütüphanesi içerisinde PD-L1 antijenine yüksek spesifite ve afinite ile bağlanan antikorları taşıyan fajların seçimi üç döngüde yapıldı.

İmmünotüpler içerisinde afinite seleksiyonu için yapılan birinci seçim döngüsünde; (1) immünotüpün 20 µg/ml konsantrasyonda steril PBS içerisinde sulandırılan PD-L1 antijeni ile kaplanarak +4°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(2) ertesi gün antijen solüsyonunun toplandı ve immünotüp steril PBS ile bir defa yıkandı,

(3) immünotüp bloklama solüsyonu (%2 süt tozu içeren steril PBS) ile doldurularak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi,

(4) immünotüp üç defa steril PBS ile yıkandı,

(5) bölüm 2.2.5'te elde edilen süpernatant faj kütüphanesinden 100 µl alınarak 4 ml bloklama solüsyonuna eklendi ve bu solüsyon immünotüpe eklenerek oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edildi (panning in basamağı),

(6) immünotüp sekiz defa PBST ile, on defa PBS ile yıkandı,

(7) immünotüp üzerine 1 ml 100 mM trietilamin eklenerek oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 30 dk inkübe edildi (elüsyon basamağı),

(8) immünotüpte elüe edilen ürün, daha önceden 0,5 ml 1M TrisCl (pH: 7,4) konulmuş bakteri tüpüne eklendi (faj nötralizasyon basamağı),

(9) nötralize fajlar TG-1 (OD₆₀₀: 0,5) hücreleri üzerine eklendi ve 37 °C'de çalkalamasız 30 dk inkübe edildi,

(10) bu stoktan 100 µl alınıp 2X YT besiyeri içerisinde 10⁻¹-10⁻⁵ aralığında dilüe edilip 2X YTAG agar üzerine ekildi ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı (biopanningden çıkan faj konsantrasyonunun belirlenmesi için),

(11) geriye kalan stoğu oda sıcaklığı 3300xg 10 dk santrifüj edildive süpernatant aspire edilerek pellet 1 ml 2X YT ile çözdürüldü ve 4 adet 2X YTAG agar petrilere ekilip ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı (ikinci biopanning döngüsüne sokulacak faj stoğu olarak kullanıldı.),

(12) ertesi gün titrasyon petrilерinin kontrolü ile faj kütüphanе konsantrasyonu kontrol edildi,

(13) ertesi gün yoğun üreme gözlenen petrilерdeki ikinci afinite seçimine sokulacak hücreler %15 gliserol içeren 2X YTAG besiyeri ile agardan hafifçe kazınarak toplandı,

(14) bu stoktan 2 ml'si alınıp 100 ml 2X YTAG besiyerine eklenerek 37 °C 230 Rpm'de OD₆₀₀: 500 olana kadar inkübe edildi,

(15) geriye kalan gliserollü stok tüplere bölünerek -80 °C'ye kaldırıldı (Output 1),

(16) 14. basamakta çoğaltılan bakteri solüsyonuna 1/20 oranında helper faj eklenerek 37 °C’de çalkalamadan 30 dk, 37 °C 180 Rpm’de 30 dk inkübe edildi,

(17) enfekte hücreler oda sıcaklığında 3300xg 10 dk santrifüj edildi ve pellet 100 ml 2X YTAK besiyerinde çözdürülerek 37 °C 160 Rpm’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(18) buradan 40 ml’sinin alınıp +4 °C 10800xg 10 dk santrifüj edilip süpernatanı alınarak yukarıdaki protokole benzer şekilde PEG/NaCl ile fajlar çöktürüldü ve ikinci afinite seçimine girecek fajlar (Input-2) elde edildi.

İkinci afinite seçiminde immünotüpe kaplanan PD-L1 antijen konsantrasyonu yarıya düşürülerek 10 µg/ml yapıldı, bunun nedeni daha düşük antijen koşullarında yüksek afinite ile bağlanan fajların elde edilmesini sağlamaktı. Diğer biopanning basamakları birinci afinite seçiminde yapıldığı gibi tekrarlandı.

Üçüncü afinite seçiminde yine yarı yarıya azaltmaya gidilerek immünotüpe kaplanan PD-L1 antijen konsantrasyonu 10 µg/ml yapıldı. Yine yukarda ayrıntılı bir şekilde yazılan birinci afinite seçiminin protokolü uygulanarak elde edildi. Böylece afinite seçim döngüsü üç ayrı defa yapılmış, her defada immünotüpe kaplanan PD-L1 protein miktarı yarı yarıya azaltılarak daha güçlü ve spesifik bağlanan fajlar elde edildi.

Daha yüksek afiniteli bağlandığı düşünülen ikinci ve üçüncü afinite seçim fajları poliklonal faj ELISA’da kullanıldı.

2.3.7. PD-L1 Antijenine Bağlanan Anti-PD-L1-scFv Fajlarının Poliklonal ve Monoklonal Faj ELISA ile Tanımlanması

Afinite seçim sonucunda elde edilen fajlardan PD-L1 antijenine en yüksek afiniteyle bağlananların saptanması için poliklonal ve monoklonal faj ELISA yapıldı.

Poliklonal faj ELISA için;

(1) yüksek antijen bağlama özelliğine sahip 96-kuyucuklu ELISA plağı kaplama tamponu içerisinde bir kısmının 10 µg/ml PD-L1 antijeni ile diğer bir kısmının 10 µg/ml BSA (kontrol grubu) ile kaplanıp +4°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(2) ertesi gün protein içeren kaplama tamponları toplandı ve kuyular üç defa PBS ile yıkandı,

(3) kuyulara 250 µl %3 BSA içeren PBS eklenip 37 °C’de 1 saat bloklandı,

(4) kuyular üç defa PBS ile yıkandı,

(5) kuyulara 100 µl eklendikten sonra üzerlerine 50 µl afinite seçimi yapılmış fajlar eklendi, bu kuyu ana stok olarak kullanılarak yan tarafındaki iki kuyuya sırasıyla 1:3 dilüsyonları yapıldı (BSA kaplanan kuyulara da 1:3 oranında dilüsyon yapılması) ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi,

(6) kuyular üç defa PBS, üç defa PBST ile yıkandı,

(7) kuyulara 50 µl PBST ile sulandırılmış anti-M13 HRP antikorunu eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi,

(8) kuyular üç defa PBST, üç defa PBS ile yıkandı, (9) kuyulara 100 µl TMB substrat tamponu eklendi ve 37 °C karanlıkta 30 dk inkübe edildi, (10) kuyulara 50 µl Stop solüsyonu eklendi ve hemen 450 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.

Daha spesifik anti-PD-L1-scFv antikorların seçimi için, PD-L1 proteinine bağlandığı gösterilen örneklerden tek koloni ekim yapıp monoklonal faj ELISA’ya geçildi.

Monoklonal faj ELISA için;

(1) poliklonal faj ELISA ile PD-L1 antijenine bağlandığı gösterilen faj örneklerinin 10 ml 2X YT besiyerine tek koloni ekimi yapılmış TG-1 hücrelerinin (OD₆₀₀: 0,5) üzerine eklenmesi ve 37 °C’de çalkalamadan 30 dk enfeksiyonu yapıldı,

(2) oda sıcaklığında 3300xg 10 dk santrifüj sonrası elde edilen pelletin 2X YT besiyerinde çözdürüldükten sonra 2X YTAG agara ekimi ve 37 °C’de gece boyunca inkübasyonu yapıldı,

(3) ertesi gün petride üreyen kolonilerden 96 tanesinin alınıp her bir kuyucukta 100 µl 2X YTAG besiyeri bulunan yüksek antijen bağlama kapasitesine sahip ELISA plağına ekimi yapıldı ve 30 °C 150 Rpm’de gece boyunca inkübe edildi,

(4) üreme gözlenen kuyulardan 10 µl’şer alınıp içerisine 200 µl 2X YTAG besiyeri eklenen yeni ELISA plağına ekim yapıp 37 °C 150 Rpm’de 1 saat inkübe edildi,

(5) her kuyu üzerine 25 µl 10⁹ helper faj içeren 2X YTAG besiyeri eklendi ve 37 °C çalkalamadan 30 dk, 37 °C 150 Rpm 1 saat enfekte edildi,

(6) ELISA plağı 1800xg 10 dk santrifüj edilerek pelletlerin 200 µl 2X YTAG besiyerinde çözdürüldü ve 30 °C 150 Rpm’de gece boyunca inkübe edildi,

(7) aynı gün içinde yüksek antijen bağlama özelliğine sahip 96-kuyucuklu başka iki adet ELISA plağı kaplama tamponu içerisinde 96 kuyunun 10 µg/ml PD-L1 antijeni ile kalan 96 kuyunun 10 µg/ml BSA (kontrol grubu) ile kaplanıp +4°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(8) ertesi gün protein içeren kaplama tamponları toplandı ve kuyular üç defa PBS ile yıkandı,

(9) kuyulara 250 µl %3 BSA içeren PBS eklenip 37 °C’de 1 saat bloklandı,

(10) kuyular üç defa PBS ile yıkandı,

(11) kuyulara 100 µl PBST eklendikten sonra üzerlerine 6. basamakta inkübe edilen ELISA plağı 1800xg 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlarından 100 µl eklenerek 37 °C 1 saat inkübe edildi,

(12) kuyular üç defa PBST, üç defa PBS ile yıkandı,

(13) kuyulara 50 µl PBST ile sulandırılmış anti-M13 HRP antikorunu eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi,

(14) kuyular üç defa PBST, üç defa PBS ile yıkandı,

(14) kuyulara 100 µl TMB substrat tamponu eklendi ve 37 °C karanlıkta 30 dk inkübe edildi,

(15) kuyulara 50 µl Stop solüsyonu eklendi ve hemen 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

Okunan absorbanslara bakıldığında her bir örneğin BSA kontrollerine göre 2-3 katı veya daha fazla absorbans gösteren örnekler anti-PD-L1-scFv antikorunu pozitif olarak kabul edildi ve bu örneklerin daha ileri analizlerini yapabilmek için 2X YTAG besiyerine tek koloni ekimleri yapıp 37 °C 160 Rpm'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

2.3.8. Anti-PD-L1-scFv Antikor Pozitif Örneklerinin Doğrulanması

Tek koloni ekimi yapılan anti-PD-L1-scFv antikor pozitif örneklerin doğrulanması için plazmid izolasyonu yapıldıktan sonra VH + VL spesifik primeler ile PCR yapıldı. Bunun için; tek koloni ekim yapılan örneklerden plazmid izolasyonunun yapıldıktan sonra plazmidlerden PD-L1-scFv'yi çoğaltmak için Overlap Extension PCR aşamasında kullanılan VH+VL için spesifik olarak tasarlanan primerler kullanılarak PCR yapıldı %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

