

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜN KONTROL NOKTASI PD-L1 PROTEİNİNİ BLOKE EDİCİ
MONOKLONAL ANTİKORLARIN GELİŞTİRİLMESİ

DURMUŞ AKDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜN KONTROL NOKTASI PD-L1 PROTEİNİNİ
BLOKE EDİCİ MONOKLONAL ANTİKORLARIN
GELİŞTİRİLMESİ

DURMUŞ AKDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2023

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DEVELOPMENT OF BLOCKING MONOCLONAL
ANTIBODIES TO THE IMMUNE CHECKPOINT PD-
L1 PROTEIN**

DURMUŞ AKDOĞAN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/07/2023 tarih ve 2023/40 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11/08/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Durmuş Akdoğan'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Ceren ÇIRACI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

../.. /2023 tarih ve 2023/.. sayılı kararı.

İMZA / MÜHÜR

ÖZET

Programlı Ölüm Ligandı 1 (Programmed Death-Ligand 1, PD-L1), immün kontrol noktaları (Immune Checkpoint) moleküllerinden biridir. PD-L1, aktif T hücrelerinde ifade edilen Programlı Hücre Ölümü (PD-1) reseptörü ile etkileşerek T hücre aktivasyonunu sonlandırmakta görev alır ve periferdeki immün yanıtları düzenleyerek otoimmüniteyi engeller. Tümör hücrelerinde PD-L1, aktive T hücrelerindeki PD-1 ile etkileşime girerek tümöre karşı bağışıklık tepkisinin azalmasını sağlayan inhibitör sinyaller oluşturur. Bu sebeple, tümör hücrelerindeki PD-L1'in bloke edilmesi çeşitli tümörlere karşı önemli bir terapötik etkiye sahiptir. Bu tez çalışmasında, PD-L1'i bloke edici monoklonal antikorlar geliştirmek hedef edinilmiştir.

PD-L1'i bloke edici monoklonal antikorların geliştirilmesi için klasik hibridoma teknolojisinden faydalanıldı. Bu bağlamda, fareler insan PD-L1 proteini ile bağışıklandı. Bağışıklanan farenin B hücreleri ile fare myelom hücreleri füzyon edildi ve füzyon sonrası oluşan hücrelerin seçilimleri gerçekleştirildi. Seçim sonrası antikor üretebilen hibrit hücre hatları oluşturuldu. Geliştirilen hibrit hücre hatlarının ürettiği monoklonal antikorların, insan PD-L1 proteinini bloke edici aktivitelerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar gerçekleştirildi. Buna ek olarak, geliştirilen monoklonal antikorların diğer immün kontrol noktası proteinleri ile çapraz reaksiyonları ve sıçan, fare, köpek, cynomolgus maymunu gibi farklı türlerin PD-L1 proteinlerine karşı etkileşimleri de ele alınmıştır.

Bu çalışma sonucunda, PD-L1'i bloke edici antikorlar geliştirilmiştir. Geliştirilen monoklonal antikorların terapötik değer taşıdığı ve ileri araştırmalar sonrasında ilaç endüstrisine devredilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İmmün Kontrol Noktası, PD-L1, Monoklonal Antikor, Hibridoma Teknolojisi, Bloke Edici Antikor.

SUMMARY

Programmed Death-Ligand 1 (Programmed Death-Ligand 1, PD-L1) is one of the immune checkpoint molecules. PD-L1 is involved in terminating T cell activation by interacting with the Programmed Cell Death (PD-1) receptor expressed on activated T cells and prevents autoimmunity by regulating peripheral immune responses. In tumor cells, PD-L1 interacts with PD-1 in activated T cells to generate inhibitory signals that reduce the immune response against the tumor. Therefore, blocking PD-L1 in tumor cells has an important therapeutic effect against various tumors. In this thesis study, the aim was to develop PD-L1 blocking monoclonal antibodies.

In this study, classical hybridoma technology was used to develop monoclonal antibodies that block PD-L1. In this regard, mice were immunized with the human PD-L1 protein. Myeloma cells and B cells of the immunized mouse were fused, and the cells formed after the fusion were selected. Hybrid cell lines capable of producing antibodies after selection were established. Investigations were carried out to determine the human PD-L1 protein blocking activities of monoclonal antibodies produced by the developed hybridomas. In addition, the cross-reactions of the developed monoclonal antibodies with other immune checkpoint proteins and their interactions against PD-L1 proteins specific to different species such as rat and dog were also analyzed.

As a result of this study, PD-L1 blocking antibodies were developed. It is thought that the developed monoclonal antibodies have therapeutic value and can be transferred to the pharmaceutical industry after further research.

Keywords: Immune Checkpoint, PD-L1, Monoclonal Antibody, Hybridoma Technology, Blockade Antibody.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanmasında bana verdiği değerli katkılar ve büyük desteği için sevgili danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya en içten samimiyetimle teşekkür ederim.

TY lab'ın güzide insanı, gülüşüyle neşe saçı, laba katıldığımda bilimin fenerini üzerime tutan sevgili Arş. Gör Arzu Aysan'a; bilgi ve tecrübesini bizden esirgemeyen değerli hocam Dr. İrem Yalın Camcı'ya ve yüksek lisans eğitimimde yer alan tüm akademisyen hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Sizlerle geçirdiğimiz keyifli zamanlar, güçlü bir ekip olmamızı sağladı. Beraber zorlukların üstesinden geldik, birlikte başardık. Zaman zaman sırdaş zaman zaman yoldaşlarım olarak gördüğüm, unutulmaz anılarımı paylaştığım değerli arkadaşlarım, lab ortaklarım Maide Şeker, Nurşah Ersezen, Melike Binnur Bahçekapılı ve Şevval Dik'e teşekkür ediyor birlikte geçirdiğimiz her an için kendimi çok şanslı hissettiğimi belirtmek istiyorum.

Okulda edindiğim arkadaşlarım, tezimin gerek çalışma gerek yazma süreçlerinde yanımda bulunan değerli Büşra Tiryaki ve Agit Çetinkaya'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Sizlerle olan keyifli zamanlarım ve anlamlı sohbetlerim, bu tez çalışmasının en yorucu sürecinde bile yüzümü güldürebildi. Sizinle bir arada olmak, daima tam motivasyonla devam edebilmemi sağladı; hatta bu tezi tamamlamak için ekstra bir motivasyon kaynağı oldu. Değerli arkadaşlarım, can dostlarım sevgili Oğuz İşgören, Erkan Özdemir, Emre Işıktekiner ve Furkan Öksüz'e sonsuz sevgilerimle teşekkür ederim.

Sen, hayatıma renk katan, her adımda bana destek olan ve en zor zamanlarda bile yanımda olan en özel insan; Merve Akçar. Senin sevgin ve ilgin, bu tez çalışmasını tamamlamamda bana en büyük güç ve motivasyon kaynağı oldu. En içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Teşekkürlerin en büyüğünü, en büyük destekçilerim olan aileme atfediyorum. Bu teze ve bana olan katkılarınız için sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1004 20AG054 projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. Literatür Özeti	2
2.1. Antikor	2
2.1.1. Monoklonal Antikorlar	3
2.2. Monoklonal Antikor Geliştirme Stratejileri	4
2.2.1. Hibridoma Teknolojisi	6
2.3. İmmünoterapi	6
2.4. İmmün Kontrol Noktaları	7
2.4.1. Kostimülatör Etkileşimde Bulunan İmmün Kontrol Noktaları	7
2.4.1.1 CD137 ve CD137L	7
2.4.1.2. GITR ve GITRL	7
2.4.1.3.OX40 ve OX40L	8
2.4.2. İnhibitör Etkili İmmün Kontrol Noktaları	8
2.4.2.1. VISTA	8
2.4.2.2. LAG-3	9
2.4.2.3. TIM-3	9
2.4.2.4. TIGIT	10
2.5. Kanser İmmünoterapisi ve İmmün Kontrol Noktaları	10
2.6. PD-1/PD-L1 Etkileşimi	11
2.7. PD-L1'in Düzenlenmesi	13

2.8 Kanser ve PD-1/PD-L1 Yolağı	16
2.9. PD-1/PD-L1'i Bloke Edici Monoklonal Antikorlar	17
3. GEREÇLER	20
3.1. Cihazlar	20
3.2. Genel Kimyasallar	20
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	20
3.4. Hücre Hatları	21
3.5. Çözelti ve Tamponlar	21
3.6. Kitler	22
4. YÖNTEMLER	23
4.1. Monoklonal Antikor Üreten Hücrelerin Geliştirilmesi	23
4.1.1 Farelerin Bağışıklanması	23
4.1.2 Füzyon Partneri Hücre Hattının Kültürü	23
4.1.3 Bağışıklanmış Farelerin Seçimi	23
4.1.4. Füzyon	24
4.1.5. Hibridomaların Geliştirilmesi	25
4.1.6. Alt-klonlama	25
4.2. Antikorların Saflaştırılması	25
4.3. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının Diğer İmmün Kontrol Noktası Proteinlerine Karşı Çapraz Reaksiyonlarının Belirlenmesi	26
4.4. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının Türe Özgüllüğünün Belirlenmesi	27
4.5 Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının PD-L1 Reseptörünü Bloklayıcı Aktivitesinin Test Edilmesi	27
4.5.1. Yarışmalı ELISA Temelli İnhibisyon Analizi	27
4.5.2. Lüsiferaz Temelli PD-1/PD-L1 Blokaj Analizi	28
4.6. İstatistiksel Analizler	28
5. BULGULAR	29
5.1. Fare Anti-PD-L1 Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi	29
5.2. Monoklonal Antikorların Diğer İmmün Kontrol Noktası Proteinlerine Karşı Çapraz Reaksiyonları	31

5.3. Monoklonal Antikorların Türe Özgüllüğünün Belirlenmesi	33
5.4. Antikorların Saflaştırılması	35
5.5. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının PD-L1 Reseptörünü Bloklayıcı Aktivitesi	37
5.5.1. Yarışmalı ELISA Temelli İnhibisyon	37
5.5.2. Lüsiferaz Temelli İnhibisyon	39
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	58
EKLER	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve : Açıklamalar

Kısaltmalar

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMP	: Adenozin Monofosfat
APC	: Antijen Sunan Hücre
C3	: Kompleman Protein 3
CAR	: Kimerik Antijen Reseptörü
CD20	: Farklılaşma Kümesi 20
CD252	: Farklılaşma Kümesi 252
CD3	: Farklılaşma Kümesi 3
CD4	: Farklılaşma Kümesi 4
CD80	: Farklılaşma Kümesi 80
CDK4	: Sikline Bağımlı Kinaz 4
CKLF	: Kemokin Benzeri Faktör
CKLF	: Kemokin Benzeri Faktör
CMTM6	: CKLF Benzeri MARVEL Transmembran Etki Alanı 6 Proteini
CTLA-4	: Sitotoksik T-lenfosit ilişkili Protein 4
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EBV	: Epstein-Barr Virüs
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMT	: Epitelyal Mezankimal Geçiş

ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Bozunma
Fab	: Antijen Bağlanma Fragmanı
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FZR1	: Fizzy ile İlgili Protein 1
g	: Gram
GITR	: Glukokortikoid Kaynaklı TNFR ile İlgili
GSK3 β	: Glikojen Sentaz Kinaz-3 Beta,
HAMA	: Fare İnsan Antikoru
HAT	: Hipoksantin Aminopterin Timidin
HCC	: Hepatoselüler Karsinom
HDR1	: β -Hydroxy β -methylglutaryl koenzim A redüktaz Bozunması 1
HIP1R	: Huntingtin etkileşimli protein 1 ilgili protein
HNSCC	: Baş ve Boyun Sküamoz Hücre Kanseri
Ig	: İmmünoglobülin
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
LAG-3	: Lenfosit Aktivasyon Geni 3
LCK	: Lenfosit Spesifik Protein Tirozin Kinaz
M	: Molar
MHC	: Majör Doku Uygunluk Kompleksi
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
NFAT	: Aktive Edilmiş T hücrelerinin Nükleer Faktörü
NFIL3	: İnterlökin 3 Düzenleyici Nükleer Faktör
NF- κ B	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
PD-1	: Programlı Hücre Ölümü Proteini 1
PD-L1	: Programlı Ölüm Ligandı 1

PLC- γ 1	: Fosfolipaz C, Gamma 1
RCC	: İlerlemiş Renal Hücreli Karsinom
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
scFv	: Tek Zincirli Değişken Parça
sdAb	: Tek Bölge Antikor
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SHP-1	: Src Homoloji Bölgesi 2 Alanı İçeren Fosfataz-1
SHP-2	: Src Homoloji Bölgesi 2 Alanı İçeren Fosfataz-2
SPOP	: Benek Tipi BTB/POZ Proteini
STT3	: Oligosakkaril Transferaz
T-bet	: T Hücrelerinde İfade Edilen T Kutusu
TC1	: Sitotoksik T Hücre 1
TCR	: T Hücre Reseptörü
TCR	: T Hücre Reseptörü
TH1	: Yardımcı T Hücre 1
TIGIT	: Ig ve ITIM alanlarına sahip T hücre İmmünreseptör
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör İlişkili
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VISTA	: T Hücre Aktivasyonunun V-Alanı Ig Baskılayıcısı
Zap70	: Zeta Zinciriyle İlişkili Protein Kinaz 70
β -TrCP	: β -transducin tekrar içeren protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	Sayfa
2.1: İmmüoglobülin izotipleri.	2
2.2: Monoklonal antikor geliştirme stratejileri.	5
2.3: T hücrelerinde PD-1/PD-L1 aracılı inhibisyon mekanizmaları.	12
2.4: Glikolize olmayan ve glikolize olan PD-L1 proteinin yapısı.	14
2.5: PD-L1'in hücre içinde düzenlenmesi.	16
5.1: Rekombinant PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumlarının ELISA değerleri.	29
5.2: Füzyon sonrası çeşitli klonların indirekt ELISA değerleri.	30
5.3: Alt-klonlamalar sonrası elde edilen tüm monoklonal hibridoma klonlarının ELISA değerleri.	31
5.4: Monoklonal antikorların çapraz reaksiyonları.	32
5.5: Monoklonal antikorların tür özgüllüğü.	34
5.6: Monoklonal antikorların Coomassie Brilliant Blue jel görüntüsü.	36
5.7: Referans ilaçlar ve Geliştirilen anti-PD-L1 monoklonal antikorların luminometrik ölçüm grafikleri.	41

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.	21
5.1: Monoklonal hibridoma klonlarının izotipleri ve saflaştırılmada kullanılan boncuk tipleri.	35
5.2: Geliştirilen Anti-PD-L1 monoklonal antikorlarının PD-1 ve CD80 proteinlerine karşı %inhibisyon değerleri.	38
5.3: Geliştirilen anti-PDL1 monoklonal antikorlarının ve referans ilaçların PD-1/PD-L1 blokaj potansiyelleri.	40
5.4: Geliştirilen anti-PD-L1 monoklonal antikorların ve referans ilaçların IC50 değerleri.	40

1. GİRİŞ

Programlı Ölüm Ligandı 1 (Programmed Death-Ligand 1, PD-L1), immün kontrol noktaları (Immune Checkpoint) moleküllerinden ve B7 yardımcı uyarıcı protein ailesinin yüzey proteinlerinden biridir. PD-L1, immün yanıt oluşumunda kritik rollere sahiptir. Aktif T hücrelerinde ifade edilen Programlı Hücre Ölümü (PD-1) reseptörü ile etkileşerek T hücre aktivasyonunu sonlandırmakta görev alır ve periferdeki immün yanıtları düzenleyerek otoimmüniteyi engeller. Tümör hücrelerinde PD-L1, aktive T hücrelerindeki PD-1 ile etkileşime girerek tümöre karşı bağışıklık tepkisinin azalmasını sağlayan inhibitör sinyaller oluşturur. Bu sebeple, tümör hücrelerindeki PD-L1'in bloke edilmesi çeşitli tümörlere karşı önemli bir terapötik etkiye sahiptir.

1.1 Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, immün kontrol noktası proteinlerinden biri olan PD-L1'i bloke edici fare monoklonal antikorlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, PD-L1'i bloke edici fare monoklonal antikorların geliştirilmesi için hibridoma teknolojisinden yararlanılmış ve antikor üretebilen hibrit hücre hatları geliştirilmiştir. Geliştirilen hibridoma hatlarının ürettiği monoklonal antikorların, insan PD-L1 proteinini bloke edici aktivitelerinin araştırılması hedeflenmiştir. Buna ek olarak, geliştirilen monoklonal antikorların diğer immün kontrol noktası proteinleri ile çapraz reaksiyonları ve fare, sıçan, köpek ve cynomolgus maymunu gibi farklı tür PD-L1 proteinlerine karşı etkileşimleri de ele alınmıştır.

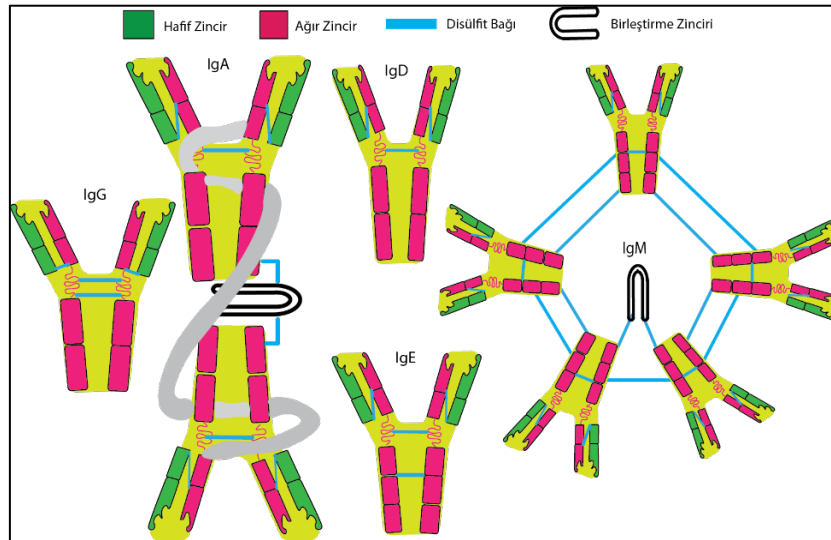
PD-L1'i bloke edici antikorları geliştirmek üzere yapılan bu çalışmalar sonucunda endüstriye devredilebilecek terapötik değer taşıyan ilaç adaları geliştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Antikor

Antikorlar, B hücreleri tarafından üretilirler ve onları üreten B hücrelerinin antijen reseptörüne özgündürler. Antijen ise, adaptif bağışıklık yanıtı oluşturabilen maddeler olarak adlandırılmaktadır. Antikorların fonksiyonlarına örnek olarak, enfeksiyonun nötralizasyonu, fagositoz, antikora bağlı hücresel sitotoksite veya patojenlerin kompleman aracılı lizisi gösterilebilir [1].

