

Genetik Mühendisliđiyle Hastalıklara Güdümlü Mermiler

Savaşların en korkunç silahları arasında yer alan güdümlü mermiler, sağlık alanında hastalıklarla savaşta yeni yöntemlerin geliştirilmesine esin kaynağı oluyor. Teknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak günümüz tıp dünyasında, yeni nesil ilaçlar artık istenen hedefe güdümlü mermiler gibi yönlendirilebiliyor. Bu sayede ilaçların hastalıklarla mücadelede etkisi artarken, tedavi sırasında normal dokulara zarar vermesi gibi istenmeyen yan etkileri azalıyor. Sağlık alanında kullanılan güdümlü mermiler, antikor olarak isimlendirilen savunma sistemi elemanlarıdır.

Vücudumuz, antijen olarak adlandırılan kendi kalıtsal yapısına yabancı her türlü hücre dışı madde ve mikroorganizmalara karşı farklı hücrelerden ve moleküllerden oluşan bir savunma sistemi tarafından korunur. Savunma sisteminin temel hücresi lenfositlerdir. Lenfositler antijenle uyarıldıklarında immünoglobulin (=antikor) ve diğer bağışıklık yanıtı maddelerini sentezlerler. Antikorlar, antijenle uyarılan B-lenfositlerin değişimi ile oluşan plazma hücrelerince sentezlenirler. Glikoprotein yapısındaki antikor yapıları, savunma sisteminde anahtar rol oynayarak, yabancı moleküllerin yol açması muhtemel zarar verici et-

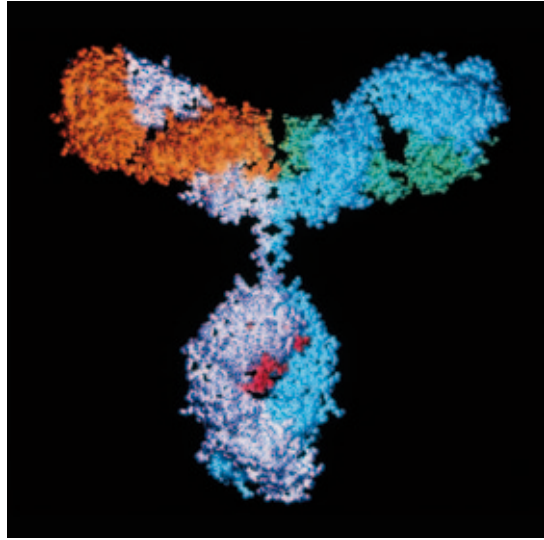
kilere karşı koruyuculuk sağlarlar. Immünoglobulinler farklı özellikleri nedeniyle IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere beş çeşide ayrılırlar. Ancak immünoglobulinlerin Y harfi şeklinde duruş gösteren temel bir yapısı var. İki kısa (L zinciri), iki uzun (H zinciri) olmak üzere dört polipeptid zincirinden oluşur ve Y'nin kolları (Fab kısmı) antijeni bağlar, gövde (Fc kısmı) ise çeşitli biyolojik aktivitelere rol oynar. Bazı Ig'lerde Y harfi şeklindeki birim yapıdan (=monomer) birkaç tane bulunabilir. Tek bir epitop (tanıma bölgesi) için, tek bir B-lenfosit hücre klonu tarafından sentezlenen antikorlara ise "monoklonal antikorlar" denir.

Son yıllarda, viral ve bakteriyel enfeksiyonların, romatizmal hastalıkların ve kanserin de dahil olduğu birçok hastalığın tedavisinde, monoklonal antikorlar önem kazandı. Hastalıklarla savaşta bu tür yaklaşımların ilk örneğinde, Hericourt ve Richet isimli araştırmacılar, kanser hücreleri ile bağışıklık tepkisi oluşturmaları sağlanan hayvanların serumlarını hastalara vererek yaptıkları tedavide, hastalık semptomlarında kayda değer azalmanın olduğunu gösterdiler. 1930'lı yılların başlarına kadar geçen dönemde, zatürre, menenjit, difteri ve kızamık gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde serumla yapılan uygulamalar klinik olarak etkili oldu. Ancak, tedavinin yan etkisi olarak serumun farklı birçok yapıya karşı gelişmiş olan antikorlar, viral partiküller gibi bulaşıcı ajanlar ve serum proteinleri içerebilmesi nedeniyle tedavi sırasında hastalarda aşırı duyarlılık tepkisi gibi toksik olaylar gelişebiliyordu.

