

ÖZET**5 HİBRİT/KİMERİK HÜCRELERİN OLUŞTURULMASINA YÖNELİK
YÖNTEMLER VE BUNLARIN KULLANIMLARI**

Mevcut buluş, hibrit hücreler ve hibrit hücrelerin üretimine yönelik yöntemler ile ilgilidir. Belirgin olarak, buluş, en az iki hücrenin farklı soylardan türetildiği en az üç hücrenin
10 hibridizasyonundan üretilen hibrit hücreler ile ilgilidir. Buluş ayrıca, tanısal, profilaktik, terapötik ve/veya araştırma uygulamalarının bir aralığında kullanışlı proteinlerin ekspresyonuna yönelik hibrit hücrelerin kullanımı ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Aşağıdakilerin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücre:

5

bir birinci hücre, burada söz konusu birinci hücre, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen bir hücredir, burada yaygın bir miyeloid progenitör hücre, miyeloid soy ile kısıtlı olan ve ya megakaryosit/eritrosit ya da granülosit/makrofaj progenitörlerine sebep olabilen, ancak lenfoid hücreler ile kısıtlı olmayan bir hematopoietik kök hücrenin bir progenidir;

10

yaygın bir lenfoid progenitör hücreden türetilen bir ikinci hücre; ve

yaygın bir lenfoid progenitör hücreden türetilen bir üçüncü hücre, burada yaygın bir lenfoid progenitör hücre, lenfoid soyu ile kısıtlı olan ve B, T ve doğal öldürücü hücrelere sebep olabilen, ancak miyeloid hücreler ile kısıtlı olmayan bir hematopoietik kök hücrenin bir progenidir,

15

burada söz konusu ikinci hücre ve söz konusu üçüncü hücre, bir miyelom hücre değildir,

ve burada söz konusu ikinci hücre, tercihen B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve

20

söz konusu üçüncü hücre, tercihen B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir veya burada söz konusu ikinci hücre, tercihen T lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, tercihen T lenfoid soyundan türetilen bir hücredir.

2. Söz konusu ikinci hücrenin, B lenfoid soyundan türetilen bir hücre olduğu ve B lenfoid

25

soyundan türetilen söz konusu hücrenin, tercihen bir ön-B hücre, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B hücresi veya bir efektör B hücresi olduğu, söz konusu efektör B hücresinin, tercihen bir antijen deneyimli B hücresi veya bir plazma hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, T lenfoid soyundan türetilen bir hücre olduğu, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücrenin, tercihen bir ön-T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresi olduğu, İstem 1'e göre bir hibrit hücre.

30

3. Yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücrenin, bir

- miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofilden oluşan gruptan seçildiği ve yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücrenin, tercihen bir immortalize hücre olduğu, söz konusu immortalize hücrenin, bir maligniteden veya belirsiz büyüme kapasitesini indükleyen bir hücrede bir eylemin uygulanmasıyla türetildiği ve/veya dalak, periferik kan, umbilikal kordon kanı veya kemik iliğinden türetildiği, İstem 1'e göre bir hibrit hücre.
4. B lenfoid soyundan veya T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücrenin, bir immortalize hücre olduğu, söz konusu immortalize hücrenin, bir maligniteden veya belirsiz büyüme kapasitesini indükleyen bir hücrede bir eylemin uygulanmasıyla türetildiği veya B lenfoid soyundan veya T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücrenin, periferik kan, kordon kanı, dalak, kemik iliği, timus, bademcikler, adenoidler ve bölgesel lenf bezi gibi lenfoid dokudan türetildiği, İstem 2'ye göre hibrit hücre.
5. Hücrelerden en az birinin, bir insan hücresi veya bir fare hücresi olduğu, İstem 1'e göre hibrit hücre.
6. Yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücrenin, bir K562 hücresi olduğu, İstem 3'e göre hibrit hücre.
7. Söz konusu ikinci hücrenin veya söz konusu üçüncü hücrenin, bir WIL2-NS hücresi veya bir MOLT4 hücresi olduğu, İstem 1'e göre hibrit hücre.
8. B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu, İstem 2'ye göre hibrit hücre.
9. T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücrenin, bir MOLT4 hücresi olduğu, İstem 2'ye göre hibrit hücre.
10. Söz konusu birinci hücrenin, bir K562 hücresi olduğu; söz konusu ikinci hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, bir MOLT4 hücresi olduğu veya söz konusu birinci hücrenin, bir K562 hücresi olduğu; söz konusu ikinci hücrenin, bir primer B hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, bir primer T hücresi olduğu veya söz konusu birinci hücrenin, bir primer insan monosit olduğu; söz konusu ikinci

hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, bir primer T hücresi olduğu veya söz konusu birinci hücrenin, bir primer insan miyelomonositik progenitör olduğu; söz konusu ikinci hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, bir primer insan T hücresi olduğu veya söz konusu birinci hücrenin, bir K562 hücresi olduğu; söz konusu ikinci hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, bir primer T hücresi olduğu veya söz konusu birinci hücrenin, bir primer monosit olduğu; söz konusu ikinci hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu ve söz konusu üçüncü hücrenin, bir WIL2-NS hücresi olduğu, İstem 1'e göre hibrit hücre.

10

11. Söz konusu hibrit hücrenin, arzu edilen bir proteini, birden fazla arzu edilen proteini, iki arzu edilen proteini veya üç arzu edilen proteini eksprese ettiği, proteinlerden herhangi biri veya daha fazlasının, bir endojen protein veya bir rekombinant protein olduğu ve söz konusu proteinin, tercihen bir sitokin, bir koloni uyarıcı faktör, bir interlökin, GM-CSF, interlökin 2, bir reseptör veya bunun fragmanı, bir çözünür reseptör, insan IL-4 reseptörü alfa zinciri, CD54 veya IgM veya IgG dâhil olmak üzere bir immünoglobulin olduğu, İstem 1'e göre hibrit hücre.

15

12. Söz konusu hibridizasyonun, elektrik araçları vasıtasıyla veya kimyasal araçlar vasıtasıyla elde edildiği, İstem 1'e göre hibrit hücre.

20

13. Söz konusu hibrit hücrenin, ilgili bir proteini eksprese eden bir hücre ile daha fazla hibridize edildiği veya söz konusu hibrit hücrenin, arzu edilen bir posttranslasyonel modifikasyon veya arzu edilen işlevselliği sergileyen bir protein ekspresyonuna imkân tanınması amacıyla belirli bir hücre tipi tanımlayıcı markör için zenginleştirildiği, İstem 1'e göre hibrit hücre.

25

14. Söz konusu hibridizasyonun, üç bireysel hücrenin hibridize edilmesiyle uygulandığı veya söz konusu hibridizasyonun, üç hücre popülasyonu kullanılarak uygulandığı, her bir söz konusu popülasyonun, birden çok özdeş hücre tipini içerdiği, İstem 1'e göre hibrit hücre.

30

15. Bir proteinin üretimine yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem İstem 1'e göre bir hibrit hücrede bir proteinin eksprese edilmesi adımını içermektedir.

TARİFNAME**HİBRİT/KİMERİK HÜCRELERİN OLUŞTURULMASINA YÖNELİK
YÖNTEMLER VE BUNLARIN KULLANIMLARI**

5

TEKNİK ALAN

Mevcut buluş, hibrit hücreler ve hibrit hücrelerin üretimine yönelik yöntemler ile ilgilidir. Belirgin olarak, buluş, en az iki hücrenin farklı soylardan türetildiği en az üç hücrenin hibridizasyonundan üretilen hibrit hücreler ile ilgilidir. Buluş ayrıca, tanısal, profilaktik, terapötik ve/veya araştırma uygulamalarının bir aralığında kullanışlı proteinlerin ekspresyonuna yönelik hibrit hücrelerin kullanımı ile ilgilidir.

15

ÖNCEKİ TEKNİK

Tarifname boyunca önceki tekniğin herhangi bir açıklaması, önceki tekniğin geniş ölçüde bilindiği veya alanda yaygın genel bilginin bir parçasını oluşturduğu kabulü olarak düşünülmemelidir.

20

Çeşitli farklı hücre tipleri, günümüzde tanısal, profilaktik, terapötik ve/veya araştırma uygulamalarının bir aralığında ticari olarak alakalı olan proteinleri eksprese etmek üzere kullanılmaktadır. Günümüzde, bu proteinlerin üretimi, bakteri, maya, mantarlar, böcek ve insan olmayan memeli hücreler gibi hücrelerde rutin bir şekilde uygulanmaktadır.

25

Hücreler, proteinleri, kısıtlayıcı olmayacak şekilde glikosilasyon, asilasyon, fosforilasyon, metilasyon, sülfatlama, prenilasyon ve lipidasyon dahil olmak üzere birçok posttranslasyonel modifikasyon ile sıklıkla modifiye etmektedir. Bu modifikasyonlar, spesifik türlerdir ve bu şekilde ticari olarak alakalı proteinlerin üretiminde mevcut olarak kullanılan hücreler, insan hücrelerden eksprese edilen veya insan gövdesinde doğal olarak oluşan proteinlerde gözlemlenen posttranslasyonel modifikasyonlardan ayrı olan posttranslasyonel modifikasyonları sergilemektedir. Örneğin, ticari olarak alakalı proteinleri üretmek üzere kullanılan birçok memeli olmayan hücre tipi, proteinleri glikosile etme kapasitesinden mahrumdur veya insan hücrelerde eksprese edilen proteinler ile sergilenen glikosilasyon paternlerinden farklı olan glikosilasyon paternlerini sergilemektedir.

30

- Hatta Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücreleri gibi insan olmayan memeli ekspresyon sistemlerinde, glikosilasyon paternlerine dair önemli farklar, insan hücrelerinininki ile kıyaslanarak belgelenmektedir. Örneğin, rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan
- 5 CHO hücre dizileri, insan hücrelerinde mevcut olan (α 2, 6)-bağlı terminal sialik asitlerin sentezine yönelik bir işlevsel (α 2, 6) sialiltransferaz enziminden mahrumdur. Dahası, CHO hücreli eksprese glikoproteinlerde mevcut olan sialik asit motifleri, bir CHO hücresi endojen sialidaz ile degradasyona meyillidir (Gramer ve ark. Biotechnology 13 (7):692-&, 1995).
- 10 İnsan olmayan ekspresyon sistemlerinin ayrı posttranslasyonel modifikasyon repertuvarlarının bir sonucu olarak, bunlardan eksprese edilen proteinler, insan hücre türevi proteinlerden ayrı olan yarı ömür, immunojenesite, stabilite ve işlevsel verimlilik gibi fizyokimyasal ve farmakolojik özellikleri sergilemektedir. Bu, bu proteinlerin klinik kullanımını büyük ölçüde etkileyebilmektedir.
- 15 Türlerle bağımlı yapıya ek olarak, posttranslasyonel modifikasyonların, aynı türler içerisinde spesifik doku ve hatta hücre tipi olabildiğine dair artan kanıtlar mevcuttur. Bu, özellikle terminal glikosilasyonu sergileyen proteinlerin doku ve hücre tipine özgü ekspresyon ile ilgilidir (Feizi Nature 314: 53-54, 1985; Rademacher ve ark. Annu Rev Biochem 57: 785-838,
- 20 1988). Spesifik olarak, terminal sialik asitleri glikoprotein şeker zincirlerine birleştiren üç sialiltransferazın, yedi sıçan dokusunda diferansiyel ekspresyon sergilediği gösterilmiştir (Paulson ve ark. J. Biol. Chem. 264: 10931-10934, 1989). Bu, aynı proteinin dokuya özgü glikoizilasyon için destek sağlamaktadır. Dahası, fare fibroblastlar ve kemik iliğinden fare osteoblastlar ile eksprese edilen yüksek oranda fosforile glikoproteinin iki izoformu ile
- 25 yapılan çalışma (fare osteopontin), biyolojik aktivitedeki farklarla ilişkili fosforilasyon derecelerindeki ana farkları sergilemiştir. Bu sonuçlar, farklı hücre tipleri ile üretilen osteopontin işlevinin ayrı olduğunu göstermektedir (Christensen ve ark. J Biol. Chem. 282(27): 19463-19472).
- 30 Tamamen insan özelliklerini sergileyen biyolojiklerin üretimi için uygun verimli hücre sistemleri, kısıtlayıcı olmayacak şekilde aşağıdakiler dahil bir dizi kriteri yerine getirmelidir:
- a) insan dokusundan türeme;
 - b) kültürde yüksek yoğunlukta büyüme;

- c) ticari olarak canlı protein ürünlerinin sergilenmesi;
- d) stabil yabancı gen girişine izin verilmesi;
- e) gen amplifikasyon yöntemlerine izin verilmesi;
- f) insan-insan hibridomlarında olduğu gibi monoklonal antikor üretimine yönelik bir ana hücrenin kullanımına izin verilmesi;
- g) stabil uzun dönemli protein ekspresyonunun sergilenmesi;
- h) serumsuz ve glutaminsiz bir ortamda büyüebilme kabiliyeti;
- i) protein degradasyonunu azalacak şekilde endo-peptidaz aktiviteden mahrumiyet;
- j) viral DNA ve mikoplazma dahil patojenik maddelerden yoksun olma;
- k) doğal yollarla oluşan insan proteinlerinde, tercihen spesifik doku ve hücrede oluşan posttranslasyonel modifikasyonlara işlevsel olarak benzer olan veya bunlarla aynı olan posttranslasyonel modifikasyonları sergileyen proteinlerin üretilmesi.

Bu posttranslasyonel modifikasyonlar, kısıtlayıcı olmayacak şekilde glikoproteinlerde karbonhidrat parçalarını içerebilmektedir.

Bir dizi insan konak hücre veya heterohibridoma, insan protein ekspresyonu için mevcut olurken, bunlardan hiçbirisi yukarıda listelenen tüm kriterleri yerine getirmemektedir. En önemlisi, klinik olarak kullanışlı ürünlerde mevcut insan hücre ekspresyon sistemlerinden proteinleri eksprese etme ve izole etme girişimleri sınırlı başarıyla sonuçlanmıştır.

Ökaryotik hücrelerde protein ekspresyonu, aşağıdakiler dahil olmak üzere çok sayıda aşamada kontrol edilmektedir: (a) kromatinde bulunan genlerdeki düzenleyici faktörlerin etkisi; (b) transkripsiyonun başlatılmasının düzenlenmesi; ve (c) posttranslasyonel modifikasyon. Bu farklı aşamaların, gelişimsel aşama ve/veya dokuya özgül olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde, arzu edilen bir proteini kodlayan bir eksojen gen, bir hücreye dahil edildiğinde, arzu edilen protein ekspresyonu, optimalden daha az olabilmektedir. Stabil ekspresyon yoksunluğu (Li ve ark., Proc Natl Acad Sci USA 95: 3650-3654, 1998; Miyaji ve ark., Cytotechnology, 3: 133-140, 1990; Miyaji ve ark., Cytotechnology 4: 173-180, 1990; Miyaji ve ark., Cytotechnology 4: 39-43, 1990; Satoh ve ark., Cytotechnology 13: 79-88, 1993), düşük ekspresyon ürünleri (Airoldi ve ark., Cancer Research 61:1285-1290, 2001; Hosoi ve ark. Cytotechnology 7: 25-32, 1991) ve optimal olmayan posttranslasyonel modifikasyonlar (Shinkawa ve ark., J. Biol. Chem. 278:3466-3473, 2003) meydana gelebilmektedir. Tüm bu faktörler, proteinin potansiyel ticari kullanımını etkileyebilmektedir.

Bir örnek olarak, Namalwa hücrelerinin bir alt çizgisi (süspansiyon kültürlerinde büyüyen ve bir serum ve albumin içermeyen ortama uyarlanan insan B lenfoblastoid hücreleri), Namalwa KJM-1, Burkitt lenfoma hücrelerine bir endojen protein olan alfa-interferonun geniş ölçekli üretimi için kullanılmıştır. Fakat, Burkitt lenfoma hücrelerine yabancı olan, fakat B hücreleri için endojen olan G-CSF proteini (Airoldi ve ark., Cancer Research 61:1285-1290, 2001) elektroporasyon vasıtasıyla transfeksiyon için hedeflenen protein olarak kullanıldığında, çok sayıda metotreksata (MTX) dirençli klonlar ve en yüksek G-CSF üretici klonu arasında değişkenlik gösteren G-CSF ekspresyon seviyeleri, serum içermeyen koşullara uyarlandığında sadece 2.4 µg/ml/gün spesifik bir üretkenliğe sahip olmuştur.

10

Dahası, spesifik üretkenlik, hücre sayısı 7×10^5 hücre/ml miktarının üzerinde olduğunda, yüksek yoğunlukta kültürde bastırılmıştır (Hosoi ve ark. Cytotechnology 7: 25-32, 1991). Bildirilen maksimum G-CSF konsantrasyonu önemli ölçüde geliştirilmesine ve 41 µg/ml miktara ulaşmasına rağmen, buna ulaşmak için, oldukça sıkı pH kontrolü ile hücre kültürü koşullarının pahalı ve iş gücü gerektiren manipülasyonunu gerektirmiştir. Optimal büyüme için kullanılan ortamın, optimal üretim için kullanılan farklı olduğu gösterilmiştir, bu şekilde arzu edilen yüksek yoğunluk ve yüksek üretim oranı arasındaki önemli çatışma oluşturmaktadır ve endüstriyel olarak güvenilir olmayan bir sistemi ortaya çıkarmaktadır.

20

Ökaryotlardaki gen ekspresyonu, aşağıdakileri içeren çok sayıda adımda kontrol edildiği için: (a) düzenleyici faktörlerin, kromatindeki genlere mevcudiyeti ve erişilebilirliği; (b) transkripsiyonun spesifik başlama oranının erişilebilir promoterlerine dair modülasyon; ve (c) daha sonrasında, çeşitli adımlarda posttranslasyonel eylemler, bu dokuya özgü ve gelişime özgü transkripsiyon faktörlerinin mevcudiyeti, genlerin ekspresyonunda büyük bir etkiye sahiptir. Dahası, spesifik bir hücre tipinin gen düzenlemesi, moleküler sinyalleri genlere ileten proteinlerin bağlayıcı bölgeleri olan çeşitli cis-etkili DNA düzenleyici sekansların işbirliğini gerektirmektedir (Blackwood ve ark., Science 281: 60-63, 1998). Bu sekanslar, enhanceozomlar olarak bilinen kompleksleri oluşturmak üzere düzenleyici proteinleri bağlamaktadır (Marika ve ark., Curr Opin Genet Dev 11(2): 205-208, 2001). Bu şekilde, hedeflenen gen, insan soyuna özgü konak hücrelere dahil edildiğinde genel hücresel ortamdan ayrı kaldıkça, yüksek üretimde arzu edilen proteinin stabil ekspresyonu ve üretimi de düşmektedir. Namalwa KJM-1 hücreleri, beta interferon (Miyaji ve ark., Cytotechnology, 3: 133-140, 1990; Miyaji ve ark., Cytotechnology 4: 173-180, 1990) veya insan lenfotoksin (Miyaji ve ark., Cytotechnology 4: 39-43, 1990) veya pro-urokinaz (Satoh ve ark.,

30

Cytotechnology 13: 79-88, 1993) gibi lenfoblastoid hücre dizileri için soya özgü proteinlerden daha uzakta olan yabancı proteinlerin genleri ile transfekte edildiğinde, transfeksiyon oranı ve hücre üretkenliği, daha düşük bile bulunmuştur.

- 5 İnsan soyuna hücre hücre dizilerinde yabancı genlerinin etkili ekspresyonu da insan konak hücrelerinden mevcut nükleer faktörlere yönelik bağlayıcı bölgeleri içerecek olan uygun bir geliştiricinin/promoterin dikkatli ve bazen sıkıcı bir seçimini gerektirmektedir. Bu tarz bir geliştiricinin/promoterin bulunması, hala bu tarz bir promoterin kısıtlı uygunluğuna neden olabilmektedir. Örneğin, simian virüs 40 (SV40) erken gen promoteri, insan sitomglovirüs
- 10 (hCMV) ana ara-erken gen promoteri, Moloney mürin lösemi virüs (Mo-MuLV) promoteri, Rous sarkoma virüs (RSV) prooteri ve yavuk β -aktin promoteri gibi çeşitli geliştiriciler/promoterler, Namalwa KJM-1 hücrelerindeki bir yabancı genin daha etkili ekspresyonu için incelendiğinde, Mo-MuLV promoterinin, geleneksel SV40 erken promoterinden yaklaşık 10 kat daha güçlü olduğu bulunmuştur ve yüksek üretici klonlar, 30-
- 15 40 $\mu\text{g}/10^6\text{hücre/gün}$ üretkenliğine ulaşmıştır (Satoh ve ark., Cytotechnology 18:162-172, 1996). Fakat, Mo-MuLV gibi retroviral vektörlerin kullanımına dair problem, nükleer ekleme makinesi tarafından çıkarılmalarından evirici sekanslarla (intronlar) genlerin transfeksiyonu için kullanımının zor olmasıdır (Li ve ark., Proc Ntl Acad Sci USA 95: 3650-3654, 1998).
- 20 Hücresel ve nükleer ortam arasındaki uyumsuzluk, antikorlar gibi iki gen tarafından kodlanan proteinlerin durumunda daha fazla arttırılmaktadır. Dahası, Namalwa KJM-1 hücreleri, insan-insan hibridomların üretimi için kullanılırken, antikor ürünleri, bu hücre dizisini, endüstriyel üretim için kullanışsız hale getirmiştir.
- 25 Bir diğer örnek olarak, insan embriyonik böbrek hücre dizisi 293'ün, yüksek stabilite derecesine sahip yabancı kaynaklı genlerle oldukça kolay bir şekilde transfekte edildiği kanıtlanmıştır. Fakat, 293 transfektanttan türetilen proteinler, kısıtlı kullanıma sahiptir ve genel olarak sadece 293 hücrelerinin, insan adenovirüs Ad5 DNA'yı (HEK 293 hücreleri) içermesinden dolayı araştırma amaçlar için uygun hale getirilmektedir. Fakat, ticari bir ayarda
- 30 293 hücrelerinin kullanımında en büyük kısıtlama, yapışık yapısıdır. 293 hücrelerini, polietilenimin (Durocher ve ark., Nucleic Acids Res 30(2):e9, 2002; Schlaeger ve ark., Cytotechnology 30:71-83, 1999) veya kalsiyum fosfat (Girard ve ark., Cytotechnology 38:15-21, 2002; Jordan ve ark., Cytotechnology 26:39-47, 1998; Meissner ve ark., Biotechnol Bioeng 75(2):197-203, 2001) gibi maliyet açısından uygun vehikülleri kullanarak

süspansiyonda etkili transfeksiyona uyarlamak için bir dizi girişimde bulunulmuştur. Fakat, bu vehiküller, sadece rekombinant proteinlerin geçici ekspresyonuna neden olmaktadır, bu da transfeksiyonun, her bir yeni tohumlanmış yığın için tekrar edilmesi gerekmesidir. EBV'nin oriP'si, vektör omurgasında mevcut olduğunda süspansiyon büyümesine ve daha yüksek protein ekspresyonuna ulaşma için, 293 hücrelerinin, Epstein Barr virüsü EBNA1 proteinini (293E) stabil bir şekilde eksprese etmek üzere genetik olarak modifiye edilmesi gerekmiştir (Durocher ve ark., *Nucleic Acids Res* 30(2):e9, 2002; Parham ve ark., *Cytotechnology* 35:181-187, 2001; Schlaeger ve ark., *Cytotechnology* 30:71-83, 1999). EBNA1 ile transfeksiyondan sonra bile, 293E hücreleri, serum içermeyen ortamda (HEK293 EBNA1) büyütüldüğünde (büyük ölçekli üretim için ön şart), yüksek ihtimalle hücre agregasyonunu önlemek üzere eklenen polianyonların (heparin, dekstran sülfat) mevcudiyetinden kaynaklı olarak oldukça zayıf bir transfeksiyon oranını sergilemektedir. Et, jelatin ve kazein gibi hayvansal kaynaklı enzimatik hidrolizden elde edilen peptonlarla ortamı besleyerek bu problemin giderilmesi için girişimlerde bulunulmuştur (Pham ve ark., *Biotechnol Bioeng* 84(3):332-42, 2003). HEK293 EBNA1 hücre dizisi, Tie-2 (anjiyopoietin büyüme faktörlerine yönelik reseptör tirozin kinazı) ve Nörofilin-1 ED (nöronal hücre rehberliğini yönlendiren reseptör) üretimi için kullanıldığında, protein ekspresyonu, transfekte edilmemiş kültürlerde elde edilenler ile kıyaslandığında düşük hücre yoğunluğunda kültürler ile kısıtlanmıştır. Ayrıca, elde edilen proteinin >%95 saflığı, sadece araştırma dereceli ürünler için uygundur. Ek olarak, HEK293 EBNA1 hücreleri, monoklonal antikorların (mAb'ler) üretimi için uygun değildir.