Antikorlar, immüoglobülin (Ig) olarak da bilinirler. İmmüoglobülinlerin memelilerde A, D, E, G ve M olmak üzere 5 farklı izotipi mevcuttur. Tüm izotipler, IgA (dimer), IgD (monomer), IgE (monomer), IgG (monomer), IgM (pentamer) aynı birimlerle oluşmuş farklılıklara sahiptir [2]. İmmüoglobülinler, çoğunlukla iki hafif ve iki ağır zincirden oluşan Y şeklindeki glikoproteinlerdir (Şekil 2.1). Hem hafif hem de ağır zincirler değişken (N-terminal) ve sabit bölgeler (C-terminal) içermektedirler. Antikorların antijenler ile bağlantı kurduğu antijen bağlayıcı fragment bölgesi hafif zincirin tamamına sahiptir fakat ağır zincirin bir değişken bölgesi ve bir sabit bölgesini içerir [3].



Şekil 2.1: İmmüoglobülin izotipleri.

2.1.1. Monoklonal Antikorlar

Literatürde, Kitasoto ve Behring'in "sihirli mermi (magic bullet)" serumunu üretmesi, antikorların terapötik olarak kullanımının ilk örneğidir [4]. Ardından 1975 yılında, Köhler ve Milstein'in hibridoma teknolojisini icat etmesi ile ilk monoklonal antikorlar üretildi [5]. Tanım olarak monoklonal antikorlar, spesifik bir epitopa karşı bağlanma gösteren antikorlardır.

Monoklonal antikorların kullanım yelpazesi çok geniş bir alana yayılmaktadır. Örneğin, klinikte tanı ve tedavide kullanılabilirken moleküler immünolojik araştırmalarda ise, epitop haritalaması ve moleküler modellemede kullanılmaktadır [6]. Monoklonal antikorlar, histopatolojide çeşitli belirteçlere bağlanarak dokuları, tümörleri sınıflandırmak için kullanılabilir. Örneğin, prostat spesifik antijenine, α -fetoproteine ya da α -fetoprotein gibi belirli bir organ ile ilişkili antijenlere karşı monoklonal antikorlar patolojik tanıda yardımcı olmaktadır [6]. Ayrıca, mezotelyoma ve adenokarsinom gibi benzer lezyonlar arasında ayırım yapmayı kolaylaştırdığı ispat edilmiştir [7], [8].

1986 yılında FDA tarafından Muromonab'ın onaylanması ile ilk terapötik monoklonal antikor klinikte kullanılmaya başlanmıştır [9]. Enflamatuar hastalıklara, kansere, virüs enfeksiyonlarına karşı monoklonal antikorlar geliştirilmiştir ve kullanılmaktadır. Örneğin İnfixlimab, Adalimumab, Ustekinumab, Basiliximab, Daclizumab, Omalizumab enflamatuar hastalıklara karşı kullanılmakta olan onaylanmış ilaçlardır [10] - [15]. Kansere karşı onaylanmış monoklonal antikorlar arasında Trastuzumab, Pertuzumab, Cetuximab, Panitumumab, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerine (EGFr) karşı geliştirilmiştir [16] - [19]. Bavecizumab, Vasküler Endotel Büyüme Faktörüne (VEGF), Rituximab Farklılaşma Kümesi 20'ye (CD20), İpilimumab CTLA-4'e (Sitotoksik T Hücre Aracılı Protein) karşı üretilen monoklonal antikorlardır[20] - [22].

2.2. Monoklonal Antikor Geliştirme Stratejileri

Antikorlar, B hücreleri tarafından spesifik antijenlere karşı üretilmektedir [23]. 1986 yılında bir monoklonal antikorun FDA tarafından onaylanmasının ardından monoklonal antikor geliştirme süreçleri hızlı bir şekilde çeşitlenmiştir [9]. Bu bağlamda, hibridoma teknolojisi, faj gösterimi, tekil B hücresi antikor teknolojisi gibi çeşitli monoklonal antikor geliştirme stratejileri geliştirilmiştir (Şekil 2.2) [24].

Faj gösterimi, antikor geliştirme stratejileri arasında önemli bir yere sahiptir. İnsan antikor faj gösterimi kütüphaneleri aracılığıyla tamamen insan antikorları üretmek mümkündür. Faj gösterimi tekniği ilk olarak 1985 yılında, klonlanan antijenleri viral yüzeyde göstermek için kullanıldı. Antikorlar, fajın antijen ifade eden yüzeyine bağlanırlar [25]. Bu teknoloji ile klinikte kullanılan Adalimumab, Belimumab, Ramucirumab, Necitumumab, Atezolizumab, Avelumab gibi monoklonal antikorlar geliştirilmiştir [26]. Ayrıca, George Pearson Smith ve Gregory Paul Winter, 2018 yılında "peptitlerin ve antikorların faj gösterimi" çalışmalarıyla Nobel Kimya Ödülü'nü almışlardır [27]. Günümüzde, antijen bağlama fragmanı (Fab) kütüphaneleri, tek zincirli değişken parça (scFv) kütüphaneleri, tek bölge antikor (sdAb) kütüphaneleri faj gösteriminde yaygın olarak kullanılan kütüphanelerdir [28] - [32].

2.2.1. Hibridoma Teknolojisi

Hibridoma teknolojisi, ilk kez 1975 yılında Georges Köhler ve Cesar Milstein tarafından tanımlanmıştır. Temelde, istenilen antijen ile hayvanın bağışıklanması sonrası antikor üreten B hücreleri ile ölümsüz myelom hücrelerinin füzyon edilmesi prensibine dayanmaktadır [5]. Fare, tavşan, sıçan ve hamster hibridoma teknolojisinde bağışıklanan hayvanlardır [37]. Füzyon ile geliştirilen hibrit hücreler, seçilime uğrayarak stabil monoklonal hale getirilmektedir. Seçim sonrasında hücreler, yüksek hacimlerde kültür edilebilir ve istenilen miktarda antikor üretebilir [46]. Bu avantajın yanında çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Örneğin, yavaş ilerleyen bir hazırlık sürecine sahiptir [37]. Ek olarak, elde edilen antikorların insana uygulanması durumunda, fare immünoglobülininin, insan fare karşıtı antikor (HAMA) yanıtı gibi konakta bağışıklık sistemi yanıtları yarattığı görülmüştür [47]. Fare antikorları immünojenik olduğu için insanlarda ters etkilere sebebiyet verebilmektedir [48].

Bazı araştırmacılar, bağışıklama esnasında çeşitli adjuvan birleşimleri ile hayvanlarda daha yüksek titrelerde antikor üretimi gözlemlemişlerdir. Örneğin, Dempsey ve arkadaşları tamamlayıcı bileşen 3 proteininin (C3) son bozunmuş ürünü C3d proteinin doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık arasında bir köprü kurarak moleküler bir adjuvan olduğunu ortaya koymuşlardır [49]. Ayrıca, BALB/c farelerde yapılan bir çalışma ile sentetik oligonükleotit içeren CpG motiflerinin güçlü adjuvanlar olduğunu gösterilmiştir [50].

2.3. İmmünoterapi

İmmünoterapi, kanser tedavi yöntemlerinden biridir. Temelde, tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi elemanları tarafınca tanınması ve yok edilmesini sağlayarak kanserin tedavi edilmesini amaçlar [51]. Yakın geçmişte, kanserin bağışıklık sistemini nasıl atlattığı konusunda büyük ilerleme kaydedilmiştir [52]. Bu bağlamda, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından yok edilmesi lehine yeni yollar bulunmuştur [53].

İmmünoterapi, 2013 yılında Science dergisi tarafından “yılın atılımı” olarak adlandırılmıştır [54]. Bu başarının ardında, immün kontrol noktası ve CAR (kimerik antijen reseptörü) T hücre tedavilerinin klinikteki performansı bulunmaktadır. Bu başarılı tedavilere ek olarak, kanser aşıları da immünoterapi çatısı altında değerlendirilmektedir [53].

2.4. İmmün Kontrol Noktaları

İmmün kontrol noktaları, otoimmüniteyi önleyen ve dokuları immün saldırılardan koruyan negatif düzenleyiciler olarak tanımlanabilir [55]. İki tür immün kontrol noktası bulunmaktadır. Bunlar, T hücreleri ile kostimülatör etkileşimde bulunan ve baskılayıcı faktör olarak işlev gören immün kontrol noktaları olarak adlandırılmaktadırlar.

2.4.1. Kostimülatör Etkileşimde Bulunan İmmün Kontrol Noktaları

2.4.1.1. CD137 ve CD137L

CD137 (Cluster of Diffrentiation 137), tümör nekroz faktör (TNF) süper ailesi üyesi yüzey glikoproteinlerinden biridir. Doğal öldürücü hücreler, düzenleyici T hücreleri, Doğal öldürücü T hücreleri tarafından ifade edilen indükleyici kostimülatör işlevli moleküllerden biridir [56]. Ayrıca monositler, granülositler, dentritik hücreler ve eozinofiller gibi doğal immün hücrelerinde de ifade edilebilir [57].

2.4.1.2. GITR ve GITRL

Glukokortikoid indüklenmiş tümör nekroz faktör reseptörü ilişkili (TNFR) protein (GITR), ilk olarak 1997 yılında tanımlanmıştır [58]. İnsan GITR (hGITR), 241 amino asitten oluşan bir transmembran proteindir. GITRL, GITR'nin aktive edici ligandı olan transmembran proteindir [59].

GITR, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde düşük düzeyde ifade edilmektedir fakat aktive edildiğinde hızla ifade seviyesi artmaktadır. Ayrıca, dentritik hücrelerde, makrofajlarda, doğal öldürücü hücrelerde ve aktif B hücrelerinde olmak üzere birçok antijen sunan hücrelerde (APC) ifade edilmektedir. GITR, kostimulatör reseptör olarak bilinmektedir ve timusta T hücresi gelişimi sırasında ifade edilir. Ayrıca, düzenleyici T hücrelerinin farklılaşması ve büyümesinde görev almaktadır [60].

2.4.1.3. OX40 ve OX40L

OX40, TNFR süper ailesi üyesi olan ve aktif T hücrelerinde ifade edilen transmembran bir glikoproteindir. OX40'ın bilinen tek ligandı olan OX40L ya da CD252 (Cluster of Diffrentiation 252), aktif antijen gösterici hücrelerde ifade edilmektedir [61].

T hücre reseptörü (TCR) uyarıldığında, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde geçici olarak OX40 ifade edilmeye başlar. Tümörlerde OX40 ifadesine bakıldığında, CD4+ T hücrelerinde CD8+ T hücrelerine kıyasla daha fazla OX40 ifadesi olduğu belirlenmiştir [62]. Ayrıca, TCR/CD3 (Cluster of Diffrentiation 3) çapraz bağlanması gerçekleştiğinde ve IL-1 (İnterlökin 1), IL-2 ve TNF- α gibi sitokinlerin varlığı ile indüklenmesi gerçekleşir [63]. T hücrelerinin OX40 ile kostümüasyonu sonucunda, NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) ve NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) gibi T hücre sinyalleri ile ilişkili yollar aktive olur [64].

2.4.2. İnhibitör Etkili İmmün Kontrol Noktaları

2.4.2.1 VISTA

VISTA (V-domain Ig-containing Suppressor of T cell Activation), negatif kontrol noktası düzenleyicileri B7 protein ailesinin bir üyesidir. VISTA, en çok myeloid hücrelerde ifade edilmektedir.

VISTA hem ligand hem de reseptör işlevli bir proteindir. VISTA, T hücre aktivasyonunu baskılama, sitokin salınımını düzenleme ve immün toleransı sağlamak gibi çeşitli immüdüzenleyici işlevleri sağlamaktadır [65].

2.4.2.2 LAG-3

LAG-3 (Lymphocyte-activation Gene 3), immüoglobülin süper ailesi üyesi proteinlerinden biridir. Kromozomda, CD4'e (Cluster of Differentiation 4) yakın konumda bulunmaktadır. Dört ekstraselüler Ig benzeri alan ve bir tip I transmembran alan içermektedir ve bu nedenle yapısal olarak CD4 koreseptörüne benzerlik gösterir. CD4 gibi, LAG-3, APC'lerdeki (Antijen Presenting Cell) MHC-II'ye (Major Histocompatibility Complex 2) çok daha güçlü bir bağlanma yeteneğine sahiptir ve bu durum doğrudan immün yanıtta TCR sinyalleşmesini engeller [66], [67]. Aktive olan CD4+ ve CD8+ etkileyici T hücreleri, B hücreleri, plazmasitoid 9entritik hücrelerde kümesinde LAG-3 ifade edilmektedir. LAG-3 ve CD3'ün birleştirilmesi, kalsiyum iyon akışlarını engelleyerek T hücre proliferasyonunu ve sitokin salınımını etkileyebilir [68].

2.4.2.3 TIM-3

TIM-3 (T Cell Immunoglobulin Mucin-3), ilk kez 2001 yılında keşfedilen ve bağışıklık sisteminde kritik rolü olan bir hücre yüzey proteinidir [69].

İlk olarak, yardımcı T hücresi 1 (Th1) ve sitotoksik T hücresi 1 (Tc1) hücreleri için özgül bir işaretleyici olarak tanımlanmıştır. TIM-3 ifadesi, Th1 transkripsiyon faktörü T-bet (T-box expressed in T cells) ile başka bir transkripsiyon faktörü olan NFIL3 (Nuclear factor, interleukin 3 regulated) tarafından düzenlenir. Bu, TIM-3'nün Th1 yanıtının bir parçası olduğunu ve Th1/Tc1 hücrelerinin aktivasyon ve fonksiyonlarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir [70].

2.4.2.4 TIGIT

TIGIT (T hücresi immünglobulin ve ITIM alanı) 2008 yılında tanımlanmış CD28 ailesi üyesi bir transmembran proteindir. LAG-3 ve TIM-3 ile benzer şekilde, TIGIT inhibe edici reseptör olarak görev yapar ve özellikle düzenleyici, hafıza ve aktif T hücreleri gibi hücrelerde yaygın olarak ifade edilir [71].

TIGIT ifade eden düzenleyici T hücrelerinin, yardımcı T hücresi 1 ve 17 'nin hücre yanıtlarını inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibisyon, yardımcı T hücresi 1 ve 17'nin fonksiyonunu ve aktivasyonunu baskılayarak gerçekleşmektedir. Sonuç olarak, TIGIT immün yanıtların dengelenmesinde ve otoimmünite gibi durumların kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır [72].

2.5. Kanser İmmünoterapisi ve İmmün Kontrol Noktaları

Kanser ciddi bir sağlık sorunudur ve dünyada morbidite ve mortaliteye neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Kemoterapi ilerlemiş kanserli hastalarda şu anda birincil tedavi seçeneğidir ancak ciddi yan etkiler ve ilaç direnci nedeniyle sınırlayıcı olabilir [73]. Bu nedenle dezavantajların üstesinden gelmek için yeni tedaviler geliştirilmesi son derece gereklidir.

Kanser immünoterapisi, bağışıklık sistemi hücrelerinin kanser ile savaşmasını teşvik eden bir tedavi yaklaşımıdır. Ayrıca, tümör hücrelerine karşı bağışıklık sisteminin özgüllüğünü ve gücünü artıran etkili bir tedavi seçeneğidir. Ancak her hasta farklı olduğundan, tedaviye verilen yanıt ve yan etkiler bireysel olarak değişebilir. Bu sebeple, kanser immünoterapisi hastaların durumu göz önünde bulundurularak kişiselleştirilmeli ve değerlendirilmelidir. Bağışıklık sistemi, kanser hücrelerini tanıyıp yok etmeye çalışan bir dizi hücresel mekanizmaya sahiptir [74]. Fakat, bazı durumlarda kanser hücreleri, bağışıklık sisteminden kaçmayı başararak bağışıklık yanıtından etkilenmemeyi başarırlar [75]. Kanser immünoterapisi ise bu kaçış noktalarının hedeflenerek kanserli hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve öldürülmesini sağlamaktadır. İmmünoterapi yöntemleri içerisinde immün kontrol noktası proteinlerine karşı geliştirilen antikorlar önemli bir yer arz

etmektedir. Gerçekleştirilmiş birçok çalışma, immün kontrol noktası inhibitörlerinin önemli terapötik değere sahip olduğunu göstermiştir [76].

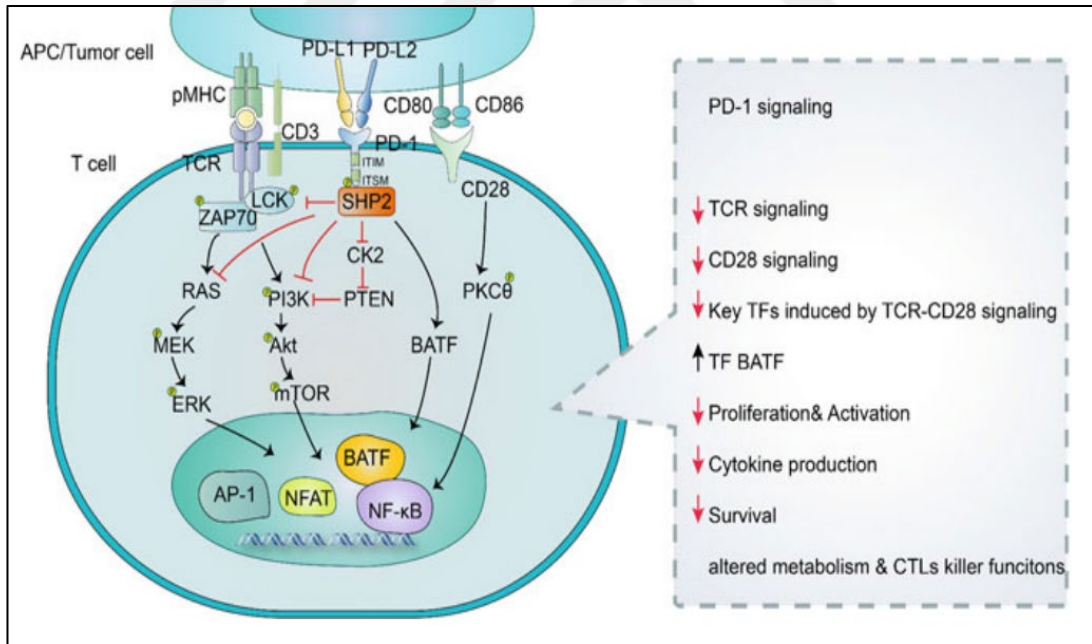
1987 yılında Pierre Goldstein tarafından Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4 (CTLA-4) keşfedildi [77]. CTLA-4'ün hem *in vivo* hem de nakavt farelerde gerçekleştirilen deneylerinde inhibitör işlevli bir reseptör olduğu ortaya konuldu [78], [79], [80]. Bu keşiflerin ardından James Allison'un farelerde CTLA-4'ü bloke ederek tümörleri yok ettiği çalışması CTLA-4'u hedef alan antikorların klinikte kullanımına bir gerekçe sağlamış oldu [81]. 2011 yılında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) kanser immünoterapisinde bu immün kontrol noktasını hedef alan monoklonal antikorun kullanımına onay verdi [10], [53]. Ayrıca, PD-1 ve PD-L1 proteinlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar da klinikte kullanılmaya devam etmektedir [82].