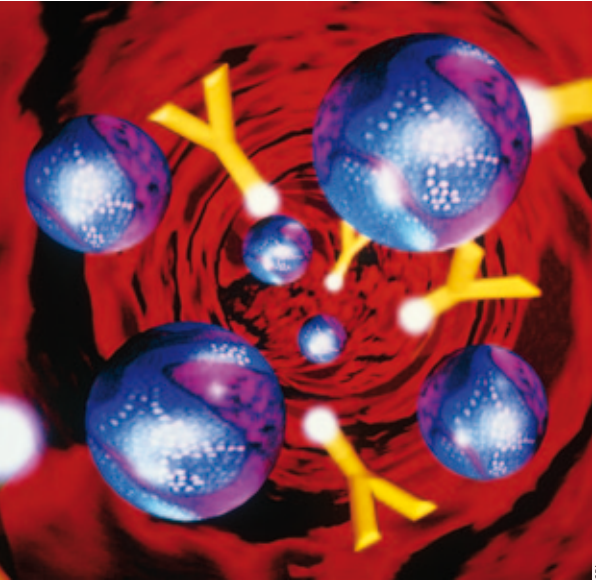
1975 yılında Georges J. F. Köhler ve Cesar Milstein isimli iki immünolog tarafından geliştirilen hibridoma yöntemiyle, hedef yapıda yer alan bir antijenik bölgeye karşı (epitop) limitsiz miktarda monoklonal antikor (mAb) üretmek mümkün oldu. Bu yöntem sayesinde araştırmacılar, 1984 yılında tıp dalında Nobel Ödülü kazandılar.

Hibridoma yönteminde, bağışıklanmış fare B lenfositleri ile fare kemik iliği kanserinin füzyonu (birleşmesi) sonucu oluşan, antikor üretme yeteneğine sahip ölümsüz hibrid hücreler elde edilebiliyor. Hibridoma yöntemiyle monoklonal antikor üretiminde, bakımlarının ucuz, teminlerinin kolay olması ve immünizasyonlara (bağışıklık tepkisi oluşturma işlemi) iyi cevap vermeleri nedeniyle fare ve ratlardan yararlanılıyor. Bu yöntemle çeşitli antijenlere karşı geliştirilen antikorlar testlerde tanı amaçlı olarak başarılı bir şekilde kullanılıyor. Monoklonal antikorların tanı amaçlı kullanımlarının yanı sıra en önemli uygulama alanlarından biri de tedaviye yönelik yaklaşımlar. Hedef hücrenin yüzey antijenlerine karşı geliştirilen antikorlara kemoterapik veya radyoaktif maddelerin bağlanmasıyla tedavinin sadece hedef hücreye yapılması olası hale geliyor. Fare kökenli antikorların tedavi amaçlı kullanımları ilk kez 1986 yılında, organ reddini önlemeye yönelik olarak, T hücre yüzey antijenine karşı geliştirilmiş bir ilaç olan olan ortaclonun FDA (ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmasıyla başlıyor. Hibridoma yöntemiyle çeşitli hedef yapılara karşı monoklonal antikor üretiliyor.

Hibridoma yöntemiyle üretilen fare kökenli monoklonal antikorlar, klinik laboratuvarlarda tanı için geniş uygulama olanağına sahip olsa da, tedavi amaçlı uygulamalarda sınırlı başarı elde ediliyor. Tedavi amaçlı kullanımlarında fare antikorlarına karşı alerjik cevap meydana gelebiliyor. Bunun yanı sıra, fare antikorlarına ait Fc kısmının insan savunma sisteminde daha az etkili olması ve insan kökenli antikorlara göre fare kökenli antikorların daha kısa yarı ömre sahip olması, fare antikorlarının tedavi amaçlı uygulamalarını kısıtlıyor. Araştırmacılar antikorların tedavi amaçlı kullanımlarında karşılaşılan güçlükleri yenmek üzere antikor üretiminde yeni yaklaşımlar arayışına girdi.