2.4.2. Anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss plazmidinin HEK293 Hücrelerine Transfeksiyonu

HEK293 hücreleri T25 flaska 7×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek 37°C %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre yoğunluğu ortalama %70 civarında olan HEK293 hücreleri ile anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss plazmidini transfeksiyon ajanı aracılığıyla transfekte edildi. Özetle, 650 μl serumsuz ve antibiyotiksiz DMEM içerisine $\sim 3,5$ μg plazmid DNA eklenip pipet ucu ile hafifçe karıştırıldıktan sonra üzerine 14 μl transfeksiyon ajanı eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. HEK293 hücrelerinin besiyeri aspire edildikten sonra, inkübe edilen transfeksiyon kompleksi flaskan farklı bölgelerine pipet ucu ile damlatılıp hafifçe karıştırıldı. Son olarak flask üzerine 5 ml %10 FBS içeren ve antibiyotik içermeyen DMEM eklenip 37°C %5 CO_2 içeren ortamda 72 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra hücrelerin besiyeri toplanıp -30°C 'ye kaldırıldı. Hücreler üzerine %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin-amfoterisin içeren DMEM ve 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ blastisidin eklenip, 72 saat 37°C %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde her 72 saatte bir tazelenen blastisidin ile seçim işlemine devam edildi. Blastisidin ile seçilen anti-PD-L1-scFv-His-plazmid pozitif hücreler daha sonra ayrı bir hücre kültür flaskına alınıp 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ blastisidin %10 FBS %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM besiyerinde çoğaltılmaya devam edildi. Bu süreçte HEK293 hücreleri tarafından besiyerine eksprese edilen anti-PD-L1-scFv antikörlerinin saflaştırılması toplanan tüm besiyerler -30°C 'ye kaldırıldı.

2.5. İmmobilize Metal Afinité Kromatografisi (IMAC) Yöntemi ile Anti-PD-L1-scFv-His Antikörünün Saflaştırılması

Üretilen anti-PD-L1-scFv antikörü polihistidin (6xHis) afinité etiketleri ile füzyon şeklinde eksprese edildiği için, saflaştırılmasında immobilize metal afinité

kromatografi (IMAC) yöntemi kullanıldı. HEK293 hücrelerinin ana besin kaynaklarından olan FBS'nin içerisinde bulunan albüminin Ni-NTA reçinesine 6xHis ile yarışmalı olarak bağlanarak scFv antikorunun reçineye bağlanma verimini düşüreceği bilindiğinden, protein saflaştırma verimini arttırmak için transfeksiyon aşamasında HEK293 hücrelerinin FBS oranı kademeli olarak azaltıldı. Ancak transfeksiyon sonrası elde edilen ve içerisinde antikor bulunduğu tahmin edilen besiyerlerinde anti-HisTag western blot antikoruna ile anti-PD-L1-scFv-His antikorunun kontrolü yapıldığında, %10 FBS içeren HEK293 hücrelerinin %5 ve %2,5 FBS içeren HEK293 hücrelerine göre çok daha fazla antikor ürettiği saptandı. Bundan dolayı, antikor verimini en yüksek seviyede tutmak için transfeksiyon deneyi tekrarlanarak sadece %10 FBS'li besiyeri ile devam edildi.

Ni-NTA saflaştırma kitinin verimini düşüren albüminin toplanan transfeksiyon besiyerlerinden uzaklaştırılması için, albümine yüksek afiniteyle bağlanarak onun ayrılmasını ve saflaştırılmasını sağlayan Cibacron Blue 3GA kullanıldı.

Bunun için;

(1) kolon içerisindeki 3 ml Cibacron Blue 3GA reçinesi 30 ml 0,01 M TrisHCl (pH: 7,6) ile dengelendi,

(2) kolona blastisidin seçim sonrası toplanan besiyerlerinden 6 ml eklendi ve yer çekimi etkisiyle reçineye tutunmayan antikorlar uzaklaştırıldı,

(3) kolona 30 ml 0,01 M TrisHCl (pH: 7,6) eklendi ve reçineye bağlanmamış proteinler uzaklaştırıldı,

(4) kolona 6 ml 0,01 M TrisHCl (pH: 7,6) + 1,5 M NaCl eklenerek reçineye tutunan albüminin elüsyonu yapıldı. Bu deney sonucunda ikinci basamakta kolondan aşağı geçen antikor içeren solüsyon alınıp Ni-NTA saflaştırma kiti ile saflaştırıldı.

Saflaştırma için;

(1) 3 ml Ni-NTA reçine içeren kolondaki saklama tamponu oda sıcaklığında 700xg 2 dk santrifüj ile uzaklaştırıldı,

(2) kolon 6 ml dengeleme tamponu (10 mM imidazol + PBS) eklenerek dengelendi ve 700xg 2 dk santrifüj ile tampon uzaklaştırıldı,

(3) kolon üzerine Cibacron Blue 3GA ile albümini uzaklaştırılmış antikor örneği 6 ml eklendi, karıştırıcıda 30 dk inkübe edildi ve 700xg 2 dk santrifüj ile reçinete tutunmayan antikor dışı proteinler uzaklaştırıldı,

(4) kolon üç defa 6 ml yıkama tamponu (25 mM imidazol + PBS) ile yıkandı ve 700xg 2 dk santrifüj ile reçineye bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı,

(5) kolon üç defa elüsyon tamponu (250 mM imidazol + PBS) eklendi ve 700xg 2 dk santrifüj ile reçineye tutunan anti-PD-L1-scFv-His antikorları elde edildi.

Saflaştırma sonrası elde edilen anti-PD-L1-scFv-His antikorlarının Bradford tayini yapıldı ve farklı elüsyon örneklerindeki konsantrasyon aralığı 90-290 µg/ml olarak hesaplandı.

Antikorumun doğrulanması için anti-His Tag antikoru ile %12 resolving ve %6 stacking jel hazırlanarak western blot analizi yapıldı.

2.6. Anti-PD-L1-scFv-His Antikorumun PD-L1 Ligand Bağlama Özelliklerinin Test Edilmesi

Saflaştırılan anti-PD-L1-scFv antikorumun antijen afinitesi tayini için non-competitif ELISA yapıldı. Sırasıyla;

(1) yüksek antijen bağlama özelliğine sahip 96 kuyucuklu plağı kaplama tamponu (0,1 M Sodyum karbonat, pH: 9,5) içerisinde 2 µg/ml PD-L1 proteini ve

kontrol olarak 2 µg/ml BSA ile kaplanıp +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı,

(2) ertesi gün kaplama tamponları toplandı ve kuyular iki defa PBS ile yıkandı,

(3) kuyulara saflaştırılan anti-PD-L1-scFv antikoru %2 FBS içeren PBS içerisinde dilüe edilerek 2 µg/ml (1:1 dilüsyon)- 1 µg/ml (1:2 dilüsyon)- 0,5 µg/ml (1:4 dilüsyon)- 0,25 µg/ml (1:8 dilüsyon) konsantrasyonlarında eklendi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi,

(4) kuyular iki defa yıkama tamponu ile yıkandı,

(5) kuyulara PBS ile sulandırılmış 100 µl (0,5 µg) Anti-HisTag HRP antikoru eklenip 37 °C'de 1 saat inkübe edildi,

(6) kuyular iki defa yıkandı,

(7) kuyulara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve karanlıkta 30 dk inkübe edildi,

(8) kuyulara 50 µl stop solüsyonu eklenip hemen 450 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

2.7. Anti-PD-L1-scFv Antikorumun In Vivo Etkinliğinin Test Edilmesi

PD-L1 eksprese eden CRL2539 (4T1) fare meme kanseri hücreleri BALB/c farelere 1×10^6 sayıda subkutan olarak enjekte edilerek tümör modeli oluşturulduktan sonra ticari olarak satılan anti-PD-L1 monoklonal antikor (Avelumab) ile saflaştırılan anti-PDL1-scFv antikorumun karşılaştırmalı olarak tedavi etkinlikleri takip edildi. Bu amaçla 3 çalışma grubu oluşturuldu.

A1: CRL2539 Avelumab deney grubu: 400 µg

A2: CRL2539 Anti-PD-L1-scFv deney grubu: 18 µg

A3: CRL2539 Kontrol Grubu: Sadece tümör oluşturulup herhangi bir tedavi verilmemiş grup.

Uygulanan Avelumab konsantrasyonu (400 µg), insan dozuna eşdeğer olacak şekilde hesaplandı. Belirlenen anti-PD-L1-scFv konsantrasyonu (18 µg) ise, bu doktora tezinin bağlı olduğu projede PD-L1-scFv-Ga⁶⁸ bağlanma çalışmaları yapılırken 4T1 tümör modelinde tedavi etkinliği saptanmış olan konsantrasyon miktarıydı. İki tedavi grubunda da tümör enjeksiyonu yapıldıktan sonraki sekizinci günden itibaren 72 saatte bir toplamda dört defa tedavi verilmiş ve sonrasında takip yapıldı. Deney hayvanları ilacın olası yan etkileri açısından günlük olarak izlenmiş ve tümör ölçümleri yapıldı. Deney protokolü sonunda veya tümör hacmi 1500 mm³'e ulaşan hayvanlara ötanazi uygulandı.

2.8. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler SPSS for Windows 10.0 programı kullanılarak yapıldı. Deney gruplarında deney süresince izlenen tümör hacimleri Ortalama±Standart Hata olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Anova-Repeated Measures test ile test edildi. Sağ kalım analizleri Kaplan-Meier yöntemi ile yapıldı ve log-rank testi uygulandı.

3. BULGULAR

3.1. PD-L1 Antijeni ile Rat İmmünizasyonu Sonucu Oluşan Serum Antikor Titre Tayini

İmmünizasyon sonrasında ratların kulaklarından alınan 1 ml kan örneğinden serum kısmı ayrıldı ve bu serum örneklerinden PD-L1 proteinine karşı oluşan antikor varlığının ve antikor titrelerinin belirlenmesi amacıyla ELISA testi yapıldı.

Sonuçlar **Çizelge 3.1**'de verilmiş olup, çizelgenin sol tarafında antikor titrasyon oranları, sağ tarafında absorbans (OD) değerleri gösterilmektedir.

LOD (limit of detection) = 3X blank bufferın standart sapması / kalibrasyon çizgisinin eğimi; LOQ (limit of quantification) = 10X blank bufferın Standart sapması / kalibrasyon çizgisinin eğimi formülüyle hesaplandı. Bu hesaplamalara göre OD 0,0798'in üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edildi. Elde edilen bu sonuçlara göre, PD-L1 ile immünize edilen ratlarda antikor titrelerinin 1/243000 olduğu görüldü ve böylece ratların uygun anti-PD-L1 antikor titresine sahip olduğu gösterildi.