2.6. PD-1/PD-L1 Etkileşimi

PD-1'in ilk olarak apoptik hücrelerde ifade edildiği kanıtlandı [83]. Ardından ilerleyen çalışmalarla, aslında T ve B hücrelerinde antijen tepkilerinin eşliğini düzenlemekte olan immün kontrol noktası proteini olduğu anlaşıldı. Hem PD-1 hem de PD-L1, immüoglobulin (Ig) süper ailesinin üyesi zar proteinleridir [84]. PD-1, bir Ig-V benzeri hücre dışı alan, bir transmembran alan, bir sitoplazmik alan ve iki tirozin sinyal motifi bulundurur [84]. PD-L1, iki tane hücre dışı alan ve bir kısa sitoplazmik kuyruk bölgesi bulundur [85], [86].

T hücre aktivasyonu sırasında PD-1 yapısını değiştirerek PD-L1 ile etkileşime geçer [87]. PD-1'in sitoplazmik kuyruğu Src ailesi kinazları tarafından fosforillenir [88], [89]. Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Olmayan Tip 11 (SHP-2) ve Protein Tirozin Fosfataz Non-reseptör Tip 6 (SHP-1) proteinleri için kenetlenme noktaları olarak görev alır. SHP-2'nin bağlanması T Hücre Reseptörünün (TCR) sinyalinde azalmaya sebep olur [90]. Ayrıca, Spesifik Protein-Tirozin Kinaz (LCK) aracılı ve Zeta zincir aracılı protein kinaz 70'in (Zap70) fosforillenmesini engelleyerek bir dizi sinyal yoluna etki eder [91] - [94].

PTEN-PI3K-Akt (Phosphatase and tensin homolog-Phosphoinositide 3-kinase-Protein kinase B) ve RAS-MEK-ERK sinyal yolları, PD-1/PD-L1 bağlanmasından etkilenmekte olan iki ana sinyal yolağıdır [92], [93]. PI3K aktivasyonu, SHP-2'nin PD-1 ile etkileşime girmesi ile bloke olmaktadır. Fakat PTEN hedeflenirken SHP-2 değil CK2 aracılık etmektedir. PTEN, PI3K'nin aktivasyonundan sorumlu bir serin-fosfoinositol fosfatazdır. Ayrıca PTEN, PI3K-Akt yolağını baskılar. T hücre aktivasyonu sırasında, CK2, PTEN'i fosforiller ve stabilize eder. Bu da PTEN'in fosfotaz aktivitesini baskılar. PD-1, PTEN'in fosforilasyonunu engeller. Böylelikle PTEN azalmaya başlar ve PTEN fosfataz aktivitesi artar [95]. MEK-ERK-MAP kinaz yolağı içinse PD-1, PLC-γ1 (Phospholipase C Gamma 1) ve Ras aktivasyonunun engellenmesi ile ilişkilidir [93]. Ayrıca, PD-1 birçok T hücre işlevini çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ifadesini artırarak baskılayabilir. Bu tip etkileşimler ile T hücre çoğalmasını, aktivasyonunu, sağ kalımını, sitokin üretimini ve aktifleşmiş T hücrelerinin ölümü gibi çeşitli etkilere neden olabilir (Şekil 2.3.) [85], [87], [96] – [100].



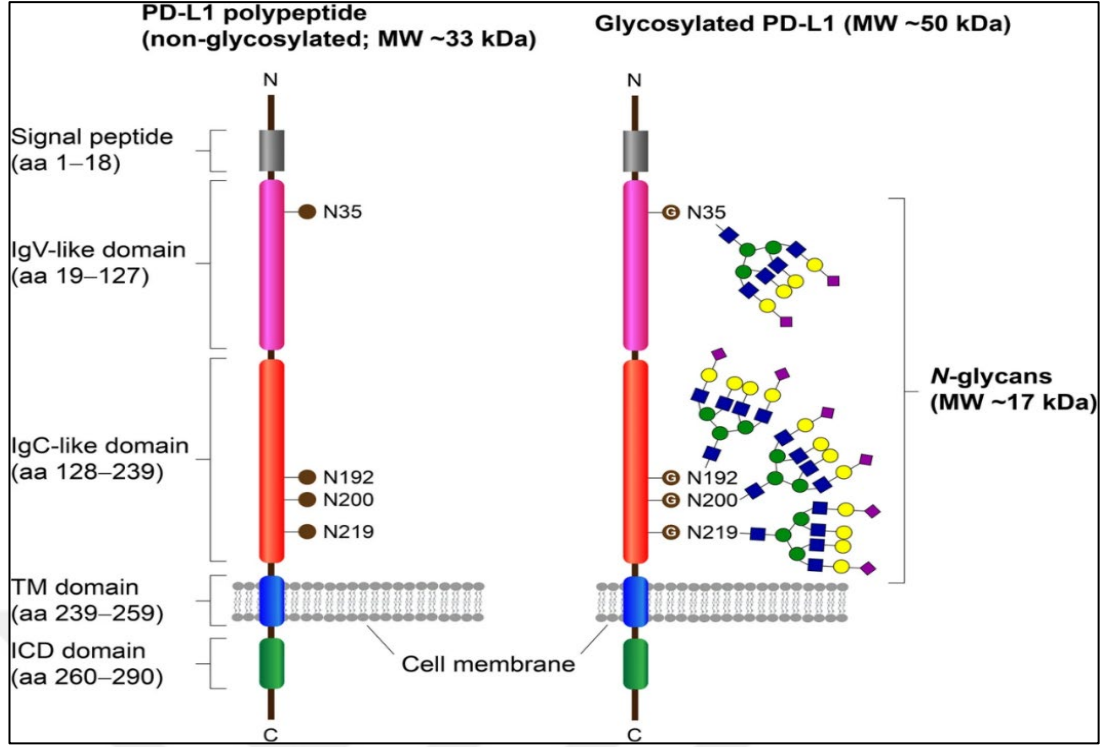
Şekil 2.3: T hücrelerinde PD-1/PD-L1 aracılı inhibisyon mekanizmaları. PD-L1'in PD-1 ile etkileşime girmesiyle ZAP70 fosforilasyonunu zayıflatan ve RAS-MEK-ERK/PI3K-Akt-mTOR yolunu azaltan fosfataz SHP2 aktive olur. Ek olarak, PD-1 aktivasyonu, efektör genleri baskılayan BATF'nin ifadesini indükler. Toplu olarak, PD-1 sinyali, T hücresi çoğalmasının, aktivasyonunun, efektör fonksiyonunun ve hayatta kalmasının inhibisyonuna yol açar.

PD-1'in T hücrelerindeki ifade seviyesi, T hücrelerinin fonksiyonlarını etkilemektedir [101]. Yüksek seviyede PD-1 ifadesi, makrofaj enflamatuvar protein 1 β (MIP-1 β) üretiminin baskılanmasını sağlar. Sitotoksiteyi ya da interferon- γ (IFN- γ) üretimini bloke etmek için düşük seviyelerde PD-1 ifadesi gerekmektedir. İnterferon- α ve interlökin-2 üretimi için çok daha aşağı PD-1 ifadesi gerekmektedir. Anlaşılabileceği üzere, PD-1'in T hücre yanıtı aşamalarında aktivasyonda değil de efektör olarak rol üstlendiği düşünülmektedir. PD-1 fonksiyonlarının aktivasyon aşamasında neden kısıtlandığı düşünüldüğünde, aktifleştirilmiş dentritik hücrelerde cis etkileşim olarak PD-L1'in CD80 (Cluster of Differentiation 80) ile etkileşimde bulunuyor olabileceği açıklama olarak sunulabilir. Bu sebeple, PD-L1'in ve PD-1'in T hücreleri üzerinde etkileşimleri zayıflayacaktır [102].

PD-L1'in sinyal verme kapasitesi bir başka araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır. PD-L1'in sitoplazmik kuyruğu sinyal motifi içermese de PD-1 ligandları yoluyla PD-1 ligandları ifade eden hücrelere ters sinyaller göndererek interferonların proapoptotik etkilerine karşı dirençlerini artırdığının kanıtları mevcuttur [103], [104]. Yine de hangi hücre içi faktörün bu etkileşimi sağladığı belli değildir. PD-L1, PD-1'e ek olarak farklı etkileşim partnerlerine sahiptir. PD-L1, CD80 ile etkileşime girerek PD-1/PD-L1 etkileşimine müdahale edebilir [102]. Sonuç olarak, PD-1/PD-L1 sinyal yolağı hakkındaki bilgilerimiz, aktive edilmiş T hücrelerinde elde edilen çalışmalardan elde edilmiştir [91]. PD-1'in diğer T hücre tiplerinde ne tip fonksiyonlara sahip olduğu daha az bilinmekte ve araştırılmaya devam etmektedir.

2.7. PD-L1'in Düzenlenmesi

PD-L1 proteini bir zar proteinidir ve diğer immün kontrol noktası proteinleri gibi Endoplazmik Retikulumda (ER) üretilerek hücre yüzeyine gönderilir [105]. Yüzeye iletim sırasında glikolizasyon gerçekleşir. Glikolizasyon, immün kontrol noktası proteinlerinin işlevselliğini değerlendirmek için kontrol mekanizması işlevindedir. İnsan PD-L1 molekülü 4 N-glikolizasyon bölgesi bulundurmaktadır. Bunlar; N35, N192, N200 ve N199'dur. PD-L1'in protein stabilitesi için bu modifikasyonlar büyük önem arz etmektedir (Şekil 2.4) [105], [106].

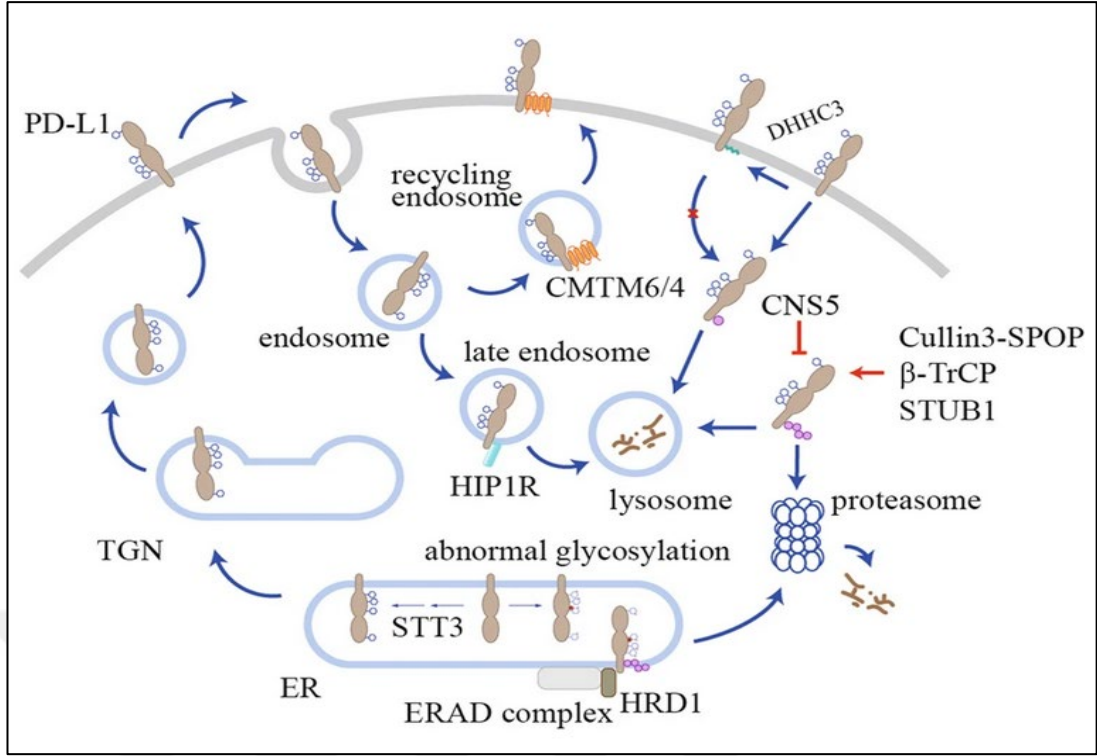


Şekil 2.4: Glikolize olmayan ve glikolize olan PD-L1 proteinin yapısı. PD-L1, PD-L1'in IgV benzeri ve IgC benzeri alanlarını kapsayan dört glikozilasyon bölgesine (G; kahverengi daireler) sahip bir hücre zarı proteinidir. Sayılar, kaçınıcı amino asitten bağlantı kurduğunu temsil eder. PD-L1 polipeptidinin tahmini moleküler ağırlığı, glikozile edilmemiş bir formda (solda) yaklaşık 33 kDa'dır. Glikosile edilmiş PD-L1, Western blotlarda (sağda) yaklaşık 50 kDa'da bir bant aralığında yaklaşık 17 kDa N-glikan parçalarından oluşur. MW: moleküler ağırlık; IgV: immünoglobulin değişkeni; IgC: immünoglobulin sabiti; TM: transmembran; ICD: hücre içi alan.

Oligosakkaril Transferaz (STT3) ER ilişkili N-glikoziltransferaz olup PD-L1'in ilk N-glikozilasyonunu kataliz eder (Şekil 2.5) [105]. Kanseri kök hücre benzeri hücrelerinde STT3'e bağlı gerçekleşen N-glikozilasyon, PD-L1'in epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) için gerekli olan PD-L1 seviyesini stabilize eder ve yukarı regülasyonunu sağlar [107]. Tam aksine Adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilen AMP protein kinazın (AMPK) S195 fosforilasyonunu gerçekleştirmesi, PD-L1'in anormal glikozilasyonunu indükler ve PD-L1'in ER'den golgiye taşınmasını bloke ederek Endoplazmik Retikulum ilişkili bozunmaya (ERAD) sebep olur [108].

PD-L1, sürekli olarak internalize edilir ve devamında geri dönüşüme ya da bozulmaya uğrar. Bir şaperon proteini olan, kemokin benzeri faktör (CKLF) benzeri MARVEL transmembran etki alanı 6 proteini (CMTM6), PD-L1'in geri dönüşümünden sorumludur (Şekil 2.4) [105]. CMTM6 proteini hem PD-L1 ile hücre zarında etkileşime

girerek hem de endozomlarla etkileşime girerek geri dönüşümü başlatır. Ayrıca, lizozom ile etkileşime girerek ubiquitinasyon ve bozunmayı engeller. CMTM6 eksikliği olan tümör hücrelerinde PD-L1 geri dönüşümünde azalma olmaktadır, bu sayede T hücre aktivasyonunun daha az baskılandığı görülmektedir [109]. PD-L1'in lizozomda bozunmasını düzenleyen birçok protein tanımlanmıştır. Huntington etkileşimli protein 1 ilgili protein (HIP1R), lizozom ayrıştırıcı motif taşıyarak PD-L1'e bağlanır ve bu bağlantı PD-L1'in lizozom tarafından hedeflenmesini sağlar [16][110]. Ayrıca, farklı araştırmacı gruplarının yaptığı çalışmalara göre, proteazomun PD-L1'in bozunmasında yol oynadığı görülmektedir. SPOP (Speckle Type BTB/POZ Protein) ve HRD1 (β -Hydroxy β -methylglutaryl koenzim A redüktaz Bozunması 1 proteini), PD-L1'in proteozomal bozunmasından sorumludur (Şekil 2.5) [105]. Hücre döngüsü esnasında PD-L1 seviyesi, erken G1 ve M fazlarında en yüksek seviyede iken ileri G1 ve S fazlarında hızla azalmaktadır. Bu azalma siklin D-siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4)-SPOP-Fizzy Hücre Bölünmesi Döngüsü 20 İlgili 1 (FZR1) sinyal yolu aracılığıyla düzenlenir. CDK4, SPOP'u fosforiller ve stabilize ederek PD-L1'in poliubikitinasyonuna ve bozunmasına aracılık eder [111]. PD-L1'in glikolizasyonu, HRD1 ve β -transducin tekrar içeren proteini (β -TrCP) aracılığıyla ubiquitinasyonunu doğrudan etkileyebilir. PD-L1 glikolize edilmediğinde T180 ve S184 bölgelerinden Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (GSK3 β) tarafından fosforile edilerek β -TrCP aracılığıyla PD-L1'i ubiquitinasyona ve bozunmaya uğratabilir [112]. Diğer taraftan S195 bölgesinin fosforilasyonu, PD-L1'in glikolize olmasına neden olur ve bu da ERAD'ı tetiklemek için HRD1'in uzaklaştırılmasını sağlar [108]. Bu hücresel aktiviteler aracılığıyla, PD-L1'in hücrede düzenlenmesi sağlanmaktadır.



Şekil 2.5: PD-L1'in hücre içinde düzenlenmesi. STT3 katalizli N-glikozilasyon, PD-L1 yüzey ifadesini stabilize eder. PD-L1'in P-S195 kaynaklı anormal glikozilasyonu ERAD'ye neden olur. İnternalize olan PD-L1, HIP1R tarafından parçalanmak üzere lizozoma ayrılır veya CMTM6/4 yardımıyla hücre yüzeyine geri dönüştürülür. PD-L1, farklı bağlamlar içerisinde çeşitli E3 ligazları (HRD1, Cullin3-SPOP, β -TrCP ve STUB1) tarafından übikütilenleştirilir ve CNS5 tarafından deübikütilenleştirilir. PD-L1'in DHHC3 tarafından palmitoilasyonu, mono-ubikütilasyonunu ve lizozomal bozulmasını baskılar.

2.8. Kanser ve PD-1/PD-L1 Yolağı

PD-1, antijen yanıtlarını düzenleyen bir "reostat" olarak işlev görür [113]. PD-1 yolağının bozulması, konağın fizyolojisini etkileyebilir. PD-1 eksikliği olan farelerde timik T hücresi eğitiminde bozulmalar gözlemlenebilir ve otoimmün hastalıklara yatkınlık oluşturabilir. CTLA-4 eksikliği olan farelerde yıkıcı otoimmün hastalıklar gözlemlenirken, PD-1 eksikliği olan farelerde daha hafif ve kronik otoimmün rahatsızlar gözlemlenmektedir. PD-1 eksikliği olan C57BL/6 farelerinde, artrit ve lupus benzeri glomerülonefrit görülmüştür [114]. PD-1 eksikliği olan BALB/c farelerinde ise genişlemiş kardiyomiyopati gelişmiştir [115], [116]. Bu gözlemler, genişlemiş kardiyomiyopatinin otoimmün temeline dair ilk deneysel kanıtlar olmuştur. NOD ve

MRL farelerde PD-1 eksikliği, tip 1 diyabet ve miyokardit oluşumunu hızlandırmıştır [117]. Bu kanıtlar, PD-1 yolağının immün düzenlemedeki önemini göstermektedir.