Terapötik mAb'lerin üretimine yönelik mevcut stratejiler, transjenik fare taşıyıcı insan Ig genlerinin (xenomice) immünizasyonundan, kemirgen mAb'lerin insanlaştırılmasından veya insan mAb kütüphanelerinin taraması vasıtasıyla türetilen mAb'leri rekombinant olarak üretmek üzere memeli hücre sistemlerinin (bir başka ifadeyle, CHO veya NS0 transfektomalarının) kullanımını içermektedir (van Dijk ve ark., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:368-374, 2001). Sekansları açısından, terapötik mAb'ler, günümüzde alerjik tepkiyi minimize etmek üzere kimerik (kemirgen değişken ve insan sabit bölgeler), insanlaştırılmış (kemirgen tamamlayıcılık belirleyici bölgeler haricinde insan sekansı) ve tamamen insan antikorlara (insan Ab'ler) değişirken, terapötik bir mAb'nin önemli yönü, mAb'nin, natif glikosilasyon paternini değiştiren, insan olmayan konak hücrelerde üretilmesi halinde tehlikeye giren antikora bağımlı hücresel sitotoksiste gibi immün efektör işlevlerini sağlayabilme kabiliyetidir (Shinkawa ve ark., *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473, 2003). Bu

gerçekler açısından, ideal bir senaryo, terapötik antikorların insan hücreler tarafından üretildiği bir senaryodur. Bu durumda, tamamen insan mAb'ler, insan efektör işlevlerini uygulayabilecektir ve natif insan yapılarından dolayı oldukça kısıtlı immunojenesiteye sahiptir.

5

Hibridomların veya insan B hücrelerinden türetilen Epstein-Barr virüsü (EBV) dönüşümlü lenfoblastoid dizileri bildirilmiştir (Kirman ve ark., Hybrid. Hybridomics 21: 405-414, 2002; Boerner ve ark., J. Immunol. 147: 86-95, 1991; Zafiroopoulos ve ark., J. Immunol. Methods 200: 181-190, 1997). Fakat, uzun dönemli stabilitelerine ve tüm toplu üretimler esnasında özellikle Ig salgısının üretim seviyeleri ve stabilitesi gibi üretim süreçlerine uygunluğa göre bu mAb'lerin ve dizilerin karakterizasyonuna dair kısıtlı bilgi bulunmaktadır. 4 günlük bir çalışma esnasında 1.2 g/litrelik bir kümülatif litrede insan GM-CSF'ye karşı hücre dizilerini üreten insan mAb'ler bildirilirken, bu hücre dizileri, heteromilolenfoma K6H6/B5 hücreleri (bir başka ifadeyle, bir insan B hücresi lenfomanın ve bir fare miyelom hücresinin bir hibridizasyonundan elde edilen bir fare-insan hücre dizisi) ile primer insan B hücrelerinin somatik hücre hibridizasyonundan (füzyon) türetilmiştir (Li ve ark., Proc Natl Acad Sci USA 103(10):3557-3562, 2006).

EBV-dönüşümü durumunda, stabil antikor üretimi sürdürülürken tamamen immortalize insan B hücresi dizisinin oluşumunda zorluk yaşanmıştır. Bu, düşük immortalizasyon verimliliğinden, hücre büyümesinin tutulumundan ve IgM üreten hücrelerin baskın immortalizasyonundan kaynaklanmaktadır. Ek olarak, güncel bildiriler, çoğu EBV dönüşümlü B hücrelerinin, çoğunlukla 160 popülasyonun ikiye katlanma seviyelerinden önce kısaltılmış telomerlere ve kısıtlı bir ömre sahiptir (Sugimoto ve ark., J Virol 73:9690-9691, 1999; Toda ve ark., J Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 787:197-206, 2003). Bu problemin üstesinden gelmek için, EBV ile dönüştürülmüş B hücrelerini, uygun bir partner hücre dizisi (ekspresyon sistemi) ile hibridize etmek (veya füzyon yapmak) için girişimlerde bulunulmuştur, fakat aslında bu partner hücre dizileri, bir insan B hücresi ile bir fare-insan heterohibridomdan türetilen bir triom gibi heterohibridlerin çeşitli kombinasyonunu temsil etmiştir (Ainai ve ark., Hum Antibodies 15:139-154, 2006; Kalantarov ve ark., Hum Antibodies 11: 85-96, 2002; Karpas et. al., Proc Natl Acad Sci USA 98:1799-1804, 2001). Bu tarz bir triom, bir antikor üreten primer EBV ile dönüştürülmüş B hücreleri ile tetanoz toksisine (TT) kaynaşık hale getirildiğinde, fare bileşeninin dörtte birine sahip olan bir tetroma neden olmuştur. MAb'lerin TT'ye stabil üretimi, tetromların üç defalık ardışık

klonlanmasından sonra mümkün olmasına rağmen, bu tekrar edilen hücre klonlama adımları, zahmetli ve zaman alıcıdır. Ek olarak, tetromlar ile üretilen mAb'lerin miktarları, deneysel amaçlar için yeterli olmasına rağmen, seviyeler, farmasötik maddeler olarak mAb'lerin büyük ölçekli üretimi için yetersiz olmuştur. Poliklonal aktivatör CpG 2006'nın mevcudiyetindeki immobilizasyon veya CD19 veya BCR'nin ko-ligasyonu, terapötik kullanım için uygun hacimlerde spesifik mAb'lerin etkili bir üretimi için tam bir sistemi sağlayabilmektedir (Hartman ve ark., J Immunol 164: 944-953, 2000; Hur ve ark., Cell Prolif 38: 35-45, 2005; Traggiai ve ark., Nat Med 10: 871-875, 2004).

- 10 Hering ve ark., BIOMEDICA BIOCHIMICA ACTA 47:211-216, 1988, B lenfoblastoid hücre dizisinin Raji (Burkitt lenfoma) ve miyeloid-eritroid hücre dizisi K562'nin (alt dizi AB5) füzyonu ile ilgilidir. Bu hücrelerin hibridleri, insan ile uyarılmış dalak hücreleri ile kaynaşık hale getirildiğinde triom üretimi için kullanılmıştır. EP 0 292 965 A2 (CETUS CORPORATION, 1988), bir insan miyelom hücrelerini (U266), bir EBV ile dönüştürülmüş lenfoblastoid B hücrelerini ve bir lenfoblastoid hücre dizisi salgılayıcı IgG'yi içeren bir triom hücreleri ile ilgilidir.

Büyüme faktörleri, antikorlar ve çözülebilir proteinler gibi biyolojik maddelerin üretimine yönelik insan hücrelerinin kullanımı için bir dizi yaklaşım denenmiştir.

20

Önceki tekniğin dezavantajlarından en az birisinin üstesinden gelinmesi veya hafifletilmesi veya kullanışlı bir alternatifin sağlanması, mevcut buluşun bir amacıdır.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

25

Buluşa göre, bağımsız istem 1'e göre belirlenen bir hibrit hücre ve bağımsız istem 15'e göre belirlenen bir proteinin üretimine yönelik bir yöntem sağlanmaktadır. Tercih edilen veya isteğe bağlı özelliklerin örnekleri, bağımlı istemlerde sağlanmaktadır.

30

Genel olarak, çok füzyonlu hücrelerin stabil olmaması ve bir füzyonda daha fazla hücre dahil oldukça, elde edilen hibrit hücrenin instabilitesinin daha büyük olması göz önünde bulundurulmaktadır. Şaşırtıcı bir şekilde, mevcut buluşta, üç hücre gibi bir dizi hücrenin füzyonundan elde edilen hibrit hücreler, işlevsel stabilite sergilemektedir. Belirgin olarak, farklı soylardan türetilen hücrelerin, büyük ölçüde stabil kimerik/hibrit hücreleri oluşturmak

üzere somatik olarak kaynaşık hale getirilebildiği veya hibridize edilebildiği keşfedilmiştir. Daha belirgin olarak, mevcut buluş, en az üç parental hücrenin hibridizasyonundan üretilen çapraz soy kimerik/hibrit hücreler ile ilgilidir, bu da en az iki parental hücrenin, farklı soyalardan türetildiği ve bir miyelom hücresinin, hibridizasyonda dahil edilmediği bir tri-
5 hibride neden olmaktadır.

Ayrıca, buluşun stabil kimerik/hibrit hücrelerinin, örneğin kısıtlayıcı olmayacak şekilde insan glikosilasyon paternleri gibi arzu edilen posttranslasyonel modifikasyonları sergileyen proteinlerin üretiminde uygulamalara sahip olduğu şaşırtıcı bir şekilde keşfedilmiştir.

10

Ayrıca, buluşun stabil kimerik/hibrit hücrelerinden arzu edilen bir proteinin ekspresyon seviyelerinin, ikinci bir arzu edilen protein, buluşun kimerik/hibrit hücrelerinden eş zamanlı olarak eksprese edildiğinde geliştirilebildiği şaşırtıcı bir şekilde keşfedilmiştir. Dahası, iki hedef proteinin ekspresyon seviyeleri, buluşun kimerik/hibrit hücrelerinden üçüncü bir arzu
15 edilen proteinin eş zamanlı ekspresyonu ile geliştirilebilmektedir.

15

Dolayısıyla, mevcut buluş, hibrit hücrelerin çeşitliliği ve stabilitesi açısından öncesinde bilinen sistemler üzerinden önemli avantajlar sağlamaktadır. Buluşun hibrit hücreleri, iki benzer hücrenin veya aynı soyun iki hücresinin ve farklı bir soydan bir hücrenin füzyonu ile
20 üretilmektedir. Bu tarz bir hibrid, hibridizasyonda kullanılan çoğu hücre tipine doğru yönlendirilen bir fenotipe eğilim göstermektedir. Bu hibrit hücreler, dokuya özgü posttranslasyonel modifikasyonun, protein işlevselliği için önemli olduğunun bilindiği proteinleri eksprese etmek üzere spesifik olarak kullanılabilir. Örneğin, bir B hücresinden eksprese edildiğinde spesifik bir işlevsel posttranslasyonel modifikasyona sahip
25 olduğu bilinen bir sitokin, işlevsel posttranslasyonel modifikasyonu temin ettiği şekilde bir B hücresi soyundan türetilen en az iki hücreyi içeren bir hibrit hücreden daha etkili bir şekilde eksprese edilebilmektedir.

25

Proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu, doku veya hücre tipine özgü olabildiği için, buluşun hibrit hücrelerinin, özel bir hücre tipi veya fenotip ile ilişkili arzu edilen bir posttranslasyonel modifikasyonu veya arzu edilen işlevselliği sergileyen bir proteinin ekspresyonuna izin vermek üzere özel bir hücre tipi veya fenotip (spesifik CD markörlerinin mevcudiyeti ile kanıtlandığı üzere) zenginleştirilebildiği, teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından anlaşılacaktır.

30

Bir yapılandırmada, mevcut buluş, en az bir immortalize hücre kullanımını içeren hibrit hücreler ile ilgilidir. Fakat, mevcut buluşun ayrıca, immortalize olmayan, daha sonrasında Epstein-Barr virüsü (EBV), Simian virüsü 40 (SV40) T antijeni, adenovirüs E1A ve E1B ve insan papillomavirüsü (HPV) E6 ve E7 benzeri viral genlerin dahil edilmesi gibi bir in vitro dönüşüm süreci ile immortalize edilebilen hücrelerin füzyonu ile ilgili olduğu, teknikte tecrübe sahibi kişi tarafından anlaşılabilecektir. Alternatif olarak, immortalize olmayan hücreler, telomeraz ters transkriptaz proteinin (TERT) ekspresyonu vasıtasıyla immortalize edilebilmektedir. İmmortalize hücreler ayrıca onkojen ekspresyonunun modifiye edildiği hücrelerden türetilmektedir. İmmortalize hücreler ayrıca, kısıtlayıcı olmayacak şekilde immortalizeye yönelik mekanizmanın bulunduğu UV maruziyeti veya spontane dönüşüm dahil belirsiz büyüme kapasitesini içeren herhangi bir eylemden türetilmektedir.

Mevcut buluşun, bir yapılandırmada üç bireysel hücrenin füzyonu ile ilgili olduğu anlaşılabilecektir. Alternatif bir yapılandırmada, mevcut buluş, her bir popülasyonun, birden fazla özdeş hücre tipini içerdiği üç hücre popülasyonunun füzyonu ile ilgilidir. Teknikte tecrübe sahibi kişi, hücre popülasyonlarının füzyonun, toplu hücre kültürlerinde uygulanabildiğini anlayacaktır. Arzu edilen hibridize hücreler, hipoksantin aminopterin timidin (HAT) ortamı gibi seçici ortamlar vasıtasıyla teknikte iyi bilinen yöntemler vasıtasıyla tanımlanabilmekte ve izole edilebilmektedir. Alternatif olarak, kaynaşık halde olan hücreler, CD markörleri gibi spesifik hücre markörlerinin tanımlanması vasıtasıyla tanımlanabilmekte ve izole edilebilmektedir.

CD markörleri gibi markörlerin ekspresyonlarının temelinde hücrelerin izolasyonunun, ayrıca özel bir hücre tipi veya fenotipi için bir hücrenin zenginleştirilmesinin, floresan aktive hücre sıralama (FACS) yöntemleri gibi teknikte iyi bilinen yöntemler tarafından tamamlanabildiği anlaşılabilecektir.

Ayrıca, mevcut buluşun hücrelerinin, arzu edilen bir proteini kodlayan DNA ile stabil olarak veya geçici olarak transfekte edilebildiği anlaşılabilecektir. Bu stabil veya geçici olarak transfekte hücreler, transfeksiyonda kullanılan DNA'daki bir seçim bildirici geni içererek olduğu gibi teknik iyi bilinen yöntemler vasıtasıyla tanımlanabilmektedir. Bu tarz bildirici genler, transfekte hücrelerinin, örneğin dihidrofolat redüktaz (dhFr) geni gibi bir bileşiği eksik ortamda büyümesine izin veren genleri içerebilmektedir. Bildiriciler ayrıca lusiferaz geni veya

bir yeşil floresan protein (gfp) geni gibi transfekte hücrelerin görsel tanımlanmasını sağlayan genleri de içerebilmektedir. Alternatif olarak, bildirici gen, G418 gibi özel bir bileşiğe direnç sağlayabilmektedir. Bu tarz bildirici genler teknikte iyi bilinmektedir.

- 5 Tercih edilen bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücreleri, monoklonal antikorları eksprese etmek üzere kullanılabilmektedir. Geleneksel olarak, monoklonal antikor üretimi, bir fare gibi immünize bir hayvanın dalağından türetilen bir miyelom hücresinin ve bir B hücresinin füzyonu vasıtasıyla uygulanmıştır. Fakat, miyelom hücre instabilitesi ve özellikle genomik instabilite, arzu edilen antikorun yeterli ekspresyonundan daha azına neden olabilmektedir. Ek
- 10 olarak, hayvan hücreleri, hibridomların üretiminde kullanıldığı için, üretilen antikorlar, insan olmayan posttranslasyonel modifikasyonları sergilemektedir. Antikorlar, insan terapötikleri olarak kullanıldığında, insan olmayan posttranslasyonel modifikasyonlara sahip antikorlar önemli problemlere neden olabilmektedir. Bu problemler, antikorun, ayrıca immünojenitesinin azaltılmış efektör işlevini içerebilmektedir, bu da yeterli olmayan bir *in*
- 15 *vivo* yarı ömre ve bu şekilde *in vivo* verimliliğin azaltılmasına neden olmaktadır. Ayrıca, hibridlerin, bir miyelom hücre yokluğunda başarılı bir şekilde üretilmeyeceğini öneren kanıtlar mevcuttur. Buluşun hibrit hücreleri, stabil hibridlerin, bir miyelom hücre yokluğunda üretilbildiğini şaşırtıcı bir şekilde göstermiştir. Fakat, buluşun hibrit hücrelerinden eksprese edilen antikorları, hibridomlar tarafından üretilen monoklonal antikorların kullanımı ile ilişkili
- 20 problemleri ele almaktadır. Bu antikorlar, insanlaştırılmış posttranslasyonel modifikasyonları sergilemektedir ve işlevsel stabilite sergileyen hücrelerden eksprese edilmektedir.

Bir birinci yöne göre, mevcut buluş, aşağıdakinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır:

- 25 bir birinci hücre, burada söz konusu birinci hücre, bir kök hücre veya kabul edilmeyen bir progenitör hücreden türetilen bir hücredir;
- yaygın bir lenfoid progenitör hücreden türetilen bir ikinci hücre; ve
- yaygın bir lenfoid progenitör hücreden türetilen bir üçüncü hücre,
- 30 ve burada, söz konusu birinci hücre, bir miyelom hücre değildir.

Bir yapılandırmada, söz konusu ikinci hücre, B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir.

Bir diğer yapılandırmada, söz konusu ikinci hücre, T lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, T lenfoid soyundan türetilmektedir.

- 5 Bir diğer yapılandırmada, söz konusu ikinci hücre, B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, T lenfoid soyundan türetilmektedir.

Buluşa göre, söz konusu birinci hücre, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen bir hücredir. Bu şekilde, buluşun, yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya bir kök hücrenin
10 hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi ve iki B lenfoid hücre veya iki T lenfoid hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücre veya bir kök hücre, bir B lenfoid hücre ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

- 15 Tercihen yaygın bir miyeloid profenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofildir. Bu şekilde, buluşun, bir miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofilin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca,
20 miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofilin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

- Tercihen yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, aşağıdaki CD
25 antijenleri CD16, CD15 veya CD14 arasından en az birisini sergilemektedir. Bu şekilde, buluşun, aşağıdaki CD antijenleri CD16, CD15 veya CD14 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca CD antijenleri CD16, CD15 veya CD14 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid
30 progenitör hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

Bir yapılandırmada, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir monositir. Bu şekilde, buluş, bir monositin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid

hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, bir monositin, bir B lenfoid hücresinin ve bir T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

- 5 Bir diğer yapılandırmada, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir primer miyelomonositik progenitördür. Bu şekilde, buluş, bir primer miyelomonositik progenitörün ve iki B lenfoid hücresinin veya iki T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, bir primer miyelomonositik progenitörün, bir B lenfoid hücresinin ve bir T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi
- 10 sağlamaktadır.

- Bir yapılandırmada, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir immortalize hücredir. Bu şekilde, buluşun, bir miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofil arasından seçilen bir immortalize
- 15 hücresinin ve iki B lenfoid hücresinin veya iki T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca, miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofil arasından seçilen bir immortalize hücresinin, bir B lenfoid hücresinin ve bir T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

20

- Bir diğer yapılandırmada, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, dalak, periferik kan, göbek kordonu kanı veya kemik iliği arasından türetilmektedir. Bu şekilde, buluşun, dalak, periferik kan, göbek kordonu kanı veya kemik iliğinden türetilen yaygın bir miyeloid progenitör hücresinin ve iki B lenfoid hücresinin veya iki T lenfoid hücresinin
- 25 hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca, dalak, periferik kan, göbek kordonu kanı veya kemik iliğinden türetilen yaygın bir miyeloid progenitör hücresinin, bir B lenfoid hücresinin ve bir T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

- 30 Bir diğer yapılandırmada, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, bir ön-B hücresi, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B hücresi veya bir efektör B hücresidir. Bu şekilde, buluşun, bir ön-B hücresi, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B hücresi veya bir efektör B hücresi arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücresinin veya bir kök hücresinin ve iki B lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi

sağladığı anlaşılmaktadır. Bu şekilde, buluş, bir ön-B hücresi, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B hücresi veya bir efektör B hücresi ve bir T lenfoid hücre arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

5

Bir yapılandırmada, söz konusu efektör B hücresi, bir antijen deneyimli B hücre veya bir plazma hücresidir. Bu şekilde, buluş, bir antijen deneyimli B hücresi veya bir plazma hücresinden seçilen yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya bir kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir antijen deneyimli B hücresinin veya bir plazma hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

10

Bir yapılandırmada, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, CD antijenleri CD19, CD20, CD72 veya CD5 arasından en az birisini sergilemektedir. Bu şekilde, buluş, CD antijenleri CD19, CD20, CD72 veya CD5 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin ve kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş, CD antijenleri CD19, CD20, CD72 veya CD5 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin ve kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

20

Bir yapılandırmada, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, bir ön T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresidir. Bu şekilde, buluş, bir ön-T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresi arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş, bir ön-T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresi arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve bir T lenfoid hücrelerinin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

25

30

Bir yapılandırmada, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, CD antijenleri CD3, CD4, CD5 veya CD8 arasından en az birisini sergilemektedir. Bu şekilde, buluş, CD antijenleri

CD3, CD4, CD5 veya CD8 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin, bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, CD antijenleri CD3, CD4, CD5 veya CD8 arasından en az birisini sergileyen T hücrelerinden yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

Bir yapılandırmada, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, immortalize edilmiş bir hücredir. Bu şekilde, buluş, en az birisinin bir immortal hücre olabildiği yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, bir immortal B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

Bir yapılandırmada, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, bir immortalize hücredir. Bu şekilde, buluş, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir immortal T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

Bir yapılandırmada, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, lenfoid dokudan türetilmektedir. Bu şekilde, buluş, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, lenfoid dokudan türetilen bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

Bir yapılandırmada, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, bir lenfoid hücredir. Bu şekilde, buluş, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, B lenfoid hücre dokusunun ve lenfoid dokusundan bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

Buluşun hibrit hücrelerine dahil edilen B veya T lenfoid hücrelerinin, lenfoid dokusundan türetildiği yerde, söz konusu lenfoid doku tercihen periferik kan, kordon kanı, dalak, kemik iliği, timüs, bademcikler, adenoidler ve bölgesel lenf bezinden seçilmektedir.

Bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücresinin oluşumunda bulunan en az bir hücre, bir insan hücresidir. Ayrıca bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücresinin, en az bir fare hücrelerini içerebildiği anlaşılmaktadır.

5

Bir yapılandırmada, yaygın bir miyeloid progenitör hücrelerinden türetilen söz konusu hücre, bir K562 hücresidir. Bu şekilde, buluşun, bir K562 hücresinin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, bir K562 hücresinin, bir immortal B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

10

Bir yapılandırmada, söz konusu ikinci hücre veya söz konusu üçüncü hücre, bir WIL2-NS hücresidir veya bir MOLT4 hücresidir. Bu şekilde, buluşun, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir WIL2-NS hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir MOLT4 hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

15

Bir yapılandırmada, söz konusu birinci hücre, bir K562 hücresidir, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir MOLT4 hücresidir.

20

Bir diğer yapılandırmada, söz konusu birinci hücre, bir K562 hücresidir, söz konusu ikinci hücre, bir primer B hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

Bir diğer yapılandırmada, söz konusu birinci hücre, bir primer insan monosit, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

25

Bir diğer yapılandırmada, söz konusu birinci hücre, bir primer insan miyelomonosit progenitördür, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer insan T hücresidir.

30

Bir diğer yapılandırmada, söz konusu birinci hücre, bir K562 hücresidir, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu birinci hücre, bir primer monosit, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu     nc  hücre, bir WIL2-NS hücresidir.

5 Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu birinci hücre, bir primer fare monosit, söz konusu ikinci hücre, bir SP2 hücresidir ve söz konusu     nc  hücre, bir primer fare T hücresidir.

Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu birinci hücre, bir primer fare monosit, söz konusu ikinci hücre, bir SP2 hücresidir ve söz konusu     nc  hücre, bir SP2 hücresidir.

10 Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu birinci hücre, bir primer insan veya fare monosit, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu     nc  hücre, bir SP2 hücresidir.

Bir yapılandır mada, buluşun hibrit hücresi, arzu edilen bir proteini eksprese etmektedir. Bir diğ er yapılandır mada, buluşun hibrit hücresi, arzu edilen bir proteinden fazlasını eksprese etmektedir. Belirli bir yapılandır mada, buluşun hibrit hücresi, iki arzu edilen proteini eksprese etmektedir. Diğ er yapılandırmalarda, buluşun hibrit hücresi,    arzu edilen proteini eksprese etmektedir. Bir yapılandır mada, söz konusu arzu edilen protein, bir endojen proteindir ve birden fazla arzu edilen proteinin eksprese edildiği yerde, arzu edilen proteinler arasından en az birisi, bir endojen proteindir. Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu protein, bir rekombinant proteindir ve birden fazla arzu edilen proteinin ifade edildiği yerde, arzu edilen proteinler arasından en az birisi, bir rekombinant proteindir. Tercihen söz konusu protein, örneğin bir koloni uyarıcı faktör veya bir interlökin gibi bir sitokindir. Bir yapılandır mada, söz konusu protein, GM-CSF'dir. Bir yapılandır mada, söz konusu protein, interlökin 2'dir. Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu protein, bir reseptör veya bunun bir fragmanıdır. Bir yapılandır mada, söz konusu protein,     lebilir bir reseptördür. Bir yapılandır mada, söz konusu protein, bir imm noglobulindir.

30 Bir yapılandır mada, söz konusu protein, bir insan IL-4 reseptör alfa zinciridir. Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu protein, IgM'dir. Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu protein, IgG'dir. Bir diğ er yapılandır mada, söz konusu protein, CD54'tür.