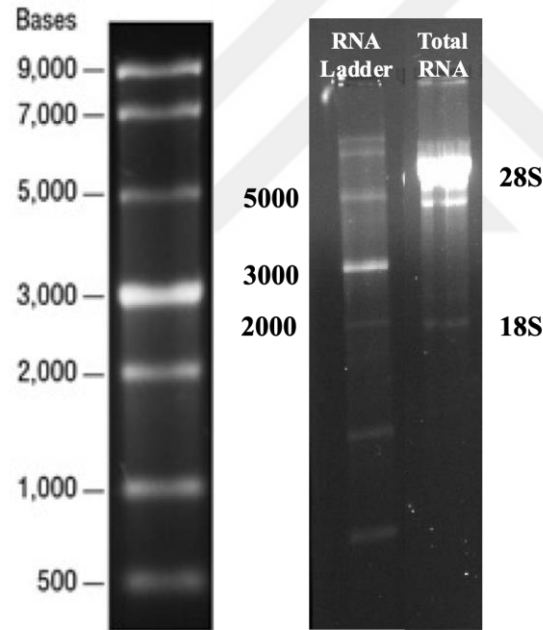
Çizelge 3.1. Rat serumlarında anti-PD-L1 antikor titresinin belirlenmesi amacıyla yapılan ELISA sonuçları

	1. rat	2. rat		1. rat	2. rat
	Antikor titrasyon oranları			OD (Abs)	
A	1/1000	1/1000	A	2,8607	2,9482
B	1/3000	1/3000	B	2,7066	2,7689
C	1/9000	1/9000	C	2,2643	2,0772
D	1/27000	1/27000	D	1,4475	1,2008
E	1/81000	1/81000	E	0,9876	0,5831
F	1/243000	1/243000	F	0,4407	0,2669
G	Assay buffer		G	0,0318	0,0419
H	Negatif fare serumları		H	0,036	0,0438
				Negatif ort	0,0399
				Cut off	0,0798

Boost işleminden 3 gün sonra ratlar sakrifiye edilerek alınan dalak hücrelerinin total RNA izolasyonu yapıldı.

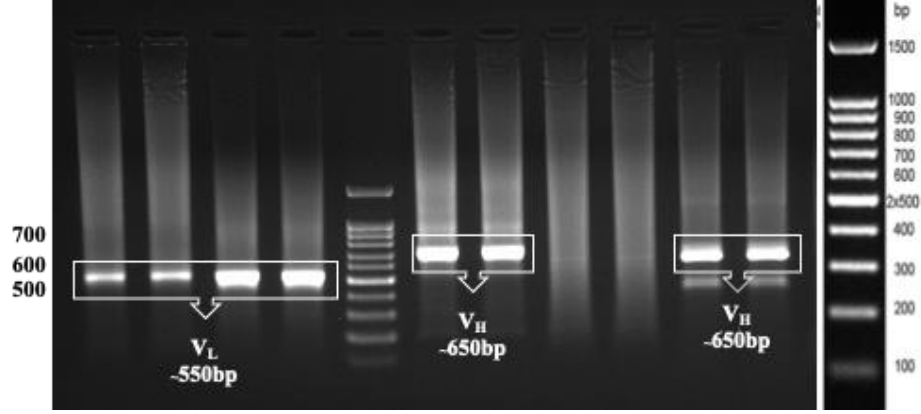
3.2. Dalak Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA Örneğinin Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA örneğinin degrede olup olmadığını kontrolü %2'lik agaroz yürütülerek kontrol edildi. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi yürütülen total RNA örneğinde net 28S rRNA (~5000 bp) ve 18S rRNA (~2000 bp) bantları görüldüğünden RNA'nın degrede olmadığı ve total RNA izolasyonunun başarılı olduğu kabul edildi.



Şekil 3.1. İzole edilen total RNA örneğinin agaroz jel elektroforezi

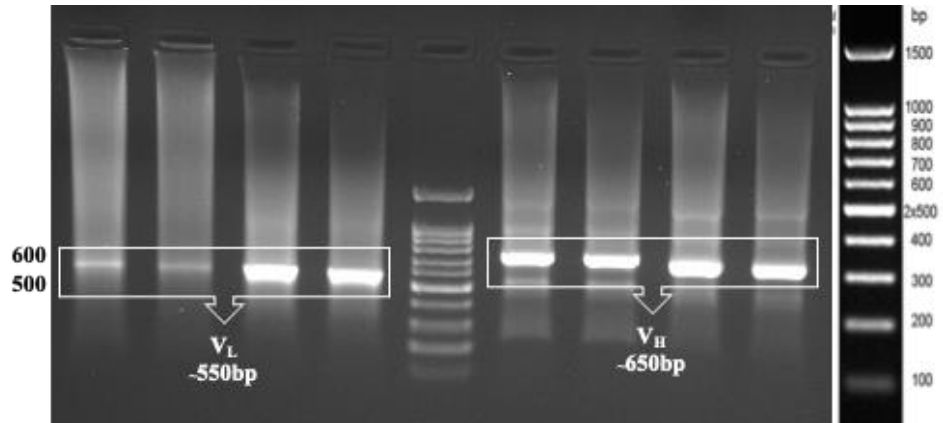
RNA kalitesinin kontrolü ayrıca Agilent Bioanalyzer cihazı ile de yapıldı. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi, analiz sonucunda 18S ve 28S rRNA pikleri elde edilmiş olup RIN değeri 7,5 olarak saptandı (İdeal RIN aralığı 7-10).



Şekil 3.3. 5'-RACE PCR ile çoğaltılan rat immünglobulin hafif (VL) ve ağır (VH) domainleri

Ürünlerin tamamı %1'lik agaroz jelde yürütülüp bant boyutları doğrulandıktan sonra jel ekstraksiyon kiti ile jelden ekstrakte edilip sonrasında saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldı.

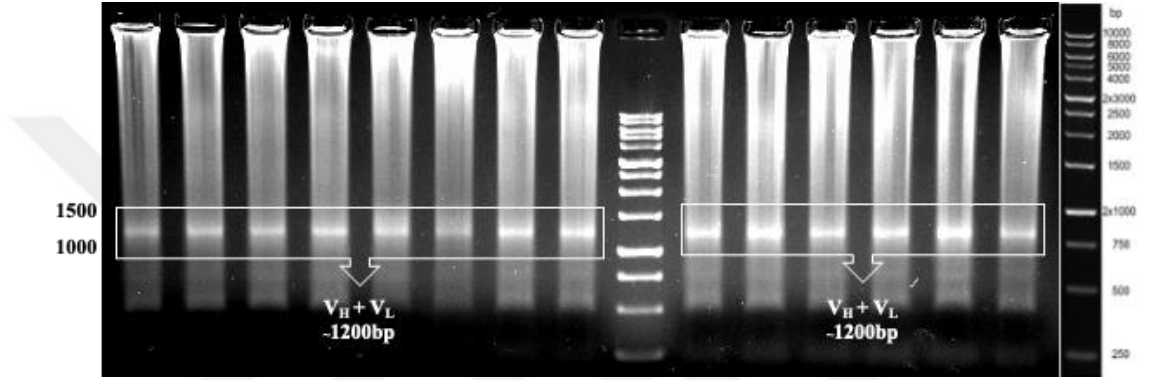
Ekstrakte edilen VH ve VL PCR örnekleri linker bağlantı bölgesi eklenen primerler ile yeniden PCR yapıldı. **Şekil 3.4'**de gösterildiği gibi ürünlerin tamamı %1'lik agaroz jelde yürütülüp bant boyutları doğrulandıktan sonra jel ekstraksiyon kiti ile jelden ekstrakte edilip sonrasında saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldı.



Şekil 3.4. Linker bağlantı bölgesi eklenen VL ve VH immünoglobulin molekülleri

3.4. Overlap Extension PCR Yöntemi ile Bağlantı Bölgesi Eklenen VH ve VL İmmünglobulin Genlerinin Birleştirilmesi ve Çoğaltılması

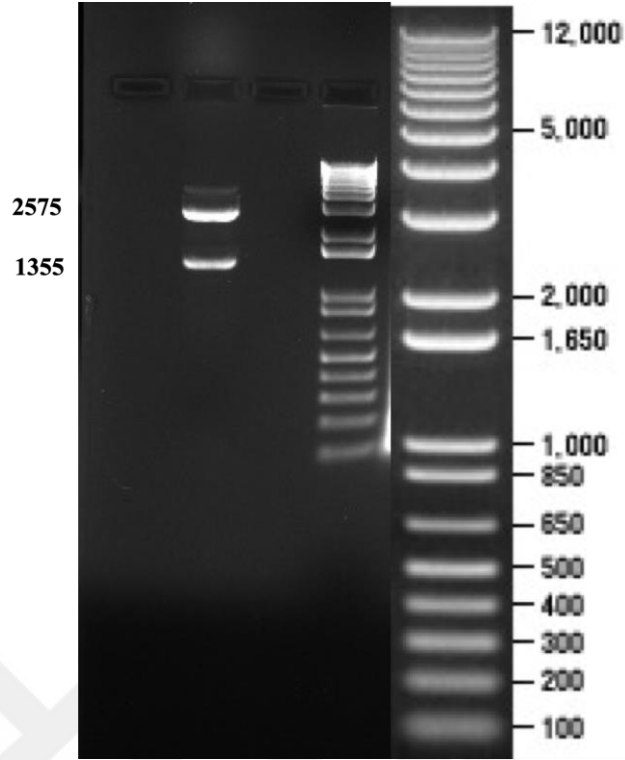
İmmünglobulin ağır ve hafif zincirlerini birleştirip scFv yapısında antikor elde etmek için bağlantı bölgeleri eklenen VH ve VL immünoglobülin molekülleri **Şekil 3.5**'te gösterildiği gibi, iki aşamalı overlap extension PCR yöntemi ile birleştirildi (yaklaşık 1200bp) ve çoğaltıldı.



Şekil 3.5. Linker bağlantı bölgesinden bağlanan VH+VL molekülleri ve bu aşamada uygulanan PCR koşulları

3.5. pADL20c Fajemid Vektörün Kesim Enzimleri ile Doğrulanması

Şekil 3.6'da gösterildiği gibi, NheI ve ECORI enzimleri ile kesilip %1'lik agaroz jelde yürütülerek pADL20c vektörün doğrulanması yapıldı. 3390 bp uzunluğundaki pADL20c vektöründe NheI kesim bölgesi vektörün 3359., ECORI kesim bölgesi ise 2004. bölgesinde bulunmaktadır. Bu enzimler ile kesim sonucu agaroz jelde biri 1355 bp'de diğeri 2575 bp'de olmak üzere iki bant saptandı.