PD-1'in tümör hücrelerinin immün sağkalımını engellemesine dair ilk kanıtlar, P815 tümör hücrelerinde PD-L1 aşırı ifadesinin, CD8+ T hücrelerinin sitolitik aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği ve PD-1 ile etkileşime girerek *in vivo* ortamda tümörögenез ve invaziviteyi artırdığı gözlemleriyle sağlanmıştır [118]. Daha sonraki çalışmalar, klinik tümör örneklerinde anormal PD-L1 ifadesi oluşumunu ve bunların kötü prognozla sonuçlandığını ortaya koymuştur [119], [120]. Bu sonuçlar, PD-1/PD-L1 yolağının hedeflenmesinin kanser tedavisinde etkili olacağı fikrini ortaya koymuştur.

PD-L1 ifade eden tümör hücreleri ve antijen sunan hücreler, PD-1 ifade eden T hücreleri ile etkileşime girerek T hücrelerinin apoptozuna, bitkinleşmesine ve interlökin-10 ifade etmesine yol açar. PD-L1, adaptif bağışıklık sisteminin CD8+ T hücre aracılı lizise karşı, PD-L1+ tümör hücrelerini korumak için kritik bir "beni bulma" sinyali gönderen moleküler bir "kalkan" gibi işlev görür. T hücresi işlev bozukluğu, birçok kanserin belirgin özelliğidir [121]. Ayrıca yukarıca belirtildiği gibi PD-L1, T hücrelerine ve tümörlere geri sinyaller iletebilir ve onların hayatta kalmasını etkileyebilir [103], [122]. Bu gözlemler, PD-1/PD-L1 yolağının bloke edilmesi amacıyla ilaçlar tasarlamak için bilimsel temel sağlar.

2.9. PD-1/PD-L1'i Bloke Edici Monoklonal Antikorlar

PD-L1 ifade eden çeşitli kanser türlerinin bağışıklık sisteminden kaçabildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [123]. Bu fenomen, "adaptif bağışıklık direnci" olarak adlandırılmaktadır [124]. PD-1 ve PD-L1'in yüksek ifadesi hem organ malignitelerinde hem de hematolojik olarak gösterilmiştir [125]. Bu bağlamda hem tümör hem de tümöre sızabilen miyeloid hücrelerde PD-L1'in ifadesinin arttığı bilinmektedir [126]. Bu sebeplerle PD-L1 ifade eden kanser tiplerine karşı, PD-L1'i bloke edici monoklonal antikorlar geliştirilmiştir ve klinikte uygulanmaktadır.

PD-1/PD-L1 bloke edici monoklonal antikorlar, önceden immünojenik olarak kabul edilmeyen türler de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde etki

göstermektedirler. PD-L1 bloke edilen hücrelerde, PD-1/PD-L1 etkileşimi gerçekleşmeyeceğinden T hücreleri baskılanmayacak ve immün kaçış gerçekleşmeyecektir [127]. Normal şartlar altında, PD-1/PD-L1 etkileşimi büyük ölçüde inaktif durumda olduğundan, tümöre özgü yüksek PD-L1 ifadesinin bloke edilmesi lokalize ve spesifik bir bağışıklık yanıtının gerçekleşeceği anlamına gelmektedir [128]. Ek olarak, PD-1/PD-L1 etkileşimini bloke eden monoklonal antikolar immünolojik belleğin oluşmasını sağlayarak kalıcı yanıtlar oluşturabilir [129].

Nivolumab, PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 ile bağlantısını bloke eden bir monoklonal antikordur [130]. Uygulaması onaylanan kanser tipleri arasında, melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), baş ve boyun sküamöz hücre kanseri (HNSCC), ilerlemiş renal hücreli karsinom (RCC), ilerlemiş ürotelyal karsinom, Hodgkin's lenfoma, hepatoselüler karsinom (HCC) ve kolorektal karsinom bulunmaktadır. Pembrolizumab PD-1'in PD-L1 ile etkileşimini bloke eden bir diğer monoklonal antikordur fakat arada küçük farklılıklar bulunmaktadır [131]. Örneğin, Pembrolizumab uygulaması için PD-L1 ifadesinin seviyesi önemlidir. Melanom, NSCLC, HNSCC, mide ve gastroözofageal karsinom, Hodgkin's lenfoma, ürotelyal karsinom ve servikal karsinom için Pembrolizumab uygulaması onaylanmıştır. PD-L1'in PD-1 ile bağlanmasını bloke eden antikolar arasında Avelumab, Atezolizumab, Durvalumab FDA tarafından onaylanmıştır [132]. Atezolizumab, hümanize antikor, Avelumab ve Durvalumab ise insan antikoru [133] - [135].

PD-1/PD-L1 bağlanmasını bloke eden monoklonal antikolar, dozaja bağlı olarak öngörülemeyen anormal ilaç reaksiyonları oluşturabilirler [136]. Bu reaksiyonlar, kolit, döküntü ve zatürre gibi hastalıklara sebebiyet verebilir. Bağışıklıkla ilgili gerçekleşen bu tip olumsuz olayların, bloke edici monoklonal antikoların kullanımında gerçekleşmesi kaçınılmaz görünmektedir [137].

PD-1/PD-L1 blokajı, tüm hastalarda etki göstermemektedir. Ayrıca zaman içerisinde tedaviye karşı direnç gelişebilmektedir. Ek olarak, önemli üretim maliyeti ve uygulamada potansiyel toksisite göze alındığında doğru moleküle yönelik tedavi geliştirmek önemlidir. PD1/PD-L1 tedavisine karar verilirken, yalnızca hücrelerdeki PD-L1 ifadesi göz önünde bulundurulmaktadır. [138]. Yani, tedavi kararlaştırılırken yalnızca PD-L1 testi yapılmaktadır. Daha doğru tedavi yönteminin seçilebilmesi için

başka biyobelirteçlerin araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Son olarak, tedavide antikorların tek başına mı yoksa çeşitli kombinasyonlar ile birlikte mi verilmesi gerektiği henüz anlaşılamamıştır.



3. GEREÇLER

3.1. Cihazlar

Karbondioksit inkübatörü (Euroclone), su banyosu (Nüve), class II tip laminar akış kabini (Esco), +4°C buzdolabı (Vestel), -20°C derin dondurucu (Bosch), -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific), buz makinesi (BAR-LINE BF85), soğutmalı santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), vortex (DragonLabs, MX-S), ters ışık mikroskobu (Leica), hassas terazi (Sartorius BL210S), şarjlı pipetleyici (Thermo Scientific), ısıtıcı blok (Denville Scientific), ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Denville Scientific), sıvı azot tankı (Arpege 140), orbital çalkalayıcı (Denville Scientific), santrifüj (Nüve, NF400), jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), otoklav (Hriyama), Nanodrop (Thermo Scientific), Varioskan LUX (Thermo Scientific).

3.2. Genel Kimyasallar

Tris (Sigma Aldrich), HCl (Fischer Scientific), DMSO (NeoFroxx), Acrilamid/Bisacrilamid (NeoFroxx), 2-Propanol (Merck), SDS (Calbiochem), APS (Fischer Scientific), TEMED (Fisher Scientific), PhosSTOP Fosfataz İnhibitör Kokteyl Tabletleri (Roche), Polietilen Glikol (Sigma Aldrich). Incomplete Freund's Adjuvant (Sigma Aldrich).

3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

Hücre besiyeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM (Gibco), %10 fetal dana serumu (FBS, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco), 1X esansiyel olmayan amino asitler (NEAA, Gibco), 10X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) kullanıldı.

3.4. Hücre Hatları

F0 fare myeloma hücre hattı Gebze Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hücre stoğundan temin edildi. Hücreler, yüksek glikoz içerikli, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 esansiyel olmayan aminoasitler içeren DMEM besiyerinde büyütüldü.

3.5. Çözelti ve Tamponlar

Tez çalışması için kullanılan solüsyonların içerikleri ve kullanım amaçları tablodaki gibidir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.

Çözelti-Kimyasal	İçeriği	Kullanım Amacı
10X PBS	NaCl 80 g, KCl 2 g, Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 17,8 g, KH ₂ PO ₄ 2,4 g, 1 L saf su (pH:7,4).	Hücre kültürü
Dondurma Ortamı	%90 FBS, %10 DMSO.	Hücre dondurma
%4'lük SDS-PAGE İstifleme Jeli	3,15 ml ultra saf su, 1,25 ml 0,5 M Tris (pH:6,8), 50 µl %10 SDS, 0,5 ml %40 Ac/Bis, 50 µl %10 APS, 3 µl TEMED.	SDS-PAGE jeli
%12'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli	4,4 ml ultra saf su, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH:8,8), 100 µl %10 SDS, 3 ml Ac/Bis (%40), 100 µl %10 APS, 6 µl TEMED.	SDS-PAGE jeli
Elektroforez Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 190 mM glisin, 0,1% SDS.	SDS-PAGE
Commasie Brilliant-Blue Boya Solüsyonu	Comassie Brilliant-Blue R-250 %0.1, Metanol %40, Glacial asetik asit %10.	SDS-PAGE boyaması

Tablo 3.1: Devamı.

Commasie Brilliant-Blue Destain Solüsyonu	Metanol 15 mL, Buzlu asetik asit 5 mL, 30 mL distile su.	Jel Yıkama Solüsyonu
Karbonat-bikarbonat Tamponu	0.0125 M Sodyum bikarbonat, 0.0875 M Sodyum karbonat.	ELISA
10X TBS	500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1.5 M NaCl.	Yarışmalı ELISA
TBS-T	1X TBS, %0,05 Tween-20.	Yarışmalı ELISA
Bloklama Solüsyonu	%5 Yağsız süt tozu, 1X TBS-T.	Yarışmalı ELISA
Fosfat Tamponu	0- 0.02M Na ₂ HP0 ₄ B- 0.02M NaH ₂ PO ₄ A (39ml) + B (61ml) + dH ₂ O ile 200ml'e tamamlanır. (pH:7)	Antikor Saflaştırma
Tris Tamponu	1 M Tris/HCl (pH:9)	Antikor Saflaştırma
ProteinA Saflaştırma Tamponu	0.05 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , 0.3 M NaCl (pH:3)	Antikor Saflaştırma
ProteinG Saflaştırma Tamponu	0.1 M glycine-HCl, pH 2.7	Antikor Saflaştırma

3.6. Kitler

SMART BCA protein assay kit (Intron Biotechnology, ABD), PD-1/PD-L1 Blokade Bioassay (Promega, ABD). Rapid ELISA Mouse mAb isotyping Kit (ThermoScientific, ABD)

4. YÖNTEMLER

4.1. Monoklonal Antikor Üreten Hücrelerin Geliştirilmesi

4.1.1. Farelerin Bağışıklanması

6-8 haftalık dişi BALB/c fareler 25 µg ticari PD-L1-Fc rekombinant proteini ile "Complete Freund's Adjuvant" kullanılarak 1:1 (hacim:hacim) oranında emülsifiye edilip periton içinden verilerek bağışıklanma sağlandı. Her iki haftada bir devam eden bağışıklanmalarda kullanılan rekombinant proteinler ise "Incomplete Freund's Adjuvant" içerisinde hazırlandı. Toplamda her fare için en az 3 bağışıklanma gerçekleştirildi.

4.1.2. Füzyon Partneri Hücre Hattının Kültürü

F0 hücre hattı, %20 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 NEAA ile yüksek glikoz içeren DMEM besiyerinde büyütülmeye başlandı ardından kademeli olarak fetal dana serumu oranı %10'a düşürüldü. Hücreler kültür petrilerinde, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. %80-90 oranında konfluent olan yarı-süspanse hücreler 1X PBS ile yıkandı, hafif darbeler uygulanarak kültür kapları zemininden kaldırılarak yeni kültür petrilerine ihtiyaca göre oranlanarak ekildi.

4.1.3. Bağışıklanmış Farelerin Seçimi

Bağışıklanmış BALB/c farelerden ve bağışıklanmamış kontrol farelerinden 3. bağışıklama sonrasında kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden serumu ayrıştırıldı. Serumda indirekt ELISA yöntemi uygulanarak oluşturulan bağışıklık yanıt kontrolü yapıldı. Bağışıklama işleminde kullanılan PD-L1-Fc rekombinant proteini ile gerçekleştirilen indirekt ELISA testinde, her kuyuda 100 ng PD-L1-Fc antijeni olacak şekilde 100 µl karbonat-bikarbonat tamponu (pH:9,6) içerisinde kaplandı. Gece boyu

+4°C 'de inkübe edildi. Fare serumları 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600 olacak şekilde dilüe edildi ve kuyucuklara uygulandı. İkincil antikor olarak alkalın fosfataz konjuge edilmiş fare anti-IgG antikorı kullanıldı. Ardından para-nitrofenil-fostat substratı ile 30 dakika inkübe edildi ve elde edilen kolorimetrik reaksiyon 405 nm dalga boyunda ölçüldü. Serumlarda bulunan antikor değeri tayin edildi.

4.1.4. Füzyon

Bağışıklaınmış BALB/c farelerden elde edilen serumların indirekt ELISA sonuçlarına göre en iyi fare seçildi ve füzyonda kullanılmasına karar verildi. 25 µg antijenle son bağışıklaıma gerçekleştirildi. Son bağışıklaımanın 3 gün ardından füzyon işlemine geçildi. Füzyondan bir gün önce ise F0 miyeloma hücrelerinin ertesı gün logaritmik büyüme fazında olması sağlanacak şekilde pasajlandı. Sağlıklı fareden elde edilen dalak hücrelerinin 96 kuyulu plaklara besleyici katman oluşturmaı için ekimi gerçekleştirildi.

Füzyon günü, bağışıklaıma seviyesi en yüksek olduğuna karar verilen farenin dalağı, 40µm cell strainer içerisinde ezilerek hücrelerin birbirinden ayrıştırılması sağlandı. Büyüme fazında olan F0 hücreleri ve dalak hücreleri içerisinde serum bulunmayan besiyerinde yıkandı ve 1:6 oranında birleştirildi ardından tekrar serumsuz DMEM içerisinde çöktürüldü ve pelet oluşturuldu. Dalak-F0 hücre peleti 1 ml polietilenglikol (PEG; MW:1500) ile 1 dakika boyunca pipet ucu yardımıyla karıştırıldı, yavaşça çözünmesi sağlandı. Kademeli olarak serumsuz besiyeri eklenerek hücrelerin hacmi 45 ml'e çıkartıldı ve 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından santrifüjlendi. Elde edilen füzyon hücreler 1X HAT (Hypoxanthine/Aminopterin/Thymidine) içeren besiyerinde çözüldü ve bir gün önce ekilen besleyici katman oluşturulmuş 96 kuyucuklu plaklara dağıtıldı.

4.1.5. Hibridomaların Geliştirilmesi

Füzyon hücrelerinin takibi sağlandı, 7. Gün ve takip eden günlerde besiyeri değişimleri gerçekleştirildi. Yeterli büyüme sağlayan kuyucuklardaki hücrelerin üst sıvıları alınarak PD-L1'e karşı reaktiviteleri, rekombinant PD-L1 ile kaplanmış plakalarda indirekt ELISA ile test edildi. Absorbans değeri yüksek olan kuyucuklarda bulunan hücrelerin, PD-L1'e karşı antikor ürettiği göz önünde bulundurularak monoklonal hale getirilmesi için alt-klonlama işlemine geçildi.

4.1.6. Alt-klonlama

Sağlıklı farelerden elde edilen dalak hücreleri besleyici katman oluşturmak üzere, alt-klonlama işleminden 1 gün önce 96 kuyucuklu plaklara ekildi. PD-L1'e karşı spesifik antikor ürettiği görülen klonlardaki hücreler sayıldı. Besleyici katman oluşturulan 96 kuyulu plağa, her kuyuya 1 hücre düşecek şekilde ekimleri gerçekleştirildi. Büyüyen klonlar indirekt ELISA yöntemiyle test edildi. En az 2 alt-klonlama işleminin ardından monoklonal hale getirilen klonlar, büyük hacimlerde büyütüldü ve donduruldu. PD-L1'e karşı antikor bulunduran üst sıvıları -20°C'de saklandı.

4.2. Antikorların Saflaştırılması

Antikorların saflaştırılması için monoklonal hibridoma klonları serumsuz DMEM besiyerinde 5 gün süre ile inkübe edildi ve hücreler uzaklaştırılarak üst sıvıları toplandı. Üst sıvıda bulunan antikorların saflaştırılması için afinite kromatografisi uygun görüldü. Afinite kromatografisinde kullanılacak boncukların optimum performansta olması için antikorların izotiplerinin belirlenmesi kararlaştırıldı. ELISA Mouse mAb isotyping Kit, talimatlara uyularak uygulandı ve izotipler belirlendi. İzotip türlerine göre kullanılacak boncukların seçimi yapıldı. Boncuklar üst sıvı ile birleştirilmek üzere 1800 rpm'de 5 dakika çöktürüldü. Üst sıvı boncuklardan ayrıldı ve fosfat tamponu (pH:7) eklenerek 5 ml'e tamamlandı. Hazırlanan boncuklar 45 ml'lik

hibridoma üst sıvıları ile birleştirildi. Boncuk ve üst sıvıların karıştırılması işlemi +4°C’de gece boyu gerçekleştirildi.

Ertesi gün fosfat tamponu (pH:7) kolonlardan geçirilerek kolonlar hazırlandı. Ardından boncuk ve üst sıvı karışımı kolonlardan geçirilerek kolondan akımı sağlanan karışım flow-through 1 (FT1) olarak adlandırıldı ve toplandı. Kolonda kalan boncukların üzerinden fosfat tamponu geçirilerek akışı sağlandı ve toplanan sıvı FT2 olarak adlandırıldı. Safılaştırma adımına geçmeden önce 1,5 ml’lik deney tüplerine +4°C 50 µl Tris tamponu (pH:9) koyuldu ve buzda bekletildi. Deney tüplerinin sayısına safılaştırmada kullanılan üst sıvı miktarına göre karar verildi. Safılaştırma adımında kullanılan boncuk türüne göre protein A safılaştırma tamponu (pH:3) ya da protein L/G safılaştırma tamponu (pH:2.5) kolonlara uygulandı ve akım gerçekleşmesi sağlandı. Deney tüplerinde bulunan 50 µl Tris tamponunun üzerine 1:10 oran olacak şekilde 500 µl’ye tamamlandı. Safılaştırılan antikorların özgüllükleri, indirekt ELISA belirlendi.

Safılaştırılan monoklonal antikorların, smart BCA protein assay kiti ile konsantrasyonu tayin edildi. Ayrıca antikorlar, Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütüldü ve Coomassie Brilliant-Blue boyaması gerçekleştirilerek saflıkları kontrol edildi.