Buluşun hibrit hücresinin, birden fazla arzu edilen proteini eksprese ettiği bir yapılandır mada, tercihen arzu edilen proteinler, bir sitokin, bir koloni uyarıcı faktör, bir interlökin veya bir reseptör veya bunun bir fragmanı arasından seçilmektedir. Belirli bir yapılandır mada, arzu

edilen proteinler, IgM ve belirgin olarak insan çözülebilir IgM gibi bir immünoglobulin; örneğin bir interlökin ve belirgin olarak interlökin-2 (IL-2) ve daha belirgin olarak insan IL-2 gibi bir sitokin; ve/veya belirgin olarak bir interlökin reseptörü ve daha belirgin olarak bir insan interlökin reseptörü ve hatta daha belirgin olarak insan interlökin-4 reseptör alfa (IL-4Ra) gibi bir reseptördür.

Teknikte tecrübe sahibi kişiler, buluşun hibrit hücrelerinin, ne özel arzu edilen proteinlerinin ekspresyonuna ne de bunların belirli sayıda proteinlerinin ekspresyonuna kısıtlı olmadığını anlayacaktır. Dahası, buluşun hibrit hücrelerinden arzu edilen proteinlerin eş zamanlı olarak eksprese edilmesinin, arzu edilen protein ekspresyon seviyelerinin geliştirilmesini sağlayabildiği teknikte tecrübe sahibi kişiler tarafından anlaşılabilecektir.

Bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücrelerini oluşturmak üzere kullanılan söz konusu hibridizasyona, elektrik araçları vasıtasıyla ulaşılmaktadır. Bir diğer yapılandırmada, buluşun hibrit hücrelerini oluşturmak üzere kullanılan söz konusu hibridizasyona, kimyasal araçlar vasıtasıyla ulaşılmaktadır.

Bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücresi, ilgili bir proteini eksprese eden bir hücre ile hibridize edilmektedir.

Belirli bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücresi, CD25 antijeni sergileyen bir B lenfosit ile hibridize edilmektedir.

Özellikle tercih edilen bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücresi, CD25 antijeni sergilemektedir ve bir immünoglobulini eksprese etmektedir. Bir diğer yapılandırmada, buluşun hibrit hücresi, CD25 antijeni sergileyen bir B lenfosit ile hibridize edilmektedir ve elde edilen hücre, bir immünoglobulini eksprese etmektedir.

Bir yapılandırmada, buluşun hibrit hücrelerini oluşturmak üzere kullanılan söz konusu hibridizasyon, üç bireysel hücrenin hibridize edilmesi ile uygulanmaktadır.

Bir diğer yapılandırmada, buluşun hibrit hücrelerini oluşturmak üzere kullanılan söz konusu hibridizasyon, her bir söz konusu popülasyonun, birden fazla özdeş hücre tipini veya fenotipleri içerdiği üç hücre popülasyonu kullanılarak uygulanmaktadır.

Bir yapılandırmada, buluşun söz konusu hibrit hücresi, arzu edilen posttranslasyonel modifikasyonu veya arzu edilen işlevselliği sergileyen bir protein ekspresyonuna izin vermek üzere belirli bir hücre tipi belirleyici markör için zenginleştirilmektedir.

5

Bir diğer yönde, buluş, bir proteinin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır, söz konusu yöntem, buluşa göre bir hibrit hücrede bir proteinin eksprese edilmesi adımını içermektedir.

10 Bir diğer yönde, buluş, buluşa göre bir hibrit hücrede üretildiğinde bir proteini sağlamaktadır.

Bir diğer yönde, buluş, buluşa göre bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır, burada söz konusu yöntem, aşağıdakilerin hibridize edilmesi adımını içermektedir:

15

bir birinci hücre, burada söz konusu birinci hücre, bir kök hücre veya kabul edilmeyen bir progenitör hücreden türetilen bir hücredir;

yaygın bir lenfoid progenitör hücreden türetilen bir ikinci hücre; ve

yaygın bir lenfoid progenitör hücreden türetilen bir üçüncü hücre,

20

ve burada söz konusu birinci hücre, bir miyelom hücre değildir.

Buluşun yönteminin bir örneğinde, söz konusu ikinci hücre, B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir.

25

Buluşun yönteminin bir örneğinde, söz konusu ikinci hücre, T lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, T lenfoid soyundan türetilmektedir.

30

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu ikinci hücre, B lenfoid soyundan türetilen bir hücredir ve söz konusu üçüncü hücre, T lenfoid soyundan türetilen bir hücredir.

Tercihen, söz konusu birinci hücre, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen bir hücredir. Bu şekilde, buluşun, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin

üretilmesine yönelik yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile üretilen bir hibrit hücreyi sağlamaktadır.

- 5 Tercihen yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofildir. Bu şekilde, buluşun, bir miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofilin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağladığı
- 10 anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca, miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofilin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

- Tercihen yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, aşağıdaki CD
- 15 antijenleri CD16, CD15 veya CD14 arasından en az birisini sergilemektedir. Bu şekilde, buluşun, CD antijenleri CD16, CD15 veya CD14 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca CD antijenleri CD16, CD15 veya CD14 arasından en az birisini
- 20 sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

- Bir örnekte, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir
- 25 monositir. Bu şekilde, buluş, bir monositin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, bir monosit, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

- 30 Bir diğer örnekte, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir primer miyelomonositik progenitördür. Bu şekilde, buluş, bir primer miyelomonositik progenitörün ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, bir primer

miyelomonositik progenitörün, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir
5 immortalize hücredir. Bu şekilde, buluşun, bir miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya bazofil arasından seçilen bir immortalize hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca, miyelomonositik progenitör, monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, dendritik hücre veya
10 bazofilin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir diğer örnekte, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, dalak, periferik kan, göbek kordonu kanı veya kemik iliğinden türetilmektedir. Bu şekilde, buluşun,
15 dalak, periferik kan, göbek kordonu kanı veya kemik iliğinden türetilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin veya iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş ayrıca, dalak, periferik kan, göbek kordonu kanı veya kemik iliğinden türetilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir
20 hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir diğer örnekte, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, bir ön-B hücresi, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B hücresi veya bir efektör B hücresidir. Bu şekilde, buluşun, bir ön-B hücresi, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B
25 hücresi veya bir efektör B hücresi arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemin sağladığı anlaşılmaktadır. Buluş, bir ön-B hücresi, bir immatür B hücresi, bir naif B hücresi, bir aktive B hücresi veya bir efektör B hücresi ve bir T lenfoid hücre arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin
30 ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, söz konusu efektör B hücresi, bir antijen deneyimli B hücresi veya bir plazma hücresidir. Bu şekilde, buluş, bir antijen deneyimli B hücresi veya bir plazma hücresinden

seçilen yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir antijen deneyimli B hücrenin veya bir plazma hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, CD antijenleri CD19, CD20, CD72 veya CD5 arasından en az birisini sergilemektedir. Bu şekilde, buluş, CD antijenleri CD19, CD20, CD72 veya CD5 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş, CD antijenleri CD19, CD20, CD72 veya CD5 ve bir T lenfoid hücre arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, bir iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, bir ön T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresidir. Bu şekilde, buluş, bir ön-T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresi arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş, bir ön-T hücresi, bir immatür T hücresi, bir naif T hücresi, bir aktive T hücresi veya bir efektör T hücresi arasından seçilen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, CD antijenleri CD3, CD4, CD5 veya CD8 arasından en az birisini sergilemektedir. Bu şekilde, buluş, CD antijenleri CD3, CD4, CD5 veya CD8 arasından en az birisini sergileyen yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, CD antijenleri CD3, CD4, CD5 veya CD8 arasından en az birisini sergileyen T hücrelerinden yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, immortalize edilmiş bir hücredir. Bu şekilde, buluş, en az birisinin bir immortal hücre olabildiği yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir immortal B hücresinin veya bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, immortalize edilmiş bir hücredir. Bu şekilde, buluş, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir immortal T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, B lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, lenfoid dokudan türetilmektedir. Bu şekilde, buluş, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin ve lenfoid dokudan türetilen iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, lenfoid dokusundan türetilen B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, T lenfoid soyundan türetilen söz konusu hücre, lenfoid dokudan türetilmektedir. Bu şekilde, buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid profenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, lenfoid dokusundan türetilen B lenfoid hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Buluşun bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik yöntemde dahil edilen B veya T lenfoid hücrelerinin, lenfoid dokusundan türetildiği yerde, söz konusu lenfoid doku tercihen periferik kan, kordon kanı, dalak, kemik iliği, timüs, bademcikler, adenoidler ve bölgesel lenf bezinden seçilmektedir.

Bir yapılandırmada, buluşun bir hibrit hücresinin üretilmesine yönelik yöntemde bulunan en az bir hücre, bir insan hücresidir. Ayrıca bir yapılandırmada, buluşun bir hibrit hücresinin üretilmesine yönelik yöntemin, en az bir fare hücrelerini içerebildiği anlaşılmaktadır.

Bir örnekte, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden türetilen söz konusu hücre, bir K562 hücresidir. Bu şekilde, buluşun, bir K562 hücresinin ve iki B lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücresinin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, bir K562 hücresinin, bir immortal B lenfoid hücresinin ve bir T lenfoid hücresinin hibridizasyonu ile bir hibrit hücresinin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, söz konusu ikinci hücre veya söz konusu üçüncü hücre, bir WIL2-NS hücresi veya bir MOLT4 hücresidir. Bu şekilde, buluşun, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya bir kök hücrenin, bir WIL2-NS hücrenin ve bir T lenfoid hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır. Buluş ayrıca, yaygın bir miyeloid progenitör hücrenin veya kök hücrenin, bir B lenfoid hücrenin ve bir MOLT4 hücrenin hibridizasyonu ile bir hibrit hücrenin üretilmesine yönelik bir yöntemi sağlamaktadır.

Bir örnekte, söz konusu birinci hücre, bir K562 hücresidir, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir MOLT4 hücresidir.

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir K562 hücresidir, söz konusu ikinci hücre, bir primer B hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir primer insan monosit, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir primer insan miyelomonositik progenitördür, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir K562 hücresidir, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer T hücresidir.

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir primer insan monosittir, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir WIL2-NS hücresidir.

- 5 Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir primer fare monosittir, söz konusu ikinci hücre, bir SP2 hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir primer fare T hücresidir. Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir primer fare monosittir, söz konusu ikinci hücre, bir SP2 hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir SP2 hücresidir.

10

Buluşun yönteminin bir diğer örneğinde, söz konusu birinci hücre, bir primer insan veya fare monosittir, söz konusu ikinci hücre, bir WIL2-NS hücresidir ve söz konusu üçüncü hücre, bir SP2 hücresidir.

15 TANIMLAR

Buluşun bağlamında, “içermektedir”, “içeren” ve benzeri sözcükler, münhasır veya ayrıntılı bir algının dışında kapsayıcı bir algıda; bir başka ifadeyle, “kısıtlayıcı olmayacak şekilde kapsayan” algısında yorumlanacaktır.

20

Hibrit hücre

- 25 Bir hibrit hücre, birden fazla genomdan (zigotlardan ve türevlerinden başka) bileşenleri içeren bir hücredir. Örneğin iki veya ikiden fazla biyolojik hücrenin (ana hücreler) bir somatik hücre hibridizasyonundan (veya bir tüm hücre hibridizasyonundan) oluşturulan bir hücredir. Ana hücreler, aynı soydan (veya türlerden) veya farklı bir soydan (veya türlerden) elde edilebilmektedir. Aynı soydan ve türlerden oluşturulan hibrit hücre, oto-hibrit olarak adlandırılırken, farklı soyalardan oluşturulan, bir hetero-hibrit olarak adlandırılmaktadır.

30 *Kimerik hücre*

Bir kimerik hücre, iki veya ikiden fazla farklı türden kaynaklanan bir genoma sahip yapay olarak üretilmiş bir hibrit hücredir.

Çapraz soy hibrit hücre

Bir çapraz soy hibrit hücre, farklı hücre soylarından türetilen iki veya ikiden fazla farklı türden kaynaklanan bir genoma sahip yapay olarak üretilmiş bir hibrit hücredir.

- 5 Hematopoietik hücreler, iki ana soya ayrılmaktadır: lenfoid (T hücreler, B hücreler ve NK hücreler) ve miyeloid (monositler ve makrofajlar, nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller, eritrositler, megakaryositler/trombositler, dendritik hücreler).

Tri-hibrit hücre

10

Bir tri-hibrit hücre, üç hücreden kaynaklanan bir genoma sahip yapay olarak üretilmiş bir hibrit hücredir.

Stabil

15

Bir hücre ifade edildiğinde, “stabil” terimi, mevcut bir büyüme veya üretkenlik parametresinin tutarlılığını veya artan jenerasyon sayısı ile hücre dizisinin ürün özelliklerinin tutarlılığını sergileyen bir hücre kapasitesini tanımlamaktadır. Bir stabil transfektanta referansla kullanıldığında, nispeten sabit bir seviyede bir transgeni büyük ölçüde süresiz olarak eksprese eden bir hücre dizisini tanımlamaktadır.

20

Somatik hücre hibridizasyonu

Mevcut başvurunun bağlamında, “somatik hücre hibridizasyonu” terimi, hücrelerin plazma-
25 membranlarının, iyi bir temasta, indüklendiği, temas noktasında ana hücrelerinin plazma membranlarının tersine çevrilebilir bir kopmasının eş zamanlı olarak indüklendiği ve her bir ana hücrenin varlıklarının veya organellerinin, yeni oluşturulmuş tek hücre zarfı içerisinde birleştirildiği şekilde tek bir canlı hücrenin, iki veya ikiden fazla diploid (non-gamet) hücreden (ana hücreden) oluşturulduğu bir süreci ifade etmektedir. Yeni oluşturulan tek
30 hücre, bir hibridize hücre veya hibrit hücre olarak adlandırılmaktadır.

Kök hücre

“Kök hücre” terimi, mitoz ile bölünme ve farklı hücre tipinde bir aralığa gelişme kapasitesi ile özelleştirilmemiş bir hücreyi ifade etmektedir. Kök hücreler, enbriyonik kök hücreleri, umbilikal kordondan türetilen “yetişkin” kök hücrelerini veya yetişkinlerden türetilen kök hücreleri içerebilmektedir. Kök hücreler, tüm hücre tiplerine, bir başka ifadeyle insan totipotent hücrelere farklılaşmaya yönelik kısıtlı olmayan bir kapasiteye sahip olan, insan olmayan hücreleri içermektedir. Kök hücreler, örneğin pluripotent, multipotent, oligopotent veya unipotent kök hücreler gibi özelleştirilmiş hücrelere farklılaşım kapasitelerinde kısıtlı olan hücreleri içerebilmektedir.

10 *İmmortalize hücre*

“İmmortalize hücre” terimi, belirsiz büyüme kapasitesine sahip bir hücreyi ifade etmektedir. Bir immortalize hücrenin, bir *in vivo* malignite veya insan olmayan embriyodan türetililebileceği anlaşılabacaktır. Alternatif olarak, bir immortalize hücre, belirsiz büyüme kapasitesini indükleyen bir hücrede bir eylemi uygulayarak türetililebilmektedir. Bu eylemler, örneğin *in vitro* dönüşüm süreçlerini, örneğin Epstein-Barr virüsü (EBV), Simian virüs 40 (SV40) T antijeni, adenovirus E1A ve E1B ve insan papillomavirüs (HPV) E6 ve E7 gibi viral genlerin dahil edilmesini içerebilmektedir. Alternatif olarak, bir immortalize hücre, telomeraz ters transkriptaz proteinin (TERT) ekspresyonu veya diğer araçlar vasıtasıyla bir hücreden türetililebilmektedir. İmmortalize hücreler ayrıca onkojen ekspresyonunun modifiye edildiği hücrelerden türetililebilmektedir. İmmortalize hücreler ayrıca, kısıtlayıcı olmayacak şekilde immortaliteye yönelik mekanizmanın bilinmediği UV maruziyeti veya spontane dönüşüm dahil belirsiz büyüme kapasitesini içeren herhangi bir eylemden türetililebilmektedir.

25 *Miyelom hücre*

“Miyelom hücre” terimi, bir plazma hücresinin bir malignitesini ifade etmektedir.

Hibridom

30

“Hibridom” terimi, bir immünize hayvanın dalağından türetilen bir miyelom hücrenin ve bir B hücresinin hibridizasyonu ile üretilen bir hücreyi ifade etmektedir. Hibridomlar, monoklonal antikörleri üretme kapasitesine sahip immortalize hücrelerdir.

Adanmış olmayan progenitör hücre

- 5 “Adanmış olmayan progenitör hücre” terimi, herhangi bir spesifik soya sunulmadan, sadece kısıtlı türde hücreye farklılaşabilen, fakat kendisini artık yenileyemeyen bir kök hücrenin bir erken soyunu ifade etmektedir.

Yaygın miyeloid progenitör hücre

- 10 Yaygın bir miyeloid progenitör hücre, miyeloid soya kısıtlı olan ve megakaryosit/eritrosit veya granülosit/makrofaj progenitörlerine sebep verebilen, fakat lenfoid hücreler dahil olmadığı bir hematopoietik kök hücrenin bir progenidir.

Yaygın lenfoid progenitör

- 15 Yaygın bir miyeloid progenitör hücre, lenfoid soya kısıtlı olan ve B, T ve doğal öldürücü hücrelere sebep veren, fakat miyeloid hücrelerin dahil olmadığı hematopoietik kök hücrelerin bir progenidir.

B lenfoid soydan türetilmiş hücre

- 20 Bir B lenfoid soydan türetilmiş hücre, herhangi bir tipte B hücresi olmak üzere B soyundan olması zorunluluğundan sonra yaygın bir lenfoid progenitörden kaynaklanan herhangi bir hücredir.

25 *T lenfoid soydan türetilmiş hücre*

- Bir T lenfoid soydan türetilmiş hücre, herhangi bir tipte T hücresi olmak üzere T soyundan olması zorunluluğundan sonra yaygın bir lenfoid progenitörden kaynaklanan herhangi bir hücredir.

30

Granülosit-makrofaj progenitör hücre

Bir granülosit-makrofaj progenitör hücre, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden kaynaklanan ve granülosit ve monosit soyalara sunulan, fakat megakaryositik ve eritroid soyalara sunulmayan bir progenitör hücredir.

5 *Megakaryosit-eritroid progenitör hücre*

Bir megakaryosit-eritroid progenitör hücre, yaygın bir miyeloid progenitör hücreden kaynaklanan ve megakaryositik ve eritroid soyalara sunulan, fakat granülosit ve monosit soyalara sunulmayan bir progenitör hücredir.

10

Ön-B hücresi

Bir ön B hücresi, membrana bağlı IgM'nin ağır zinciri, taşıyıcı hafif zincir ile eksprese edildiğindeki aşamada geliştirici bir B hücresidir.

15

Immatür B hücresi

Immatür bir B hücresi, antikorun rekombinasyon aşamasında, VJ lokuslarının, L zincirlerine yeniden düzenlendiği ve VDJ'nin, H zincirlerine yeniden düzenlendiği, IgM reseptör ekspresyonunun sergilendiği kemik iliğinde geliştirici bir B hücresini ifade etmektedir.

20

Naif B hücresi

Bir naif B hücresi, yüzey immünoglobulininin rastgele gen yeniden düzenlemesi vasıtasıyla kemik iliğinde farklılaşan ve olgunlaşan, fakat henüz periferde kognat antijen ile karşılaşmamış olan bir olgun B hücresidir.

25

Aktive B hücresi

BCR vasıtasıyla antijen tanımlaması vasıtasıyla periferde kognat antijeni ile karşılaşan olgun B hücresinin bir tipi, klonal proliferasyonun ve bir T-bağımlı veya bağımsız şekilde plazma hücrelerine terminal farklılaşımın bir kombinasyonuna neden olmaktadır.

30

Efektör B hücresi

Bir efektör B hücresi genel olarak özel bir antijene, ayrıca immün sistemlerin diğer hücrelerine bağlanmak üzere sitokinlerin fazlalığına özgü antikorları salgılayan kısa ömürlü B hücresinin bir tipi olan bir antikor salgılayıcı plazma hücresi ile uyumludur.

5

Belek B hücresi

Bir bellek B hücreleri, primer immün yanıt esnasında karşılaşılan antijene özgü olan ve aynı antijene ikinci bir maruziyetten sonra hızlı yanıt verebilen aktive bir B hücresinden oluşturulan bir uzun ömürlü B hücresidir.

10

Plazma hücresi

Bir plazma hücresi, $CD4^+$ lenfosit (Th hücreleri) ile uyarımdan sonra bir B hücresinden farklılaşan ve büyük antikor miktarlarını salgılayan immün sisteminin bir terminal mitotik sonrası, kısa ömürlü hücresidir.

15

Ön-T hücresi,

Bir ön-T Hücresi, VbDbJb tam olduğunda ve TCR beta zinciri, bir çift negatif ($CD4^-CD8^-$) T hücresinde ($CD3^+$) eksprese edildiğindeki aşamada gelişen bir T hücresidir.

20

Immatür T hücresi

Immatür bir T hücresi, kemik iliğinden timusa geçiş yapan, fakat TCR'nin yeniden düzenlenmesini veya kendi majör histokompatibilite kompleksin (MHC) moleküllerinin bağlamında sunulan kendi peptitlerine TCR bağlama kapasitesi için seçimini tamamlamamış olan veya sırasıyla kesin olarak MHC sınıfı I veya II moleküllerine karşı bir hücrenin TCR özgüllüğü ile ilişkili olan T öldürücü veya T yardımcı soyalara sunuma tabi olan bir gelişen T hücresidir. Soyun sunumu, ko-reseptör molekülleri olan CD8 veya CD4 arasından birisinin ekspresyon kaybı ile fenotipik olarak işaretlenmektedir.

25

30

Naif T hücresi

Kemik iliğinde farklılaşan ve TCR'nin yeniden düzenlenmesi ve ko-reseptör molekülleri arasından birisinin kaybı ile timusta merkezi seçimin pozitif ve negatif süreçlere tabi olan, fakat periferde kognat antijenle henüz karşılaşmamış olan bir olgun T hücresidir.

5 *Aktive T hücresi*

Aktive bir T hücresi, sırasıyla antijen sunan hücrelerde majör histokompatibilite kompleksi peptidi (peptit: MHC kompleksi) ve B7 aile elemanları ile hücre yüzeyinde TCR ve CD28'in vasıtasıyla, antijene özgü efektör T hücresi olma yolunda ayarlanan bir T hücresidir.

10

Efektör T hücresi

Bir efektör T hücresi, hücre için uygun peptit:MHC kompleksini taşıyan hücrelerle temasa hemen yanıt verebilen kısa ömürlü T lenfositin bir tipidir.

15

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

- | | |
|---------|--|
| Şekil 1 | Tanımlama ve kısa saflaştırılmış CD71 ⁺ K562 hücreleri. |
| Şekil 2 | CD15 ve CD71 pozitif K562 hücrelerinin FACS profilleri; (a) orijinal CD71 ile zenginleştirilmiş K562 hücre popülasyonunun yaklaşık olarak %18'i, CD15 (R1 bölgesi) için pozitif olmuştur ve (b) kültürde iki aydan sonra CD15 pozitif K562 hücrelerinin yeniden analizi. |
| Şekil 3 | CD34 ⁺ AML mononükleer hücrelerde CD15'in ekspresyonu. |
| Şekil 4 | CD14 manyetik tanecikler (MACS) ile izole edilen CD14 ⁺ hücrelerinin farklı popülasyonları için CD16'nın ve sınıflandırıcı kapıların bir FACS profili. |
| Şekil 5 | Fare anti insan CD19 ve fare anti insan CD5 antikorları ile boyanan umbilikal kordon kanı mononükleer hücrelerin bir FACS profili. |
| Şekil 6 | Fare anti insan CD3 ve fare anti insan CD5 antikorları ile boyanan mononükleer umbilikal kordon kanı hücrelerinin bir FACS profili. |
| Şekil 7 | Fare anti insan CD20 ve fare anti insan CD72 antikorları ile boyanan kemik iliği mononükleer hücrelerinin bir FACS profili. |
| Şekil 8 | CD3 ve CD54 için tonsiler mononükleer hücrelerinin bir tipik FACS profili. |
| Şekil 9 | IgM ve IgG pozitif kültürlü lenfositlerin tanımlanması; (A) 5 günlük kültürden sonra, CD19 ⁺ hücrelerinin %18'i, IgM pozitif olmuştur ve %1'i, hücre |

kültüründe tespit edilebilir IgG'ye sahip olmuştur; ve (B) 10 günlük kültürden sonra, IgM pozitif lenfositlerin yüzdesi, %2'ye azaltılmıştır ve IgG pozitif hücrelerinin yüzdesi, %15'e arttırılmıştır.

Şekil 10 Miyeloid ve lenfosit kaynaklarının onkojeni ile KMW tri-hibrit hücrelerinde CD ekspresyonlarının FACS profilleri.

Şekil 11 Primer karışık dalak lenfositlerde CD4 ve CD19'un ekspresyonu, sınıflandırılmış CD4 ve CD19'un popülasyonları ve elde edilen bir KBT tri-hibrit hücre dizisi; (a) primer dalak lenfositlerinde CD4 ve CD19'un ekspresyonu, (b) sınıflandırılmış CD19⁺ hücrelerin (%98.1) saflık profili; (c) sınıflandırılmış CD4⁺ hücrelerinin saflık profili (%96.8); (d) tri-hibrit hücrelerinde CD19 ve CD4'ün ko-ekspresyonu. Tri-hibrit hücre popülasyonunun %99'undan fazlası, B ve T hücreleri için markörleri ko-eksprese etmektedir.