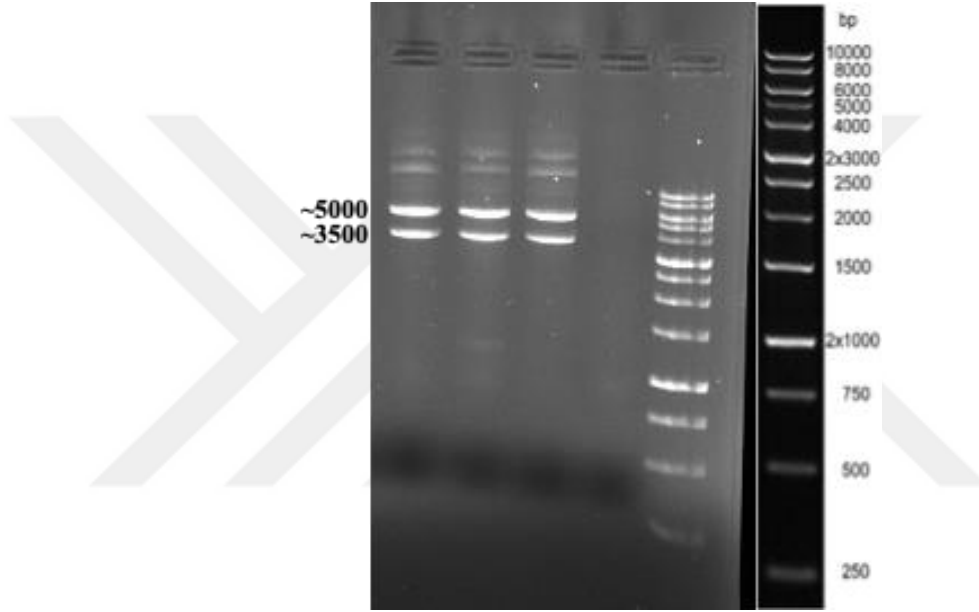
Şekil 3.6. pADL20c vektörünün NheI ve ECORl kesim enzimleri ile doğrulanması

3.6. Rekombinant Anti-PD-L1-scFv Antikor Kütüphanesinin Doğrulanması

Şekil 3.7’de SfiI ile kesimi yapılan plazmid örneklerinin %1’lik agaroz jel görüntüsü bulunmaktadır. Yaklaşık 1200 bp boyutunda görülen bant ile PD-L1-scFv antikor kütüphanesi doğrulanarak ligasyonun başarılı olduğu kabul edildi. Jel görüntüsünde ayrıca görülen farklı boyutlardaki bantlar (500-900 bp), rekombinant PD-L1-scFv antikor taşıyan fajemid vektörlere farklı uzunlukta ürünlerin de eklendiğini ve antikor kütüphanesinin çeşitli olduğunu göstermektedir.

3.8. M13 Helper Fajının Kesim Enzimleri ile Doğrulanması

M13 fajı 8668 bp uzunluğunda olup, bu dizinin içerisinde bulunan BamHI kesim bölgesi 2220-2025 bp, HindIII kesim bölgesi ise 7401-7406 bp aralığındadır. M13'ün BamHI ve HindIII enzimleri ile kesimi sonucu 5176 bp ve 3492 bp olmak üzere iki ayrı dizi oluşacaktır. Buna uygun şekilde, **Şekil 3.9**'da görüldüğü gibi %1'lik agaroz jelde yaklaşık 5000 bp ve 3500 bp'de bant gözlemlendi.



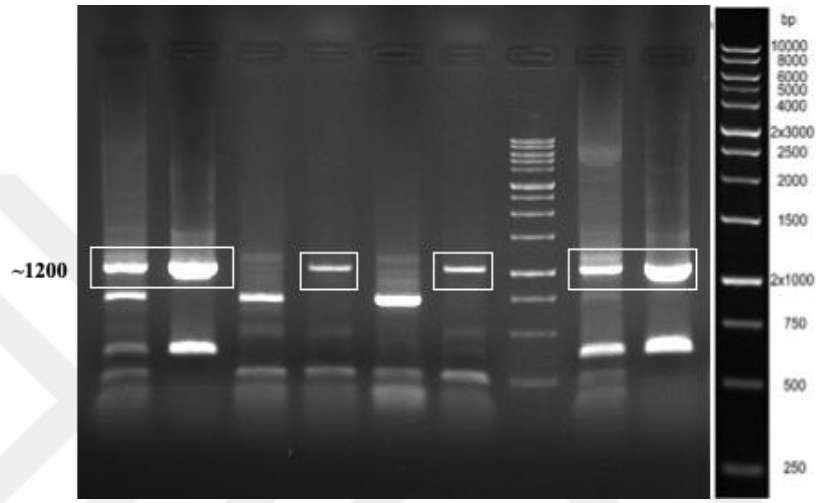
Şekil 3.9. M13 fajının BamHI ve HindIII ile kesimi

3.9. Helper Faj Titrasyon Analizi

Şekil 3.10'da görüldüğü üzere, 10^{-7} - 10^{-14} dilüsyon aralığında 10^{-12} dilüsyona kadar faj plağı gözlenirken, 10^{-13} ve 10^{-14} dilüsyon petrilerinde üreme gözlenmedi. Bundan dolayı, M13 helper faj ana stok konsantrasyonu 1×10^{12} pfu/ml olarak saptandı. PD-L1-scFv antikor faj kütüphanesinin oluşturulma deneylerinde bu konsantrasyona göre hesaplama yapıldı.

3.14. Monoklonal Faj ELISA Pozitif Plazmid Örneklerinin PCR ile Kontrolü

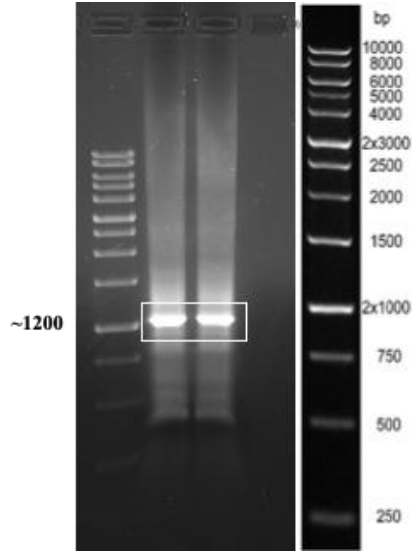
Monoklonal faj ELISA’da pozitif olarak değerlendirilen örneklerden izole edilen plazmidlerin antikorun VH+VL için spesifik olarak tasarlanan primerler ile PCR’ı sonucu **Şekil 3.15**’de görüldüğü gibi ~1200 bp boyutunda bant elde edildi.



Şekil 3.15. Monoklonal faj ELISA pozitif plazmid örneklerinin PCR’ından elde edilen PD-L1-scFv örnekleri

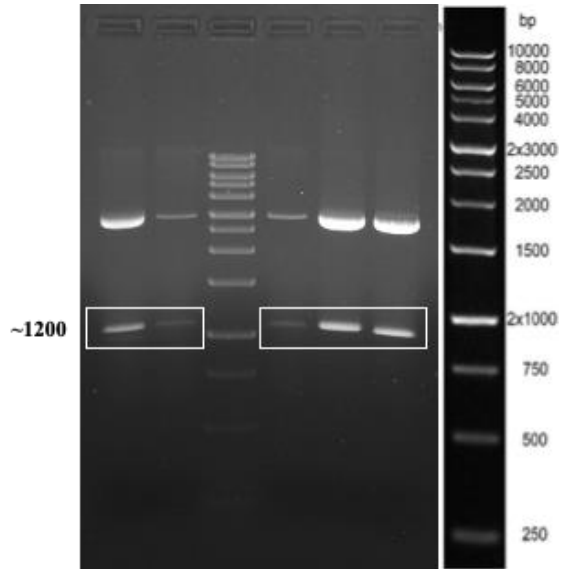
3.15. Anti-PD-L1-scFv Genine 6xHis-Tag Eklenecek Taşıyıcı Plazmidine ve Ekspresyon Plazmidine Klonlanması

Anti-PD-L1-scFv antikor geni, ekspresyon vektörüne klonlanıp HEK293 hücrelerinde transfeksiyonun yapılabilmesi gerekli kesim enzim bölgelerini ve saflaştırılabilmesi için gerekli 6X Histidin etiketini içeren primerler ile PCR yapılarak çoğaltıldı. **Şekil 3.16**’da beyaz kutucuklar içerisinde gösterildiği gibi PCR sonucunda çoğalan ~1200 bp boyutundaki antikor ürünü daha sonra jelden ekstrakte edildi.



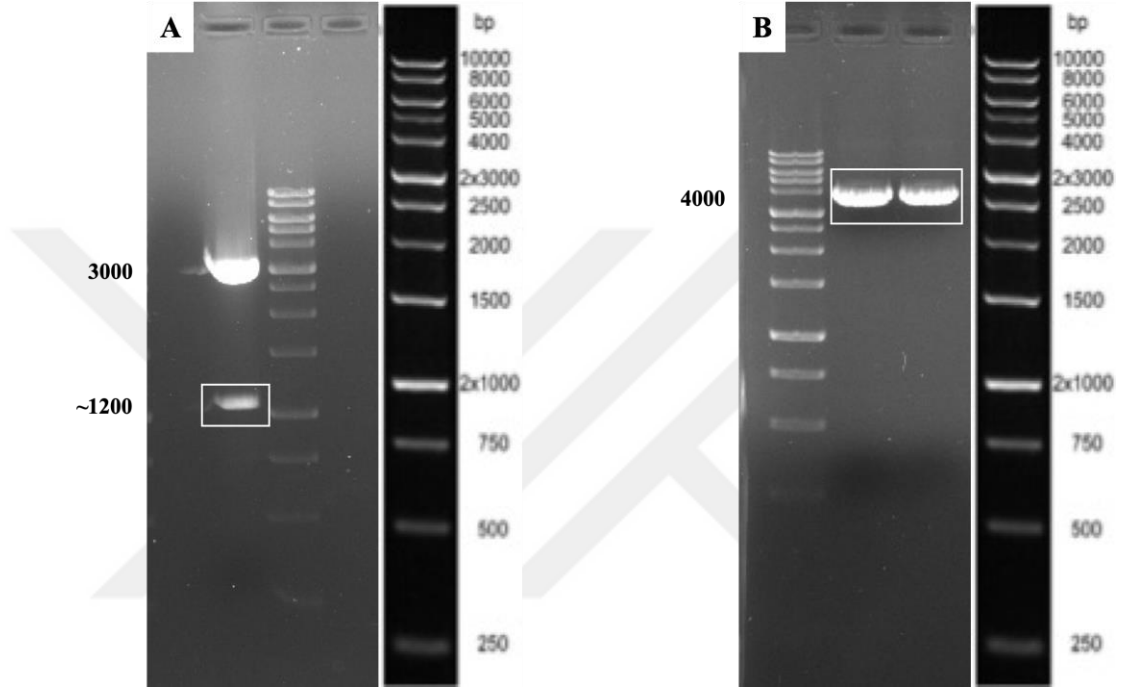
Şekil 3.16. Kesim enzim bölgeleri ve 6X Histidin etiketi içeren anti-PD-L1-scFv-His ürünü

Jelden saflaştırılan anti-PD-L1-scFv-His geni pJET1.2/blunt vektörüne klonlandıktan sonra antikorun ligasyonunun doğrulanması için XhoI ve XbaI enzimleri ile kesim yapıldı. **Şekil 3.17**'de beyaz kutucuklar içerisinde görüldüğü gibi, anti-PD-L1-scFv-His geni kesim sonrası ~1200 bp'de görülmektedir. Şekilde ayrıca görülen ~3000 bp'deki bantlar pJET1.2/blunt vektörüne aittir.