4.3. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının Diğer İmmün Kontrol Noktası Proteinlerine Karşı Çapraz Reaksiyonlarının Belirlenmesi

Geliştirilen anti-PD-L1 monoklonal antikorlarının diğer immün kontrol noktası proteinlerine karşı çapraz reaksiyonlarının belirlenmesi için belirlenen proteinler ticari olarak temin edildi. Diğer immün kontrol noktası proteinleri olan PD-L2, B7-1, B7-2, PD-1, CD28, TIGIT, TIM3 ve VISTA’ya karşı çapraz reaksiyonlarının belirlenmesi için indirekt ELISA yapıldı. 96 kuyucuklu plaklarda immün kontrol noktası proteinleri kuyulara 100’er ng olarak 100 µl kaplama tamponu içerisinde kaplandı +4°C’de gece boyu inkübe edildi. Antijenlerin kaplandığı kuyucuklara eklenen %5 süt tozu içeren TBS-T tamponu 1 saat boyunca oda sıcaklığında bırakılarak bloklanması sağlandı.

Bloklanan kuyucuklara birincil antikor olarak monoklonal hibridoma klonlarının üst sıvıları verildi ve bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından, ikincil antikor olarak alkalın fosfataz konjuge edilmiş olan fare anti-IgG antikorı verilerek yine oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. Son olarak para-nitrofenil-fosfat substrat uygulaması yapılarak 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi ve elde edilen kolorimetrik reaksiyon 405 nm dalga boyunda Multiscan plaka okuyucuda ölçüldü.

4.4. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının Türe Özgüllüğünün Belirlenmesi

Monoklonal antikorların tür özgüllüğü belirlenirken 96 kuyulu plaklara rekombinant insan PD-L1-Fc, fare PD-L1-Fc, sıçan PD-L1-His, cynomolgus maymunu PD-L1-His, köpek PD-L1-Fc antijenleri kuyucuklara 100 ng olarak 100 µl karbonat-bikarbonat tamponu içerisinde eklendi ve +4°C’de gece boyu kaplanması sağlandı. Antijenle kaplanan kuyucuklar yıkandı ve birincil antikor olarak monoklonal antikor üreten klonlar ilave edildi. Ardından kuyucuklar tekrar yıkanarak ikincil antikorların uygulanmasına geçildi. İkincil antikor olarak alkalın fosfataz konjuge edilmiş fare anti-IgG antikorlar kullanıldı (1:1000). Son olarak ikincil antikorların da yıkanmasının ardından para-nitrofenil-fosfat substratı uygulandı ve elde edilen kolorimetrik reaksiyon 405 nm dalga boyunda Multiscan plaka okuyucuda ölçüldü.

4.5. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının PD-L1 Reseptörünü Bloklayıcı Aktivitesinin Test Edilmesi

4.5.1. Yarışmalı ELISA Temelli İnhibisyon Analizi

Yarışmalı inhibisyon ELISA testinde 96 kuyulu plaklar 100 ng PD-1 (BPS Bioscience) ve 250 ng CD80 (BPS Bioscience) antijenleri ile 100 µl karbonat-bikarbonat tamponu (pH:9,6) içerisinde +4°C’de gece boyu kaplandı. Kaplamanın

ardından yıkanarak %5 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T tamponu ile bloklandı. 200 ng anti-PD-L1 saf monoklonal antikorları 50 µl hacim içerisinde kuyucuklara uygulandı. 5 dakikalık inkübasyon süresinin ardından 100 ng PD-L1-biotin 50 µl hacim içerisinde kuyulara nazikçe pipetlendi. 2 saat inkübe edilmek üzere oda sıcaklığında bırakıldı. Süre sonunda kuyular yıkandı ve 1:1000 dilüsyon ile streptavidin-HRP konjugatı (Merck) eklenerek 1 saat oda sıcaklığında 30 rpm hızda inkübe edildi. Reaksiyon sonunda yıkama yapıldı ve 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Merck) solüsyonu substrat olarak uygulandı. 20 dakikalık bekleme süresinin ardından reaksiyon, durdurma tamponunun eklenmesi ile durduruldu ve oluşan kolorimetrik reaksiyon 450 nm'de ölçüldü.

4.5.2. Lüsisferaz Temelli PD-1/PD-L1 Blokaj Analizi

Lüsisferaz temelli PD-1/PD-L1 Blokade Bioassay (Promega) kiti kullanılarak antikorların PD-1/PD-L1 etkileşimine olan bloklayıcı etkisinin hücre temelli olarak incelenmesi hedeflendi. Deney kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

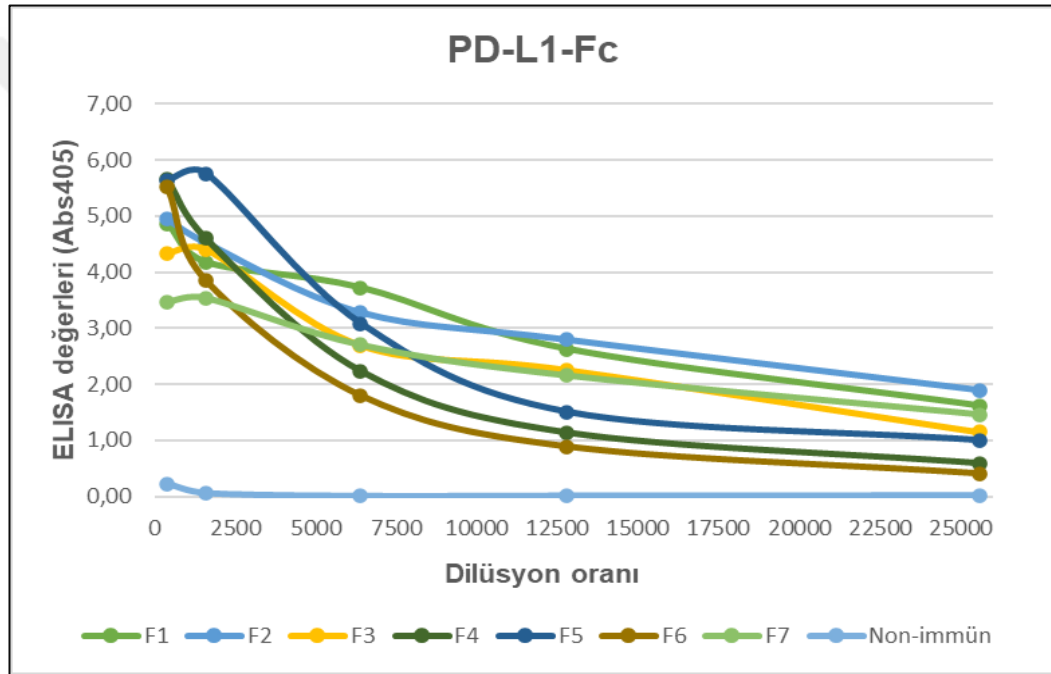
4.6. İstatistiksel Analizler

Klonlara ve referans ilaçlara ait deney verileri GraphPad Prism 9 programı vasıtasıyla analiz edildi. IC50 değerleri hesaplandı.

5. BULGULAR

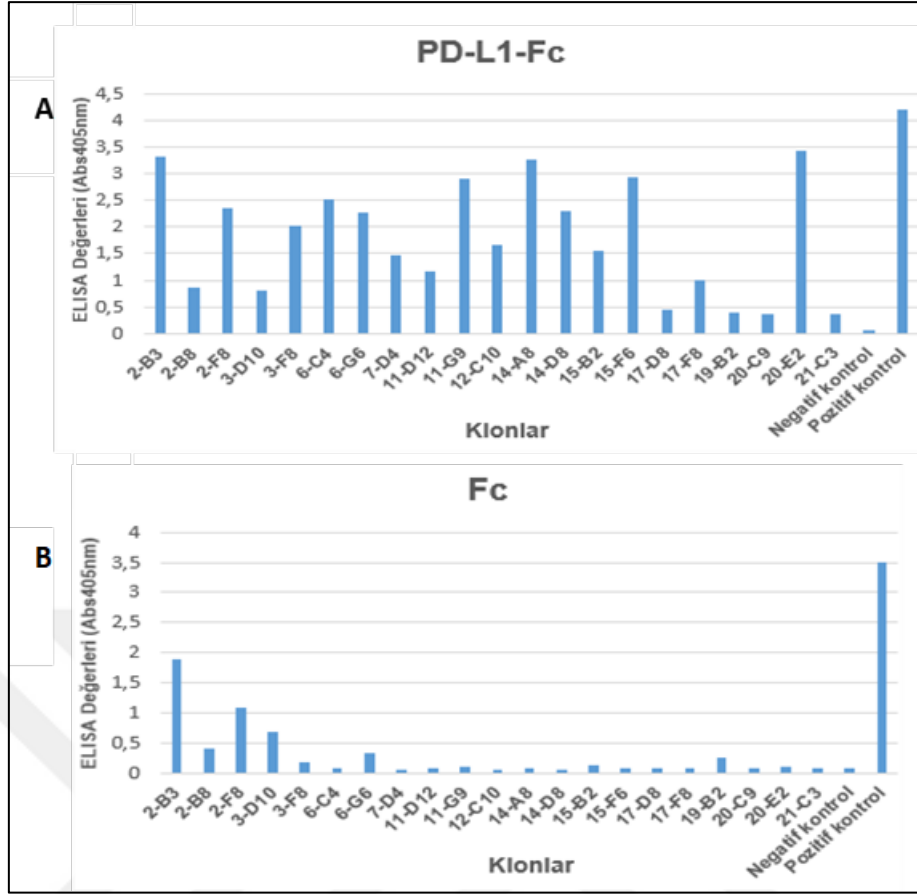
5.1. Fare Anti-PD-L1 Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi

PD-L1 proteinini bloke edici monoklonal antikorların geliştirilmesi amacıyla, fareler ticari rekombinant insan PD-L1 proteini ile bağışıklandı. Yapılan bağışıklamalar sonucunda en iyi bağışıklanan farenin saptanabilmesi için kan serumları indirekt ELISA ile test edildi (Şekil 5.1).



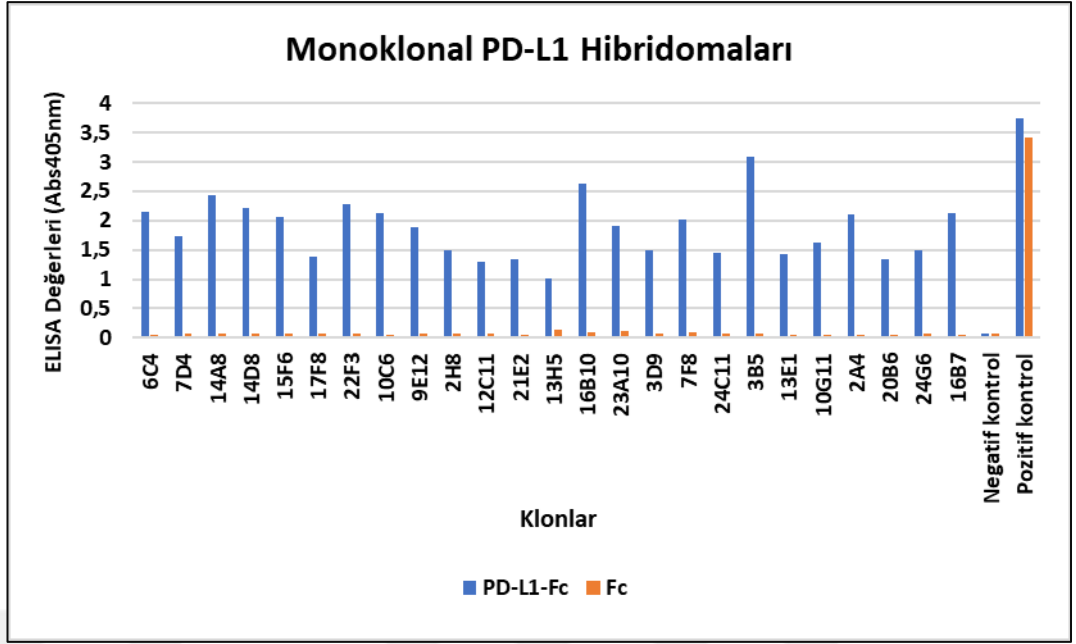
Şekil 5.1: Rekombinant PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumlarının ELISA değerleri.

Elisa sonuçlarına göre en yüksek dilüsyonda dahi yüksek absorbans değeri veren F2 faresi füzyona uygun görüldü. Yapılan füzyon işlemi sonrası gelişen klonlar izlendi ve indirekt ELISA yöntemi ile PD-L1 proteinine karşı aktivitesi olan klonlar saptandı (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: Füzyon sonrası çeşitli klonların indirekt ELISA değerleri. A) PD-L1-Fc antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçları, PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumu pozitif kontrol, besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. B) Fc antijeni kullanılarak yapılan ELISA sonuçları, PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumu pozitif kontrol, besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

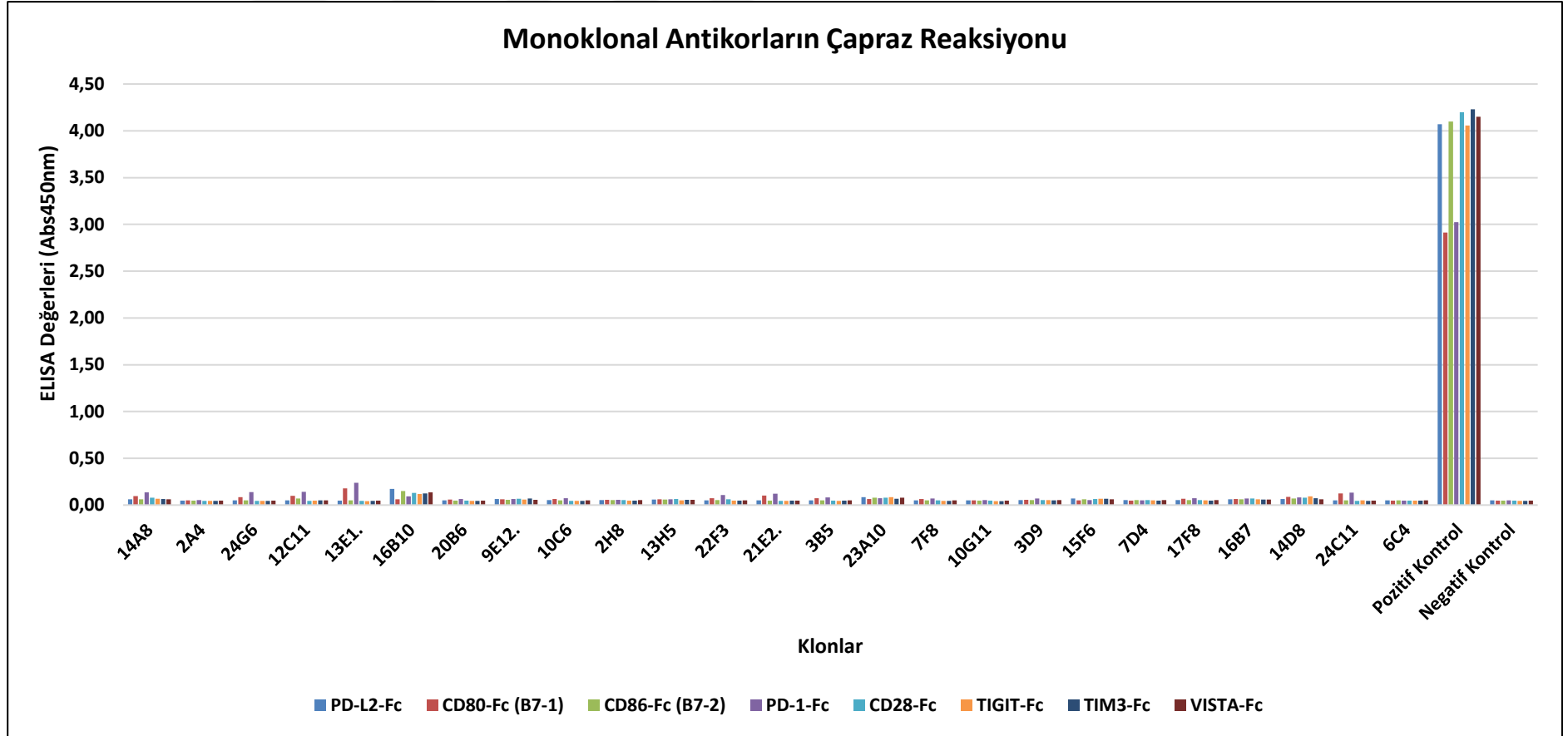
Füzyon sonucunda rekombinant PD-L1 proteinin etiketi olan Fc bölgesine karşı da antikor üretilebileceği düşünüldüğünden bu proteine karşı da indirekt ELISA yapılarak yanlış pozitif olabilecek sonuçların önüne geçilmesi amaç edinildi. Yapılan indirekt ELISA sonuçları incelendiğinde çeşitli klonların Fc bölgesine karşı antikor geliştirdiği gözlemlendi. Bu klonlar elendi ve yalnızca PD-L1'e karşı aktivitesi olan klonlar ile devam edildi. Elde edilen parental klonların alt-klonlama işlemleri tamamlandı ve 25 adet monoklonal hibridoma hücre hattı geliştirildi. Alt-klonlama işlemlerinin ardından stabil hale getirilen hibridomaların PD-L1 proteinine karşı aktivitesi indirekt ELISA yöntemi aracılığıyla saptandı (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Alt-klonlamalar sonrası elde edilen tüm monoklonal hibridoma klonlarının ELISA değerleri. PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumu pozitif kontrol, besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

5.2. Monoklonal Antikorların Diğer İmmün Kontrol Noktası Proteinlerine Karşı Çapraz Reaksiyonları

Monoklonal hibridoma klonlarının ürettiği antikorların diğer immün kontrol noktası proteinleri olan PD-L2, B7-1, B7-2, PD-1, CD28, TIGIT, TIM3 ve VISTA'ya karşı çapraz reaksiyonları belirlenmiştir. Yapılan indirekt ELISA sonucuna göre üretilen monoklonal antikorların diğer immün kontrol noktası proteinlerine karşı çapraz reaksiyon göstermediği, yalnızca PD-L1'e karşı reaksiyon gösterdiği ortaya konmuştur (Şekil 5.4).