Şekil 12 İmmortal miyeloidden türetilen bir KBT tri-hibride ve 2 primer antijen deneyimli lenfoid hücrede CD19, CD3 ve CD5'in ekspresyonları; (a) KBT tri-hibrit hücre yüzeyinde CD19 ve CD5'in ekspresyonu, (b) KBT tri-hibride CD3 ve CD5'in ekspresyonu.

Şekil 13 İmmortal miyeloidden türetilen KBT tri-hibrit hücrelerde ve kemik iliği ve timustan türetilen 2 primer lenfoid hücrelerde CD4, CD8, CD72 ve CD20'nin yüzey ekspresyonu; (a) CD4 ve CD8'in ekspresyonu, (b) CD4 ve CD72'nin ekspresyonu, (c) CD20 ve CD8'in ekspresyonu.

Şekil 14 Lenfoid kaynağın onkojeni ile bir WTM tri-hibrit çizgisinde ve primer hücrelerden CD4 ve CD14'te CD ekspresyonlarının FACS profilleri; (a) CD4 ekspresyonunun (CD19⁺ CD4^H) yüksek seviyesine sahip bir CD19 hücre popülasyonu ve CD4 ekspresyonunun (CD19⁺ CD4^L) düşük seviyesine sahip bir diğer popülasyonu sergileyen tri-hibrit hücrelerde CD19 ve CD4'ün ko-ekspresyonu; (b) CD14'ün (CD4^HCD14^L; CD4^HCD14^H; CD4^LCD14^H) yüksek veya düşük ekspresyonuna bağlı olarak hücre popülasyonunun diğer heterojenitesini sergileyen aynı CD19 pozitif tri-hibrit popülasyonunda CD4 ve CD14'ün ko-ekspresyonu.

Şekil 15 Lenfoid kaynağı WIL2-NS, antijen deneyimli T hücrelerinden türetilen CD5 ve primer monosit hücrelerinden türetilen CD14'ün onkojeni ile WTM tri-hibrit hücrelerinde CD ekspresyonlarının tipik FACS profilleri.

- Şekil 16 Lenfoid kaynağı WIL2-NS, sitotoksik T hücresinden türetilen CD8 ve primer monosit hücrelerinden türetilen CD14'ün onkojeni ile WTM tri-hibrit hücrelerinde CD ekspresyonlarının FACS profilleri.
- 5 Şekil 17 Çift CD pozitif T hücrelerinden türetilen WTM tri-hibritlerinde CD4 ve CD8 ko-ekspresyonunun bir FACS profili.
- Şekil 18 Miyelomonositik progenitör hücrelerinden kaynaklanan WTM tri-hibrit hücrelerinin yüzeyinde CD ekspresyonları; (A) CD19, CD4 ve CD15 ile üç renkli boyama ve (B) miyelomonositik progenitörden türetilen CD34 ve CD15 ve efektör T hücrelerinden türetilen CD4'ün üç renkli boyama.
- 10 Şekil 19 CD4⁺ efektör T hücrelerinden türetilen KWT tri-hibrit hücrelerinin soya özgü markörlerinin ekspresyonu.
- Şekil 20 Çift pozitif CD4⁺CD8⁺ T hücrelerinden türetilen KWT tri-hibrit hücrelerinin soya özgü markörlerinin ekspresyonları.
- 15 Şekil 21 CD5⁺ antijen deneyimli T hücrelerinden türetilen KWT tri-hibrit hücrelerinin soya özgü markörlerinin bir ekspresyonu.
- Şekil 22 Her birisinin lenfoid onkojeni ve bir primer monositik hücreyi içerdiği iki hücreden kaynaklanan WWM tri-hibrit hücrelerinin tipik CD ekspresyon profili; (a) CD14'ü (R2 bölgesi) eksprese etmeyen CD19 pozitif hücrelerinin ayrı popülasyonunu sergileyen tri-hibrit hücrelerinde (R1 bölgesi) CD19 ve CD14'ün ko-ekspresyonu; (b) R1 bölgesinde sınıflandırılmış hücrelerden türetilen ve 2 aylığına kültürde genişletilen tri-hibrit hücrelerde CD14 ekspresyonu; ve (c) 2 ay sonra R2 bölgesinin sınıflandırılmış popülasyonundan türetilen tri-hibrit hücrelerinde yüzey CD14'ün yoksunluğu.
- 20 Şekil 23 WWM tri-hibrit hücrelerinin farklı alt popülasyonlarından elde edilen CD14'ün temsili RT-PCR'si.
- 25 Şekil 24 K562 hücrelerinin tek bir klonunun bir karyotiplemesi. Sonuçlar, modal sayıda 69 kromozoma sahip olan K562 hücre dizisinin triploid olduğunu göstermiştir. Aşağıdaki kromozomal anormallikler tespit edilmiştir: eksik bir X kromozomu; bantları (q33 ve q35) içeren kromozom 2'nin uzun kolun parasentrik inversiyonu; eksik kromozom 3, q11.2'yi değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir ek türetilmiş kromozom 5; bantlar (p21.2 ve p23) arasında kromozom 6'nın kısa kolunun bir segmentinin duplikasyonu; bantları (p13 ve p22) içeren kromozom 7'nin kısa kolunun bir parasentrik inversiyonuna sahip bir ek kromozom 7; eksik bir kromozom 9; banttan (p13)
- 30

5 kromozom 9'un kısa kolunun bir terminal delesyonu; iki koromozom 9'dan segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 9; koromozomlar 3 ve 10'dan segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 10'un bir türevi; eksik kromozom 13; bir kromozom 13'ün kısa kolunda bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesi; eksik kromozom 14; iki kromozom 17'de p13'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek malzeme; kromozomlar 1 ve 18'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 18; eksik bir kromozom 20; kromozomlar 1 ve 21'in segmentlerini içeren translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21; eksik bir kromozom 22; beş ek farklı markör kromozom.

Şekil 25 WIL2NS hücre dizisinin beş klonu arasından birisinin bir karyotiplemesi. Bu klonda (CLONE 1), aşağıdaki anormallikler tespit edilmiştir; kromozomlar 1 ve 8'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 8; kromozom 13'ün bir ekstra homologu; kromozomlar 5 ve 14'ten segmentleri içeren translokasyondan meydana gelen kromozom 14'ün bir türevi; q22-q23'ten segmentinin kromozom 17'sinin bir duplikasyonu.

Şekil 26 KBT-1 (CD19⁺)&(CD4⁺) tri-hybrid dizisine ait, triploide yakın olan tek bir hücre klonunu sergileyen bir karyotipleme. Kromozom sayısı, rastgele kayıptan dolayı 65-66 arasında değişkenlik göstermiştir, fakat modal sayıda 66 kromozoma sahip olmuştur. Aşağıdaki kromozomal anormallikler tespit edilmiştir: X kromozomunun ve muhtemelen 2 diğer tanımlanmamış kromozomun kısa kolunu içeren bir kompleks translokasyondan oluşturulan bir türetilmiş X; eksik bir X kromozomu; bantları (q33 ve q35) içeren kromozom 2'nin uzun kolunda parasentrik inversiyonu; eksik kromozom 3; kromozom 3p'nin delesyonu; kromozom 4'ün ve bir diğer tanımlanmamış kromozomun segmentlerini içeren bir türetilmiş kromozom 4; q11.2'yi değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir ek türetilmiş kromozom 5; bantlar (p21.2 ve p23) arasında kromozom 6'nın kısa kolunun bir segmentinin bir duplikasyonu; kromozom 7'nin uzun kolunu ve markör 3'n uzun kolunu içeren bir ek türetilmiş kromozom 7; eksik kromozom 13; bir kromozom 13'ün kısa kolunda bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesi; eksik kromozom 14; eksik bir kromozom 15; iki kromozom 17'de p13'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek malzeme; kromozomlar 1 ve 18'den segmentleri

içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 18; eksik bir kromozom 20; kromozomlar 1 ve 21'in segmentlerini içeren translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21; eksik bir kromozom 22; dört ek farklı markör kromozomu.

5 Şekil 27 KBT (K562&CD20⁺CD72⁺&CD4⁺CD8⁺ hücreleri) çapraz soy tri-hibride (veya
KBT-2 çapraz soya) ait, triploide yakın dört klon sergileyen karyotip, (A)
CLONE 1, modal sayıda 67 kromozoma ve aşağıdaki kromozom
anormalliklerine sahiptir: X kromozomunun ve olası iki diğer tanımlanmamış
10 kromozomun kısa kolunu içeren bir kompleks translokasyondan oluşturulan bir
türetilmiş X; eksik bir X kromozomu; kromozom 1 ve yüksek ihtimalle
kromozom 4'ten segmentleri içeren bir türetilmiş kromozom 1; bantları (q33 ve
q35) içeren kromozomun 2'nin uzun kolun parasentrik inversiyonu; eksik
kromozom 3; küçük bir türetilmiş kromozom 4 olma olasılığı olan yüksek
ihtimalle silinmiş bir kromozom 4; q11.2'den segmenti değiştiren bilinmeyen
15 kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir ek türetilmiş kromozom 5;
bantlar (p21.2 ve p23) arasında kromozom 6'nın kısa kolunun bir segmentinin
duplikasyonu; kromozom 7'nin uzun kolunu ve markör 3'ün uzun kolunu
içeren bir ek türetilmiş kromozom 7; eksik bir kromozom 9; banttan (p13)
kromozom 9'un kısa kolunun bir terminal delesyonu; iki kromozom 9'dan
20 segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş
kromozom 9; kromozomlar 3 ve 10'dan segmentleri içeren bir
translokasyondan meydana gelen kromozom 10'un bir türevidir; eksik kromozom
13; bir kromozom 13'ün kısa kolunda bilinmeyen kaynaktan ek kromozom
malzemesi; eksik kromozom 14; iki kromozom 17'de p13'ten segmenti
25 değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek malzeme; kromozomlar 1 ve 18'den
segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş
kromozom 18; eksik bir kromozom 20; kromozomlar 1 ve 21'in segmentlerini
içeren translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21; eksik bir
kromozom 22; dört ek farklı markör kromozom, (B) CLONE 2, rastgele
30 kaybindan (modal kromozom sayısı 67'dir) dolayı 65 ila 67 kromozomu
içermektedir ve CLONE 1'in silinmiş kromozom 4'ünün, kromozom 4'ün
segmentlerini içeren belirli türetilmiş kromozom 4 ve bir diğer tanımlanmamış
kromozom ile ikame edilmesi hariç tutularak CLONE 1'in benzer kromozomal
özelliklerine sahiptir, (C) CLONE 3 esasen CLONE 1 ile aynıdır, fakat

türetilmiş kromozom 1 eksiktir ve kromozom 1 ve 4'ün segmentlerinden türetilmiş farklı bir kromozom 4'tür. 67 modal sayı ile rastgele kayıptan dolayı 67 ila 68 kromozomu içermektedir, (D) CLONE 4, esasen CLONE 1 ile aynıdır, fakat bir kromozom 1 eksiktir ve kromozom 1 ve 4'ün segmentlerini içeren bir translokasyondan meydana gelen farklı bir türetilmiş kromozom 1 mevcuttur. Sadece iki normal kromozom 5 ve bir uydu 5q olarak görülen bir türetilmiş kromozom 5.

Şekil 28

KWT-1 tri-hibrit (KWT tri-hibrit türevi immortal miyeloid ve B lenfoid hücreleri ve primer olgun CD4⁺ T yardımcı hücre) ait, modal 129 ila 140 sayıda heksaploide yakın tek bir klonu ve aşağıdaki kromozom anormalliklerini sergileyen bir karyotipleme: eksik iki X kromozomu; eksik bir kromozom 1; eksik bir kromozom 2; bantları (q33 ve q35) içeren kromozom 2'nin uzun kolunda parasentrik inversiyonu; eksik iki kromozom 3; eksik bir kromozom 4; q35'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir türetilmiş kromozom 4; kromozom 5'in bir ekstra homoloğu; q11.2'den segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir ek türetilmiş kromozom 5; kromozom 6'nın bir ekstra homoloğu; bantlar (p21.2 ve p23) arasında kromozom 6'nın kısa kolunun bir segmentinin duplikasyonu ile ek bir kromozom 6; kromozom 7'nin bir ekstra homoloğu; bantları (p13 ve p22) içeren kromozom 7'nin kısa kolunun parasentrik inversiyonuna sahip iki kromozom 7s; kromozom 1 ve 8'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 8; eksik iki kromozom 9s; banttan (p13) kromozom 9'un kısa kolunun bir terminal delesyonu; iki kromozom 9'dan segmentler içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 9'un iki türevi; kromozom 3 ve 10'dan segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 10'un bir türevi; eksik bir kromozom 12; bir kromozom 13'ün kısa kolunda bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemeye sahip bir kromozom 13; eksik iki kromozom 14; kromozom 5 ve 14'ten segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 14'ün bir türevi; eksik bir kromozom 15; eksik bir kromozom 17; iki kromozom 17'de p13'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek malzemeye sahip iki kromozom 17s; q22-q23'ten segmentte bir duplikasyonla iki kromozom 17s; eksik iki kromozom 18s; bir ekstra kromozom 20; kromozom 1 ve 21'in segmentlerini içeren bir

translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21; eksik bir kromozom 22; markör kromozom 2'nin iki kopyasına sahip yedi ek markör kromozomu.

Şekil 29

5

KWT-2 tri-hibrit (KWT tri-hibrit türevi immortal miyeloid ve B lenfoid hücreleri ve primer bellek $CD3^+CD5^+$ T hücresi) ait, modal 135 ila 142 sayıda heksaploide yakın tek bir klonu ve aşağıdaki kromozom anormalliklerini sergileyen bir karyotipleme: eksik iki X kromozomu; eksik bir kromozom 1; eksik bir kromozom 2; bantları (q33 ve q35) içeren kromozom 2'nin uzun kolunda parasentrik inversiyonu; eksik iki kromozom 3; eksik bir kromozom 4; q35'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir türetilmiş kromozom 4; kromozom 5'in bir ekstra homoloğu; q11.2'den segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemesine sahip bir ek türetilmiş kromozom 5; kromozom 6'nın bir ekstra homoloğu; bantlar (p21.2 ve p23) arasında kromozom 6'nın kısa kolunun bir segmentinin duplikasyonu ile ek bir kromozom 6; bantları (p13 ve p22) içeren kromozom 7'nin kısa kolunun parasentrik inversiyonuna sahip iki kromozom 7s; kromozom 1 ve 8'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 8; eksik iki kromozom 9s; banttan (p13) kromozom 9'un kısa kolunun bir terminal delesyonu; iki kromozom 9'dan segmentleri içeren bir translokasyondan kromozom 9'un iki türevi; kromozom 3 ve 10'dan segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 10'un bir türevi; eksik bir kromozom 12; bir kromozom 13'ün kısa kolunda bilinmeyen kaynaktan ek kromozom malzemeye sahip bir kromozom 13; eksik iki kromozom 14; kromozom 5 ve 14'ten segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 14'ün bir türevi; eksik bir kromozom 15; eksik bir kromozom 17; iki kromozom 17'de p13'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek malzemeye sahip iki kromozom 17s; q22-q23'ten segmentte bir duplikasyonla iki kromozom 17s; eksik iki kromozom 18s; bir ekstra kromozom 20; kromozom 1 ve 21'in segmentlerini içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21; eksik bir kromozom 22; markör kromozom 2'nin iki kopyasına sahip sekiz ek markör kromozomu.

10

15

20

25

30

Şekil 30

KWT-3 tri-hibrit çizgisine (KWT tri-hibrit türevi immortal miyeloid ve B lenfoid hücreleri ve primer çift pozitif $CD4^+CD8^+$ T hücresi), modal bir 124 ila

139 kromozom sayısına sahip hiperpentaploid olan üç klonu sergileyen karyotipler. (A) CLONE 1 aşağıdaki kromozom anormalliklerine sahiptir: üç X kromozomu ve tek bir Y kromozomu; ek bir kromozom 1; iki ek kromozom 2; bantları (q33 ve q35) içeren, kromozom 2'nin uzun kolunda parasentrik inversiyon; eksik bir kromozom 3; kromozom 5'i ve bilinmeyen kaynaktan kromozomu içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 5'in ek bir türevi; ek bir kromozom 6; bantlar (p21.2 ve p23) arasında kromozom 6'nın kısa kolunun bir segmentinin bir duplikasyonu; bantları (p13 ve p22) içeren kromozom 7'nin kısa kolunun ek bir parasentrik inversiyonu; kromozomlar 1 ve 8'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 8; banttan (p13) kromozom 9'un terminal bir delesyonu; iki kromozom 9'dan segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 9; iki ek kromozom 10; kromozom 3 ve 10'dan segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 10'un iki türevi; iki ek kromozom 13; bir kromozom 13'ün kısa kolunda bilinmeyen kaynaktan bir ek kromozom malzemesi; eksik bir kromozom 14; kromozom 5 ve 14'ten segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 14'ün bir türevi; üç kromozom 17'de p13'ten segmenti değiştiren bilinmeyen kaynaktan ek bir malzeme; q22-q23'ten segmentte kromozom 17'nin bir duplikasyonu ile iki kromozom; ek bir kromozom 18; kromozom 1 ve 18'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 18; ek bir kromozom 19; eksik bir kromozom 20; kromozom 1 ve 21'in segmentlerini içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21; her bir markör kromozom 4 ve 5'in iki kopyasına sahip beş ek markör kromozomu. (B) CLONE 2, bir kromozom 9'u kaybetmesi haricinde CLONE1'inkine benzer kromozom anormalliklerine sahiptir. (C) CLONE 3, kromozom 2'nin uzun kolunda parasentrik inversiyonun, uzun kolda bir parasentrik inversiyon ile üretilmiş olan, bantları (q33 ve q35) içeren bir türetilmiş kromozom 2'yi içeren bir izokromozomun oluşturulmasından meydana gelen bir izotürevi kromozom 2 ile değiştirilmesinin haricinde CLONE 2 ile aynı kromozom anormalliklerini içermektedir.

Şekil 31 WWM tri-hibridlerin (A) ve CD14 ile zenginleştirilmiş alt dizide mevcudiyetini orijinal WWM tri-hibride %55'ten %95'e arttıran tek bir baskın klonu sergileyen CD14 ile zenginleştirilmiş alt dizinin (B)

karyotiplerleri. Her birisi, modal sayıda 47 kromozoma ve aşağıdaki kromozom anormalliklerine sahiptir: kromozom 1 ve 8'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen kromozom 8'in bir türevi; kromozom 13'ün bir ekstra homoloğu; kromozom 14'ün, kromozom 5 ve 14'ten segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelmesi halinde bir türev; q22-23'ten segmentin kromozom 17'nin bir duplikasyonu; kromozom 3 ve 21'den segmentleri içeren bir translokasyondan meydana gelen bir türetilmiş kromozom 21. Orijinal WWM tri-hibrit ve CD14⁺ ile zenginleştirilmiş alt dizisi arasındaki tek fark, bu anormalliklerin, orijinal WWM'de hücrelerin sadece %55'inde ve CD14 ile zenginleştirilmiş alt çizginin %95'inde mevcut olmasıdır. WWM tri-hibride hücrelerin geri kalanı, triploide yakından (rastgele kromozom kaybıyla) tetraploide yakın (rastgele kromozom kaybıyla) aralığındadır.

Şekil 32 ProGM kültürlerinden süpernatantlarının western blotu. Şeritler 1 ve 2, sırasıyla aktive olmayan ve aktive 4 günlük insan T lenfosit kültürlerinin süpernatantları ile yüklenmiştir. Şeritler 4 ve 5, sırasıyla tunikamisin yokluğunda veya mevcudiyetinde büyütülmüş ProGM kültürlerinin süpernatantlarını içermiştir. GM-CSF eksprese edici olmayan hücrelerin süpernatantları, Şerit 3'te kullanılmıştır. Referans olarak, *E.coli*'den türetilen rekombinant hGM-CSF (lOng), Şerit 6'da kullanılmıştır.

Şekil 33 ProGM hibrit dizi ile üretilen insan GM-CSF'nin jel elektroforezi. Tunikamisin ile (şerit 3 ve 4) kültürlenmiş ve tunikamisin olmadan (şerit 1 ve 2) kültürlenmiş numunelerden elde edilen ProGM hibrit dizisinin hücre süpernatantları, sıçan anti-insan GM-CSF antikoru (şeritler 1 ve 3) ve sıçan anti fare GM-CSF antikoru (şeritler 2 ve 4) ile immunopresipitasyona tabi tutulmuştur. Proteinler, gümüş boya ile görselleştirilmiştir.

Şekil 34 ProCD54 hücre dizisinin ve CD54 ile zenginleştirilmiş alt dizisinin, ProCD54EX, yüzeyinde CD4 ve CD54'ün ekspresyonu; (a) ProCD54'ün %100'ü, CD4'ün ekspresyonunu tutmuştur. Hücre popülasyonunun yaklaşık olarak %72'si de düşükten yükseğe ekspresyon seviyeleri aralığında CD54 için pozitif olmuştur. Ortadan yükseğe CD54 ekspresyon seviyelerine sahip CD4⁺CD54⁺ fenotipinin özelliklerine sahip hücre popülasyonunun %42'si kapılanmıştır ve sınıflandırılmıştır ve (b) orijinal ProCD54'ün sınıflandırılmış CD4⁺CD54⁺ alt dizisinin yüzeyinin CD4 ve CD54 ekspresyon analizi,

hücrelerin %98'inin, 6 aydan fazla kültürden sonra markörler için hala pozitif olduğunu göstermektedir.

Şekil 35 ProCD54 ve ProCD54EX hücreleri ile salgılanan çözülebilir insan CD54'ün Western blotu. KWT tri-hibrit partner hücre dizisinin hücreleri, kontrol olarak kullanılmıştır. ProCD54 ve ProCD54EX hücreleri, yaklaşık olarak 82kDa'nın CD54'ünün çözülebilir formunu dökmüştür.

Şekil 36 ProCD54 ve ProCD54EX hücrelerinde ICAM-1 gen ekspresyonunun bir RT-PCR analizi.

Şekil 37 Transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra hIL4-R α zinciri ile geçici olarak transfekte edilen bir KBT tri-hibrit hücre dizisinden çıkarılan hücrenin Western blotu analizi. 100 ng/ml hIL4 ve transfekte olmayan KBT hücrelerle uyarılan insan PBML, sırasıyla hIL4-R α zinciri için pozitif ve negatif bir kontrol olarak kullanılmıştır.

Şekil 38 hIL-2 ile transfekte edilen KBT tri-hibrit hücrelerinde hIL-2 mRNA'nın tespiti için bir PCR çıkışı. Ekspresyon seviyeleri, CD8⁺ insan T lenfositlerinden ve Jurkat hücrelerinden elde edilenlere benzerdir. Transfekte olmayan KBT hücreleri ve K562 hücreleri, negatif kontroller olarak kullanılmıştır.

Şekil 39 (a) orijinal KBT tri-hibrit hücrelerinde ve (b) KBT TR-IL2 hücrelerinde hücre içi hIL-2'nin FACS analizi. KBT hücrelerinin yaklaşık olarak %41'i, CD69 aktivasyon molekülü için pozitif olmuştur. KBT TR-IL2 hücrelerinin %92'si, hücre içi hIL-2 (R1+R2) için pozitif boyalı olmuştur. hIL-2 negatif hücreleri, CD69 pozitif popülasyonun parçası olurken, CD69 negatif hücreler, hücre içi hIL2 olmuştur.

Şekil 40 hGM-CSF için affinite soğurumunu takiben RP-HPLC'den sonra elde edilen elüsyon profili.

Şekil 41 hGM-CSF için affinite immünoşoğurumunu takiben RP-HPLC'den sonra toplanan fraksiyonların SDS-PAGE (alt panel) ve Western blotu (üst panel). Western blotu, fraksiyonlar arasında Pro-GM-CSF tarafından salgılanan hGM-CSF'nin moleküler ağırlık profilindeki değişimleri ortaya çıkarmıştır. 24 ila 28 dakikada ayrıştırılan fraksiyonlar, RP-HPLC elüsyon profilinde bir birinci zirveye tekabül etmiştir, 29 ve 31 dakika arasında toplanan fraksiyonlar, ikinci zirveyi temsil etmiştir, bu esnada üçüncü zirve, 34 ila 36 dakika arasında toplanan fraksiyonun içerisinde kalmaktadır.