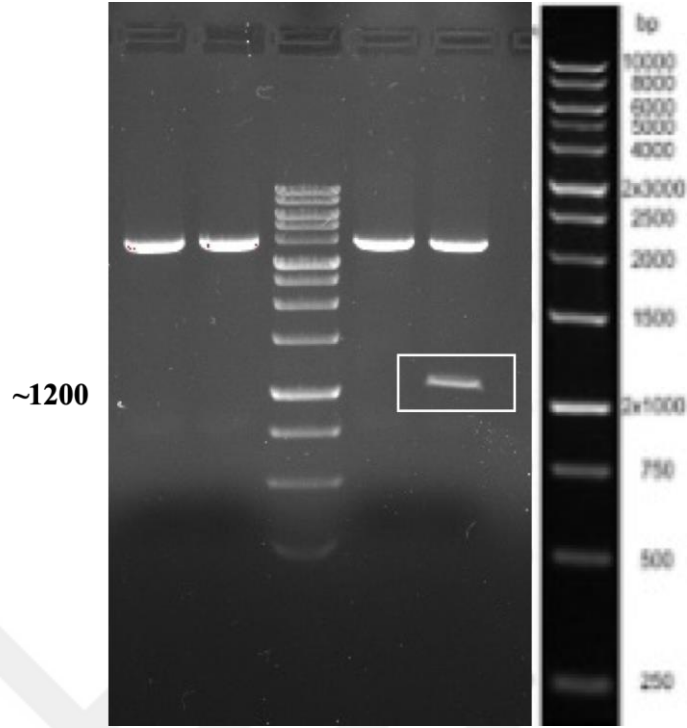
Şekil 3.17. pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmış anti-PD-L1-scFv-His ürününün XhoI/XbaI enzimleri ile doğrulanması

Şekil 3.18. A’da içerisinde anti-PD-L1-scFv-His geni olduğu doğrulanan plazmidin ECORI ve XhoI enzimleri ile kesimi sonucu jelde ~1200 bp’de anti-PDL1-scFv antikör geni ve 2974 bp boyutundaki pJET1.2/blunt plazmidi, B’de pFUSE2ss-ratK plazmidinin ECORI ve XhoI enzimleri ile kesimi sonucu boyutu aynı kalıp 3845 bp’de plazmidin kendisi görülmektedir.



Şekil 3.18. Anti-PD-L1-scFv-His taşıyan pJET1.2/blunt plazmidi (A) ile pFUSE2ss-ratK ekspresyon plazmidinin (B) ECORI ve XhoI ile kesimi

Şekil 3.19’ da görülen ~1200 bp ürün ile pFUSEss vektörüne klonlanmış anti-PD-L1-scFv-His ürününün ECOR/XhoI enzimleri ile doğrulaması yapıldı.



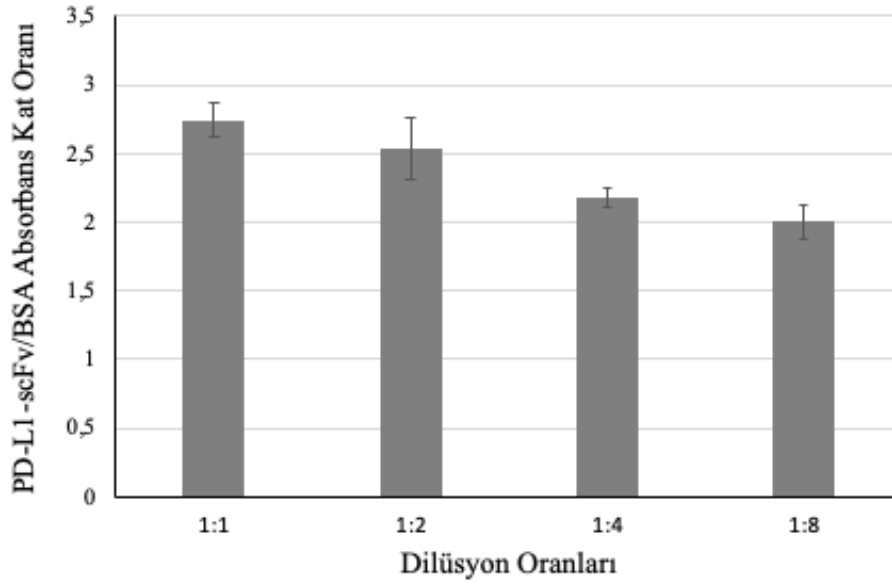
Şekil 3.19. pFUSEss vektörüne klonlanmış anti-PD-L1-scFv-His ürününün ECOR/XhoI enzimleri ile doğrulanması

3.16. HEK293 Hücrelerinde Anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss Pozitif Master Hücre Elde Edilmesi

HEK293 hücreleri ile anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss plazmidinin transfeksiyonu sonrası dört hafta boyunca blastisidin seçimi ile anti-PD-L1-scFv-His-pFUSE2ss pozitif hücreler elde edilmiş ve sonrasında çoğaltıldı. **Şekil 3.20'**de blastisidin ile pozitif klon seçilmesi ile ilgili çalışmalara ait örnekler verilmiştir.

3.18. Anti-PD-L1-scFv Antikorumun PD-L1 Ligand Bağlama Analizi

Anti-PD-L1-scFv antikorumun PD-L1 antijenine afinitesi ELISA yöntemi ile tayin edildi. **Şekil 3.22**'de görüldüğü gibi, saflaştırılan anti-PD-L1-scFv antikoru, PD-L1 antijenine aynı konsantrasyondaki BSA'ya göre yaklaşık 2,8 kat fazla bağlanma gösterdi. PD-L1 antikor konsantrasyonu 1:8 oranında dilüe edilse bile, anti-PD-L1 antikoru PD-L1 antijenine BSA'ya göre hala iki kat daha fazla bağlandığı gösterildi.



Şekil 3.22. Anti-PD-L1-scFv antikorumun farklı dilüsyonlarda PD-L1 antijeni ve BSA proteinine bağlanma absorbanslarının oranlanması

3.19. Anti-PD-L1-scFv Antikorumun In Vivo Etkinlik Analizi

Çizelge 3.4'deki medyan sağ kalım sürelerinde ve **Şekil 3.23**'deki sağ kalım eğrilerinde görüldüğü gibi, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da PD-L1 ekspresyonu yüksek 4T1 fare tümör modelindeki anti-PD-L1 tedavi grubu ile kontrol grubunun medyan sağ kalım süreleri arasında hemen hemen bir fark gözlenmezken, anti-PD-L1-scFv grubunun medyan sağ kalım süresi kontrol grubuna göre dikkat çekici bir şekilde arttığı gösterildi.

4. TARTIŞMA

İmmün kontrol noktası inhibitörleri, tedavisi zor birçok tümörde kalıcı klinik yanıtlar sağladığı için kanser tedavisinde devrim etkisi yaratmıştır. Ancak hastaların büyük bir kısmının tedaviden yanıt görememesi, ilaçların yan etki potansiyelinin yüksek olması nedeniyle farklı tedavi seçenekleri ve kombinasyonları üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bir antikoru antijen bağlayan en küçük fonksiyonel fragmenti olan scFv antikoru tam antikor molekülüne kıyasla araştırma, teşhis ve klinik uygulamalarda kullanım potansiyeli yüksektir.

Bu doktora tezinde, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak rekombinant anti-PD-L1-scFv antikorı üretildi. Bunun için, fare PD-L1 proteini ile immünize edilen rat dalaklarından elde edilen cDNA'ların antikoru antijeni tanıyan değişken bölgelerine (VH ve VL) spesifik primeler tasarlanarak PCR yöntemi ile çoğaltılması (Şekil 3.3) ardından, bu iki bölgenin birleştirilebilmesi için bağlayıcı ve esnek bir bölgeye spesifik tasarlanan primerler ile çoğaltıldı (Şekil 3.4). Bağlayıcı bölgeler içeren VH ve VL dizileri Overlap Extension PCR yöntemi ile iki aşamalı olarak birleştirildi ve ardından çoğaltıldı (Şekil 3.5). scFv geninin eksprese olabilmesi için rekombinant antikor üretiminde en yaygın olarak kullanılan faj gösterim yönteminden yararlanıldı. Elde edilen scFv kütüphanesinin fajemid vektörüne klonlanmasıyla elde edilen rekombinant anti-PD-L1-scFv fajemid vektörü faj-kompetan bakteri hücrelerine transforme edilerek rekombinant antikor kütüphanesinin oluşturulması sağlandı. Ardından fajemid içeren antikor kütüphanesinin helper faj ile enfeksiyonu sonrası anti-PD-L1-scFv antikor faj kütüphanesi oluşturuldu. Bu faj kütüphanesi içerisinde PD-L1 antijenine en yüksek afinite ile bağlanan fajların seçimi, belirli ortam ve tampon koşullarında katı bir yüzey üzerine adsorbe edilen PD-L1 antijenine bağlanma aktivitelerine göre yapıldı. Afinite seçimi sonrası yüksek afiniteli fajların tanımlanması için poliklonal ve monoklonal faj ELISA deneyi (Çizelge 3.2-3.3) yapıldı. Buradan elde edilen antikor taşıyan faj örnekleri scFv molekülüne spesifik primerler ile çoğaltılarak ve DNA dizileme yöntemi ile doğrulandı. Yüksek afinite ile bağlandığı doğrulanan antikorları taşıyan plazmid rekombinant antikorların en çok

tercih edildiği ekspresyon sistemlerinden biri olan memeli HEK293 hücrelerinde eksprese olması için pFUSE2ss ekspresyon vektörüne klonlandı (Şekil 3.19). Anti-PD-L1-scFv taşıdığı doğrulanan plazmid HEK293 hücreleri ile transfekte edildikten sonra blastidin antibiyotiği ile seçim yapılarak ortamda sadece antikor taşıyan ekspresyon vektörünün çoğalmasa sağlandı (Şekil 3.20). HEK293 hücrelerinden besiyerine eksprese edilen anti-PD-L1-scFv örnekleri toplanarak İmmobilize Metal Afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı (Şekil 3.21). Saflaştırılan antikor ürününün ligand bağlanma etkinliği test edildikten sonra (Şekil 3.22) anti-PD-L1 antikoruna ile karşılaştırmak üzere in vivo etkinliği test edildi. Elde edilen anti-PD-L1-scFv antikorunun PD-L1 antijenine bağlandığı gösterildi ve istatistiksel olarak anlamlı olmasa da anti-PD-L1 antikoruna kıyasla PD-L1 pozitif fare tümör modelinde daha uzun bir sağ kalım süresi (Çizelge 3.4, Şekil 3.23) ve daha yavaş tümör gelişimi sağladığı (Şekil 3.24) gösterildi.

İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin anti-tümör etkinliğinin artırılması için genel olarak çalışmalar PD-L1-scFv ile diğer bir immünoterapi stratejisi olan onkolitik viroterapi kombinasyonlarına yönelmektedir. Bu tedavide, kanser hücrelerini seçici olarak enfekte ederek yok edebilen, tümör ile ilişkili antijenlerin salınmasını indükleyerek antitümöral immün yanıtlar oluşmasını sağlayan replikasyon defektif virüsler kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, retroviral vektör ile birleştirilen PD-L1-scFv ürününün (RRV-scFv-PD-L1), fare tümör modellerinde anti-PD-1 ve anti-PD-L1 moAb tedavileri ile karşılaştırılabilir veya daha üstün immün aracılı antitümör aktivitesi sağladığı gösterildiği için bu ürünün, piyasada onaylanmış antikorlara kıyasla daha gelişmiş bir güvenlik ve etkinlik profili sağlayabileceği söylenmektedir (Mitchell ve ark., 2019). Başka bir çalışmada PD-L1-scFv antikorunun onkolitik virüs tedavisiyle birleştirilerek elde edildiği VSVM15R-PD-L1 ürününün fare tümör modellerinde güçlü bir terapötik etkinliği olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2019). Bir başka çalışmada ise PD-L1-scFv antikoruna ile patojenik olmayan replikasyon defektif rekombinant adeno-ilişkili vektör (rAAV) birleştirilerek oluşturulan rAAV-PD-L1-scFv'nin kolorektal ve meme fare tümör modellerinde test edilmesi sonucunda, tümör mikroçevresinde PD-1-CD8⁺ T hücrelerinde artış saptanırken, düzenleyici T hücrelerinde, M2 makrofajlarda ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerde azalma

meydana geldiği için ürünün, etkili antitümör sitotoksik T lenfosit aktivitesi nedeniyle kanser tedavisinde anti-PD-L1 mAb tedavisine alternatif olabileceği gösterilmiştir (H. Wang ve ark., 2022). Bu nedenle immün kontrol noktası inhibitörlerinin ciddi yan etki potansiyellerinin inhibe edilmesi ve tedavi etkinliklerinin artırılması için tam antikor yapılarından ziyade scFv gibi daha küçük formatta ve immün sistemin aktive olmasını destekleyecek diğer tedavi seçenekleriyle kombine edilmesi fikri üzerinde durulmaktadır.

Rutinde bakılan PD-L1 IHC boyamanın çeşitli dezavantajları olduğu bilindiğinden tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyon seviyesinin tespiti için farklı teşhis yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Tümörlerdeki PD-L1 ekspresyonunun önceden saptanarak immünoterapiden yarar görece hastaların belirlenmesi için de çalışmalar yapılmaktadır. PD-L1-scFv formatında olmasa da Zr⁸⁹ ile bağlanan PD-L1 antikoru ile yapılan bir çalışmada ⁸⁹Zr-DFO-6E11 PET görüntülemenin tümör cevabını takibinde de yararlı olabileceği gösterilmiştir (Christensen ve ark., 2020). Başka bir çalışmada Ga-68 işaretli PD-L1 nanobodynin spesifik olarak MC38 insan PD-L1 tümör xenografında tümör dokusunda biriktiği (Qin ve ark., 2021) ve bu nanobodynin tümör cevabını takibinde de kullanılabilmesi gösterilmiştir (Lv ve ark., 2020). Tam PD-1 ve PD-L1 antikorları ile radyoaktif izleyicilerin kombine edildiği çalışmalar da yapılmıştır. KHDAK'da PD-L1 ve PD-1 ekspresyonunun, sırasıyla ¹⁸F-BMS-986192 ve ⁸⁹Zr-nivolumab radyoaktif izleyiciler kullanılarak PET-CT görüntüleme ile non-invaziv olarak ölçülebileceği gösterilmiştir (Niemeijer ve ark., 2018). Bensch ve arkadaşları tarafından, üç tümör tipinde 22 hastada zirkonyum-89 etiketli atezolizumabın PET aracılığı ile biyolojik dağılımını karakterize edilmiş ve atezolizumab ile tedavi edilen kayıtlı hastalarda zirkonyum-89-ışaretli atezolizumab tümör tutulumunun, objektif yanıt oranı, progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalım ile pozitif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır (Niemeijer ve ark., 2018). Bu çalışmalar, PD-L1'in tümörlerdeki anti tümör immün aktivitelerin tespit edilmesi ve izlenmesi için bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesini göstermektedir. Ayrıca görüntüye dayalı tasarlanan bu biyobelirteçlerin invaziv olmaması nedeniyle, gelecekte anti-PD-1/PD-L1 immünoterapisine daha çok katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada hedeflenen amaca ulaşılmış olup, PD-L1'e spesifik olduğu gösterilen anti-PD-L1-scFv antikoru başarılı bir şekilde üretildi. PD-L1 antijenine spesifik olduğu ve PD-L1 eksprese eden fare tümör modellerinde tedavi etkinliği sağladığı gösterilen anti-PD-L1-scFv antikorunun hem diagnostik hem de terapötik açıdan ticarileşme potansiyeli yüksektir. Murin ve insan PD-L1 arasındaki protein sekans özdeşliği %77 olduğu için elde edilen özgün anti-PD-L1-scFv antikorunun insan PD-L1'ini de tanıyabilme potansiyeli yüksek olup diğer anti tümör ilaçları ve kimyasalları tümör hücrelerine taşımada güçlü bir taşıyıcı olarak kullanılabilir.

İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin büyük klinik başarılarına rağmen hastaların büyük bir kısmının tedaviye yanıt vermemesi nedeniyle yarar görmeyecek hasta grubunun tedaviden önce belirlenmesi gerekmektedir. Rutinde bakılan PD-L1 IHC boyamanın çeşitli dezavantajları olduğu bilindiğinden farklı teşhis yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen PD-L1-scFv antikorunun bir radyonüklid ile birleştirilmesi planlanmaktadır ve bu sayede immünoterapi tedavisi alacak hastaların tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyon seviyelerine göre tedaviden yarar görüp görmemesi öngörülebilir.

Elde edilen scFv antikoru rat kökenli olduğu için, insan çalışmalarında yan etki potansiyelinin azaltılması için humanizasyon çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.

İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin yan etki potansiyelinin azaltılması ve tedavi etkinliğinin artırılması için, tartışma bölümünde gösterilen çalışmalardaki onkolitik virüs çalışmalarına benzer fikirde daha etkili kombinasyonlar üzerinde çalışılması planlanmaktadır.

Ayrıca kanser araştırmalarında PD-L1 teşhisinde kullanılmak üzere elde edilen PD-L1-scFv ile kaplanmış ELISA kiti tasarımı yapılması planlanmaktadır.

ÖZET

Kanser Tanı ve Tedavisinde Kullanılmak Üzere Anti-PD-L1-scFv Antikor Geliştirilmesi

Kanser ciddi bir sağlık sorunu olup, dünyada morbidite ve mortaliteye yol açan hastalıkların başında gelmektedir.

Kanser hücreleri ile mücadelede, vücudun en önemli silahı olan T hücrelerinin antijen tanınmasında ve aktivasyonunda rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması ile daha spesifik ve etkin tedavi ajanları geliştirilmesi mümkün hale gelmiştir. Aktive T hücrelerinde bulunan PD-1, immünojenik aktivasyonu sınırlandıran ve inhibe eden bir moleküldür. T hücrelerinde bulunan PD-1'e bağlanarak bu inhibisyonun gerçekleşmesini sağlayan başlıca iki ligand (PD-L1 ve PD-L2) bulunmaktadır. Bu ligandlar antijen sunan hücrelerin yanı sıra diğer stromal hücrelerde ve tümör hücrelerinde de bulunmaktadır. Tümör dokusunda PD-L1 ekspresyonunun artışı ile tümörler kendilerine karşı gelişmiş olan spesifik T hücre cevabını baskılayarak immün sistemden kaçır ve büyümeye devam eder. Bu noktadan yola çıkarak, PD-1 reseptörü veya PD-L1 ligandının bloke edilmesiyle tümörlere karşı T hücre cevabının artırılması için üretilen monoklonal antikor tedavileri son 10 yıl içerisinde ileri evre kanser tedavisinde benzeri görülmemiş bir başarı sergilediğinden onkoloji alanında devrim yaratmıştır. Klinik çalışmalarda tümör dokusunda immunohistokimyasal olarak PD-L1 ekspresyonu olduğu gösterilen hastalarda daha yüksek oranda tedavi yanıtı elde edildiği gösterilmiştir. Tümörlerdeki PD-L1 ekspresyonunun, bu molekülü hedefleyen tedaviler için bir biyobelirteç olabileceği öngörülmektedir. Hastaların önemli bir oranının PD-1/PD-L1 ajanlarından yarar görememesi, tedavilerin hastalarda immün ilişkili toksisiteye neden olması ve tedavi maliyetinin yüksek olması nedeniyle, bu tedavilerin rasyonel kullanımını sağlayarak, immünoterapilerden yarar göreceği hasta gruplarının belirlenmesinde prediktif biyobelirteçlere ihtiyaç vardır.