Yirminci yüzyılda hibridoma teknolojisinin gelişmesine paralel olarak, genetik bilimindeki gelişmeler, pek çok yaşamsal olayın gen yönetiminde olduğunu göstermiştir. Milyonlarca farklı antikor molekülünün hangi genetik mekanizmayla sağlandığı net olarak bilinmemekle beraber, antikor yapılarının farklılıkları gen düzeyinde ortaya konulmuştur. Susumu Tonegawa isimli araştırmacı antikor çeşitliğinin gelişiminde genetik prensipler üzerine yaptığı çalışmayla 1987 yılında Nobel Ödülü almıştır. Bu bilgiler ışığında, fare antikorlarının insanlarda tedavi amaçlı uygulamalarında karşılaşılan sorunları çözmeye yönelik olarak rekombinant DNA teknolojisinin kullanımına olanak sağlanmıştır. Bunun sonucu olarak antikor mühendisliği alanı gelişmiş ve günümüz biyoteknoloji endüstrisi tarafından klinik uygulamalara yönelik birçok rekombinant antikor ve türevinin üretimi mümkün olmuştur.

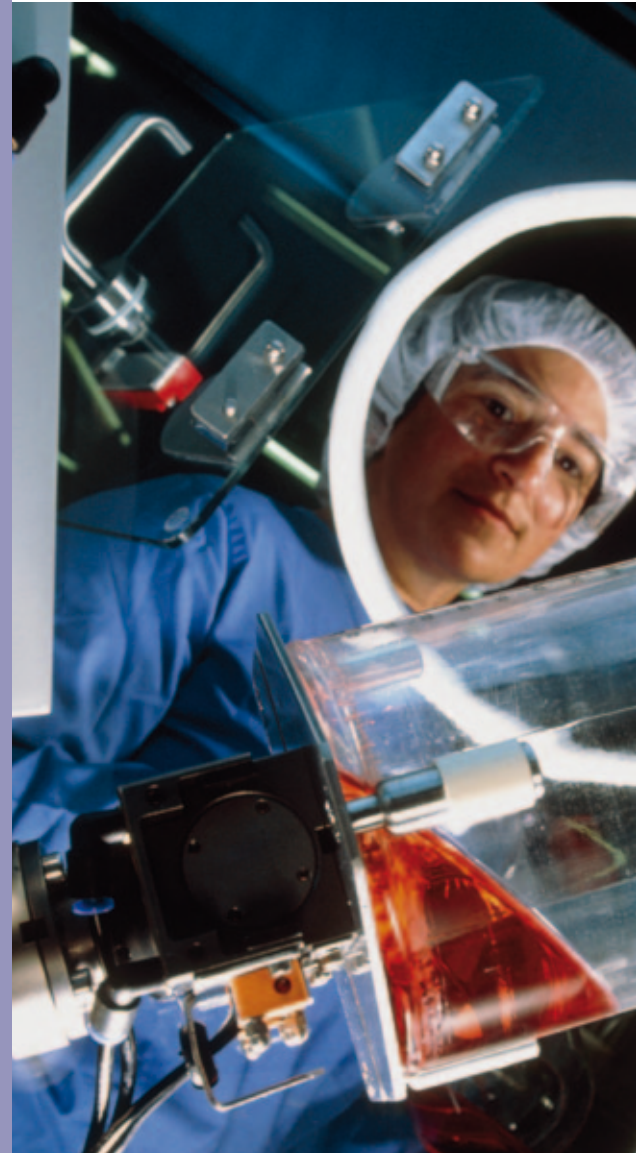


Antikor mühendisliğinin, fare kökenli antikorların insanlaştırılmasını hedefleyen ilk aşamasında fare ve insan antikorunu bileşimi olan kimerik antikorlar gündeme geliyor. Bu yaklaşımın temeli, fare antikorlarının insan bağışıklık sisteminde daha az fonksiyonel özellik göstermesinde önemli bir etken olan fare antikor sabit kısımlarının, insan kökenli sabit kısımlarla değiştirilmesine dayanıyor. 1997 yılında ilk kez kimerik bir antikorun (Rituximab) lenf bezi kanserlerinin tedavisi amacıyla kullanımı FDA tarafından onaylandı. Bu tarihten sonra Rituximab (1997), Basiliximab (1998), Infliximab (1998) ve Erbitux (Cetuximab) (2004) kimerik antikorlar olarak kullanıma sunuldu. Kimerik antikor yapılar yaklaşık % 65-90'ı insan dizileri içermesine rağmen, insanlarda anti-kimerik antikor cevabına neden olabiliyor. Kimerik antikor kullanımında fare kökenli değişken bölgelerin neden olduğu anti-kimerik antikor yanıtının engellenmesine yönelik olarak % 95'i insan kökenli insansı antikorlar geliştiriliyor. İnsansı antikorlarda, değişken bölgenin insansı hale getirilmesi hedefleniyor. Tedavi amaçlı uygulamalarda, yan etkilerden kaçınma ve kullanılan antikor yapılarının tedavide verimi açısından, tamamen insan nükleotit dizilerinden oluşan monoklonal antikorların kullanımı en iyi çözüm olarak karşımıza çıkıyor. Bu amaç doğrultusunda yeni yaklaşımların gündeme gelmesi kaçınılmaz oluyor. Faj gösterim teknolojisi bu yöntemlerden biri olarak karşımıza çıkıyor. Bu teknikle, ta-

TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde, 1994 yılından itibaren faj gösterim teknolojisi, bitki patojenlerinden insan proteinleri ve DNA yapılarına kadar çeşitli hedef moleküllerine karşı algılayıcı yapı oluşturmada kullanılıyor. Tütün mozaik virüsüne (TMV) karşı geliştirilen özgün scFv genlerinin tütün bitkisine aktarılmasıyla TMV'ye karşı dayanıklı tütün bitkileri elde edilmiştir. Bunun yanı sıra TÜBİTAK SBAG destekli çeşitli projeler kapsamında tümör gelişimini engellemek amacıyla rekombinant antikor ve peptit yapılarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştiriliyor. Bu çalışmalarda, VEGF ile VEGF'in KDR reseptörünün etkileşimini engelleyen yedi aminoasitlik peptit yapılar ile rekombinant antikorlar elde edilmiştir.

Günümüzde 30 farklı antikor tedavi amaçlı kullanılmakta olup sadece Rituxan, Remicade, Avastin, Herceptin ve Humira'nın satışının, 2008 yılında, 4 milyar doları geçtiği rapor ediliyor. Antikorların sağaltım çalışmalarında önemli avantajlara sahip olmalarının yanı sıra monoklonal antikorlara dayalı ürünlerin satışından milyar dolarlık gelir elde edilmesi biyoteknoloji sektörünün bu alana olan ilgisini daha da artırıyor. Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda da sağaltım çalışmalarında kullanılmak üzere, yeni özelliklere sahip monoklonal antikorların geliştirilmesi kaçınılmaz gözüküyor.

mamen insan antikorlarının elde edilmesine ve seçimine yönelik olarak rekombinant insan antikor kütüphaneleri geliştiriliyor. Bu yöntemle, bir insan donöründen alınan milyonlarca farklı değişken bölge kombinasyonu içeren büyük antikor kütüphaneleri oluşturulur. Faj gösterim teknolojisi vasıtasıyla, doğal antikor yapılarına benzer şekilde, hedef yapıyı tanımasını sağlamak amacıyla antikor ağır ve hafif zincir değişken bölge genlerinin bir köprü dizi tarafından bağlanması ile oluşturulan tek zincir değişken parça ve Fab yapıları bakteriyofajların (bakterileri enfekte eden virüsler) yüzeyinde sunuluyor. Bu sayede, hedef yapıya karşı özgün yüksek bağlanabilirlik özelliği gösteren rekombinant antikor yapılarının seçimi mümkün olabiliyor.