- Şekil 42 CD4⁺ hücrelerinin, PHA'sı aktive insan lenfosit kültürünün kültüründen ayrılması: (A) anti insan CD4-FITC ile işaretlenmiş hücreler kapılanmıştır (R1) ve hücre popülasyonunun geri kalanından sınıflandırılmıştır. Sınıflandırılmış hücreler, saflık için daha fazla analiz edilmiştir; (B) sınıflandırılmış popülasyonda hücrelerin %100'ü, CD4 pozitif olmuştur.
- Şekil 43 Pro-GMsf'den türetilen deglikosile hGM-CSF'İN JEL elektroforezi. Saflaştırılmış hGM-CSF, farklı bir süre zarfında PHGase F sindirimine maruz bırakılmıştır. Şerit 1- 0 dakika, şerit 2- 10 dakika, şerit 3- 20 dakika, şerit 4- 40 dakikalık inkubasyon. Şerit 5 - *E.coli*'den türetilen rekombinant insan GM-CSF. Proteinler, gümüş boya ile görselleştirilmiştir. Moleküler ağırlıkta markörler gösterilmektedir.
- Şekil 44 Fare miyelom Sp2 hücre dizisinin Tfr⁺ hücrelerinin tanımlanması ve sınıflandırılması.
- Şekil 45 Anti-fare CD4 ve CD8 ile boyanmış (a) periferik kan ve (b) kandan fare mononükleer hücrelerin FACS profilleri. Kapılanmış bölgeler R1 ve R3, tek pozitif efektör yardımcı (CD4⁺CD8⁻) ve sitotoksik (CD8⁺CD4⁻) T hücreleri temsil ederken, R2, çift pozitif (CD4⁺CD8⁺) T hücrelerini içermektedir.
- Şekil 46 Manyetik tanecikler ile negatif seçim vasıtasıyla periferik kandan izole edilen fare monositlerinin saflık profilleri. izole hücrelerin %100'ü, CD11b için pozitif olurken ve aynı zamanda, bu hücrelerin %98'ininden fazlası, B220, CD90, CD49b ve NK1.1 için negatif olmuştur. Yaklaşık olarak, CD11b⁺ hücrelerinin %38'i, yüzeylerinde Ly5G'yi düşük seviyelerde eksprese etmiştir.
- Şekil 47 Sp2'nin bir lenfoid immortal hücrelerinden, primer fare CD4⁺ T hücrelerinden ve CD11b⁺ monositlerden türetilen STmMm tri-hibridde CD138, CD4 ve Cd11b ekspresyonunun FACS profilleri. B lenfoid soyunun fenotipi, tri-hibrit hücrelerinin (a) ve (b) %100'ünde CD138'in ekspresyonu vasıtasıyla onaylanmıştır. Hücre popülasyonunun en az %82'si, CD4'ü veya CD11b'yi ko-eksprese etmeden CD138 pozitif olan hücrelerin sadece %5'i ile tüm üç CD markörünü eksprese etmiştir.
- Şekil 48 Sp2'nin bir fare immortal hücrelerinden, primer fare CD8⁺ T hücrelerinden ve CD11b⁺ monositlerden türetilen STmMm tri-hibridde CD138, CD8 ve CD11b ekspresyonunun tipik FACS profilleri. Fare CD138'in ekspresyonu, tri-hibrit hücrelerinin (a) ve (b) %97-100'ünde onaylanırken, T hücrelerinin ve monosit markörlerinin ko-ekspresyonu, sırasıyla tri-hibrit hücre popülasyonunun %56

ve %57'sinde tespit edilmiştir. Tüm tri-hibrit popülasyonunun yaklaşık olarak %40'ı, tüm üç markörü (c) ko-eksprese etmiştir ve sadece %14'ü, yüzeylerinde ne CD8'i ne de CD11b'yi eksprese etmiştir.

Şekil 49 Sp2'nin bir fare immortal hücrelerinden, bir primer fare çift pozitif CD4⁺CD8⁺ T hücrelerinden ve bir primer fare CD11b⁺ monositlerden türetilen STmMm tri-hibritlerde CD138, CD8 ve CD11b ekspresyonunun tipik FACS profilleri. Tri-hibrit hücre popülasyonunun %98-100'ü, CD8 (b) için pozitif olan popülasyonun %93'ü ile CD138 için pozitif olmuştur. Tüm hücre popülasyonunun yaklaşık %57-60'ı, CD138, CD8 ve CD11b için eş zamanlı olarak pozitif çıkmıştır.

Şekil 50 Sp2'nin bir fare lenfoid immortal hücrelerinden, bir primer fare çift pozitif CD4⁺CD8⁺ T hücrelerinden ve bir primer monositlerden türetilen STmMm tri-hibritlerin yüzeyinde CD4 ve CD8 ekspresyonunun bir tipik profili. Hücrelerin %95'i, CD8 için pozitif olurken, tri-hibrit popülasyonunun sadece %50'si, CD4 ve CD8'i ko-eksprese etmiştir. Önemli ölçüde, pratik olarak tüm CD4⁺ popülasyonu da CD8 için pozitif olmuştur.

Şekil 51 Tri-hibrit popülasyonunun %93'ünün, CD11b'yi ko-eksprese eden hücrelerin %70'i ile CD138'in pozitif boyasını gösterdiği SSMm tri-hibritlerinin yüzeyinde CD138 ve CD11b ekspresyonunun bir tipik profili.

Şekil 52 SWMm (a) ve SWMh (b) tri-hibritlerinin yüzeyinde insan CD71 ve fare TfR ekspresyonunun tipik profilleri. Monositin fare veya insan kaynağını bakılmaksızın, tri-hibritlerin %100'ü, insan ve fare transferin reseptörü için pozitif olmuştur.

Şekil 53 SWMm (a) ve SWMh (b) tri-hibritlerinde fare CD138 ekspresyonunun ve fare CD11b veya insan CD14'in tipik profilleri. Fare CD138'in ekspresyonunun, monositin fare veya insan kaynağına bağımlı olduğu görülmektedir. SWMm tri-hibritlerinin %84'ü, fare CD138 için pozitif olurken, SWMh'nin sadece %29'u, yüzeylerine sahip olmuştur.

Şekil 54 SWMh kimerik tri-hibritlerinin yüzeyinde insan CD19 ve insan CD14 ekspresyonunun bir FACS profili, hücrelerin %96'sının, %66 ko-eksprese edici insan CD14 ile insan CD19'u eksprese ettiğini göstermektedir.

Şekil 55 Tek bir hücre manipülasyon/iletim sistemi.

Şekil 56 Bir cam mikro-pipet.

Şekil 57 Bir mikro-elektrot.

Şekil 58 İki paralel mikro-elektrot.

Şekil 59 Bir doku kültürü plakasının bir haznesinde iki mikro elektrot.

Şekil 60 3 hücreli ara 2 mikro elektrotu içeren bir haznenin bir üstten görünüşüdür.

Şekil 61 Şekil 60'ın haznesinin yandan bir görünüşüdür.

5 Şekil 62 İkinci protein hIL-2 ile stabil transfeksiyondan (A) önce ve (B) sonra bir KBT hücresinin ve bir shIgM⁺CD25⁺ B hücresinin hibridizasyonu ile oluşturulan hibrit hücrelerin yüzeyinde CD25 ve sIgM'nin ekspresyonu.

BULUŞUN AÇIKLAMASI

10

Buluşun tercih edilen bir yapılandırması, ekteki şekillere referansla aşağıdaki kısıtlayıcı olmayan örnekler vasıtasıyla daha fazla açıklanmaktadır.

Örnek 1

15

1. Hücre seçimi, hücre manipülasyonu ve tek hücreli klonlama

Aşağıdaki örnekler, memeli hücre dizilerinin çapraz soy tri-hibridlerin oluşturulması için ve arzu edilen proteinlerin ekspresyonu için kullanılan primer hücrelerin seçimini ve izolasyonunu (veya sınıflandırılmasını) içeren hücre preparasyonlarını açıklamaktadır. Spesifik karakterlerle hücrelerin saf popülasyonunun elde edilmesine dair belirgin seçim tekniğinin seçimi veya özel bir fenotipin hücrelerinin izolasyonu için özel bir markörün (veya markörlerin) kullanımı, herhangi bir şekilde kısıtlayıcı değildir, bunun yerine açıklayıcıdır. Diğer hücresel markörler veya sınıflandırma prosedürleri, benzer sonuçları iletme için kullanılabilir.

1. 1. Memeli hücre dizilerinden bir onkojen kaynağı olarak hücrelerin seçimi

Tüm immortal hücre dizileri (aşağı bakınız), NaHCO₃ (JRH Biosciences), 20 mM HEPES (Sigma), 4 mM L-glutamin (Sigma) içeren ve %10 Fetal buzağı serumu, FCS (JRH Biosciences) ile takviye edilen modifiye edilmiş RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute ortamı) kullanılarak nemlendirilmiş %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de bir CO₂ inkubatorunda standart (normal) koşullar altında süspansiyon kültüründe büyütülmüştür. Aksi belirtilmedikçe, burada açıklanan doku kültürü ortamı (TC ortamı), tüm immortal hücre

dizilerini, primer kanser hücrelerini, primer hücre kültürlerini ve mevcut buluş için oluşturulan tri-hibrit hücre dizilerini kültürlemek üzere standart ortamdır. Genelde, kullanılan tüm hücre dizileri, primer kanser hücreleri ve primer hücreler, antibiyotik içermeyen ortamda kültürlenmiştir. Fakat, yüksek bakteriyel ve/veya mantar kontaminasyonu riski şüphesinin olması halinde, standart ortama %2 penisilin (5000 birim)/streptomisin (5 mg) çözelti (Sigma) dahil edilmiştir.

İnsan hücre dizileri

10 Mevcut buluşta kullanılabilen insan hücre dizileri aşağıdaki gibidir: -

- a) Yaygın miyeloid progenitör soyu, K562 (bir insan kronik miyelojeniz lösemiden türeyen bir hücre dizisi),
- b) T lenfoid soyu, MOLT4 (insan T lenfoblast), ve
- 15 c) B lenfoid soyu, WIL2NS (insan B lenfoblast).

İnsan olmayan hücre dizileri

Mevcut buluşta kullanılabilen bir insan olmayan hücre dizisi, bir fare miyelom hücre dizisi-Sp2'dir (B lenfosit plazma hücresi).

1.1.1. Tek hücreli iletim sistemi

Hücre izolasyon veya sınıflandırma, hücre manipülasyonu ve tek hücreli klonlama, mevcut buluş boyunca temel süreçlerdir. Burada, ilgili tek bir hücrenin manipülasyonu ve/veya klonlanması için oluşturulmuş olan tek hücreli bir iletim sistemini açıklamaktayız. Hücre iletim sistemi (Şekil 55) ana olarak bir cam mikro-pipetten, bir 1 ml şırıngadan ve tek boyutlu bir kalın manipülatörden oluşmaktadır. Şekil 56, ilgili tek bir hücrenin toplanması için kullanılan bir cam, L şekilli mikro-pipeti göstermektedir. Pipet, uzunluk olarak 75 milimetre (mm) olan, sırasıyla 1.5 mm ve 1.10 mm bir dış ve iç çapa sahip bir hematokrit kapiler tüpten oluşmuştur. Isıyı kullanarak, tüpün bir ucu, yaklaşık olarak 250-300 mikrometre (µm) bir iç çapa sahip olan ucun (1) ve yaklaşık olarak 30 µm kalınlığında ucun çeperinin elde edildiği şekilde çekilmiştir. Mikro-pipetin diğer ucu, modifiye edilmemiş kalmıştır (2). Hücre iletim sisteminde (Şekil 55), bir şırınga (4), bir kalın manipülatöre monte edilmektedir, bu şekilde

bir manyetik stand (16) monte edilmektedir. Sistem, şırınga pompasının (6), şırıngaya göre ileri doğru veya geriye doğru oldukça yavaş bir şekilde hareket etmesinin zorlanabildiği şekilde çalışmaktadır. İlgili tek bir hücreyi manipüle etmek için, şırınga, esnek, tıbbi dereceli bir tüp (3) kullanılarak şekilde gösterildiği gibi mikro-pipetin (2) modifiye edilmemiş ucuna bağlanmalıdır. Tek hücreli iletim sistemi, %70 alkol ile birkaç defa yıkanarak sterilize edilmeli ve son olarak, gerektiğinde herhangi bir hücre manipülasyonundan önce uygun bir doku kültürü ortamı veya çözeltisi ile hava baloncukları olmadan doldurulmalıdır.

1.1.2 Tek hücreli klonlama

Her bir hücre dizisinden hücrelerin klonları, tek hücreli klonlama ile oluşturulmuştur. Mevcut buluşta kullanılan herhangi bir biyolojik hücrenin, örneğin K562 hücre dizisinin hücrelerinin tek bir hücrenin klonlanmasına veya manipüle edilmesine yönelik bir teknik aşağıda açıklanmaktadır.

K562 hücrelerinin 5 µl hücre süspansiyonu, log fazında kültüründen alınmıştır ve 150 µl TC ortamını içeren bir doku kültürü 96 hazneli plakanın (TC plakası, Becton ve Dickinson veya BD) bir haznesine biriktirilmiştir. Hazne, bir “hücre sınıflandırma haznesi” olarak belirlenmiştir. Plaka, tersine çevrilmiş bir mikroskopun (Axiovert 40C, Carl Zeiss) bir XY mikroskop tablasına yerleştirilmiştir. Tek hücreli manipülasyon/klonlama sürecinden önce, bir mikro-pipet (Şekil 56), hava baloncukları olmadan TC ortamı ile tamamen doldurulmuştur. Tek hücreli iletim sisteminin (Şekil 55) mikro-pipeti, tübajı ve şırıngası, tek boyutlu bir kalın manipülatöre (Narishege) monte edilmiştir. Mikro-pipet ucu (1), ucun, mikroskopun optik açılı merkezine konumlandırıldığı şekilde düzenlenmiştir. K562’nin tek bir hücresinin manipüle etmek ve klonlamak için, mikro-pipet, hücre sınıflandırma haznesine eklenmiştir. Şırınga pompasını bir emme yönünde oldukça yavaş bir şekilde hareket ettirerek, K562’nin tek bir hücreyi, mikro-pipette biriktirilmiştir. Mikro-pipet, hücre sınıflandırma haznesinden çekilmiştir. Mikroskop tablasını hücre sınıflandırma haznesinden “bir klonlama haznesi” olarak belirtilen bir bitişik hazneye yanal olarak hareket ettirerek ve daha sonrasında, mikro-pipeti, bu klonlama haznesine ekleyerek, mikro-pipette tek hücre, mikro-pipetten nazik bir şekilde salınmıştır. Buna, şırınganın pompasını bir salma yönünde oldukça yavaş bir şekilde hareket ettirerek ulaşılmıştır. Tek bir hücreyi, hücre sınıflandırma haznesinden çekme ve tek hücreyi, klonlama haznesine biriktirme süreci, TC plakası başına 60 tek hücreli klonlar elde edilene kadar sayısız defa tekrar edilmiştir. Klonlama plakası, 10 günlük bir süreçte %5 CO₂

ile 37°C'de çalıştırılan bir nemlendirilmiş inkubatörde (Thermoline Scientific) inkübe edilmiştir. Her bir klonlama haznesindeki ortam, inkubasyon süreci esnasında taze TC ortamı ile düzenli bir şekilde yenilenmiştir. Her bir klonlama haznesinden her bir klonun hücre proliferasyonu, her 24 saatte bir kaydedilmiştir. İnkubasyon sürecinin sonunda, K562 hücrelerinin bir dizi klonu oluşturulmuştur. Hücre yüzeyinde eksprese edilen ilgili bir markörün, örneğin K562 hücrelerinde CD71 transferin reseptörünün en yüksek proliferasyon oranı veya en yüksek seviyesine sahip bir klon, tri-hibrit üretim veya diğer deneyler için seçilmiştir.

10 1.1.2. CD71⁺ hücrelerinin sınıflandırılması

Bir örnek olarak, aşağıdaki yöntem, bir hücre seçimini ve bir floresanı aktive hücre sınıflandırıcı (FACS) kullanılarak K562 hücre dizisinden CD71 pozitif hücrelerinin sınıflandırılmasını açıklamaktadır.

15

%2 bovin serum albumini BSA, (Sigma) içeren 100 µl bir fosfat tampon çözeltisinde (Dulbeco PBS) askıya alınan 1×10^5 K562 hücreleri, oda sıcaklığında 30 dakikalığına 20 µl fikoeritrin (PE) konjüge anti-CD71 (BD Pharmingen) veya PE konjüge izotipik kontrol antikorları IgG2a,κ (BD Pharmingen) ile karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkubasyon karışımı, 1 ml PBS ile seyreltilmiştir ve boyanan hücreler, 10 dakikalığına 300 g miktarda santrifüjlenerek toplanmıştır. 1 ml PBS ile ek bir yıkamadan sonra, boyanan hücreler, 1 ml PBS'de askıya alınmıştır ve bir FACS (BD FACSCalibur) kullanılarak hızlı bir şekilde analiz edilmiştir. Şekil 1, K562 hücre dizisinin CD71⁺ hücrelerinin profillerini göstermektedir. CD71⁺ pozitif hücreleri kapılanmış ve sınıflandırılmıştır (Şekil 1a). Orijinal K562 popülasyonunun yaklaşık olarak %65'i, CD71 için pozitif olmuştur. Sınıflandırılmış hücreler, 10 dakikalığına 300 g miktarda santrifüjlenmiştir ve diğer deneler için 1 ml PBS'de askıya alınmıştır. 100 ml askıya alınmış CD71⁺-sınıflandırılmış hücreler, Şekil 1b'de gösterildiği gibi saflık analizi için toplanmıştır. CD71⁺ sınıflı hücrelerin %99'unun saflığı elde edilmiştir. Hücre sınıflandırma işleminden sonra, K562 hücre dizisinin CD71⁺ hücreleri, deneyler için kullanılmıştır veya standart kültür koşulları altında kültüre yerleştirilmiştir ve CD71 ile zenginleştirilmiş K562 hücreleri olarak işaretlenmiştir. Aynı metodoloji, CD71 ile zenginleştirilmiş WIL2NS ve CD71 ile zenginleştirilmiş MOLT4 kültürlerini oluşturmak üzere kullanılmıştır.

30

1.1.3.1 K562 kültüründen miyelomonositik soya ait CD71⁺ hücrelerinin sınıflandırılması

Hücre hibridizasyon deneyleri için hücrelerin miyelomonositik fenotipini temin etmek için, CD71⁺ K562 hücreleri, FACS analizi ve bundan sonra sınıflandırma kullanılarak CD15⁺ hücreleri için daha fazla zenginleştirilmiştir.

Bu amaca yönelik olarak, Bölüm 1.1.3'te açıklanan süreçten elde edilen CD71 ile zenginleştirilmiş K562 hücreleri, PE anti-insan CD71 ve FITC anti-insan CD15 (BD Pharmingen) ile işaretlenmiştir. %2 BSA içeren 100 µl PBS'de askıya alınan 1×10^5 yıkanmış CD71 ile zenginleştirilmiş K562 hücreleri, 20 µl anti-insan CD71-PE ve anti-insan CD15-FITC antikorları veya negatif izotipik kontrol antikorları veya FITC ve PE işaretli negatif izotipik kontrol antikorları ile oda sıcaklığında 30 dakikalığına karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkubasyon karışımı, 1 ml PBS ile seyreltilmiştir ve boyanan hücreler, 10 dakikalığına 300 g miktarda santrifüjlenerek toplanmıştır. 1 ml PBS ile ek bir yıkamadan sonra, boyanan hücreler, 1 ml PBS'de askıya alınmıştır ve bir FACSCalibur (BD) kullanılarak hızlı bir şekilde analiz edilmiştir.

Bir tipik FACS profili, Şekil 2a'da gösterilmektedir. Kültürde 5 aydan sonra, CD71 ile zenginleştirilmiş K562 hücrelerinin %99'u, yaklaşık olarak %18'nin, yüzey CD15'i eksprese ettiği CD71 için pozitif kalmıştır. CD71 ve CD15 için pozitif olan hücreleri kapılanmıştır (Şekil 2a) ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırılmış hücreler, 10 dakikalığına 300 g miktarda santrifüjlenmiştir ve diğer deneyler için 1 ml PBS'de askıya alınmıştır. 100 µl askıya alınmış CD71⁺CD15⁺ sınıflandırılmış hücreler, saflık analizi için toplanmıştır. İki aylık kültürden sonra, sınıflandırılmış hücreler, CD71 ve CD15'in ko-ekspresyonu için yeniden analiz edilmiştir (Şekil 2b). Sonuçlar, saflaştırılmış hücrelerin yaklaşık olarak %98'inin, CD71 ve CD15'i tuttuğunu göstermektedir. Yüzeyde CD71 ve CD15'i erken eksprese eden bazı hücrelerin, CD15 ekspresyonlarını kayıp ettiği keşfedilmiştir (Şekil 2b), bu da K562 hücrelerinde miyelomonositik soya sunumun, stabil olmadığı ve tersine çevrilebilir olduğunu göstermektedir.

1.1.4. Fare Sp2 hücre dizisinden transferin reseptör pozitif hücrelerinin seçimi

Fare miyelom hücre dizisi Sp2, tri-hibridlerin oluşturulmasında kullanıldığında, popülasyon, insan CD71'in analoğu olan hücre eksprese edici fare transferin reseptörü (TfR) için zenginleştirilmiştir.

- 5 Esasen, FITC-konjüge sıçan anti-fare TfR antikorlarının (Abcam), PE-konjüge fare anti-insan CD71 yerine kullanılmasının haricinde CD71⁺ hücreleri için insan hücre dizilerinin zenginleştirilmesini açıklayan Bölüm 1.1.3'teki ile aynı protokol takip edilmiştir. İzotip kontrolleri bu şekilde ayarlanmıştır.
- 10 Şekil 44, Sp2 hücre dizisinin TfR⁺ hücrelerinin profilini göstermektedir. TfR⁺ pozitif hücreleri kapılanmış ve sınıflandırılmıştır (Şekil 44a). Orijinal Sp2 popülasyonunun yaklaşık olarak %45'i, TfR için pozitif olmuştur. Sınıflandırılmış hücreler, 10 dakikalığına 300 g miktarda santrifüjlenmiştir ve diğer deneler için 1 ml PBS'de askıya alınmıştır. 100 ml askıya alınmış TfR⁺ ile sınıflandırılmış hücreler, Şekil 44b'de gösterildiği gibi saflık analizi için toplanmıştır.
- 15 TfR⁺ sınıflı hücrelerin %99.5'inin saflığı elde edilmiştir. Hücre sınıflandırma işleminden sonra, Sp2 hücre dizisinin TfR⁺ hücreleri, diğer deneyler için kullanılmıştır veya standart kültür koşulları altında kültüre yerleştirilmiştir ve TfR ile zenginleştirilmiş Sp2 hücreleri olarak işaretlenmiştir.

20 1.2. Primer kanser hücrelerinden onkojenin bir kaynağı olarak hücrelerin seçimi

- Bir örnek olarak, aşağıdaki yöntem, akut miyelojen lösemi (AML) ile hastalardan elde edilen kemik iliği numunelerinden miyelojen soyuna ait dönüştürülmüş hücrelerin seçimini açıklamaktadır. Aynı yöntem ayrıca, ilgili kan malignitelerinin kemik iliği numunelerinden
- 25 diğer soyalara ait hücreleri seçmek üzere uygulanabilmektedir.

- AML ile hastalardan kemik iliği aspiratları, bilgilendirilmiş onam sonrasında elde edilmiştir. Numuneler, AML tanısının, deneyleri yürütmeden önce oluşturulduğu hastalardan ekstrakte edilmiştir. AML mononükleer hücreleri, Bölüm 1.3.1'de açıklanan ile aynı yoğunluk
- 30 tırmanışında santrifüjleme prosedürü kullanılarak izole edilmiştir ve numunelerden CD34⁺ hücreleri, bir FACS kullanılarak sınıflandırılmış veya izole edilmiştir.

Yukarıda elde edilen mononükleer hücreleri boyamak veya işaretlemek için, 10 µl bir fare anti-insan CD34-PE antikor (BD Pharmingen) veya bir PE izotip kontrol antikor (BD

Pharmingen), bir boyama ortamında (PBS+%5 BSA) 1×10^6 mononükleer hücrelerin 100 μ l sunulan bir tam bölene eklenmiştir. Sunulan bir tam bölün için, boyama karışımı, buzda 30 dakikalığına inkübe edilmiştir. 10 ml buz soğukluğunda boyama ortamı, hücre topağına eklenmiştir ve 7 dakikalığın 350 g miktarında ve 4°C’de santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar havalandırılmıştır ve daha sonrasında, hücre topağı, buz soğukluğunda boyama ortamının kıyaslanabilir bir hacminin eklendiği tüpü hareket ettirilerek yeniden askıya alınmıştır. Boyanan hücreler santrifüjlenmiştir ve buz soğukluğunda boyama ortamında bir kez daha yıkanmıştır. İşaretlenmiş hücreler, boyama ortamında askıya alınmıştır ve FACS’ye uygulanmıştır. CD34⁺ hücre popülasyonu için uygun sınıflandırma kapıları ayarlandıktan sonra, hücre fraksiyonları toplanmıştır.

Zenginleştirme kültürleri için, CD34⁺ ile zenginleştirilmiş hücrelerin 40×10^3 hücreleri, sentetik hücre dışı matris ile önceden kaplanmış 12 hazneli plakalarda plakalanmıştır. Hücreler, 57 mM β -merkaptotanol (Sigma), 1 mM hidrokortizon ve 20 ng/ml insan IL-3 ve insan G-CSF ile takviye edilen tam TC ortamında genişletilmiştir. Kültürde 48 saat sonra, hücreler, FACS kullanılarak CD15 ekspresyonu için ayırda seçilmiştir.