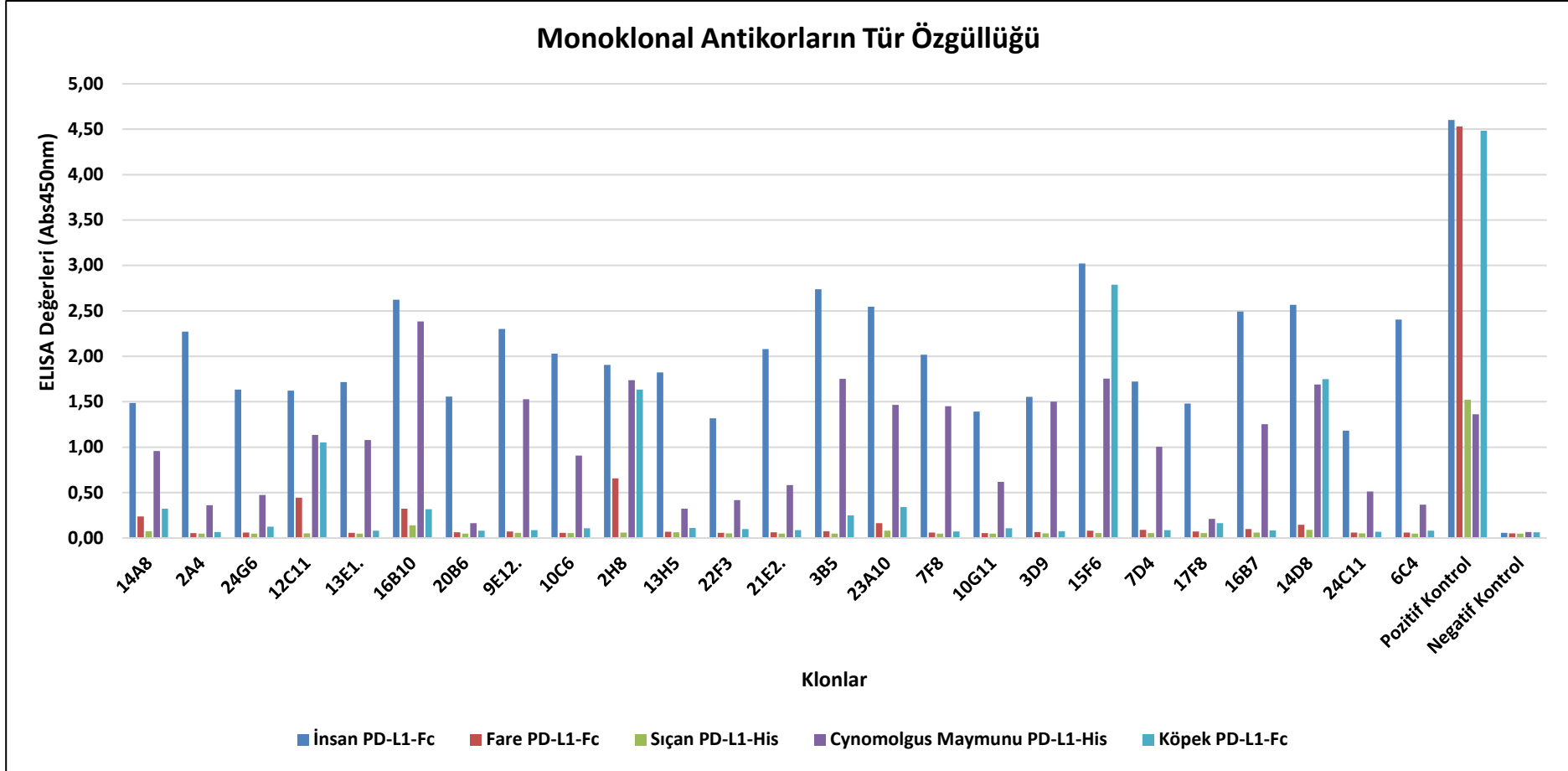


Şekil 5.4: Monoklonal antikorların çapraz reaksiyonları. Pozitif kontrol olarak PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumu, negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır.

5.3. Monoklonal Antikorların Türe Özgüllüğünün Belirlenmesi

İnsan PD-L1'e karşı geliştirilen monoklonal antikorların diğer hayvan türlerine karşı aktivitesinin belirlenmesi için fare PD-L1-Fc, sıçan PD-L1-His, cynomolgus maymunu PD-L1-His, köpek PD-L1-Fc, insan PD-L1-Fc antijenleri ile indirekt ELISA yapılmıştır. Yapılan indirekt ELISA sonucuna göre sırasıyla en yüksek aktivitenin cynomolgus maymunu, köpek, fare ve sıçana türlerine karşı olduğu görülmüştür (Şekil 5.5).





Şekil 5.5: Monoklonal antikorların tür özgüllüğü. İnsan, fare, köpek antijenleri için PD-L1-Fc ile bağışıklanmış fare serumu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sıçan ve cynomolgus maymunu için PD-L1-His ile bağışıklanmış fare serumu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır.

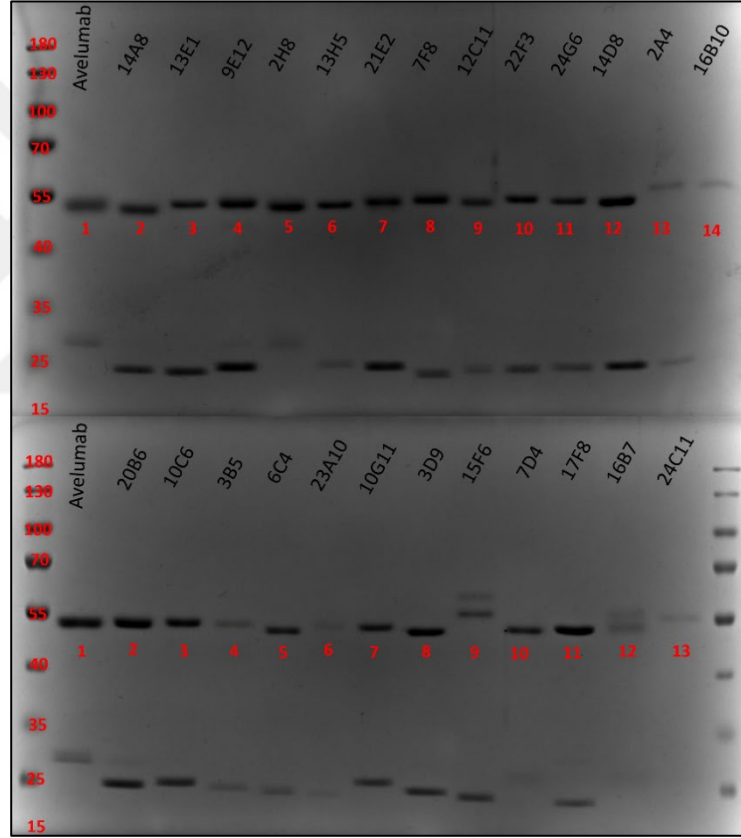
5.4. Antikorların Saflaştırılması

Monoklonal hibridoma klonlarının ürettiği antikorların bloke edici aktivitesinin belirlenmesi amacıyla antikorların saflaştırılması amaçlanmıştır. Monoklonal hale gelmiş olan hibridoma klonlarının üst sınırları toplanarak izotipleri belirlendi. İzotiplerinin belirlenmesinin ardından, afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırma protokolünde hangi protein boncuklarının kullanılacağına karar verildi (Tablo 5.1). Ardından, antikorlar gerekli boncuklar kullanılarak afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı.

Tablo 5.1: Monoklonal hibridoma klonlarının izotipleri ve saflaştırılmada kullanılan boncuk tipleri.

Klon Adı	Ağır Zincir	Hafif Zincir	Kullanılan Boncuk
6C4	IgG1	Kappa	Protein A
7D4	IgG1	Kappa	Protein A
14A8	IgG1	Kappa	Protein A
14D8	IgG1	Kappa	Protein A
15F6	IgG2b	Kappa	Protein G
17F8	IgG1	Kappa	Protein A
22F3	IgG1	Kappa	Protein A
10C6	IgG1	Kappa	Protein A
9E12	IgG2a	Kappa	Protein G
2H8	IgG2a	Kappa	Protein G
12C11	IgG1	Kappa	Protein A
21E2	IgG2a	Kappa	Protein G
13H5	IgG1	Kappa	Protein A
16B10	IgG1	Kappa	Protein A
23A10	IgG2a	Kappa	Protein G
3D9	IgG1	Kappa	Protein A
7F8	IgG2a	Kappa	Protein G
24C11	IgG1	Kappa	Protein A
3B5	IgG2a	Kappa	Protein G
13E1	IgG1	Kappa	Protein A
10G11	IgG1	Kappa	Protein A
2A4	IgG2a	Kappa	Protein G
20B6	IgG2a	Kappa	Protein G
24G6	IgG1	Kappa	Protein A
16B7	IgG2b	Kappa	Protein G

Saflaştırma sonrası antikorların aktivitelerinin belirlenmesi için indirekt ELISA yapıldı ve antikorların aktivitelerinde bir değişiklik gözlemlenmedi. Bunun üzerine saflaştırma etkinliğinin tayin edilmesi amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulandı ve Coomassie Brilliant Blue ile boyanarak antikorların saflığı belirlendi (Şekil 5.6). Coomassie Brilliant Blue uygulaması sonucu tüm antikorların yeterli saflıkta olduğu fakat bazı antikorlarda yeterli antikor miktarına ulaşılamadığı tespit edildi ve gerekli antikorlar tekrar saflaştırıldı. Yeterli antikor miktarına ulaşıldığında antikorlar, yarışmalı ELISA ve lüsiferaz temelli PD-1/PD-L1 deneylerinde kullanılmak üzere muhafaza edildi.



Şekil 5.6: Saflaştırılan monoklonal antikorların Coomassie Brilliant Blue jel görüntüsü. Kontrol olarak Avelumab kullanılmıştır.

5.5. Anti-PD-L1 Fare Monoklonal Antikorlarının PD-L1 Reseptörünü Bloklayıcı Aktivitesi

5.5.1. Yarışmalı ELISA Temelli İnhibisyon

PD-L1'e karşı geliştirilen monoklonal antikorların PD-L1 reseptörünü bloklayıcı aktivitelerinin test edilmesi amacıyla yarışmalı ELISA temelli inhibisyon deneyleri gerçekleştirildi. Afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan ve BCA testi ile konsantrasyonları belirlenen 25 farklı monoklonal antikorun yarışmalı ELISA deneyleri yapıldı ve yüzde inhibisyon değerleri aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı (Tablo 5.2). Ayrıca, inhibisyonlar hesaplanırken klinikte kullanımı onaylanmış PD-L1 bloke edici monoklonal antikor olan Atezolizumab ve Avelumab kontrol grubu olarak kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left(1 - \frac{\text{Örnek Abs}}{P.K. Abs} \right) \times 100$$

(5.1)

Sonuç olarak, 17F8D7 ve 24C11C8 klonlarına ait monoklonal antikorların PD-1 ve CD-80 proteinlerinin PD-L1 proteini ile olan etkileşimlerini blokladığı görüldü. 17F8 monoklonal antikoru %94,25 ve 24C11 monoklonal antikoru %97,80 oranında ayrıca 20B6 monoklonal antikoru %60,63 oranında PD-1/PD-L1 etkileşimini bloke ettiği anlaşılmıştır. Diğer 22 monoklonal antikorun PD1/PD-L1 etkileşiminde yeterli bloke edici aktivitesi gözlemlenmemiştir. CD80/PD-L1 etkileşiminde ise 14A8 monoklonal antikoru %94,40, 17F8 monoklonal antikoru %48,52, 22F3 monoklonal antikoru %70,41, 9E12 monoklonal antikoru %52,26, 21E2 %72,16, 13H5 monoklonal antikoru %94,50, 7F8 monoklonal antikoru %62,10, 24C11 %93,25, 13E1 monoklonal antikoru %52,12, 10G11 monoklonal antikoru %51,28, 16B7 monoklonal antikoru ise %88,88 oranında bloke edici aktivite göstermiştir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında 24C11 ve 17F8 monoklonal antikorları hem PD-1/PD-L1 hem de CD80/PD-

L1 etkileşimlerini bloke edici aktivite göstermiştir. Bu sebeple, 24C11 ve 17F8 monoklonal antikorları lüsiferaz temelli PD-1/PD-L1 blokajı deneylerinde kullanılmak üzere seçilmişlerdir.

Tablo 5.2: Geliştirilen Anti-PD-L1 monoklonal antikorlarının PD-1 ve CD80 proteinlerine karşı %inhibisyon değerleri. Pozitif kontrol olarak Avelumab ve Atezolizumab kullanılmıştır.

Klon Adı	PD-1 %inhibisyon	CD80 %inhibisyon
6C4	0	0
7D4	0	0
14A8	0	94,40
14D8	0	0
15F6	0	0
17F8	94,25	48,52
22F3	0	70,41
10C6	0	0
9E12	7,18	52,26
2H8	0	0
12C11	0	0
21E2	0	72,16
13H5	0	94,50
16B10	0	24,24
23A10	8,82	0,77
3D9	0	0
7F8	0	62,10
24C11	97,80	93,25
3B5	0	0
13E1	0	52,12
10G11	0	51,28
2A4	0	14,99
20B6	60,63	0
24G6	0	0
16B7	0	88,88
Atezolizumab	97,90	94,43
Avelumab	97,96	93,69

5.5.2. Lüsiferaz Temelli İnhibisyon

17F8 ve 24C11 klonlarına ait monoklonal antikorların inhibisyon potansiyelleri değerlendirildikten sonra, lüsiferaz temelli PD-1/PD-L1 Blokade Bioassay (Promega) kullanılarak PD-1/PD-L1 etkileşiminin hücresel temelde incelenmesi amaçlandı. Deney, kit talimatlarına uyularak gerçekleştirildi. Klinikte kullanılmakta olan PD-L1 bloke edici monoklonal antikor olan Atezolizumab ve Avelumab referans olarak kullanılmıştır. 17F8 ve 24C11 klonlarına ait monoklonal antikorlar ve referans grubu 3 tekrarlı 9 farklı dozda uygulandı ve kit talimatlarına uygun olarak luminometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Kit talimatında verilen aşağıdaki formül yardımıyla, PD-1/PD-L1 etkileşimine olan bloklama potansiyelleri hesaplanmıştır.

$$Fold\ Induction = \frac{RLU(Antibody - Background)}{RLU(No\ Antibody\ Control - Background)} \quad (5.2)$$

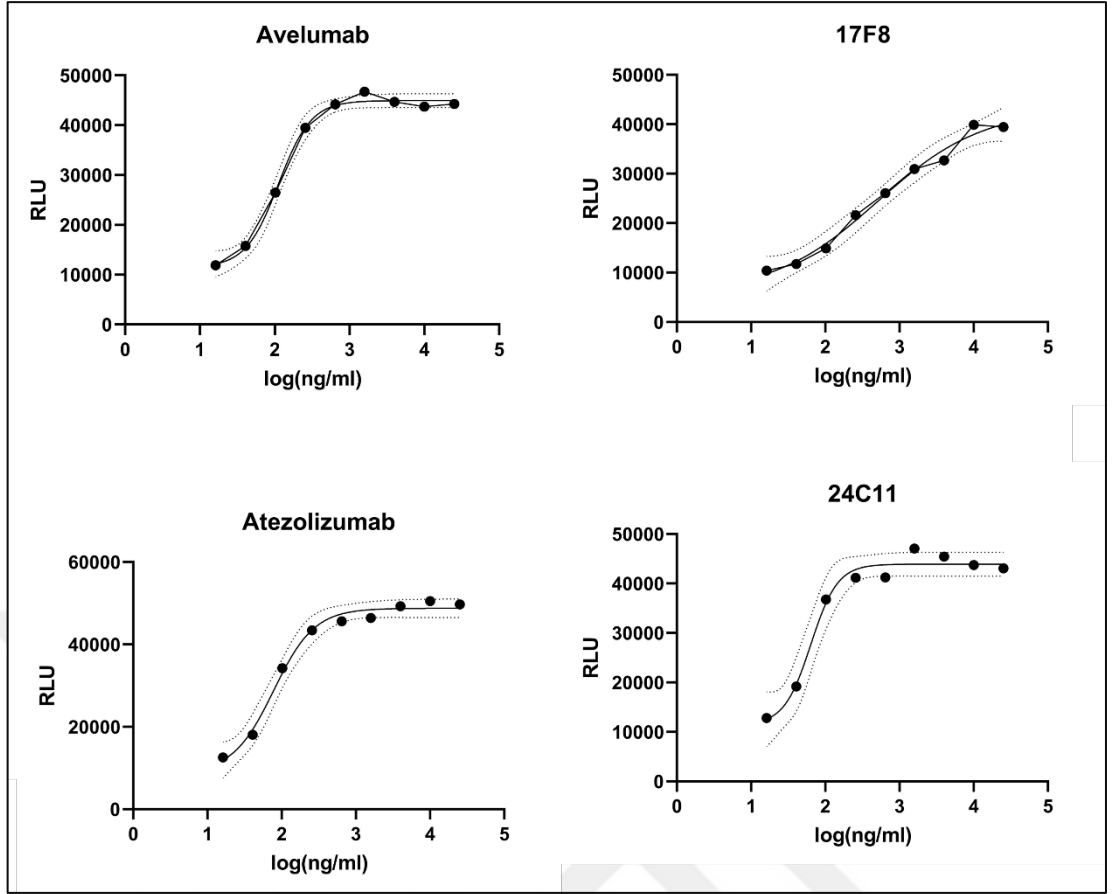
Sonuç olarak, 17F8 ve 24C11 klonlarına ait monoklonal antikorların konsantrasyon artışına bağlı olarak luminesans sinyalinde referans ilaçlarda görülen artışa benzer bir artış görüldü (Tablo 5.3). Ayrıca, deney verileri GraphPad Prism 9 programı aracılığıyla analiz edildi ve IC50 değerleri belirlendi (Tablo 5.4). 17F8 ve 24C11 klonlarına ait monoklonal antikorların referans ilaçlara benzer IC50 değerleri olduğu belirlendi. Klonlar ve referans ilaçların konsantrasyona bağlı luminometrik ölçümlerinin grafikleri oluşturuldu (Şekil 5.7).

Tablo 5.3: Geliştirilen anti-PDL1 monoklonal antikorlarının ve referans ilaçların PD-1/PD-L1 blokaj potansiyelleri.

Konsantrasyon (µg/ml)	Fold Induction			
	17F8	24C11	Avelumab	Atezolizumab
0,016384	1,07	1,33	1,26	1,33
0,04096	1,22	2	1,68	1,92
0,1024	1,56	3,82	2,82	3,62
0,256	2,28	4,29	4,16	4,61
0,64	2,72	4,35	4,72	4,9
1,6	3,25	4,94	5,03	4,91
4	3,47	4,76	4,79	5,15
10	4,2	4,57	4,61	5,32
25	4,15	4,44	4,64	5,2

Tablo 5.4. Geliştirilen anti-PD-L1 monoklonal antikorların ve referans ilaçların IC50 değerleri.

	IC50	
	ng/ml	nM
17F8	172,2	1,15
24C11	50,35	0,34
Avelumab	75,94	0,51
Atezolizumab	57,35	0,38



Şekil 5.7: Referans ilaçlar ve Geliştirilen anti-PD-L1 monoklonal antikörlerin luminometrik ölçüm grafikleri.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser ciddi bir sağlık sorunudur ve çeşitli tedavi yöntemleri kullanılarak üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Kemoterapi, ilerlemiş kanserli hastalarda şu anda birincil tedavi seçeneğidir ancak ciddi yan etkiler ve ilaç direnci nedeniyle sınırlayıcı olabilir [1]. Bu nedenle dezavantajların üstesinden gelmek için yeni tedaviler geliştirilmesi son derece gereklidir. Bu bağlamda, immünoterapi gibi yenilikçi yaklaşımlar geçtiğimiz yıllarda hız kazanmıştır.