Humira (Adalimumab), 2002 yılında faj gösterim teknolojisi ile oluşturulmuş ve FDA tarafından kullanımı onay almış ilk insan antikoruna özelliğine sahip. 2008 itibarıyla adalimumab, FDA tarafından romatoid artrit, psoriatik artrit, ankilozan spondilit, Crohn hastalığı, orta ve ileri derecede ciddi se-def hastalığı ve juvenil idyopatik artrit tedavisi için onaylandı.

Bunun yanı sıra tamamen insan antikoruna üretiminde fare immünooglobulin genleri yerine insan IgG genlerine sahip transgenik farelerden (HuMab mice) de yararlanılabiliyor. Bu yöntemin avantajı, hedef antijenle kullanılarak yapılan bağışıklamanın tekrarlanabilmesi ve bu yolla antijene özgü yüksek affiniteli antikorların elde edilmesinin mümkün olması. Transgenik fare vasıtasıyla elde edilmiş olan Panitumumab, 2006 yılında me-

tastatik kolorektal kanser tedavisinde ve 2009 yılında Ilaris (Canakinumab) romatizmal bir hastalık olan romatoid artritte kullanılmak üzere FDA onayı aldı.

Tümör hücrelerine özgü antijenik yapıların tanımlanması, antikorların güdümlü mermiler olarak kullanılmasını da gündeme getiriyor. Araştırmacılar, toksin, sitotoksik ilaçlar ve radyoaktif maddeler gibi savaş başlıklarını antikorlara bağlayarak, antikorları daha etkili hale getirmeye yönelik çalışmalar yapıyor. Radyoaktif işaretli monoklonal bir antikorun prostat kanserinde tedavi amaçlı uygulamasına yönelik yapılan klinik çalışmalar bu uygulamalara örnek teşkil ediyor.

Antikor tasarımıdaki yeni yaklaşımlardan biri de iki farklı antijen yapısını tanıma yeteneğine sahip bispesifik antikor yapılarının geliştirilmesi. CD3 ve tümör hücresine özgü antijenlere karşı geliştirilmiş antikorların birleştirilmesiyle oluşturan bispesifik antikorlar ilgili lenfositleri kanser hücrelerine yönlendirebiliyor.

Tanı ve tedavi alanındaki ilerlemelere rağmen, kanser halen en önemli ölüm nedenlerinden birini oluşturuyor. Son döneme kadar, kansere karşı tedavilerde tümör hücrelerinin kendileri, öncelikli hedef olarak kullanılıyordu. Bu strateji solid tümörlerin birçok tipinde, hastanın yaşam süresini uzatıyordu, ancak tedaviye bağlı toksik etkiler ve ilaca dirençli klonların gelişmesi gibi tedavide istenmeyen yan etkilerinin gözlenmesi, yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yönelik araştırmaların yapılmasına neden oldu. 1971 yılında Folkman ve grubu, bir tümörün büyümesinin yakın çevresinde yer alan kılcal damarlardan tümöre oksijen ve enerji götüreceği yeni kapillerlerin oluşturulmasından (damarlanma (anjyogenez) olayı) kaynaklandığını gösterdi. Bu nedenle anjiogeneze karşı geliştirilecek stratejilerin kanser tedavisi için etkili bir yol olabileceği gündeme geldi. Böylelikle kansere yönelik tedavi yaklaşımlarında yeni bir kapı açıldı. Tümör damarlanmasında anahtar rol oynayan vasküler endotel büyüme faktörüne (VEGF) karşı geliştirilmiş insansı antikor yapısı bevacizumab günümüzde damarlanmayı önleyici olarak kanser tedavisinde kullanılıyor.

Kaynaklar

http://www.abbott.com/static/content/microsite/annual_report/2006/humira.html
<http://www.researchandmarkets.com/reports/354677>
 Redwan, el-RM, "Animal-derived Pharmaceutical Proteins", *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, Temmuz 2009.
 Gebauer, M., Skerra, A., "Engineered Protein Scaffolds as Next-generation Antibody

Therapeutics" *Current Opinion in Chemical Biology*, Haziran 2009.
 Mathew, M., Verma, R. S., "Humanized Immunotoxins: A New Generation of Immunotoxins for Targeted Cancer Therapy", *Cancer Science*, Ağustos 2009.