Floresan-hücre boyaması için, bir fare anti-insan CD15-FITC (BD Pharmingen) ve bir fare anti-insan CD34-PE (BD Pharmingen) kullanılmıştır ve bu Bölümde önceden açıklanan benzer bir hücre boyama yöntemi de kullanılmıştır. Boyanan numuneler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. CD34 ve CD15 pozitif popülasyon (CD34⁺CD15⁺) için veya CD34 pozitif ve CD15 negatif hücre popülasyonu (CD34⁺CD15⁻) için uygun sınıflandırma kapılarının ayarlanmasından sonra, fraksiyonlar toplanmıştır.

Kültürde 48 saatten sonra CD34⁺ AML hücrelerinde CD15 ekspresyonunun profili, Şekil 3’te gösterilmektedir. AML mononükleer hücrelerin yaklaşık %54’ünün testi, CD34 ekspresyonları devam ettirilirken CD15 için pozitif çıkmıştır, bu esnada hücre popülasyonunun geri kalanı, miyelomonositik soya sunulmadan CD34 ekspresyonunu tutmuştur. CD34⁺CD15⁺ hücreleri, tri-hibridlerin oluşturulmasına yönelik deneylerde kullanılmıştır.

1.3. Primer hücreler

Primer hücreler, periferik kan, kordon kanı, dalak, kemik iliği, timus, bademcikler ve bölgesel lenf bezleri gibi herhangi bir lenfoid dokularından türetilebilmektedir. Bir birinci adımda, tüm lenfoid dokuları, mononükleer hücreleri izole etmek için işlenmiştir.

5 1.3.1. Kemik iliği, periferik kan veya umbilikal kordon kanından insan mononükleer hücrelerinin izolasyonu

Periferik kan numuneleri, bilgilendirilmiş onamdan sonra sağlıklı bireylerden toplanmıştır. Her bir kan numunesi, heparinize tüplerde (Vacutainer, BD) toplanmış, havuza alınmış ve
10 RPMI1640'da seyreltilmiştir.

İnsan kemiği iliği aspiratları, kemik iliği biyopsilerine tabi olan ve herhangi bir kan anormalliği olmadan normal kemik iliğine sahip olan hastalardan elde edilmiştir. Numuneler, RPMI1640 ile 1:3 bir oranda seyreltilmiştir.

15

İnsan umbilikal kordon kanı numuneleri, bilgilendirilmiş onamdan sonra normal uzun dönemli vajinal yollardan elde edilmiştir. Her bir kordon kanı, plasentanın çıkarılmasından önce bebek doğumundan ve kordonun ligasyonundan sonra heparinize bir 60 ml şırınga ile toplanmıştır. Her bir numune, RPMI1640'da seyreltilmiştir.

20

Periferik kan mononükleer hücreler (PBMC'ler), kemik iliği mononükleer hücreler (BMMC'ler) ve umbilikal kordon kanı mononükleer hücreler (UCBMC'ler), Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia) üzerinden yoğunluk santrifüjleme ile hazırlanmıştır. Özet olarak, 10 ml Ficoll-Paque, 20 ml bir şırıngaya birleştirilen kanül tüpü kullanılarak 20 ml hücre
25 süspansiyonu altında katmanlanmıştır. Numune hücreleri, 4°C'de 40 dakikalığına 1,700 rpm'de (700 g) santrifüjlenmiştir. Ara yüzdeki hücreler toplanmış ve 10 dakikalığına 2,000 rpm'de (1,000 g) santrifüjleme ile 50 ml RPMI1640'da yıkanmıştır. Süpernatant tahliye edilmiştir ve topak halindeki hücreler, 40 ml of RPMI1640'da yeniden askıya alınmıştır ve 10
30 dakikalığına 1,300 rpm'de (400 g) santrifüjlenmiştir. Kırmızı kan hücreleri ve trombositler, sırasıyla ağırlık/hacim cinsinden %0.83 NH4Cl ile lizis ve PBS ile 1:2 bir oranda seyreltilen Ficoll-Paque üzerinden ikinci bir santrifüjleme vasıtasıyla çıkarılmıştır.

İzole mononükleer hücreler, kültürleme veya analiz ve bir FACS veya bir manyetik tanecik ayırma sistemi vasıtasıyla hücreye özgü fraksiyonlara sınıflandırma için kullanılmıştır.

1.3.2. Katı lenfoid dokulardan insan mononükleer hücrelerin izolasyonu

Aşağıdaki yöntem, dalak, timus, bademcik veya bölgesel lenf bezlerinden mononükleer hücrelerin izole edilmesine yönelik, mevcut yöntemde kullanılan prosedürü açıklamaktadır. Hücre boyama ve sınıflandırmasına yönelik bir yöntem de verilmektedir.

Dalak numuneleri, ulusal etik kurallara uyarak organ transplant donörlerinden elde edilmiştir. Her birisi yaklaşık olarak 2 x 2 x 3 cm olan dalak blokları, splenositlerin izolasyonuna kadar RPMI 1640'da 4°C'de tutulmuştur. Her bir blok, bir şırınganın pompası kullanılarak steril bir eleğin örgüsü vasıtasıyla küçük parçalara kesilmiştir. Hücreler daha sonrasında oda sıcaklığında 30 dakikalığına tam ortamda 20 U/ml tip VII kolajenez (Sigma) ve 20 U/ml DNaz (Sigma) ile sindirim vasıtasıyla enzimatik olarak ayrıştırılmıştır. Hücre agregatları, 10mM'yi elde etmek üzere EDTA eklentisi ve oda sıcaklığında 5 dakikalığına ajitasyon ile ayrıştırılmıştır. Daha sonrasında, splenositler, enzimatik sindirimi tespit etmek üzere tam ortam ile iki defa yıkanmış ve RPMI 1640'da yeniden askıya alınmıştır. Bu koşullar, enzimatik olmayan ayrıştırma prosedürlerine kıyasla yüzey molekül ekspresyonunu etkilememiştir (McIlroy ve ark. 1995). Dalak mononükleer hücreler, kırmızı kan hücrelerinin çıkarılması haricinde Bölüm 1.3.1'de açıklandığı gibi yoğunluk tırmanışında santrifüjleme vasıtasıyla bu splenosit süspansiyonlarından izole edilmiştir. Dalak mononükleer hücreleri, RPMI1640'da yeniden askıya alınmıştır ve hücre konsantrasyonu, ml başına 1×10^6 hücreye ayarlanmıştır. Hücre canlılığı, tripan mavisinin hariç tutulması ile belirlendiği gibi %98'in üzerinde çıkmıştır.

Timuslar, ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra kardiyak cerrahiye tabi tutulan çocuklardan elde edilmiştir. Timositler, timus dokusunu bozarak ve dokudan timositleri, RPMI1640 ortamı ile doldurulmuş bir şırınga ile yıkanarak timuslardan izole edilmiştir. Timositler, yukarıda açıklandığı gibi yoğunluk gradyan-santrifüjleme ile saflaştırılmıştır.

Bademcikler, bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra inflamatuvar rahatsızlıklar için tonsilektomiye tabi olan hastalardan elde edilmiştir. Doku numuneleri, tam ortamda ve 250 µg/ml gentamisinde buzda depolanmıştır ve 3 saat içerisinde işlenmiştir. Tonsiler doku, epitelyal katmanın çıkarılmasından sonra parçalara kesilmiştir ve doku blokları, bir kesme

aktarım pipeti vasıtasıyla nazikçe havalandırılmıştır. Tonsiler hücreler daha sonrasında, splenik mononükleer hücrelerin izolasyonunda öncesinde açıklanan ile aynı prosedür kullanılarak izole edilmiştir.

5 1.3.3. Çeşitli dokulardan türetilen mononükleer hücrelerden soya özgü primer hücrelerin izolasyonu

10 B lenfoid soyuna, T lenfoid soyuna ve miyeloid soyuna ait insan hücreleri, FACS analizi ve hücre sınıflandırma veya manyetik hücre sınıflandırma işlemi kullanılarak standart prosedürler ile izole edilmiştir. Çeşitli dokulardan soya özgü primer hücrelerin izolasyonu için hücre boyama ve sınıflandırma işleminin kısıtlayıcı olmayan örnekleri, aşağıda verilmektedir.

1.3.3.1. İnsan dalaklarından ve periferik kandan B hücrelerinin, yardımcı T hücrelerinin ve miyelomonisitik hücrelerin izolasyonu

15

Doku numuneleri, ilk olarak Bölüm 1.3.1’de açıklandığı gibi bir mononükleer hücre popülasyonunu ekstrakte etmek üzere işlenmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun izolasyonunun 4 saati içerisinde floresan hücre boya işlemi, daha sonrasında hücre sınıflandırma işlemi uygulanmıştır. Hücreler, boyama işlemine kadar standart kültür koşulları (bkz. Bölüm 1.1) altında tam ortamda askıya alınmıştır.

20

1.3.3.1.1. Çeşitli dokulardan türetilen primer olgun B hücrelerinin, efektör T hücrelerinin ve miyelomonositik hücrelerin hücre boyama ve sınıflandırma işlemi

25 Aşağıda, primer hücrelerden B ve T hücrelerinin boyanmasına ve sınıflandırılmasına dair örnekler mevcuttur. Genel olarak, B hücrelerinin ve yardımcı T hücrelerinin seçimleri, sırasıyla CD19 ve CD4’ün yüzey ekspresyonlarına bağlı olurken, miyelomonositik hücreler, CD14 ve/veya CD16’nın yüzey ekspresyonuna bağlı olmuştur.

30 Özet olarak, 10 µl her bir fare anti-insan CD19-FITC antikoru (BD Pharmingen) ve fare anti-insan CD4-PE antikoru (BD Pharmingen) veya uygun izotip kontrolü, tam bölen başına 1×10^5 hücreyi içeren, boyama ortamında (PBS+%5 BSA) mononükleer hücrelerin bir 100 µl tam bölenine eklenmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun sunulan bir tam bölen için, boyama karışımı, buzda 30 dakikalığına inkube edilmiştir. 10 ml buz soğukluğunda boyama ortamı,

hücre topağına eklenmiştir ve 7 dakikalığına 350 g miktarında ve 4°C’de santrifüjlenmiştir. Süpernatant havalandırılmıştır ve daha sonrasında, hücre topağı, buz soğukluğunda boyama ortamının kıyaslanabilir bir hacminin eklendiği tüpü hareket ettirilerek yeniden askıya alınmıştır. Boyanan hücreler santrifüjlenmiştir ve buz soğukluğunda boyama ortamında bir kez daha yıkanmıştır. Süreç, diğer tam bölenler için tekrar edilmiştir. Boyanan hücreler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. En az 20,000 kapılı eylem, her bir numune için analiz edilmiştir. CD19 pozitif B hücresi popülasyonu (CD19⁺CD4⁻) için veya CD4 pozitif T hücresi popülasyonu (CD4⁺CD19⁻) için uygun sınıflandırma kapılarının ayarlanmasından sonra, fraksiyonlar toplanmıştır. 1 ml her bir fraksiyon, saflık analizi için toplanmıştır ve her bir fraksiyonun geri kalanı, diğer deneyler için tam ortamda yeniden askıya alınmıştır.

1.3.3.1.2. Sınıflandırılmış hücre popülasyonlarının geri kazanımı ve analizi

Az sayıda hücreler ($\leq 5 \times 10^5$ hücre), uygun adaptörlerle mikrosantrifüj tüplerine doğrudan sınıflandırılmıştır. Sınıflandırma işleminden sonra, az hacimli (0.1 ila 0.2 ml) takviye edilmiş RPMI1640, sınıflandırılmış numune ile karıştırmak ve sınıflandırılmış hücrelerin canlılığını arttırmak için geri kazanım tüplerine eklenmiştir. Sınıflandırma işleminden sonra, izin verilen geri kazanılmış hücre sayısının sağlanmasıyla, 20 µl her bir sınıflandırılmış hücre numunesi, saflığını doğrulamak üzere yeniden analiz için boyama ortamı ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. Kabul edilebilir bir saflık, $\geq 95\%$ olmuştur. Sınıflandırılmış numunenin ml’si başına diğer 20 ila 40 µl FCS eklenmiştir ve bundan sonra 7 dakikalığına 350 g miktarında 4°C’de santrifüjleme gelmiştir. Hücreler daha sonrasında standart doku kültürü ortamında yeniden askıya alınmıştır. Yeterli hücrelerin mevcut olması halinde, verimliliği belirlemek için sayılmışlardır.

Anti-insan CD19-FITC ve anti-insan CD4-PE ile işaretlenmiş dalak numunelerinin bir FACS profili, Şekil 11a’da gösterilirken, sınıflandırılmış CD19⁺ B hücrelerinin ve CD4⁺ T hücrelerinin saflık analizinin profilleri, Şekil 11b ve 11c’de gösterilmektedir (bkz. KBT hibrit karakterizasyonu). Fraksiyonlardaki hücre saflığı, CD19⁺ hücreleri için %98’i aşmıştır ve CD4⁺ için %96’yı geçmiştir.

Periferik kandan CD19⁺ ve CD4⁺ hücrelerinin sınıflandırma ve saflık profilleri, esasen dalak numunelerinden gelenlere benzer olmuştur, her bir hücre popülasyonunun sadece birkaçı elde edilmiştir.

İnsan monositlerinin ve miyelomonositik hücrelerinin izolasyonu için, mononükleer hücre popülasyonu, üretici talimatlarına göre ilk olarak insan CD14 manyetik tanecikler MACS (Miltenyi Biotec GmbH) kullanılarak CD14 negatif hücrelerden boşaltılmıştır. Pozitif olarak seçilmiş CD14 hücreleri, fare anti-insan CD16-PE (BD Pharmingen) ve fare anti-insan CD14-PerCP (BD Pharmingen) antikorları ile daha fazla boyanmış veya işaretlenmiştir. Sınıflandırılmış hücrelerin hücre boyama & sınıflandırma ve geri kazanma işlemine yönelik yöntemler yukarıda açıklanmıştır (bkz. Bölüm 1.3.3.1.1 ve 1.3.3.1.2).

- 10 Boyanan numuneler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. En az 20,000 kapılı eylem analiz edilmiştir. MACS tanecikleri kullanılarak CD14 için pozitif olarak seçilen toplam hücrelerin yaklaşık %86'sı, CD14 için pozitif olmuştur. CD14⁺ popülasyonu ayrıca CD16'nın ekspresyonuna bağlı üç gruba ayrılmıştır. CD14⁺ hücrelerinin büyük çoğunluğunu temsil eden CD14^HCD16⁻; CD14^HCD16^L ve CD14^HCD16^H hücrelerinin azınlık popülasyonu.
- 15 Fraksiyonlardaki hücre saflığı, CD14^HCD16^L hücreleri için %98'i aşmıştır ve CD14^HCD16^H için %92'yi aşmıştır. Uygun sınıflandırma kapıları ayarlandıktan sonra, aşağıdaki hücre popülasyonu toplanmıştır: CD14^HCD16⁻, CD14^HCD16^L ve CD14^HCD16^H hücre fraksiyonları. Şekil 4, fare anti-insan CD16-PE ve fare anti-insan CD14-PerCP ile işaretlenmiş CD14 ile zenginleştirilmiş numunelerin bir FACS profilini göstermektedir.

20

Hücre sınıflandırma işlemine ve dalak numunelerinden CD14⁺ hücrelerinin saflaştırılmasına yönelik yöntemler esasen, her bir hücre popülasyonundan az sayıda elde edilmesi haricinde periferik kan numunelerinden gelenlerle aynı olmuştur.

25 **1.3.3.2. İnsan umbilikal kordon kanından CD5 pozitif (antijen deneyimli) B hücrelerinin ve CD5 negatif (naif) B hücrelerinin izolasyonu**

- Mononükleer hücreler, Bölüm 1.3.1'de açıklandığı gibi umbilikal kordon kanı numunelerinden hazırlanmıştır. Mononükleer hücre popülasyonunun izolasyonunun 4 saati içerisinde floresan hücre boyama işlemi, daha sonrasında hücre sınıflandırma işlemi uygulanmıştır. Bu belirgin örnekte, CD5 negatif (naif) B hücrelerinin ve CD5 pozitif (antijen deneyimli) B hücrelerinin, insan umbilikal kordon kanından sınıflandırılması, öncesinde açıklanan yöntem (Bölüm 1.3.3.1.1) göre bir fare anti-insan CD5-FITC antikoru (BD

Pharmlngen), bir fare anti-insan CD19-OE antikoru (BD Pharmlngen) veya uygun izotip kontrolü kullanılarak uygulanmıştır.

Boyanan numuneler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. En az 20,000 kapılı eylem, her bir numune için analiz edilmiştir. CD5 pozitif B hücresi popülasyonu (CD19⁺CD5⁻) için veya

5 CD5 pozitif T hücresi popülasyonu (CD19⁺CD5⁺) için uygun sınıflandırma kapılarının ayarlanmasından sonra, bir dizi fraksiyon toplanmıştır. Şekil 5, fare anti-insan CD19 ve fare anti-insan CD5 ile boyanan numunelerin bir tipik profilini göstermektedir.

Numunede B hücrelerinin yüzdesi, %4 ila 19.2 aralığında olmuştur ve CD5⁺ B hücreleri,

10 toplam dolaşan lenfositlerin %0.8 ila 7.2'si aralığında olmuştur.

1.3.3.3. İnsan umbilikal kordon kanından CD5 pozitif (antijen deneyimli) T hücrelerinin ve CD5 negatif (naif) T hücrelerinin izolasyonu

15 Mononükleer hücreler, Bölüm 1.3.1'de açıklandığı gibi benzer bir yöntem kullanılarak umbilikal kordon kanı numunelerinden ekstrakte edilmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun izolasyonunun 4 saati içerisinde floresan hücre boyama işlemi, daha sonrasında hücre sınıflandırma işlemi uygulanmıştır. CD5 negatif (antijen deneyimli) T hücrelerinin ve CD5 negatif (naif) T hücrelerinin, insan umbilikal kordon kanından

20 sınıflandırılmasına yönelik bu belirgin örnekte, öncesinde açıklanan yöntem (Bölüm 1.3.3.1.1) göre bir fare anti-insan CD5-FITC antikoru (BD Pharmlngen), bir fare anti-insan CD3-PE antikoru (BD Pharmlngen) veya uygun izotip kontrolü kullanılarak uygulanmıştır. Boyanan hücreler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. En az 20,000 kapılı eylem analiz edilmiştir. Sınıflandırma kapıları, CD5 negatif T hücrelerini (CD3⁺CD5⁻) veya CD5 pozitif T

25 hücreleri (CD3⁺CD5⁺) içeren fraksiyonları toplamak üzere ayarlanmıştır. Şekil 6, fare anti-insan CD3 ve fare anti-insan CD5 ile boyanan numunelerin bir tipik profilini göstermektedir.

Sınıflandırılmış popülasyonlarının geri kazanılması ve analiz edilmesi

30 Etkili bir şekilde, sınıflandırılmış popülasyonları geri kazanmak ve analiz etmek üzere kullanılan aynı yöntem, Bölüm 1.3.3.1.2'de açıklanmıştır.

Numunelerde T hücrelerinin yüzdesi, %1.7 ila 13.5 aralığında olmuştur ve CD5⁺ T hücreleri, toplam dolaşan lenfositlerin %0.4 ila 1.3 aralığında olmuştur.

1.3.3.4. İnsan kemik iliği mononükleer popülasyondan CD20 ve CD72 ekspresyonlarına bağlı erken B hücrelerinin, aktive ve duran B hücrelerinin izolasyonu

5 Mononükleer hücreler, öncesinde açıklanan yöntem (Bölüm 1.3.1) kullanılarak kemik iliğinden ekstrakte edilmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun izolasyonunun 4 saati içerisinde floresan hücre boyama işlemi, daha sonrasında hücre sınıflandırma işlemi uygulanmıştır. Aktive B hücrelerinin boyanması ve sınıflandırılması, öncesinde Bölüm 1.3.3.1.1’de açıklanmaktadır. Spesifik olarak, 10 µl bir fare anti-insan CD72-FITC antikoru (BD Pharmingen) ve 20 µl bir fare anti-insan CD20-PE antikoru (BD Pharmingen) veya uygun izotip kontrolü (PE fare IgG2b, κ antikorları) kullanılmıştır. Boyanan hücreler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. Sınıflandırma kapıları, ön B hücreleri, duran ve aktive B hücreleri, foliküler dendritik hücreleri (CD20⁺CD72⁻) içeren CD20 pozitif popülasyonu veya önceki B hücrelerini (CD20⁻CD72⁺) veya aktive B hücrelerini (CD20⁺CD72⁺) içeren CD72 pozitif hücre popülasyonunu içeren fraksiyonları toplamak üzere ayarlanmıştır. Şekil 7, fare anti-insan CD20 ve fare anti-insan CD72 antikorları ile boyanan numunelerin bir tipik profilini temsil etmektedir.

Sınıflandırılmış popülasyonlarının geri kazanılması ve analiz edilmesi

20 Etkili bir şekilde, Bölüm 1.3.3.1.2’de açıklananla aynı yöntem, sınıflandırılmış hücreleri geri kazanmak ve analiz etmek üzere uygulanmıştır.

25 Tipik olarak, kemik iliği mononükleer hücre popülasyonunun yaklaşık %10-15’i, CD20 ve CD72 için pozitif olmuştur; hücrelerin %9-12’si, CD20 için pozitif, fakat CD72 için negatif olmuştur; ve yaklaşık %8’i, sadece CD72 için pozitif olmuştur.

1.3.3.5. Manyetik tanecik sınıflandırma işlemi vasıtasıyla timosit alt popülasyonlarının izolasyonu

30 MACS CD4 Multisort kiti (Miltenyi Biotec GmbH) kullanılarak, CD4⁻CD8⁻ çift negatif timositler, CD4⁺CD8⁺ çift pozitif timositler ve CD4⁺ ve CD8⁺ tek pozitif timosit hücre popülasyonları, üretici talimatlarına göre sınıflandırılmıştır. Kısacası, Bölüm 1.3.2’de açıklanan ile benzer bir yöntem kullanılarak toplanan timositler, 30 dakikalığına CD4

Multisort CD4 mikro taneciklerle inkübe edilmiştir. PBS’de 5 mM EDTA ve %0.5 BSA ile yıkanma sonrasında, işaretlenmiş hücreler, manyetik kolonlarda ayrılmıştır. Manyetik kolonda tutulan pozitif olarak seçilmiş timositler, $CD4^+$ tek pozitif ve $CD4^+CD8^+$ çift pozitif hücre popülasyonunu içerirken, kolon vasıtasıyla ayrıştırılmış olan $CD4^+$ boşaltılmış hücre popülasyonu, $CD8^+$ tek pozitif ve $CD4^-CD8^-$ çift negatif hücreleri içermiştir. Mikro tanecikleri, $CD4^+$ pozitif olarak seçilmiş hücre popülasyonlarından çıkarmak için, hücreler, MACS Multisort salınım reaktifi ile inkübe edilmiştir. 20 dakika sonra, sindirim durdurulmuştur ve hücreler, $CD8$ mikro tanecikleri ile 30 dakikalığına işaretlenmiştir. $CD4^+CD8^+$ çift pozitif timositler, pozitif seçim ile elde edilirken, $CD4^+$ tek pozitif hücreler, boşaltılmış hücre popülasyonunda keşfedilmiştir. $CD4^+$ boşaltılmış hücre popülasyonu, $CD8$ mikro tanecikleri ile 30 dakikalığına inkübe edilmiştir. Manyetik bir kolonda işaretlenmiş hücreleri uyguladıktan sonra, $CD8^+$ tek pozitif hücreler, $CD4^-CD8^-$ çift negatif timositlerden ayrılabilir. Dört farklı timosit alt popülasyonunun saflıkları, akış sitometrik analiz ile değerlendirilmiştir. Kabul edilen saflık, %95’ten daha fazla olmamıştır.

15

1.3.3.6. İnsan bademciklerinden $CD54^+$ T hücrelerinin izolasyonu

Mononükleer hücreler, Bölüm 1.3.2’de açıklanan yöntem kullanılarak insan bademciklerinden ekstrakte edilmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun izolasyonunun 4 saati içerisinde floresan hücre boyama işlemi, daha sonrasında hücre sınıflandırma işlemi uygulanmıştır. $CD54^+$ T hücreleri (hücre arası yapışma molekülü-1 veya ICAM-1), bir fare anti-insan $CD3$ -PE antikoru (BD Pharmingen) ve bir fare anti-insan $CD54$ -FITC antikoru (BD Pharmingen) kullanılarak mononükleer tonsiler hücre popülasyonundan ekstrakte edilmiştir veya bir uygun izotip kontrolü, Bölüm 1.3.3.1.1’de açıklandığı gibi hücre boyama/sınıflandırma yöntemi kullanılarak seçilmiştir. Boyanan hücreler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. Sınıflandırma kapıları, $CD3^+$ T hücrelerini (bir başka ifadeyle, $CD3^+CD54^-$ hücreleri) veya aktive $CD54^+$ T hücrelerini (bir başka ifadeyle, $CD3^+CD54^+$ hücreleri) içeren fraksiyonları toplamak üzere ayarlanmıştır. Şekil 8, fare anti-insan $CD3$ ve fare anti-insan $CD54$ ile boyanan numunelerin bir FACS profilini göstermektedir. $CD3^+$ hücreleri, bir çapraz soy tri-hibridin oluşumu için kullanılırken, $CD54^+$ aktive T hücreleri, ekspresyon deneyleri için kullanılmıştır.