PD-L1, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve T hücre aktivasyonu gibi rolleri bulunan immün kontrol noktası proteinlerinden biridir [15]. PD-1/PD-L1 yolağını hedef alan birçok monoklonal antikor geliştirilmiş ve tedavi amaçlı klinikte kullanımı onaylanmıştır [47]-[50].

Bu çalışma kapsamında immün kontrol noktası proteinlerinden biri olan PD-L1'e karşı monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. Toplamda, 25 monoklonal antikor geliştirilmiş olup geliştirilen monoklonal antikorların, PD-1/PD-L1 etkileşimini bloke edici aktivitelerinin belirlenmesi noktasında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır.

Farklı türlere ait PD-L1 proteinlerine karşı yapılan ELISA sonucunda, en yüksek ELISA değerinin cynomolgus maymununa karşı olduğu görülmüştür (Şekil 5.5). İnsan PD-L1 proteini en çok şempanze ardından maymunlar ile benzerlik göstermektedir [139]. Bu bağlamda, PD-L1'in türler arasındaki homolojileri düşünüldüğünde geliştirilen monoklonal antikorların antijen tanıma bölgeleri bu korunmuş bölgelerden birini tanıyor olabilir. Bu sebeple, cynomolgus maymunu gibi yüksek homoloji gösteren türlere karşı ELISA değerlerinin yükselmesi beklenebilir.

Geliştirilen monoklonal antikorların, diğer immün kontrol noktası proteinleri ile etkileşimi antikorun özgüllüğü ve terapötik etkisi açısından önemlidir. Antikorların, PD-L1 dışında bir immün kontrol noktasına bağlanması farklı bir dizi olayı tetikleyebilir. Bu bağlamda, yapılan ELISA sonrası PD-L2, CD80, CD86, PD-1, CD28, TIGIT, TIM3 ve VISTA'ya karşı çapraz reaksiyonlarının olmadığı sonucu, bizi geliştirdiğimiz monoklonal antikorların PD-L1'e özgül olduğu sonucuna ulaştırmaktadır (Şekil 5.4). Antikorların çapraz reaksiyon göstermemesi, terapötik olarak kullanılabilmesi için önemli bir ölçüt olarak düşünülebilir çünkü geliştirilen anti-

PD-L1 monoklonal antikorları diğer immün kontrol noktaları ile etkileşime girmemektedir. Dolayısıyla diğer immün kontrol noktası proteinleri işleyişlerine devam edecektir.

Terapötik anti-PD-L1 monoklonal antikorları PD1/PD-L1 etkileşimini bloke etmektedir [107]. Bu sebeple, geliştirilen anti-PD-L1 monoklonal antikorlarının PD1/PD-L1 etkileşimini bloke edici aktivitesi, önce yarışmalı ELISA ile bulunmuştur (Tablo 5.2). Sonuç olarak, 2 monoklonal antikorun (24C11 ve 17F8) bu etkileşimi %97,80 ve %94,25 oranında engellediği tespit edilmiştir. Öte yandan CD80/PD-L1 etkileşimi için 4 farklı klonla ait monoklonal antikor (14A8, 13H5, 24C11 ve 16B7) benzer bir performans sergilemektedir. CD80 ve PD-L1 etkileşiminin cis etkileşim olduğu bilinmektedir. Yani, CD80 ve PD-L1 aynı hücre tarafından ifade edilerek birbirleri arasında etkileşirler [81]. Bu bağlamda, PD-1/PD-L1 etkileşiminde görülen bağlanma afinitesi CD80/PD-L1 arasında görülen bağlanma afinitesinden daha azdır. Bu sebeple, CD80'i bloke edip PD-L1'i bloke etmeyen antikorlar elenmiştir ve hem CD80/PD-L1 hem de PD-1/PD-L1 etkileşimini bloke ettiği belirlenen 17F8 ve 24C11 klonları üzerine yoğunlaşmıştır.

Lüsiferaz temelli PD-1/PD-L1 blokaj deneylerinde, yarışmalı ELISA deneylerinde PD-1/PD-L1 ve CD80/PD-L1 etkileşimini bloke ettiği görülen 17F8 ve 24C11 klonlarına ait antikorlar kullanılmıştır. Geliştirilen antikorların referans ilaçlar ile kıyaslandığında özellikle, 24C11 klonuna ait monoklonal antikorun referans ilaçlar ile çok benzer blokan aktivite sergilediği belirlenmiştir (Şekil 5.7). 17F8 klonu, iyi bir blokan aktivite sergilemekle birlikte 24C11 klonuna kıyasla geride kaldığı belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, geliştirilen antikorların terapötik olarak etkili olabileceğine dair önemli bulgular elde edilmiştir ve ileri araştırmalarının yapılması önemlidir. Örneğin, PD-L1 ifade eden kanser hücre hatları ile oluşturulacak hayvan modellerinde, 24C11 ve 17F8 klonlarına ait antikorların denenmesi gerekmektedir. Bu sayede, antikorların terapötik etkilerine dair önemli kanıtlar elde edilebilir. Ayrıca, PD-1/PD-L1 etkileşiminin sitokin üretimi ile ilişkisi bulunmaktadır (Şekil 2.3). Geliştirilen monoklonal antikorların sitokin üretimine nasıl etki edeceği ileri bir araştırmada değerlendirilmelidir.

Geliştirilen monoklonal antikorlar, fare monoklonal antikorlarıdır. Terapötik monoklonal antikorlar, insan ya da hümanize antikorlar olarak endüstride yerlerini

almıştır. Fare monoklonal antikorlarının, HAMA yanıtı oluşturabileceği bilinmektedir [77]. Bu bağlamda, geliştirilen monoklonal antikorların hümanize edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Fakat, bunun için antikorların sekanslarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu yüzden, öncelikle antikorların dizileme çalışmaları ardından hümanizasyon işlemi gerçekleştirilmelidir.



KAYNAKLAR

- [1] Meffre E., Casellas R., Nussenzweig M. C., (2000), "Antibody regulation of B cell development", *Nat Immunol*, 1 (5), 379-385.
- [2] Schroeder H. W., Jr., Cavacini L., (2010), "Structure and function of immunoglobulins", *J Allergy Clin Immunol*, 125 (2 Suppl 2), S41-52.
- [3] Ma H., O'Kennedy R., (2015), "The Structure of Natural and Recombinant Antibodies", *Methods Mol Biol*, 1348, 7-11.
- [4] Yamada T., (2011), "Therapeutic monoclonal antibodies", *Keio J Med*, 60 (2), 37-46.
- [5] Köhler G., Milstein C., (1975), "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, 256 (5517), 495-497.
- [6] Nelson P. N., Reynolds G. M., Waldron E. E., Ward E., Giannopoulos K., Murray P. G., (2000), "Monoclonal antibodies", *Mol Pathol*, 53 (3), 111-117.
- [7] Ordóñez N. G., (1999), "The immunohistochemical diagnosis of epithelial mesothelioma", *Hum Pathol*, 30 (3), 313-323.
- [8] Ordóñez N. G., (1999), "Role of immunohistochemistry in differentiating epithelial mesothelioma from adenocarcinoma. Review and update", *Am J Clin Pathol*, 112 (1), 75-89.
- [9] Todd P. A., Brogden R. N., (1989), "Muromonab CD3. A review of its pharmacology and therapeutic potential", *Drugs*, 37 (6), 871-899.
- [10] Johnsen V., Førre Ø., Haga H. J., Kvien T. K., Mikkelsen K., Nordvåg B. Y., Rødevand E., (2003), "[Combination therapy in rheumatoid arthritis]", *Tidsskr Nor Laegeforen*, 123 (11), 1511-1513.
- [11] Cacciapaglia F., Venerito V., Stano S., Fornaro M., Lopalco G., Iannone F., (2022), "Comparison of Adalimumab to Other Targeted Therapies in Rheumatoid Arthritis: Results from Systematic Literature Review and Meta-Analysis", *J Pers Med*, 12 (3).
- [12] Gisbert J. P., Chaparro M., (2017), "Ustekinumab to treat Crohn's disease", *Gastroenterol Hepatol*, 40 (10), 688-698.
- [13] Boggi U., Vistoli F., Signori S., Del Chiaro M., Amorese G., Barsotti M., Rizzo G., Marchetti P., Danesi R., Del Tacca M., Mosca F., (2005), "Efficacy and safety of basiliximab in kidney transplantation", *Expert Opin Drug Saf*, 4 (3), 473-490.

- [14] Olyaei A. J., Thi K., deMattos A. M., Bennett W. M., (2001), "Use of basiliximab and daclizumab in kidney transplantation", *Prog Transplant*, 11 (1), 33-37; quiz 38-39.
- [15] Agache I., Beltran J., Akdis C., Akdis M., Canelo-Aybar C., Canonica G. W., Casale T., Chivato T., Corren J., Del Giacco S., Eiwegger T., Firinu D., Gern J. E., Hamelmann E., Hanania N., Mäkelä M., Hernández-Martín I., Nair P., O'Mahony L., Papadopoulos N. G., Papi A., Park H. S., Pérez de Llano L., Posso M., Rocha C., Quirce S., Sastre J., Shamji M., Song Y., Steiner C., Schwarze J., Alonso-Coello P., Palomares O., Jutel M., (2020), "Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab, mepolizumab, omalizumab and reslizumab) for severe eosinophilic asthma. A systematic review for the EAACI Guidelines - recommendations on the use of biologicals in severe asthma", *Allergy*, 75 (5), 1023-1042.
- [16] Hudis C. A., (2007), "Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice", *N Engl J Med*, 357 (1), 39-51.
- [17] Gerratana L., Bonotto M., Bozza C., Ongaro E., Fanotto V., Pelizzari G., Puglisi F., (2017), "Pertuzumab and breast cancer: another piece in the anti-HER2 puzzle", *Expert Opin Biol Ther*, 17 (3), 365-374.
- [18] Messersmith W. A., Ahnen D. J., (2008), "Targeting EGFR in colorectal cancer", *N Engl J Med*, 359 (17), 1834-1836.
- [19] Keating G. M., (2010), "Panitumumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer", *Drugs*, 70 (8), 1059-1078.
- [20] Maloney D. G., Grillo-López A. J., White C. A., Bodkin D., Schilder R. J., Neidhart J. A., Janakiraman N., Foon K. A., Liles T. M., Dallaire B. K., Wey K., Royston I., Davis T., Levy R., (1997), "IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma", *Blood*, 90 (6), 2188-2195.
- [21] Zhuang H., Shi S., Yuan Z., Chang J. Y., (2019), "Bevacizumab treatment for radiation brain necrosis: mechanism, efficacy and issues", *Mol Cancer*, 18 (1), 21.
- [22] Sondak V. K., Smalley K. S., Kudchadkar R., Gripon S., Kirkpatrick P., (2011), "Ipilimumab", *Nat Rev Drug Discov*, 10 (6), 411-412.
- [23] Chaffey N., "Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn", Edition, *Ann Bot.* 2003 Feb;91(3):401. doi: 10.1093/aob/mcg023.
- [24] Wang Z., Wang G., Lu H., Li H., Tang M., Tong A., (2022), "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases", *Mol Biomed*, 3 (1), 35.

- [25] Smith G. P., (1985), "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", *Science*, 228 (4705), 1315-1317.
- [26] Lu R. M., Hwang Y. C., Liu I. J., Lee C. C., Tsai H. Z., Li H. J., Wu H. C., (2020), "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases", *J Biomed Sci*, 27 (1), 1.
- [27] Peltomaa R., Benito-Peña E., Barderas R., Moreno-Bondi M. C., (2019), "Phage Display in the Quest for New Selective Recognition Elements for Biosensors", *ACS Omega*, 4 (7), 11569-11580.
- [28] Lee C. V., Liang W. C., Dennis M. S., Eigenbrot C., Sidhu S. S., Fuh G., (2004), "High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold", *J Mol Biol*, 340 (5), 1073-1093.
- [29] Barbas C. F., 3rd, Kang A. S., Lerner R. A., Benkovic S. J., (1991), "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (18), 7978-7982.
- [30] Ahmad Z. A., Yeap S. K., Ali A. M., Ho W. Y., Alitheen N. B., Hamid M., (2012), "scFv antibody: principles and clinical application", *Clin Dev Immunol*, 2012, 980250.
- [31] Sheets M. D., Amersdorfer P., Finnern R., Sargent P., Lindquist E., Schier R., Hemingsen G., Wong C., Gerhart J. C., Marks J. D., (1998), "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (11), 6157-6162.
- [32] Smolarek D., Bertrand O., Czerwinski M., (2012), "Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine?", *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 66, 348-358.
- [33] Steinitz M., Klein G., Koskimies S., Makel O., (1977), "EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody", *Nature*, 269 (5627), 420-422.
- [34] Tsujimoto Y., (1989), "Overexpression of the human BCL-2 gene product results in growth enhancement of Epstein-Barr virus-immortalized B cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (6), 1958-1962.
- [35] Tosato G., Tanner J., Jones K. D., Revel M., Pike S. E., (1990), "Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for Epstein-Barr virus-immortalized B cells", *J Virol*, 64 (6), 3033-3041.
- [36] Ali A. I., Badran Y. R., Hassuneh M. R., Sanber K. S., Ismail S. I., (2015), "Effect of Interleukins on Antibody Production by Epstein-Barr Virus Transformed B Cells", *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 34 (3), 162-168.

- [37] Wang Z., Wang G., Lu H., Li H., Tang M., Tong A., (2022), "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases", *Mol Biomed*, 3 (1), 35.
- [38] Smith K., Garman L., Wrammert J., Zheng N. Y., Capra J. D., Ahmed R., Wilson P. C., (2009), "Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen", *Nat Protoc*, 4 (3), 372-384.
- [39] Jiang X., Suzuki H., Hanai Y., Wada F., Hitomi K., Yamane T., Nakano H., (2006), "A novel strategy for generation of monoclonal antibodies from single B cells using rt-PCR technique and in vitro expression", *Biotechnol Prog*, 22 (4), 979-988.
- [40] Tiller T., Meffre E., Yurasov S., Tsuiji M., Nussenzweig M. C., Wardemann H., (2008), "Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning", *J Immunol Methods*, 329 (1-2), 112-124.
- [41] Gottlieb R. L., Nirula A., Chen P., Boscia J., Heller B., Morris J., Huhn G., Cardona J., Mocherla B., Stosor V., Shawa I., Kumar P., Adams A. C., Van Naarden J., Custer K. L., Durante M., Oakley G., Schade A. E., Holzer T. R., Ebert P. J., Higgs R. E., Kallewaard N. L., Sabo J., Patel D. R., Klekotka P., Shen L., Skovronsky D. M., (2021), "Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination With Etesevimab on Viral Load in Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial", *Jama*, 325 (7), 632-644.
- [42] Dougan M., Nirula A., Azizad M., Mocherla B., Gottlieb R. L., Chen P., Hebert C., Perry R., Boscia J., Heller B., Morris J., Crystal C., Igbinadolor A., Huhn G., Cardona J., Shawa I., Kumar P., Adams A. C., Van Naarden J., Custer K. L., Durante M., Oakley G., Schade A. E., Holzer T. R., Ebert P. J., Higgs R. E., Kallewaard N. L., Sabo J., Patel D. R., Dabora M. C., Klekotka P., Shen L., Skovronsky D. M., (2021), "Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19", *N Engl J Med*, 385 (15), 1382-1392.
- [43] Nathan R., Shawa I., De La Torre I., Pustizzi J. M., Hastrup N., Patel D. R., Huhn G., (2021), "A Narrative Review of the Clinical Practicalities of Bamlanivimab and Etesevimab Antibody Therapies for SARS-CoV-2", *Infect Dis Ther*, 10 (4), 1933-1947.
- [44] Heo Y. A., (2022), "Sotrovimab: First Approval", *Drugs*, 82 (4), 477-484.
- [45] Gupta A., Gonzalez-Rojas Y., Juarez E., Crespo Casal M., Moya J., Falci D. R., Sarkis E., Solis J., Zheng H., Scott N., Cathcart A. L., Hebner C. M., Sager J., Mogalian E., Tipple C., Peppercorn A., Alexander E., Pang P. S., Free A., Brinson C., Aldinger M., Shapiro A. E., (2021), "Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab", *N Engl J Med*, 385 (21), 1941-1950.
- [46] Holzlöhner P., Hanack K., (2017), "Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology", *J Vis Exp* (119).

- [47] Koshida S., Asanuma K., Kuribayashi K., Goto M., Tsuji N., Kobayashi D., Tanaka M., Watanabe N., (2010), "Prevalence of human anti-mouse antibodies (HAMAs) in routine examinations", *Clin Chim Acta*, 411 (5-6), 391-394.
- [48] Baert F., Noman M., Vermeire S., Van Assche G., G D. H., Carbonez A., Rutgeerts P., (2003), "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease", *N Engl J Med*, 348 (7), 601-608.
- [49] Dempsey P. W., Allison M. E., Akkaraju S., Goodnow C. C., Fearon D. T., (1996), "C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity", *Science*, 271 (5247), 348-350.
- [50] Klinman D. M., Barnhart K. M., Conover J., (1999), "CpG motifs as immune adjuvants", *Vaccine*, 17 (1), 19-25.
- [51] Abbott M., Ustoyev Y., (2019), "Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy", *Semin Oncol Nurs*, 35 (5), 150923.
- [52] Drake C. G., Jaffee E., Pardoll D. M., (2006), "Mechanisms of immune evasion by tumors", *Adv Immunol*, 90, 51-81.
- [53] Yang Y., (2015), "Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer", *J Clin Invest*, 125 (9), 3335-3337.
- [54] Couzin-Frankel J., (2013), "Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy", *Science*, 342 (6165), 1432-1433.
- [55] Webster R. M., (2014), "The immune checkpoint inhibitors: where are we now?", *Nat Rev Drug Discov*, 13 (12), 883-884.
- [56] Cheuk A. T., Mufti G. J., Guinn B. A., (2004), "Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy", *Cancer Gene Ther*, 11 (3), 215-226.
- [57] Croft M., (2009), "The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases", *Nat Rev Immunol*, 9 (4), 271-285.
- [58] Gurney A. L., Marsters S. A., Huang R. M., Pitti R. M., Mark D. T., Baldwin D. T., Gray A. M., Dowd A. D., Brush A. D., Heldens A. D., Schow A. D., Goddard A. D., Wood W. I., Baker K. P., Godowski P. J., Ashkenazi A., (1999), "Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR", *Curr Biol*, 9 (4), 215-218.
- [59] Clouthier D. L., Watts T. H., (2014), "Cell-specific and context-dependent effects of GITR in cancer, autoimmunity, and infection", *Cytokine Growth Factor Rev*, 25 (2), 91-106.