Tam antikorların, büyük molekül yapıları nedeniyle dokuya geçişlerde sorun oluşturabilmesi ve hastalarda antikorun taşıdığı Fc kısmı nedeniyle ciddi yan etki potansiyeli taşımaları nedeniyle rutin kullanımları kısıtlanmaktadır. Antikor molekülünün scFv fragmenti, bir antikorun antijen bağlayan en küçük fonksiyonel halkasını içerir. scFv antikorunun araştırma, teşhis ve klinik uygulamalar gibi birçok alanda kullanım potansiyeli yüksektir. scFv antikor yapısının tam antikorlara kıyasla daha küçük olması, tümörlere ve diğer dokulara daha hızlı ve eşit bir şekilde nüfuz etmesine olanak sağlar. Bu fragmentlerin kandan daha hızlı atılabilmesinden ve sağlıklı dokunun bu antikorlara düşük oranda maruz kalmasından dolayı scFv antikorları anti-kanser ilaçları ve radyonüklitler ile birleştirilerek kanser tedavisinde ve görüntülenmesinde kullanılabilir.

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, PD-L1 antijenine karşı immünizasyon yoluyla elde edilen sıçan dalak hücre cDNA'larının immünglobülin VH ve VL değişken bölgelerinin spesifik primerler ile çoğaltılması ve

sonrasında bu bölgeleri birleştiren bağlayıcı diziyi içeren primerler ile birleştirilip bir scFv molekülü oluşturuldu. Elde edilen scFv antikor kütüphanesinin faj gösterim yöntemi aracılığı ile fajların yüzeyinde eksprese ettirilmesi sağlandıktan sonra afinite seçimi yapılarak PD-L1 antijenine en yüksek afiniteye bağlanan anti-PD-L1-scFv antikorunun elde edilmesi sağlandı. Yüksek afiniteli anti-PD-L1-scFv antikorunun HEK293 hücrelerinde eksprese ettirilmesi ve IMAC yöntemi ile saflaştırılması sonrası, antikorun antijen bağlama performansları saptandı ve tam anti-PD-L1 antikoru ile in vivo tedavi etkinliği kıyaslandı.

Elde edilen özgün anti-PD-L1-scFv antikoru doğrudan immün sistemi aktive etmek için kullanılabilmesi gibi diğer anti tümör ilaçları ve kimyasalları tümör hücrelerine taşımada güçlü bir taşıyıcı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Ayrıca elde edilen anti-PD-L1-scFv antikorunun bir radyonüklid ile bağlanması ile hastaların anlık PD-L1 ekspresyon oranının tespit edilmesi sayesinde doğru PD-L1 ekspresyon seviyesi analizi yapılarak PD-L1'in immünohistokimyasal analizindeki kısıtlılıkların giderilmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Anti-PD-L1-scFv, Faj gösterim, PD-L1, Rekombinant antikor, scFv

SUMMARY

Development of Anti-PD-L1-scFv Antibody for Use in Cancer Diagnosis and Treatment

Cancer is a serious health problem and one of the leading diseases that cause morbidity and mortality worldwide.

In the fight against cancer cells, it has become possible to develop more specific and effective treatment agents by elucidating the mechanisms involved in antigen recognition and activation of T cells, the body's most important weapon. PD-1 found in activated T cells is a molecule that limits and inhibits immunological activation. Two main ligands (PD-L1 and PD-L2) enable this inhibition to occur by binding to PD-1 in T cells. These ligands are found on antigen-presenting cells, other stromal cells, and tumor cells. With the increase of PD-L1 expression in tumor tissue, tumors suppress the specific T-cell response developed against them and escape from the immune system and continue to grow. From this point of view, monoclonal antibody therapies produced to increase the T cell response against tumors by blocking the PD-1 receptor or PD-L1 ligand have revolutionized the field of oncology, as they have shown unprecedented success in the treatment of advanced cancer in the last 10 years.

In clinical studies, it has been shown that a higher rate of treatment response was obtained in patients who were shown to have PD-L1 expression in tumor tissue by immunohistochemistry. PD-L1 expression in tumors is predicted to be a biomarker for therapies targeting this molecule. Predictive biomarkers are needed to determine patient groups that will benefit from immunotherapies because a significant proportion of patients do not benefit from PD-1/PD-L1 agents, the treatments cause immune-related toxicity in patients, and the high cost of treatment. The routine use of full antibodies is restricted due to their large molecular structure, causing problems in tissue penetration and the potential for serious side effects in patients due to the Fc part they carry. The scFv fragment of the antibody molecule is the smallest functional link of an antibody that binds antigen. The scFv antibody has a high potential for use in many fields such as research, diagnostics and clinical applications. The smaller scFv antibody structure compared to whole antibodies allows it to penetrate tumors and other tissues more quickly and evenly. Because these fragments can be removed from the blood faster and healthy tissue is less exposed to these antibodies, scFv antibodies can be combined with anti-cancer drugs and radionuclides to be used in cancer treatment and imaging.

In this study, an scFv molecule was formed by obtaining and combining the immunoglobulin VH and VL variable regions from rat spleen cell cDNAs obtained by immunization against PD-L1 antigen using recombinant DNA technology. After the scFv antibody library obtained was expressed on the surface of the phages by means of the phage display method, affinity selection was made to obtain the anti-PD-L1-scFv antibody that binds to the PD-L1 antigen with the highest affinity. After

expression of high-affinity anti-PD-L1-scFv antibody in HEK293 cells and purification by IMAC method, the antigen binding performances of the antibody were determined and the in vivo treatment efficacy was compared with the full anti-PD-L1 antibody. The unique anti-PD-L1-scFv antibody obtained can be used to activate the immune system directly, as well as have the potential to be used as a potent carrier in delivering other anti-tumor drugs and chemicals to tumor cells. In addition, by binding the obtained anti-PD-L1-scFv antibody with a radionuclide and detecting the instant PD-L1 expression rate of the patients, accurate PD-L1 expression level analysis can contribute to the elimination of the limitations in the immunohistochemical analysis of PD-L1.

Keywords: Anti-PD-L1-scFv, PD-L1, Phage display, Recombinant antibody, scFv



KAYNAKLAR

- AHMAD ZA, YEAP SK, ALI AM, HO WY, ALITHEEN NB, HAMID M (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol.*, 980250.
- AKINLEYE A, RASOOL Z (2019). Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol.*, **12**: 92.
- AKKIN S, VARAN G, BILENSOY E (2021). A review on cancer immunotherapy and applications of nanotechnology to chemoimmunotherapy of different cancers. *Molecules*, **26**: 3382.
- ALFALEH MA, ALSAAB HO, MAHMOUD AB, ALKAYYAL AA, JONES ML, MAHLER SM, HASHEM AM (2020). Phage display derived monoclonal antibodies: From bench to bedside. *Front Immunol.*, **11**:1986.
- ALMAGRO JC, PEDRAZA-ESCALONA M, ARRIETA HI, PÉREZ-TAPIA SM (2019). Phage display libraries for antibody therapeutic discovery and development. *Antibodies*, **8**:44.
- ANGELA CHIEW WC, YEE SIEW C, THEAM SOON L (2016). Phage Display- Derived Antibodies: Application of Recombinant Antibodies for Diagnostics. *Proof and Concepts in Rapid Diagnostic Tests and Technologies*. K. S. Shailendra (Ed.), (Chapter 7). IntechOpen.
- APOSTÓLICO JDE S, LUNARDELLI VA, COIRADA FC, BOSCARDIN SB, ROSA DS (2016). Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res*, 1459394.
- BARDERAS R, BENITO-PEÑA E (2019). The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **411**: 2475-2479.
- BASHIR S, PAESHUYSE J (2020). Construction of Antibody Phage Libraries and Their Application in Veterinary Immunovirology. *Antibodies*, **9**: 21.
- BASU K, GREEN EM, CHENG Y, CRAIK CS (2019). Why recombinant antibodies - benefits and applications. *Curr Opin Biotechnol*, **60**: 153-158.
- BECKER RS, KNIGHT KL (1990). Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits. *Cell*, **63**: 987-997.
- CHAMES P, VAN REGENMORTEL M, WEISS E, BATY D (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, **157**: 220-233.
- CHEN X, ZARO JL, SHEN WC (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**: 1357-1369.
- CHRISTENSEN C, KRISTENSEN LK, ALFSEN MZ, NIELSEN CH, KJAER A (2020). Quantitative PET imaging of PD-L1 expression in xenograft and syngeneic tumour

- models using a site-specifically labelled PD-L1 antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **47**: 1302-1313.
- D'ANGELO S, FERRARA F, NARANJO L, ERASMUS MF, HRABER P, BRADBURY ARM (2018). Many Routes to an Antibody Heavy-Chain CDR3: Necessary, Yet Insufficient, for Specific Binding. *Frontiers in Immunology*, **9**: 395.
- DEBELA DT, MUZAZU SG, HERARO KD, NDALAMA MT, MESELE BW, HAILE DC, KITUI SK, MANYAZEWAL T (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE open medicine*, **9**: 20503121211034366.
- DREES JJ, AUGUSTIN LB, MERTENSOTTO MJ, SCHOTTEL JL, LEONARD AS, SALTZMAN DA (2014). Soluble production of a biologically active single-chain antibody against murine PD-L1 in Escherichia coli. *Protein Expr Purif*, **94**: 60-66.
- FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, PARKIN DM, PIÑEROS M, ZNAOR A, BRAY F (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, **149**: 778-789.
- FRENZEL A, HUST M, SCHIRRMANN T (2013). Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol*, **4**: 217.
- GREENFIELD EA (2019). Routes of Antigen Injection in Mice and Rats. *Cold Spring Harb Protoc*, (6).
- HAIRUL BAHARA NH, TYE GJ, CHOONG YS, ONG EB, ISMAIL A, LIM TS (2013). Phage display antibodies for diagnostic applications. *Biologicals*, **41**: 209-216.
- HAMMERS CM, STANLEY JR (2014). Antibody Phage Display: Technique and Applications. *Journal of Investigative Dermatology*, **134**: 1-5.
- HE X, XU C (2020). Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, **30**: 660-669.
- HILGARTH RS, LANIGAN TM (2020). Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*, **7**: 100759.
- HOLLIGER P, HUDSON PJ (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, **23**: 1126-1136.
- HUANG JX, BISHOP-HURLEY SL, COOPER MA (2012). Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**: 4569-4582.
- HUST M, DÜBEL S (2004). Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol*, **22**: 8-14.
- KAPLON H, MURALIDHARAN M, SCHNEIDER Z, REICHERT JM (2020). Antibodies to watch in 2020. *MAbs*, **12**: 1703531.
- KEHOE JW, KAY BK (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chem Rev*, **105**: 4056-4072.