30

Sonuçlar, T hücreleri, bademciklerden izole mononükleer hücrelerin büyük çoğunluğunu (%82) oluştururken, sadece %9’unun, $CD54^+$ T hücreleri olduğunu göstermiştir.

1.3.4 Fare mononükleer hücrelerinin izolasyonu

- 8-12 haftalık BALB/c fareleri, spesifik patojen içermeyen hayvan tesislerinde sürdürülmüştür.
- 5 Doku ekstraksiyonundan önce, farelere, CO₂ maruziyeti ile ötenazi yapılmıştır. Periferik kan, aksiler veya femoral arter ponksiyonu ile elde edilmiş ve heparin kaplı tüplerde toplanmıştır. Mononükleer hücre popülasyonunun izolasyonu, insan periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için Bölüm 1.3.1’de açıklananla aynı protokol kullanılarak uygulanmıştır. Fare dalakları mekanik olarak bozulmuştur ve mononükleer hücreler, Bölüm 1.3.2’de açıklandığı
- 10 gibi insan splenik mononükleer hücrelerinin izolasyonuna yönelik prosedür kullanılarak izole edilmiştir.

1.3.5. Fare mononükleer hücrelerden soya özgü primer hücrelerin izolasyonu

- 15 T lenfoid soyuna ve miyeloid soyuna ait insan hücreleri, FACS analizi ve hücre sınıflandırma veya manyetik hücre sınıflandırma işlemi kullanılarak standart prosedürler ile izole edilmiştir. Soya özgü primer fare hücrelerinin izolasyonu için hücre boyama ve sınıflandırma işleminin kısıtlayıcı olmayan örnekleri aşağıda verilmektedir.

20 1.3.5.1. Fare dalaklarından ve periferik kandan efektör T hücrelerinin izolasyonu

Farklı efektör T hücrelerinin seçimleri, CD4 ve CD8’ün yüzey ekspresyonlarına bağlı olmuştur.

- 25 10 µl her bir fare anti-insan CD4-PE antikoru (BD Pharmingen) ve sıçan anti-fare CD8-FITC antikoru (BD Pharmingen) veya uygun izotip kontrolü, tam bölen başına 1×10^5 hücreyi içeren, boyama ortamında (PBS+%5 BSA) dalak veya periferik kan mononükleer hücrelerinin bir 100 µl tam bölenine eklenmiştir. Mononükleer hücre popülasyonunun sunulan bir tam bölen için, boyama karışımı, buzda 30 dakikalığına inkübe edilmiştir. 10 ml buz
- 30 soğukluğunda boyama ortamı, hücre topağına eklenmiştir ve 7 dakikalığına 350 g miktarında ve 4°C’de santrifüjlenmiştir. Süpernatant havalandırılmıştır ve daha sonrasında, hücre topağı, buz soğukluğunda boyama ortamının kıyaslanabilir bir hacminin eklendiği tüpü hareket ettirilerek yeniden askıya alınmıştır. Boyanan hücreler santrifüjlenmiştir ve buz soğukluğunda boyama ortamında bir kez daha yıkanmıştır. Süreç, diğer tam bölenler için tekrar edilmiştir.

Boyanan hücreler, bir FACS kullanılarak analiz edilmiştir. En az 20,000 kapılı eylem, her bir numune için analiz edilmiştir. Fare periferik kan ve dalak mononükleer hücrelerinin boyanmasına dair tipik FACS profilleri, sırasıyla Şekil 45(a) ve 45(b)'de gösterilmektedir. Her iki lenfoid dokusu, tek pozitif CD4 veya CD8 T hücrelerini ve çift pozitif T hücrelerini içermiştir, fakat hücre temsiliinde değişkenlik göstermiştir. Örneğin, periferik kanda en geniş poplasyon, CD8⁺CD4⁻ sitotoksik T hücrelerini (%43) içerirken, mononükleer dalak hücreleri başlıca CD4⁺CD8⁻ yardımcı veya düzenleyici T hücreleri (%42) tarafından temsil edilmiştir. CD4 pozitif popülasyon (bölge R1) için, CD8 pozitif popülasyon (bölge R3) veya çift pozitif hücre popülasyonu (bölge R2) için uygun sınıflandırma kapılarının ayarlanmasından sonra, fraksiyonla toplanmıştır. 1 ml her bir fraksiyon, saflık analizi için toplanmıştır ve her bir fraksiyonun geri kalanı, diğer deneyler için tam ortamda yeniden askıya alınmıştır. Her bir fraksiyonun saflığı, %98'in üzerinde olmuştur.

1.3.5.2. Fare periferik kandan monositlerin izolasyonu

Fare monositler, manyetik taneciklerle (Miltenyi Biotec) negatif seçim kullanılarak periferik kan mononükleer popülasyonundan izole edilmiştir. Mononükleer hücreler, manyetik hücre sınıflandırma tamponunda (PBS, ağırlık/hacim cinsinden %01 BSA ve 0.5 mM EDTA) askıya alınmıştır ve üreticinin protokolüne göre T hücreleri (CD90), B hücreleri (B220) ve NK hücrelerine (CD49b) karşı antikorları içeren MicroBeads antikorunun bir karışımı ile inkübe edilmiştir. Daha sonrasında hücreler, bir LD-negatif seçim kolonundan geçirilmiştir. Negatif (monosit) fraksiyonu toplanmıştır. Saflığı belirlemek için, hücreler, CD11b'ye konjüge PE ve CD90, B220, CD49b, NK1.1 ve Ly6G'ye (BD Pharmingen) konjüge antikorlar ile boyanmıştır. Monositler, CD11b⁺CD90⁻B220⁻CD49b⁻NK1.1⁻Ly6G^{-(low)} olarak tanımlanmıştır ve saflık profili, FACS ile onaylanmıştır. Fare monosit popülasyonunun saflık profili, Şekil 46'da gösterilmektedir. Hücrelerin %100'ü, CD11b için pozitif olurken, bunların %98'inden fazlası, B220, CD90, CD49b ve NK1.1 için negatif olmuştur. CD11b pozitif hücrelerinin yaklaşık olarak %38'i, Ly6G'yi düşük seviyelerde eksprese etmiştir.

Örnek 2

2. Arzu edilen proteinleri salgılayan primer hücrelerin oluşumu

Arzu edilen proteinleri salgılayan primer insan hücrelerinin üretimi için kullanılan yöntemler, aşağıdaki Bölümlerde sunulmaktadır. Bu hücreler, hücre hibridizasyon deneyleri için veya analitik deneylerdeki kontroller olarak veya tri-hibrit ekspresyon sisteminde eksprese edilen proteinlerin analizine yönelik bir referans olarak kullanılmıştır.

5

2.1. İnsan GM-CSF salgılayan lenfositlerin oluşumu

Umbilikal kordon kanı lenfositleri ilk olarak, Bölüm 1.3.1’de açıklandığı gibi gradyan yoğunluk santrifüjleme işlemi ile ayrılmaktadır ve daha sonrasında, fitohemaglutinin (PHA) ile kültürde, bundan sonra IL-2’de (1000 U/ml) hücre genişlemesi ile aktif hale getirilmiştir. İnsan GM-CSF üretimi, ELISA ile analiz edilmiştir. Üretimden konsantrasyonlar, 15 ila 40 ng/ml/10⁶ hücre aralığında olmuştur.

Toplamda 300,000 PHA ile aktive insan lenfositler, 30 dakika boyunca 4°C’de üretici talimatlarına göre konsantrasyonlarda FITC (Sigma) ile konjüge fare anti-insan CD4 antikoru ile karanlıkta inkübe edilmiştir. Aktive insan T hücreleri, bir FACS (FACS VantageSE, BD) kullanılarak analiz edilmiş ve seçilmiştir. Şekil 42 (a) PHA’sı aktive lenfosit kültürlerinde CD4⁺ T hücrelerinin bir tipik profilini göstermektedir, burada Şekil 42 (b), CD4⁺ sınıflandırılmış hücreler için %100 saflık göstermektedir.

20

2. 2. IgM ve IgG salgılayan insan lenfositlerin oluşumu

Saflaştırılmış B hücreleri (bkz. Bölüm 1.3.3.1), fare anti-insan CD154 antikoru (BD Pharmingen) ile kaplanmış 96 yuvarlak taban hazneli plakaların (Corning) haznelerinde 3.75x10⁵ hücre/ml miktarında tohumlanmıştır. Hücreler, %10 ısısı inaktif ultra düşük IgG FBS (Gibco/BRL) ve 100U/ml interlökin 4 (IL-4) (R&D systems) ve kültüre eklendikten 3 gün sonra 50ng/ml interlökin 10 (IL10) ile takviye edilen tam RPMI1640 ortamında kültürlenmiştir. Kültürler, her 2 ila 3 ügünde kültür ortamının yarısını değiştirerek yenilenmiştir. Hücre canlılığı ve sayıları, hemositometre kullanılarak tripan mavisinin hariç tutulması ile üç kopya değerlendirilmiştir. 5. günde ve 10. günde, kültürlenmiş lenfositler çıkarılmış, PBS’de iki defa yıkanmış ve fare anti-insan CD19-PE, fare anti-insan IgM-FITC veya fare anti-insan IgG-FITC antikorları (tümü BD Pharmingen’den temin edilmiştir) kullanılarak FACS vasıtasıyla analiz edilmiştir. Tüm boyama işlemlerine, 4°C’de 1x10⁶ hücre başına 1 µg her bir antikor ile ulaşılmıştır. Tüm analizde, %95’den daha fazla hücre, izotip ile

30

eşleştirilmiş negatif kontrol boyasına göre ayarlanan markörler ile çift negatif olmuştur. Ölü hücreleri ve kalıntıyı içeren bölgeler, analizden hariç tutulmuştur. Tüm analizler, 5000 ila 10000 canlı hücreyi kapılayarak tamamlanmıştır.

- 5 Kültürlenmiş lenfositlerde IgM ve IgG pozitif hücrelerinin tipik profilleri, Şekil 9'da gösterilmektedir. Kültürde 5 gün sonra, CD19⁺ hücrelerinin %18'i, IgM pozitif olurken ve sadece %1'i, yüzeyde tespit edilebilir IgG'ye sahip olurken, 10 gün sonra, IgM pozitif lenfositlerin yüzdesi, IgG pozitif hücrelerinin yüzdesi %15'e artarken sadece %2'ye azalmıştır. Uygun kapıların ayarlanmasından sonra, IgM pozitif ve IgG pozitif fraksiyonlar, 10 Ig ekspresyon deneyleri için sınıflandırılmıştır.

Kültürde IgM ve IgG konsantrasyonları, 96 ELISA hazneli plakalar ve insan μ ve γ zincirlerine plastik absorbe keçi affinitesi saflaştırılmış antikorlar kullanılarak bir standart ELISA ile belirlenmiştir. Bağlı antikorlar, HRP konjüe koyun anti-insan Ig antikorları ile 15 ortaya çıkarılmıştır. Tüm antikorlar, Sigma'dan temin edilmiştir. ABTS, bir sübstrat olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluklar, 405nm'de ölçülmüştür. Tablo 1, 5 ve 10 gün sonra B lenfosit kültürde tespit edilen IgM ve IgG'nin seviyelerini özetlemektedir.

Tablo 1

Kültürdeki süreç	IgM, ng/10 ⁶ hücre	IgG, ng/10 ⁶ hücre
5 gün	2480±182	850±92
10 gün	1215±260	1914±101

- 20 IgM üretimi, kültürde 5 gün sonra düşerken, IgG üretimi artmıştır.

Örnek 3

3. Somatik hücre hibridizasyonu

25

Somatik hücre hibridizasyonunun çeşitli yöntemleri, teknikte iyi bilinmektedir. Bunlar, kısıtlayıcı olmayacak şekilde Sendai virüsü (Kohler and Milstein, 1975) gibi fuzajenik virüs kullanılarak bir biyolojik yöntemi, polietilen glikolü (PEG) (Wojciezsyn, et al, 1983) kullanarak bir kimyasal aracı ve elektrik alanlarını kullanarak bir elektriksel yöntemi (Neil, 30 and Zimmermann, 1993) içermektedir. Her bir yöntem, ilgili hücrelerin plazma

membranlarının, tersine çevrilebilir şekilde geçirimli olmasını ve hibridize olmasını uyarabilmekte veya tersine çevrilebilir şekilde geçirimli olmasına ve hibridize olmasına olanak sağlayabilmektedir.

- 5 Yukarıda bahsi geçen hücre hibridizasyon yöntemlere bakılmaksızın, iki temel adım, prensip olarak hücre hibridizasyonuna ulaşmak için gereklidir. İlk olarak, hibridize edilecek olan hücrelerin plazma membranları, iyi hücre membran ile temasa geçirilmelidir. İkinci olarak, temas noktasında plazma membranlarının tersine çevrilebilir bir şekilde kopması, eş zamanlı olarak indüklenmelidir.

10

Elektriksel hücre hibridizasyon yöntemi için, ilgili hücreler, uygun bir alan frekansı ile alternatif akımlı bir elektrik alanı (AC alanı) kullanılarak iyi hücre membran temasına geçirilebilmektedir ve daha sonrasında, AC alanı ile eş zamanlı olarak kısa elektrik darbeye maruz bırakıldıklarında hibridize olacak şekilde indüklenebilmektedir.

- 15 Daha fazla detaylandırmak için, elektriksel hücre hibridizasyonu, aşağıdaki fiziksel fenomeni içermektedir; plazma hücre membranlarının dielektroforezi (DEP) ve bir elektriksel kopması.

- Dielektroforez (*Pohl, 1978*), uygun bir çözeltide askıya alındıklarında ve uygun bir frekansın tekdüze olmayan bir AC elektrik alanına tabi olduğunda biyolojik hücreler gibi dielektrik partiküllerin hareketini açıklayan bir fenomendir. Hücrelerin hareketinin, (i) örneğin 100 mM sorbitolde (*Mahaworasilpa, 1992*) askıya alınan Sp2 hücreleri için 0.5 - 2.0 megahertz (MHz) arasındaki alan frekanslarında dielektrik partiküllerinin dönüşümü veya geçişi ve (ii) örneğin 100 mM sorbitolde askıya alınan Sp2 hücreleri için 2 - 10 kilohertz (kHz) arasındaki alan frekanslarında dielektrik partiküllerinin (*Mahaworasilpa, 1992*) rotasyonu olarak
- 20 açıklanabildiği belgelendirilmiştir. Tekdüze olmayan bir alan, örneğin bir dizi konfigürasyonda düzenlenebilen elektriksel, silindirik kablolar gibi bir çift elektrot boyunca bir elektrik alan uygulayarak üretilebilmektedir. En yaygın kullanılan konfigürasyon, bir paralel elektrot konfigürasyonudur (Şekil 58). Tekdüze olmayan bir alanın mevcudiyetinde, DEP, dielektrik partiküllerin (bir başka ifadeyle, biyolojik hücrelerin) birbirlerini çekmesini
- 25 ve en yoğun alanın bölgelerine karşı eş zamanlı olarak geçmesini sağlayabilmektedir. Sonuç olarak, hücrelerin bir zincirini veya dizisini oluşturmaktadır ve bu şekilde, iyi hücre membran temasını indüklemektedir. Hücrelerin karşılıklı çekiminin, hücreler, kısmen düşük elektriksel iletkenliğin çözeltilerinde askıya alındığında güçlü oranda arttırıldığı ortadadır.
- 30

Hücre membranlarının elektriksel kopması, uygun bir hibridizasyon çözeltisinde askıya alınan hücreler, uygun darbe genliğine ve genişliği ile bir elektrik darbeye maruz kaldığında indüklenebilmektedir (Zimmermann, 1982). Darbe genişliklerinin bir aralığı, örneğin 1 ila 200 mikro saniye (μ saniye) kare darbeler, hibridize edilecek olan hücre tiplerine bağlı olarak geniş oranda kullanılmaktadır.

3.1. Elektriksel hücre hibridizasyon sistemi

Mevcut buluşun belirli yapılandırmalarında, bir elektriksel hücre tekniği, tri-hibridler gibi hibridize hücreleri oluşturmak üzere kullanılabilmektedir.

3.1.1. Hücre manipülasyon sistemi

Hücre hibridizasyonundan önce ilgili bireysel hücreleri manipüle etmek için, öncesinde açıklanan tek hücreli manipülasyon/iletim sistemi (Bölüm 1.1.1), mevcut buluş boyunca kullanılmıştır.

3.1.2. Mikroelektrotlar

Mevcut buluşta, iki L şekilli mikroelektrotlar kullanılmıştır. Şekil 57, çap olarak (7) 128 μ m bir kaplanmamış nikel alaşımdan oluşturulan bir mikroelektrotu göstermektedir. Mikroelektrotun mili, dış çapı (8) 1.5 mm olan bir hematokrit kapiler tüp ile kaplanmıştır. Mikroelektrotun (9 ve 10) L şekilli Bölümü, elektrotun yatay ve dikey Bölümlerinin yüzeyinin tutarlı bir alanının, bir ortama veya uygun bir çözeltiye maruz bırakılmasına olanak sağlamak üzere konfigüre edilmiştir (Mahaworasilpa, 1992). Hücre hibridizasyon sürecinden önce, iki mikroelektrot, her bir mikroelektrot için bir tane olmak üzere iki ince mikromanipülatöre monte edilmiştir. Bu mikroelektrotlar, her bir elektrotun bir paralel elektrot konfigürasyonunun elde edildiği şekilde düzenlenmiştir (Şekil 58). Her bir ince mikromanipülatör hidrolik olarak çalıştırılmıştır ve X, Y veya Z yönde 0.5 μ m kadar ince bir harekete izin vermiştir.

3.1.3. Hücre haznesi ve konfigürasyon

Şekil 59, standart 96 hazneli bir TC plakasının bir haznesinde iki paralel elektrotu göstermektedir, hazne, mevcut buluşun belirli yapılandırmalarında bir hücre hibridizasyon haznesi olarak hareket etmektedir. Hücre hibridizasyonunu uygulamak için, mikroe elektrotlar, standart 96 hazneli bir doku kültürü plakasının haznesi (12) ile dahil edilen uygun bir ortama (11) daldırılmıştır. Şekil 60 ve Şekil 61, sırasıyla paralel elektrot konfigürasyonunun üstten bir görünüşünü ve yanal bir görünüşünü göstermektedir, burada örneğin hibridize edilecek olan önceden seçilmiş üç hücre, uygun bir AC elektrik alanının mevcudiyetinde hücrelerin bir zincirini hizalamak veya oluşturmak üzere indüklenebildikleri şekilde paralel elektrotlar arasına yerleştirilmektedir.

Örnek 4

4. Elektriksel hücre hibridizasyon yöntemi ile çapraz soy tri-hibrit üretimlerinin örnekleri

Aşağıdaki Bölümler, farklı soylardan veya hücre tiplerden veya aynı soylardan veya hücre tiplerinden, fakat farklı fenotiplerden hibridize edici hücreler vasıtasıyla elde edilen tri-hibrit hücre dizisinin oluşumunun örneklerini sağlamaktadır. Her bir stabil tri-hibrid, ana hücrelerin fenotipik özelliklerini eş zamanlı olarak barındırdığını onaylamak üzere analize tabi olmuştur. Onaylama işlemi, soya özgü hücre yüzeyi markörlerinin analizine, soya özgü markörlerin hücre içi ekspresyonuna, soya özgü markörlerin RNA transkriptlerinin mevcudiyetine, karyotiplemeye ve/veya soya özgü proteinlerin salgılanmasına bağlı olmuştur. Aşağıdaki örnekler, çapraz soy tri-hibridlerin en tipik fenotipik özelliklerini göstermektedir. Fakat, bu örnekler, herhangi bir şekilde seçilmiş özel bir marköre kısıtlı değildir.

4.1. Miyeloid, T ve B lenfoid soylarından türetilen üç immortal hücreden çapraz soy tri-hibrit üretimi - *KMW*.

Bu çapraz soy tri-hibrit tipi, bir miyeloid K562 hücrelerini, bir T lenfoid MOLT4 hücrelerini ve bir B lenfoid WIL2NS hücrelerini hibridize ederek oluşturulmuştur. Bu şekilde elde edilen çapraz soy tri-hibrid, bir KMW dizisi (bundan sonra seri numara) olarak işaretlenmiştir. KMW çapraz soy tri-hibrid üretiminin sürecine yönelik adımlardan sonra, mevcut buluşta kullanılan çözümler (hibridizasyon, kültür ve geri kazanım ortamı) ve parametreler aşağıda

açıklanmaktadır.

4.1.1. KMW çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre preparasyonu

5 K562, WIL2NS ve MOLT4 hücre dizileri, standart ortamlarımızda kültürlenmiştir (bkz. Bölüm 1.1). Bir rutin olarak, her bir hücre dizisi, her 3 günde bir geçirilmiştir. Hücre hibridizasyonundan önce, en yüksek proliferasyon oranına sahip olan her bir hücre tipinin stabil klonu, Bölüm 1.1.2'de açıklanan prosedür kullanılarak oluşturulmuştur. Bazı deneylerde, Bölüm 1.1.3'te açıklandığı gibi oluşturulan CD71⁺ ile zenginleştirilmiş hücre
10 popülasyonları kullanılmıştır. Ayrıca, bazı durumlarda, CD71⁺ ile zenginleştirilmiş K562 popülasyonun CD15⁺ hücreleri (Bölüm 1.1.3.1) kullanılmıştır.

4.1.2. KMW çapraz soy tri-hibrit üretiminin hücre hibridizasyon protokolü

15 TC 96 hazneli bir plakanın bir kaç haznesi, hücre hibridizasyon haznesi olarak kullanılmıştır. Her bir hazne, 240 mM sorbitol (Sigma), 2.0 mM KH₂PO₄ (Sigma), 0.4 mM CaCl₂ (Sigma), 0.2 mM Mg(C₂H₃O₂)₂ (Sigma) ve 0.2 mM Ca'dan(C₂H₃O₂)₂ (Sigma) oluşan, %0.2 bovin serum albumini, BSA (Sigma) ile takviye edilen yaklaşık 150 µl ile doldurulmuştur. Elektriksel hücre hibridizasyonundan önce, her bir hücre tipinin önceden seçilmiş klonunun
20 hücreleri, birkaç dakikalığına bir hibridizasyon ortamında bir defa yıkanmıştır ve taze hibridizasyon ortamını içeren bir hazneye aktarılmıştır. Hazne, bir ön hibridizasyon haznesi olarak belirlenmiştir. Hücre hibridizasyon sürecinden önce, her bir seçilmiş klonun tek ve yıkanmış bir hücresi, her bir seçilmiş klondan bir tane olmak üzere sadece üç hücrenin, haznenin tabanına (Şekil 61'de gösterildiği gibi) daldırılan bir çift benzer, paralel elektrot
25 arasına konumlandırıldığı şekilde Bölüm 1.1.1'e göre manipüle edilmiştir. Elektrotların ayrılması, 400 mikrometreye (bir başka ifadeyle, 400 µm) ayarlanmıştır.

Elektriksel hücre hibridizasyonuna ulaşmak için, ilk olarak 0.8 MHz br frekansa ve metre başına yaklaşık 50 - 60 kilovolt (örn. 50-60 kV/m) bir alan mukavemetine sahip bir alternatif akım (AC) alanı, üç hücre, dielektroforez, DEP ile birbirine çekilmek ve bir hücre dizisini
30 oluşturmak üzere indüklenene kadar bir kaç saniyeliğine elektrotlar arasında uygulanmıştır. Bu süreç, hücrelerin, iyi hücre membran temasını oluşturmasını sağlamıştır. Hücreler, K562 hücresinin, hücre hizasının ortasında olduğu şekilde düzenlenmiştir (bkz. Şekil 60 veya 61). Daha sonrasında, darbeler arasında 3 saniyelik bir aralıkla iki elektrik kare darbesi, AC alanı ile eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Yaklaşık 170 kV/m bir yoğunluğa ve 75 mikro saniye

(örn. 75 µsaniye) bir darbe genişliğine sahip her bir darbe kullanılmıştır. İkinci kare darbesinin tamamlanmasından sonra, AC alanı, 5 saniye daha aralıksız olarak tutulmuştur, bu da tek bir çapraz soy tri-hibridize hücreye hücre hibridizasyonuna neden olmaktadır. Mevcut buluşun belirli yapılandırmaları için, üç hücrenin hibridizasyonunun eş zamanlı olarak yer almadığı, bir başka ifadeyle üç hücreden ikisinin hibridizasyonunun, ilk olarak üçüncü hücrenin hibridizasyonundan önce sıklıkla olduğu gözlemlenmiştir. Bazı durumlarda, ek bir kare darbenin, tam bir üç hücreli hibridizasyonu elde etmesi gerekmiştir. Yeni oluşturulmuş çapraz soy tri-hibrit hücre, hibridizasyon haznelerinkinden farklı bir sıraya konumlandırılmış bir geri kazanım haznesine hibridizasyon haznesinden aktarılmıştır. Her bir geri kazanım haznesi, µl standart TC ortamını içermiştir (bkz. Bölüm 1.1). Her bir yeni oluşturulmuş çapraz soy tri-hibrit hücre, geri kazanım haznesi başına bir çapraz soy tri-hibrit hücre olmak üzere, nemlendirilmiş bir inkubatörde inkübe edilmiş, yedi gün boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeriğinde çalıştırılmıştır. Çapraz soy tri-hibridin çoğunun, hücre hibridizasyon eyleminden sonra 36 saat içerisinde bölündüğü keşfedilmiştir. Inkubasyon sürecinin sonunda, her bir geri kazanım haznesindeki ortam, yaklaşık olarak taze standart ortamı ile yenilenmiştir. Bu, her bir çapraz soy tri-hibrit klonun hücre proliferasyonu uyarmıştır. İki veya üç gün sonra, ayırıcı veya sağ kalan hücreler, her bir geri kazanım haznesinden tanımlanmıştır ve bir standart 24 hazneli TC plakasının haznelerine plakalanmıştır, bu da çapraz soy tri-hibrit klonlarının bir kümesine sebep olmuştur. Her bir çapraz soy tri-hibrit klon, 10 mililitre (ml) standart kültür ortamımızı (bkz. Bölüm 1.1) içeren bir 25 cm² TC şişeye aktarılmadan ve yaklaşık olarak diğer analiz için işaretlenmeden önce bir hafta daha 24 hazneli plakada kültürlenmiştir. Elektriksel hücre hibridizasyonunun tüm süreci ve çapraz soy tri-hibrit geri kazanım süreci, stabil çapraz soy tri-hibrit hücrelerin bir yığını oluşturmak için bir kaç defa tekrar edilmiştir.