- [60] Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S., (2002), "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance", *Nat Immunol*, 3 (2), 135-142.
- [61] Willoughby J., Griffiths J., Tews I., Cragg M. S., (2017), "OX40: Structure and function - What questions remain?", *Mol Immunol*, 83, 13-22.
- [62] Bansal-Pakala P., Halteman B. S., Cheng M. H., Croft M., (2004), "Costimulation of CD8 T cell responses by OX40", *J Immunol*, 172 (8), 4821-4825.
- [63] Lane P., (2000), "Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells", *J Exp Med*, 191 (2), 201-206.
- [64] Lv Y. W., Chen Y., Lv H. T., Li X., Tang Y. J., Qian W. G., Xu Q. Q., Sun L., Qian G. H., Ding Y. Y., (2019), "Kawasaki disease OX40-OX40L axis acts as an upstream regulator of NFAT signaling pathway", *Pediatr Res*, 85 (6), 835-840.
- [65] Wang L., Rubinstein R., Lines J. L., Wasiuk A., Ahonen C., Guo Y., Lu L. F., Gondek D., Wang Y., Fava R. A., Fiser A., Almo S., Noelle R. J., (2011), "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses", *J Exp Med*, 208 (3), 577-592.
- [66] Workman C. J., Dugger K. J., Vignali D. A., (2002), "Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3", *J Immunol*, 169 (10), 5392-5395.
- [67] Huard B., Prigent P., Tournier M., Bruniquel D., Triebel F., (1995), "CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins", *Eur J Immunol*, 25 (9), 2718-2721.
- [68] Lichtenegger F. S., Rothe M., Schnorfeil F. M., Deiser K., Krupka C., Augsberger C., Schlüter M., Neitz J., Subklewe M., (2018), "Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells", *Front Immunol*, 9, 385.
- [69] McIntire J. J., Umetsu S. E., Akbari O., Potter M., Kuchroo V. K., Barsh G. S., Freeman G. J., Umetsu D. T., DeKruyff R. H., (2001), "Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family", *Nat Immunol*, 2 (12), 1109-1116.
- [70] Das M., Zhu C., Kuchroo V. K., (2017), "Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity", *Immunol Rev*, 276 (1), 97-111.
- [71] Yu X., Harden K., Gonzalez L. C., Francesco M., Chiang E., Irving B., Tom I., Ivelja S., Refino C. J., Clark H., Eaton D., Grogan J. L., (2009), "The surface protein TIGIT

suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells", *Nat Immunol*, 10 (1), 48-57.

- [72] Joller N., Lozano E., Burkett P. R., Patel B., Xiao S., Zhu C., Xia J., Tan T. G., Sefik E., Yajnik V., Sharpe A. H., Quintana F. J., Mathis D., Benoist C., Hafler D. A., Kuchroo V. K., (2014), "Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses", *Immunity*, 40 (4), 569-581.
- [73] Wang J., Seebacher N., Shi H., Kan Q., Duan Z., (2017), "Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer", *Oncotarget*, 8 (48), 84559-84571.
- [74] Kumar A. R., Devan A. R., Nair B., Vinod B. S., Nath L. R., (2021), "Harnessing the immune system against cancer: current immunotherapy approaches and therapeutic targets", *Mol Biol Rep*, 48 (12), 8075-8095.
- [75] Leone K., Poggiana C., Zamarchi R., (2018), "The Interplay between Circulating Tumor Cells and the Immune System: From Immune Escape to Cancer Immunotherapy", *Diagnostics (Basel)*, 8 (3).
- [76] Ljunggren H. G., Jonsson R., Höglund P., (2018), "Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine honours discoveries in cancer immunotherapy", *Scand J Immunol*, 88 (6), e12731.
- [77] Brunet J. F., Denizot F., Luciani M. F., Roux-Dosseto M., Suzan M., Mattei M. G., Golstein P., (1987), "A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4", *Nature*, 328 (6127), 267-270.
- [78] Walunas T. L., Lenschow D. J., Bakker C. Y., Linsley P. S., Freeman G. J., Green J. M., Thompson C. B., Bluestone J. A., (1994), "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation", *Immunity*, 1 (5), 405-413.
- [79] Krummel M. F., Allison J. P., (1995), "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation", *J Exp Med*, 182 (2), 459-465.
- [80] Tivol E. A., Borriello F., Schweitzer A. N., Lynch W. P., Bluestone J. A., Sharpe A. H., (1995), "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4", *Immunity*, 3 (5), 541-547.
- [81] Leach D. R., Krummel M. F., Allison J. P., (1996), "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade", *Science*, 271 (5256), 1734-1736.

- [82] Yi M., Zheng X., Niu M., Zhu S., Ge H., Wu K., (2022), "Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions", *Mol Cancer*, 21 (1), 28.
- [83] Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T., (1992), "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death", *Embo j*, 11 (11), 3887-3895.
- [84] Zhang X., Schwartz J. C., Guo X., Bhatia S., Cao E., Lorenz M., Cammer M., Chen L., Zhang Z. Y., Edidin M. A., Nathenson S. G., Almo S. C., (2004), "Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1", *Immunity*, 20 (3), 337-347.
- [85] Dong H., Zhu G., Tamada K., Chen L., (1999), "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion", *Nat Med*, 5 (12), 1365-1369.
- [86] Lin D. Y., Tanaka Y., Iwasaki M., Gittis A. G., Su H. P., Mikami B., Okazaki T., Honjo T., Minato N., Garboczi D. N., (2008), "The PD-1/PD-L1 complex resembles the antigen-binding Fv domains of antibodies and T cell receptors", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (8), 3011-3016.
- [87] Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T., (2000), "Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation", *J Exp Med*, 192 (7), 1027-1034.
- [88] Gauen L. K., Zhu Y., Letourneur F., Hu Q., Bolen J. B., Matis L. A., Klausner R. D., Shaw A. S., (1994), "Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif", *Mol Cell Biol*, 14 (6), 3729-3741.
- [89] Zak K. M., Kitel R., Przetocka S., Golik P., Guzik K., Musielak B., Dömling A., Dubin G., Holak T. A., (2015), "Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1", *Structure*, 23 (12), 2341-2348.
- [90] Sheppard K. A., Fitz L. J., Lee J. M., Benander C., George J. A., Wooters J., Qiu Y., Jussif J. M., Carter L. L., Wood C. R., Chaudhary D., (2004), "PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta", *FEBS Lett*, 574 (1-3), 37-41.
- [91] Riley J. L., (2009), "PD-1 signaling in primary T cells", *Immunol Rev*, 229 (1), 114-125.

- [92] Parry R. V., Chemnitz J. M., Frauwirth K. A., Lanfranco A. R., Braunstein I., Kobayashi S. V., Linsley P. S., Thompson C. B., Riley J. L., (2005), "CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms", *Mol Cell Biol*, 25 (21), 9543-9553.
- [93] Patsoukis N., Brown J., Petkova V., Liu F., Li L., Boussiotis V. A., (2012), "Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation", *Sci Signal*, 5 (230), ra46.
- [94] Hui E., Cheung J., Zhu J., Su X., Taylor M. J., Wallweber H. A., Sasmal D. K., Huang J., Kim J. M., Mellman I., Vale R. D., (2017), "T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition", *Science*, 355 (6332), 1428-1433.
- [95] Patsoukis N., Li L., Sari D., Petkova V., Boussiotis V. A., (2013), "PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2", *Mol Cell Biol*, 33 (16), 3091-3098.
- [96] Butte M. J., Keir M. E., Phamduy T. B., Sharpe A. H., Freeman G. J., (2007), "Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses", *Immunity*, 27 (1), 111-122.
- [97] Chang T. T., Jabs C., Sobel R. A., Kuchroo V. K., Sharpe A. H., (1999), "Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis", *J Exp Med*, 190 (5), 733-740.
- [98] Curiel T. J., Wei S., Dong H., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Krzysiek R., Knutson K. L., Daniel B., Zimmermann M. C., David O., Burow M., Gordon A., Dhurandhar N., Myers L., Berggren R., Hemminki A., Alvarez R. D., Emilie D., Curiel D. T., Chen L., Zou W., (2003), "Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity", *Nat Med*, 9 (5), 562-567.
- [99] Keir M. E., Liang S. C., Guleria I., Latchman Y. E., Qipo A., Albacker L. A., Koulmanda M., Freeman G. J., Sayegh M. H., Sharpe A. H., (2006), "Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance", *J Exp Med*, 203 (4), 883-895.
- [100] Latchman Y. E., Liang S. C., Wu Y., Chernova T., Sobel R. A., Klemm M., Kuchroo V. K., Freeman G. J., Sharpe A. H., (2004), "PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (29), 10691-10696.
- [101] Wei F., Zhong S., Ma Z., Kong H., Medvec A., Ahmed R., Freeman G. J., Krogsgaard M., Riley J. L., (2013), "Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (27), E2480-2489.

- [102] Sugiura D., Maruhashi T., Okazaki I. M., Shimizu K., Maeda T. K., Takemoto T., Okazaki T., (2019), "Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses", *Science*, 364 (6440), 558-566.
- [103] Azuma T., Yao S., Zhu G., Flies A. S., Flies S. J., Chen L., (2008), "B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells", *Blood*, 111 (7), 3635-3643.
- [104] Gato-Cañas M., Zuazo M., Arasanz H., Ibañez-Vea M., Lorenzo L., Fernandez-Hinojal G., Vera R., Smerdou C., Martisova E., Arozarena I., Wellbrock C., Llopiz D., Ruiz M., Sarobe P., Breckpot K., Kochan G., Escors D., (2017), "PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity", *Cell Rep*, 20 (8), 1818-1829.
- [105] He X., Xu C., (2020), "Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy", *Cell Res*, 30 (8), 660-669.
- [106] Wang Y. N., Lee H. H., Hsu J. L., Yu D., Hung M. C., (2020), "The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis", *J Biomed Sci*, 27 (1), 77.
- [107] Hsu J. M., Xia W., Hsu Y. H., Chan L. C., Yu W. H., Cha J. H., Chen C. T., Liao H. W., Kuo C. W., Khoo K. H., Hsu J. L., Li C. W., Lim S. O., Chang S. S., Chen Y. C., Ren G. X., Hung M. C., (2018), "STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion", *Nat Commun*, 9 (1), 1908.
- [108] Cha J. H., Yang W. H., Xia W., Wei Y., Chan L. C., Lim S. O., Li C. W., Kim T., Chang S. S., Lee H. H., Hsu J. L., Wang H. L., Kuo C. W., Chang W. C., Hadad S., Purdie C. A., McCoy A. M., Cai S., Tu Y., Litton J. K., Mittendorf E. A., Moulder S. L., Symmans W. F., Thompson A. M., Piwnica-Worms H., Chen C. H., Khoo K. H., Hung M. C., (2018), "Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1", *Mol Cell*, 71 (4), 606-620.e607.
- [109] Burr M. L., Sparbier C. E., Chan Y. C., Williamson J. C., Woods K., Beavis P. A., Lam E. Y. N., Henderson M. A., Bell C. C., Stolzenburg S., Gilan O., Bloor S., Noori T., Morgens D. W., Bassik M. C., Neeson P. J., Behren A., Darcy P. K., Dawson S. J., Voskoboinik I., Trapani J. A., Cebon J., Lehner P. J., Dawson M. A., (2017), "CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity", *Nature*, 549 (7670), 101-105.
- [110] Wang H., Yao H., Li C., Shi H., Lan J., Li Z., Zhang Y., Liang L., Fang J. Y., Xu J., (2019), "HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell-mediated cytotoxicity", *Nat Chem Biol*, 15 (1), 42-50.
- [111] Zhang J., Bu X., Wang H., Zhu Y., Geng Y., Nihira N. T., Tan Y., Ci Y., Wu F., Dai X., Guo J., Huang Y. H., Fan C., Ren S., Sun Y., Freeman G. J., Sicinski P., Wei W., (2018), "Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance", *Nature*, 553 (7686), 91-95.

- [112] Li C. W., Lim S. O., Xia W., Lee H. H., Chan L. C., Kuo C. W., Khoo K. H., Chang S. S., Cha J. H., Kim T., Hsu J. L., Wu Y., Hsu J. M., Yamaguchi H., Ding Q., Wang Y., Yao J., Lee C. C., Wu H. J., Sahin A. A., Allison J. P., Yu D., Hortobagyi G. N., Hung M. C., (2016), "Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity", *Nat Commun*, 7, 12632.
- [113] Okazaki T., Chikuma S., Iwai Y., Fagarasan S., Honjo T., (2013), "A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application", *Nat Immunol*, 14 (12), 1212-1218.
- [114] Nishimura H., Nose M., Hiai H., Minato N., Honjo T., (1999), "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor", *Immunity*, 11 (2), 141-151.
- [115] Okazaki T., Tanaka Y., Nishio R., Mitsuiye T., Mizoguchi A., Wang J., Ishida M., Hiai H., Matsumori A., Minato N., Honjo T., (2003), "Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice", *Nat Med*, 9 (12), 1477-1483.
- [116] Nishimura H., Okazaki T., Tanaka Y., Nakatani K., Hara M., Matsumori A., Sasayama S., Mizoguchi A., Hiai H., Minato N., Honjo T., (2001), "Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice", *Science*, 291 (5502), 319-322.
- [117] Wang J., Okazaki T., Yoshida T., Chikuma S., Kato Y., Nakaki F., Hiai H., Honjo T., Okazaki T., (2010), "PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice", *Int Immunol*, 22 (6), 443-452.
- [118] Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y., Okazaki T., Honjo T., Minato N., (2002), "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (19), 12293-12297.
- [119] Thompson R. H., Gillett M. D., Cheville J. C., Lohse C. M., Dong H., Webster W. S., Krejci K. G., Lobo J. R., Sengupta S., Chen L., Zincke H., Blute M. L., Strome S. E., Leibovich B. C., Kwon E. D., (2004), "Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (49), 17174-17179.
- [120] Okazaki T., Honjo T., (2007), "PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application", *Int Immunol*, 19 (7), 813-824.
- [121] McLane L. M., Abdel-Hakeem M. S., Wherry E. J., (2019), "CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer", *Annu Rev Immunol*, 37, 457-495.

- [122] Dong H., Strome S. E., Matteson E. L., Moder K. G., Flies D. B., Zhu G., Tamura H., Driscoll C. L., Chen L., (2003), "Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis", *J Clin Invest*, 111 (3), 363-370.
- [123] Ribas A., Wolchok J. D., (2018), "Cancer immunotherapy using checkpoint blockade", *Science*, 359 (6382), 1350-1355.
- [124] Taube J. M., Anders R. A., Young G. D., Xu H., Sharma R., McMiller T. L., Chen S., Klein A. P., Pardoll D. M., Topalian S. L., Chen L., (2012), "Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape", *Sci Transl Med*, 4 (127), 127ra137.
- [125] Gatalica Z., Snyder C., Maney T., Ghazalpour A., Holterman D. A., Xiao N., Overberg P., Rose I., Basu G. D., Vranic S., Lynch H. T., Von Hoff D. D., Hamid O., (2014), "Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 23 (12), 2965-2970.
- [126] Noman M. Z., Desantis G., Janji B., Hasmim M., Karray S., Dessen P., Bronte V., Chouaib S., (2014), "PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation", *J Exp Med*, 211 (5), 781-790.
- [127] Muenst S., Läubli H., Soysal S. D., Zippelius A., Tzankov A., Hoeller S., (2016), "The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts", *J Intern Med*, 279 (6), 541-562.
- [128] Sanmamed M. F., Chen L., (2014), "Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation", *Cancer J*, 20 (4), 256-261.
- [129] Sanmamed M. F., Chen L., (2018), "A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization", *Cell*, 175 (2), 313-326.
- [130] Weber J., Mandala M., Del Vecchio M., Gogas H. J., Arance A. M., Cowey C. L., Dalle S., Schenker M., Chiarion-Sileni V., Marquez-Rodas I., Grob J. J., Butler M. O., Middleton M. R., Maio M., Atkinson V., Queirolo P., Gonzalez R., Kudchadkar R. R., Smylie M., Meyer N., Mortier L., Atkins M. B., Long G. V., Bhatia S., Lebbé C., Rutkowski P., Yokota K., Yamazaki N., Kim T. M., de Pril V., Sabater J., Qureshi A., Larkin J., Ascierto P. A., (2017), "Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma", *N Engl J Med*, 377 (19), 1824-1835.
- [131] McDermott J., Jimeno A., (2015), "Pembrolizumab: PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer", *Drugs Today (Barc)*, 51 (1), 7-20.
- [132] Konala V. M., Adapa S., Aronow W. S., (2022), "Immunotherapy in Bladder Cancer", *Am J Ther*, 29 (3), e334-e337.

- [133] Reddy S. M., Carroll E., Nanda R., (2020), "Atezolizumab for the treatment of breast cancer", *Expert Rev Anticancer Ther*, 20 (3), 151-158.
- [134] Roviello G., D'Angelo A., Generali D., Pittacolo M., Ganzinelli M., Iezzi G., Manzini N., Sobhani N., (2019), "Avelumab in gastric cancer", *Immunotherapy*, 11 (9), 759-768.
- [135] Mezquita L., Planchard D., (2018), "Durvalumab in non-small-cell lung cancer patients: current developments", *Future Oncol*, 14 (3), 205-222.
- [136] Haanen J., Carbone F., Robert C., Kerr K. M., Peters S., Larkin J., Jordan K., (2017), "Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", *Ann Oncol*, 28 (suppl_4), iv119-iv142.
- [137] Constantinidou A., Alifieris C., Trafalis D. T., (2019), "Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy", *Pharmacol Ther*, 194, 84-106.
- [138] Hirsch F. R., McElhinny A., Stanforth D., Ranger-Moore J., Jansson M., Kulangara K., Richardson W., Towne P., Hanks D., Vennapusa B., Mistry A., Kalamegham R., Averbuch S., Novotny J., Rubin E., Emancipator K., McCaffery I., Williams J. A., Walker J., Longshore J., Tsao M. S., Kerr K. M., (2017), "PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project", *J Thorac Oncol*, 12 (2), 208-222.
- [139] Liu J., Xu J., (2020), "Introduction", *Adv Exp Med Biol*, 1248, 1-6.

ÖZGEÇMİŞ

Durmuş AKDOĞAN, lisans eğitimini İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde aldı. 2020 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitiminde TÜBİTAK-1004 proje bursiyeri olarak çalıştı.



EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Akdoğan D., Ersezen N., Şeker M., Yağcı T., (2023), “Hastalıkların Tanı ve Tedavisinde Önemli Protein Hedeflerine Karşı Antikor Geliştirme Stratejileri”, 7. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli, Türkiye, 31 Mayıs-1 Haziran.

EK B: Şekil Kullanım İzinleri

Tablo B1.1: Kullanılan şekiller için alınan izinler.

Şekil Numarası	Lisans Tarihi	Lisans Numarası	Hak Sahibi
Şekil 2.3	01/08/2023	5600220828849	Springer