- KINKER GS, VITIELLO GAF, FERREIRA WAS, CHAVES AS, CORDEIRO DE LIMA VC, MEDINA TDS (2021). B Cell Orchestration of Anti-tumor Immune Responses: A Matter of Cell Localization and Communication. *Front Cell Dev Biol*, **9**: 678127.
- KIRSCH M, ZAMAN M, MEIER D, DÜBEL S, HUST M (2005). Parameters affecting the display of antibodies on phage. *J Immunol Methods*, **301**: 173-185.
- KIRTANE K, ELMARIAH H, CHUNG CH, ABATE-DAGA D (2021). Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead. *J Immunother Cancer*, **9**: e002723.
- LEBIEN TW, TEDDER TF (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, **112**: 1570-1580.
- LEDSCGAARD L, LJUNGARS A, RIMBAULT C, SØRENSEN CV, TULIKA T, WADE J, WOUTERS Y, MCCAFFERTY J, LAUSTSEN AH (2022). Advances in antibody phage display technology. *Drug Discovery Today*, **27**: 2151-2169.
- LEMKE H (2018). Immune Response Regulation by Antigen Receptors' Clone-Specific Nonsel Part. *Front Immunol*, **9**: 1471.
- LERNER RA (2016). Combinatorial antibody libraries: new advances, new immunological insights. *Nature Reviews Immunology*, **16**: 498-508.
- LIM BN, TYE GJ, CHOONG YS, ONG EB, ISMAIL A, LIM TS (2014). Principles and application of antibody libraries for infectious diseases. *Biotechnol Lett*, **36**: 2381-2392.
- LITTLE AJ, MATTHEWS A, OETTINGER M, ROTH DB, SCHATZ DG (2015). The Mechanism of V(D)J Recombination. In F. W. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, ve M. Reth (Eds.), *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)* (Chapter 2). Academic Press.
- LU LL, SUSCOVICH TJ, FORTUNE SM, ALTER G (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*, **18**: 46-61.
- LU RM, HWANG YC, LIU IJ, LEE CC, TSAI HZ, LI HJ, WU HC (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, **27**: 1.
- LV G, SUN X, QIU L, SUN Y, LI K, LIU Q, ZHAO Q, QIN S, LIN J (2020). PET Imaging of Tumor PD-L1 Expression with a Highly Specific Nonblocking Single-Domain Antibody. *J Nucl Med*, **61**: 117-122.
- MITCHELL LA, YAGIZ K, HOFACRE A, VIAUD S, MUNDAY AW, ESPINOZA FL, MENDOZA D, RODRIGUEZ-AGUIRRE ME, BERGQVIST S, HAGHIGHI A, MINER MV, ACCOMANDO WP, BURRASCANO C, GAMMON D, GRUBER HE, JOLLY DJ, LIN AH (2019). PD-L1 checkpoint blockade delivered by retroviral replicating vector confers anti-tumor efficacy in murine tumor models. *Oncotarget*, **10**: 2252-2269.

- MPAKALI A, STRATIKOS E (2021). The Role of Antigen Processing and Presentation in Cancer and the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor Immunotherapy. *Cancers* **13**: 134
- NIEMEIJER AN, LEUNG D, HUISMAN MC, BAHCE I, HOEKSTRA OS, VAN DONGEN G, BOELLAARD R, DU S, HAYES W, SMITH R, WINDHORST AD, HENDRIKSE NH, POOT A, VUGTS DJ, THUNNISSEN E, MORIN P, LIPOVSEK D, DONNELLY DJ, BONACORSI SJ, VELASQUEZ LM, DE GRUIJL TD, SMIT EF, DE LANGEN AJ (2018). Whole body PD-1 and PD-L1 positron emission tomography in patients with non-small-cell lung cancer. *Nat Commun*, **9**: 4664.
- NILVEBRANT J, SIDHU SS (2018). Construction of Synthetic Antibody Phage-Display Libraries. In M. Hust ve T. S. Lim (Eds.), *Phage Display: Methods and Protocols* **1701**: 45-60.
- ORIUCHI N, HIGUCHI T, HANAOKA H, IIDA Y, ENDO K (2005). Current status of cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibody. *Ann Nucl Med*, **19**: 355-365.
- PADMA VV (2015). An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine*, **5**: 19.
- PAPAVASILIOU F, CASELLAS R, SUH H, QIN XF, BESMER E, PELANDA R, NEMAZEE D, RAJEWSKY K, NUSSENZWEIG MC (1997). V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science*, **278**: 298-301.
- PATEL SP, KURZROCK R (2015). PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, **14**: 847-856.
- POTTIER C, FRESNAIS M, GILON M, JÉRUSALEM G, LONGUESPÉE R, SOUNNI NE (2020). Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers*, **12**: 731.
- QIN S, YU Y, GUAN H, YANG Y, SUN F, SUN ., ZHU J, XING L, YU J, SUN X (2021). A preclinical study: correlation between PD-L1 PET imaging and the prediction of therapy efficacy of MC38 tumor with (68)Ga-labeled PD-L1 targeted nanobody. *Aging*, **13**: 13006-13022.
- RAKONJAC J, BENNETT NJ, SPAGNUOLO J, GAGIC D, RUSSEL M (2011). Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol*, **13**: 51-76.
- RAKONJAC J, BENNETT NJ, SPAGNUOLO J, GAGIC D, RUSSEL M (2011). Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. *Current Issues in Molecular Biology*, **13**: 51-76.
- RECK M, RODRÍGUEZ-ABREU D, ROBINSON AG, HUI R, CSŐSZI T, FÜLÖP A, GOTTFRIED M, PELED N, TAFRESHI A, CUFFE S, O'BRIEN M, RAO S, HOTTA K, LEIBY MA, LUBINIECKI GM, SHENTU Y, RANGWALA R, BRAHMER JR (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, **375**: 1823-1833.
- REDDY SM, CARROLL E, NANDA R (2020). Atezolizumab for the treatment of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, **20**: 151-158.

- SAEED AF, WANG R, LING S, WANG S (2017). Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Front Microbiol*, **8**: 495.
- SANTOS APOLONIO J, LIMA DE SOUZA GONÇALVES V, CORDEIRO SANTOS ML, SILVA LUZ M, SILVA SOUZA JV, ROCHA PINHEIRO SL, DE SOUZA WR, SANDE LOUREIRO M, DE MELO FF (2021). Oncolytic virus therapy in cancer: A current review. *World J Virol*, **10**: 229-255.
- SAW PE, SONG EW (2019). Phage display screening of therapeutic peptide for cancer targeting and therapy. *Protein ve Cell*, **10**: 787-807.
- SAXENA M, VAN DER BURG SH, MELIEF CJM, BHARDWAJ N (2021). Therapeutic cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer*, **21**: 360-378.
- SCHROEDER HW JR, CAVACINI L (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, **125**: 41-52.
- SCOTTO-LAVINO E, DU G, FROHMAN MA (2006). 5' end cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols*, **1**: 2555-2562.
- SHARMA P, JHAWAT V, MATHUR P, DUTT R (2022). Innovation in cancer therapeutics and regulatory perspectives. *Medical Oncology*, **39**: 76.
- SIDHU SS, FELLOUSE FA (2006). Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol*, **2**: 682-688.
- SMITH GP, PETRENKO VA (1997). Phage Display. *Chemical Reviews*, **97**: 391-410.
- SPRANGER S, GAJEWSKI TF (2018). Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion. *Annual Review of Cancer Biology*, **2**: 213-228.
- STANFIELD RL, WILSON IA (2014). Antibody Structure. *Microbiology Spectrum*, **2**: 2.2.06.
- SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, LAVERSANNE M, SOERJOMATARAM I, JEMAL A, BRAY F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, **71**: 209-249.
- TAUBE JM, KLEIN A, BRAHMER JR, XU H, PAN X, KIM JH, CHEN L, PARDOLL DM, TOPALIAN SL, ANDERS RA (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*, **20**: 5064-5074.
- THOUVENIN E, LAURENT S, MADELAINE MF, RASSCHAERT D, VAUTHEROT JF, HEWAT EA (1997). Bivalent binding of a neutralising antibody to a calicivirus involves the torsional flexibility of the antibody hinge¹Edited by I. A. Wilson. *Journal of Molecular Biology*, **270**: 238-246.
- TOHIDKIA MR, BARAR J, ASADI F, OMIDI Y (2012). Molecular considerations for development of phage antibody libraries. *J Drug Target*, **20**: 195-208.

- TOPALIAN SL, HODI FS, BRAHMER JR, GETTINGER SN, SMITH DC, MCDERMOTT DF, POWDERLY JD, CARVAJAL RD, SOSMAN JA, ATKINS MB, LEMING PD, SPIGEL DR, ANTONIA SJ, HORN L, DRAKE CG, PARDOLL DM, CHEN L, SHARFMAN WH, ANDERS RA, TAUBE JM, MCMILLER TL, XU H, KORMAN AJ, JURE-KUNKEL M, AGRAWAL S, MCDONALD D, KOLLIA GD, GUPTA A, WIGGINTON JM, SZNOL M (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, **366**: 2443-2454.
- VALLDORF B, HINZ SC, RUSSO G, PEKAR L, MOHR L, KLEMM J, DOERNER A, KRAH S, HUST M, ZIELONKA S (2022). Antibody display technologies: selecting the cream of the crop. *Biological Chemistry*, **403**: 455-477.
- VAN DEN BROEK T, BORGHANS JAM, VAN WIJK F (2018). The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol*, **18**: 363-373.
- WALDMAN A D, FRITZ JM, LENARDO MJ (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, **20**: 651-668.
- WANG H, KHATTAR V, HENSEL JA, ASHTON R, LU Y, SORACE AG, WANG Y, DESHANE JS, MIEHER JL, DEIVANAYAGAM C, PONNAZHAGAN S (2022). Systemic Checkpoint Blockade by PD-L1 Single-Chain Antibody Confers Potent Antitumor Immunity and Long-term Survival. *Mol Cancer Ther*, **21**: 1710-1721.
- WANG Z, WANG G, LU H, LI H, TANG M, TONG A (2022). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine*, **3**: 35.
- WILLATS WG (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol*, **50**: 837-854.
- WU C, WU M, LIANG M, XIONG S, DONG C (2019). A novel oncolytic virus engineered with PD-L1 scFv effectively inhibits tumor growth in a mouse model. *Cellular ve Molecular Immunology*, **16**: 780-782.
- YANG M, OLAOBA OT, ZHANG C, KIMCHI ET, STAVELEY-O'CARROLL KF, LI G (2022). Cancer Immunotherapy and Delivery System: An Update. *Pharmaceutics*, **14**: 1630.
- YOKOTA T, MILENIC DE, WHITLOW M, SCHLOM J (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res*, **52**: 3402-3408.
- YOU W, SHANG B, SUN J, LIU X, SU L, JIANG S (2020). Mechanistic insight of predictive biomarkers for antitumor PD-1/PD-L1 blockade: A paradigm shift towards immunome evaluation. *Oncol Rep*, **44**: 424-437.
- ZAHAVI D, WEINER L (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*, **9**: 34.

EKLER

EK-1: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatma CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks: 0 (312) 212 60 49

Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	