4.1.3. KMW çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

CD markörlerinin ekspresyonları

Oluşturulan bir KMW çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin doğrulanmasının bir örneği aşağıda verilmektedir.

Bir KMW çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay boyunca normal kültür koşulları altında oluşturulmasından sonra, çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir.

Üç renkli bir FACS analizi, aşağıdaki CD markörlerinin ko-ekspresyonlarını doğrulamak üzere kullanılmıştır: WIL2NS'den kaynaklanan CD19, K562'den kaynaklanan CD15 ve MOLT4'den kaynaklanan CD4.

- 5 Özet olarak, %5 BSA içeren PBS'de 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda 100 µl KMW çapraz soy tri-hibrit hücre, 100 µl PBS'de askıya alınmıştır ve 0.5 mg/100 ml fare anti-insan CD15-PerCP, 0.25 mg/100 ml fare anti-insan CD4-PE ve 1.0 mg/100 ml fare anti-insan CD19-FITC antikorları veya bir uygun izotip kontrol ile 4°C'de 30 dakikalığına inkübe edilmiştir. Tüm fare anti-insan antikorları, BD Pharmingen'den elde edilmiştir. PBS ile kapsamlı yıkamadan sonra, işaretlenmiş hücreler, FACSCalibur akış sitometre ve CellQuest Pro yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Şekil 10, KMW çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin FACS profilini göstermektedir, bu da soya özgü özelliklerin, immortal fenotiplerden geldiği KMW çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin, baskın olan miyeloid ile karışık fenotiplerin heterojen hücre popülasyonlarını içerdiğini göstermektedir. Fakat, KMW hücrelerinin %62'si, miyeloid ve T lenfoid fenotiplerini paylaşmıştır ve KMW hücrelerinin %28'i, T ve B lenfoid fenotiplerini eksprese etmektedir.

20 4.2. Bir immortal miyeloid ve iki primer lenfoid hücrelerinden çapraz soy tri-hibrit üretim – KBT

Çapraz soy tri-hibrid, bir miyeloid K562 hücrenin, bir primer insan B hücrenin ve bir primer insan T hücrenin somatik hücre hibridizasyonu ile oluşturulmuştur. Çapraz soy tri-hibrid, seri numaradan önce KBT olarak adlandırılmıştır.

4.2.1. KBT çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre preparasyonu

KBT çapraz soy tri-hibridin oluşumundan önce K562 hücrelerinin preparasyonu öncesinde açıklanmıştır (Bölüm 4.1.1). KBT çapraz soy tri-hibridlerin oluşumunda kullanılan primer hücreleri, (i) dalak, periferik kan veya umbilikal kordon kanından türetilen olgun B hücrelerini ($CD19^+$); kemik iliğinden türetilen önceki B hücrelerini ($CD20^+CD72^+$); kemik iliğinden türetilen aktive B hücrelerini ($CD20^+CD72^+$); umbilikal kordon kanından türetilen antijen deneyimli B hücrelerini ($CD19^+CD5^+$) ve (ii) dalak, periferik kan, umbilikal kordon

kanı ve timustan türetilen yardımcı T hücrelerini ($CD4^+$), dalak, periferik kan, umbilikal kordon kanı ve timustan türetilen sitotoksik T hücrelerini ($CD8^+$); umbilikal kordon kanından türetilen antijen deneyimli T hücreleri ($CD3^+CD5^+$); umbilikal kordon kanından $CD3^+$ T hücrelerini; deneylerde kullanılmış timustan türetilen çift negatif T hücrelerini ($CD3^+CD4^-CD8^-$), timustan türetilen çift pozitif T hücrelerini ($CD3^+CD4^+CD8^+$) içermiştir. Çeşitli primer lenfoid hücrelerin, çeşitli lenfoid dokulardan izolasyonu, öncesinde Bölüm 1.3'te açıklanmıştır.

4.2.2. KBT çapraz soy tri-hibrit üretiminin hücre hibridizasyon protokolü

KBT çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre hibridizasyon protokolü ortamın ve AC elektrik alanlarının ve darbelerinin çeşitlendirilmesinin haricinde KMW çapraz soy tri-hibrit üretimi (Bölüm 4.1.2) için kullanılabenzerdir. Bu deneylerde kullanılan hibridizasyon ortamı, %0.3 BSA ile takviye edilen 230 mM sorbitol, 1.8 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM $CaCl_2$, 0.2 mM $Mg(C_2H_3O_2)_2$ ve 0.3 mM $Ca(C_2H_3O_2)_2$ 'den oluşmuştur. 0.5 MHz ve 65-75 kV/m bir AC alanı, her birisinin 100 µsaniye bir darbe genişliğine ve 175-185 kV/m mukavemetine sahip olduğu bir 3 saniyelik aralıkta üç kare darbenin silsilesi ile eş zamanlı olarak uygulanmıştır. AC alanı, üç kare darbenin tamamlanmasından 5 saniye daha sonra aralıksız olarak değiştirilmiştir, bu da hücrelerin hibridizasyonunun, bir çapraz soy tri-hibrit hücreyi üretmesine neden olmaktadır. Yeni oluşturulan çapraz soy tri-hibrit hücrenin stabil bir dizisinin geri kazanımına ve oluşturulmasına yönelik protokoller, Bölüm 4.1.2'de açıklanmıştır.

4.2.3. KBT çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

Hücre yüzeyinde CD markörlerinin ekspresyonları

Bir immortal miyeloid (K562) hücresi, bir primer olgun B hücresi ve bir primer efektör T yardımcı hücresinden oluşturulan bir KBT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

Bir çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, örneğin birkaç ay boyunca normal kültür koşulları altında oluşturulmasından sonra, hücre dizisi, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir. KBT hücre dizisinin hücreleri, hibridizasyondan önce hücre preparasyonunda açıklanan ile aynı protokolleri (Bölüm 1.3.1.1) kullanılarak fare anti-insan

CD19 ve CD4 antikorları ile işaretlenmiştir. Şekil 11(d), bir immortal miyelomonositik hücreden ve 2 primer hücrelerinden oluşan bir KBT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin FACS profillerini (CD19 ve CD4 işaretlerini) göstermektedir. Tipik olarak, bu tarz bir stabil çapraz soy tri-hibridde hücrelerinden %95'inden fazlasının, parent, primer hücrelerinininkine benzer yoğunluğa sahip B ve T hücreler için CD markörlerini eksprese etmiştir.

Bir immortal miyeloid hücreden (K562) ve 2 primer antijen deneyimli lenfoid hücrelerden (B ve T hücreleri) oluşturulan bir KBT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi.

- 10 Bir diğer yapılandırmada, bir K562 hücresinin, bir antijen deneyimli B ve bir antijen deneyimli T hücresinin hücre hibridizasyonundan türetilen bir KBT hücre dizisi oluşturulmuştur. Hücreler, bir FACS kullanılarak CD19, CD3 ve CD5'in ko-ekspresyonu için analiz edilmiştir.
- 15 Özet olarak, hücreler, hücre hibridizasyonundan önce hücre preparasyonunda olduğu gibi aynı protokoller (Bölüm 1.3.1.1) kullanılarak fare anti-insan CD5-FITC ve fare anti-insan CD19-PE veya fare anti-insan CD4-PE antikorları ile işaretlenmiştir. Şekil 12, bu KBT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin hücrelerinin FACS profillerini göstermektedir. Sonuçlar, KBT hücre popülasyonunun %5-10'unun, CD3 ve/veya CD19 için pozitif olurken CD5 molekülünün
- 20 hücre yüzeyi ekspresyonunu sürdürerek antijen maruziyetinin belleğini tuttuğunu göstermektedir. Ayrıca, CD5 negatif hücre popülasyonunun en az %83'ü, B soyu (CD19) ve T soyu (CD3) markörlerini ko-eksprese etmiştir.

Bir immortal miyeloid hücreden (K562), bir aktive B hücresinden ve bir primer çift pozitif sunulmamış efektör T hücresinden oluşturulan bir KBT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

- 25 Bir diğer yapılandırmada, bir K562'nin, timustan izole bir T hücresinin (CD4⁺ ve CD8⁺ için çift pozitif) kemik iliğinden izole bir aktive B hücresinin (CD20⁺ ve CD72⁺) (bölüm 1.3.34'te açıklanmaktadır) hücre hibridizasyonundan türetilen bir KBT hücre dizisi oluşturulmuştur. Hücreler, hücre yüzeyinde CD4, CD8, CD20 ve CD72'nin ko-ekspresyonları için analiz edilmiştir.

Özet olarak, KBT çapraz soy tri-hibrit hücreler, primer lenfositlerinin izolasyonu için açıklananla aynı protokol (Bölüm 1.3.3.1.1) kullanılarak fare anti-insan CD4-PE ve fare anti-insan CD72-FITC antikorları veya fare anti-insan CD20-PE ve fare anti-insan CD8-FITC antikorları veya fare anti-insan CD4-PE ve fare anti-insan CD8-FITC antikorlarının antikor kombinasyonu ile işaretlenmiştir. Şekil 13, bu çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin FACS profillerini göstermektedir.

Sonuçlar (bkz. Şekil 13), KBT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %99'unun, hücrelerinin %66-71'inin, CD4 için pozitif olduğu ve hücrelerin %88-89'unun, CD8 için pozitif olduğu yüzeyinde çift pozitif T hücresi türevi CD4 veya CD8den eksprese edildiğini göstermiştir. Bu hücrelerin %60'ında, CD4 ve CD8'n ekspresyonu eş anlamlı olmuştur. Çift pozitif timositlerden türetilen CD4 için pozitif olurken, hücrelerin %61'i, kemik iliğinin aktive B hücrelerinden türetilen CD72 için pozitif olmuştur. Fakat, çapraz soy tri-hibrit popülasyonunun %94'ü, yüzeylerinde CD72'yi eksprese etmiştir. Öte yandan, CD8 pozitif çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %31'i, CD20'yi ko-eksprese etmiştir. Toplam CD20 pozitif hücre sayısı, %39 olmuştur.

4.3. Bir immortal lenfoide, bir primer lenfoid hücre ve bir primer miyelomonositik hücreden çapraz soy tri-hibrit üretimi – *WTM*

Burada, bir immortal insan B lenfoid hücresinden (WIL2NS), bir primer insan T hücresinden ve bir primer insan monositlerden bir çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin oluşumunun bir örneği mevcuttur. Çapraz soy tri-ibrid dizisi, seri numaradan önce WTM olarak işaretlenmiştir.

4.3.1. WTM çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre preparasyonu

WTM çapraz soy tri-hibridin oluşumundan önce WIL2NS hücrelerinin preparasyonu öncesinde Bölüm 4.1.1'de açıklanmıştır. Primer hücreler, bu deneylerde kullanılan, dalak ve periferik kandan türetilen CD14⁺CD16⁻ veya CD14⁺CD16^L monositlerini; dalak, periferik kan, umbilikal kordon kanı ve timustan türetilen yardımcı T hücreleri (CD4⁺); dalak, periferik kan, umbilikal kordon kanı ve timustan türetilen sitotoksik T hücreleri (CD8⁺); umbilikal kordon kanından türetilen antijen deneyimli T hücreleri (CD3⁺CD5⁺) ve CD3⁺ T hücrelerini; timustan türetilen çift negatif T hücreleri (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) ve çift pozitif T hücrelerini (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) içermektedir. Çeşitli lenfoid dokulardan çeşitli primer lenfoid hücrelerinin

izolasyonu öncesinde açıklanmıştır (Bölüm 1.3.3). Belirli yapılandırmalarda, kemik iliğinden türetilen CD34⁺CD15⁺ miyelomonositik progenitör hücreleri, CD14 pozitif monositleri yerine kullanılmıştır.

5 4.3.2. WTM çapraz soy tri-hibrit üretiminin hücre hibridizasyon protokolü

WTM çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre hibridizasyon protokolü, ortamın çeşitlendirilmesinin haricinde KMW çapraz soy tri-hibrit üretimi için kullanılabenzer olmuştur (bkz. Bölüm 4.1.2). Bu deneylerde kullanılan hibridizasyon ortamı, %0.3 BSA ile 10 takviye edilen 235 mM sorbitol, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 0.3 mM Mg(C₂H₃O₂)₂ ve 0.25 mM Ca(C₂H₃O₂)₂'den oluşmuştur. Bölüm 4.2.2'de kesin elektriksel protokol, WMT üretimi için kullanılmıştır. Yeni oluşturulan çapraz soy tri-hibrit hücrenin stabil bir dizisinin geri kazanımına ve oluşturulmasına yönelik protokoller, Bölüm 4.1.2'de açıklanmıştır.

15 4.3.3. WTM çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

CD markörlerinin ekspresyonları

20 Bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS), bir primer T hücresinden ve bir primer monositlerden oluşturulan bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

Bir WIL2NS hücresinin, bir primer T hücresinin ve bir monositin hücre hibridizasyonundan türetilen bir WTM hücre dizisi oluşturulmuştur. Çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay boyunca normal koşullar altında kültürlendikten sonra (bkz. Bölüm 1.1), çapraz soy tri-hibrit 25 hücre popülasyonu, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir. Üç renkli FACS analizi, bu primer T hücreleri, hibridizasyon için kullanıldığında, WIL2NS'den kaynaklanan CD19'un, primer monositlerden kaynaklanan CD14'ün ve primer T hücresinden kaynaklanan CD4'ün ko-ekspresyonunu doğrulamak için kullanılmıştır

30 Özet olarak, %5 BSA içeren PBS'de 1x10⁶ hücre/ml konsantrasyonunda 100 ml WTM çapraz soy tri-hibrit hücreleri, 100 µl PBS'de askıya alınmıştır ve işaretlenmiş monoklonal antikorlar (tümü BD Pharmingen'den elde edilen 0.5 mg/100 ml fare anti-insan CD15-PerCP, 0.25 mg/100 ml fare anti-insan CD4-PE ve 1.0 mg/100 ml fare anti-insan CD19-FITC antikorları) veya bir uygun izotip kontrol ile 4°C'de 30 dakikalığına inkübe edilmiştir. PBS ile kapsamlı

yıkamadan sonra, işaretlenmiş hücreler, FACSCalibur akış sitometresi ve CellQuest Pro yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

WTM çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin FACS profilleri, Şekil 14'te gösterilmektedir.

- 5 İmmortal hücreden türetilen markör olan CD19 ekspresyon seviyelerinin, çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu arasında tutarlı olduğu görülürken, primer hücrelerden kaynaklanan markörlerin ekspresyonlarının değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Bu belirli bir örnekte, hücre popülasyonları, CD14 ve CD4 ekspresyonlarının yoğunluğuna bağlı olarak üç alt gruba bölünebilmektedir: (i) $CD4^H CD14^L$; (ii) $CD4^H CD14^H$; (iii) $CD4^L CD14^H$ Bu popülasyonlar
- 10 arasından her birisi, FACS, MACS veya tek hücreli klonlama ve benzeri gibi standart teknikler ile izole edilebilmektedir ve kültür içi homojeniteyi sürdürürken birbirlerinden farklı fenotipik özellikleri işleyen ayrı çapraz soy tri-hibrit kültürlerine genişletilebilmektedir.

Bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS), bir primer antijen deneyimli T hücresinden

15 **ve bir primer monositlerden oluşturulan bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi**

- CD5⁺ antijen deneyimli T hücreleri, bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisini oluşturmak üzere kullanıldığında, CD19 ve CD14 ile eş zamanlı olarak CD5 ekspresyonu, üç renkli FACS analizi kullanılarak doğrulanmıştır. Protokol, fare anti-insan CD19-PE ve fare anti-
- 20 insan D5-FITC antikorlarının, anti-insan CD19-FITC ve fare anti-insan CD4-PE antikorlarının yerine kullanılmasının haricinde yukarıda açıklananla esasen aynı olmuştur. Çapraz soy tri-hibrit hücrelerinde bu CD ekspresyonların FACS profilleri, Şekil 15'te gösterilmektedir. Analiz, immortal hücreden türetilen ve B hücresi fenotipinden sorumlu olan CD19 ekspresyon seviyesi, hücre popülasyonunun yaklaşık %91-99 civarında olduğu
- 25 görülürken, antijen deneyimli T hücrelerinden türetilen CD5 ve primer monositlerden türetilen CD14 ekspresyonunun, WMT hibrit hücreler arasında değişkenlik gösterdiğini sergilemiştir. CD19 pozitif hücrelerinin sadece %63'ü, CD5 için pozitif olmuştur ve CD19 pozitif hücrelerinin %79'u, CD14 için pozitif olmuştur. Gözle görülür ölçüde, CD14 ekspresyonunun seviyesi, bu tarz WMT çapraz soy tri-hibrit hücreleri arasında düşükten
- 30 yükseğe değişkenlik göstermiştir. Öte yandan, hücre popülasyonu net bir şekilde CD5⁺ ve CD5⁻ çapraz soy tri-hibrit hücrelere bölünmüştür.

Bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS), bir primer sitotoksik T hücresinden ve bir

primer monositlerden oluşturulan bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

Sitotoksik CD8 pozitif T hücreleri, bir WTM çapraz soy tri-hibrit diziyi oluşturmak üzere kullanıldığında, FACS analizi, bu Bölümde önceden açıklandığı gibi aynı üç renkli işaretleme protokolü kullanılarak CD19, CD8 ve CD14'ün ko-ekspresyonunu doğrulamak için uygulanmıştır. Şekil 16, bu WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin hücrelerinde CD19, CD8 ve CD14'ün FACS profillerini göstermektedir. CD19 ekspresyonu ve seviyesi, bu WMT çapraz soy tri-hibrit hücreleri arasında sabit kalırken, bu hücrelerin sadece %46'sı, primer sitotoksik T hücrelerinden türetilen CD8'i düşük seviyelerde ko-eksprese etmektedir ve %41'i, primer monositlerden türetilen CD14'ü ko-eksprese etmektedir. Gözle görülür ölçüde, bu WMT hücreleri arasında CD14 ekspresyon seviyesi, düşükten yükseğe çeşitlendirilmiştir.

10

Bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS), bir primer çift pozitif T hücresinden ve bir primer monositlerden oluşturulan bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

Timustan türetilen çift CD pozitif T hücreleri ($CD4^+CD8^+$) bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin oluşturulması için kullanıldığında, CD4 ve CD8 ko-ekspresyonunun analizi, CD19, CD8 ve CD14 ekspresyonlarının analizine ek olarak kullanılmıştır. Şekil 17, çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin hücrelerinde CD4 ve CD8'in ko-ekspresyonu için bir FACS profilini göstermektedir. Çift pozitif T hücrelerinin kullanıldığı bu durumda, WTM çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %96'sı, CD4 ve CD8 için pozitif olmuştur. $CD4^+CD8^+$ pozitif T hücrelerinden türetilen WTM çapraz soy tri-hibrit hücrelerinde CD19 ve CD14'ün ekspresyon profili, esasen sitotoksik CD8 pozitif efektör T hücrelerinden türetilen bu WTM çapraz soy tri-hibrit hücrelere benzer olmuştur.

15

20

Bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS), bir primer T hücresinden ve bir primer miyelomonositik progenitör hücreden oluşturulan bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

25

Kemik iliğinden türetilen $CD34^+CD15^+$ miyelomonositik hücreler, bir WTM çapraz soy tri-hibrit hücre dizisini oluşturmak üzere kullanıldığında, CD19 (B soyu), CD3 (T soyu), CD15 (miyeloid soyu) ve CD34'e (progenitör hücresi) yönelik yüzey markörleri analiz edilmiştir. Özet olarak, bu WMT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin hücreleri, fare anti-insan CD19-PE, fare anti-insan CD4-FITC (BD Pharmingen) ve fare anti-insan CD15-PerCP antikörlerinin kombinasyonu ile veya fare anti-insan CD34-PE, fare anti-insan CD4-FITC ve fare anti-insan CD15-PerCP antikörlerinin kombinasyonu ile işaretlenmiştir. Hücre boyama işlemi, önceden

30

açıklanan protokollere göre uygulanmıştır (Bölüm 1.3.3.1.1). CD34⁺CD15⁺ miyelomonositik progenitör hücrelerinden kaynaklanan WTM çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin tipik ekspresyon profilleri, Şekil 18’de gösterilmektedir. Analiz, WTM çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin yaklaşık %81’inin, B soyunu ve miyelomonositik fenotipleri (CD19⁺CD15⁺) paylaştığını ve CD19⁺’nın %61’inin, T soyu markörü olan CD4 için pozitif olduğunu sergilemiştir. CD4⁺ çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %34’ü, yüzeylerinde CD34’ü tutmuştur ve CD34⁺ tri-hibrit hücrelerinin %68’i, CD15’i eksprese etmiştir. İlginç bir şekilde, CD34⁺ çapraz soy tri-hibrit hücrelerin %28’i, CD34 ve CD14, aynı kaynaktan (miyelomonositik progenitör hücreden) gelmesine rağmen CD15 ekspresyonunu tutmamıştır.

4.4. Bir immortal lenfoidden, bir immortal miyeloid hücreden, bir immortal lenfoid hücreden ve bir primer lenfoid T hücresinden çapraz soy tri-hibrit üretimi. – KWT

Bu tipte çapraz soy tri-hibrit üretimi, bir immortal miyeloid hücrenin (K562), bir immortal B lenfoid hücrenin (WIL2NS) ve bir primer insan T hücresinin hücre hibridizasyonu ile oluşturulmuştur. Bu tipte çapraz soy tri-hibrid, seri numaradan önce KWT olarak adlandırılmıştır.

4.4.1. KWT çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre preparasyonu

Bu hücre hibridizasyon deneylerine yönelik K562 ve WIL2NS hücrelerinin preparasyonları, Bölümler 4.1.1’de açıklanmıştır. Hücre hibridizasyonundan önce, en yüksek proliferasyon oranına sahip olan her bir hücre tipinin stabil klonu, Bölüm 1.1.1’de açıklanan prosedür kullanılarak oluşturulmuştur. Belirli yapılandırmalarda, Bölüm 1.1.3’te açıklanan CD71⁺ ile zenginleştirilmiş hücre popülasyonları kullanılmıştır. Diğer yapılandırmalarda, Bölüm 1.1.3.1’de açıklandığı gibi seçilen CD71⁺ ile zenginleştirilmiş K562 popülasyonunun CD15⁺ hücreleri kullanılmıştır. KWT çapraz soy tri-hibridlerinin oluşturulması için kullanılan primer hücreler, bu deneylerde kullanılan, dalak, periferik kan, umbilikal kordon kanı ve timustan türetilen yardımcı T hücrelerini (CD4⁺); dalaktan, periferik kandan, umbilikal kordon kanı ve timustan türetilen sitotoksik T hücrelerini (CD8⁺); umbilikal kordon kanından türetilen antijen deneyimli T hücrelerini (CD3⁺CD5⁺) ve CD3⁺ T hücrelerini; timustan türetilen çift negatif T hücrelerini (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) ve çift pozitif T hücrelerini (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) içermiştir (bkz. Bölüm 1.3).

4.4.2. KWT çapraz soy tri-hibrit üretiminin hücre hibridizasyon protokolü

KWT çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre hibridizasyon protokolü, KMW çapraz soy tri-hibrit üretimi için kullanılabenzer olmuştur (bkz. Bölüm 4.1.2).

5

4.4.3. KWT çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

CD markörlerinin ekspresyonu

10 **Bir immortal miyeloid hücreden (K562), bir immortal lenfoidden (WIL2NS) ve bir primer T hücresinden oluşturulan bir KWT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi**

Bir K562 hücresinin, bir WIL2NS hücresinin ve bir primer T hücresinin hibridizasyonundan türetilen bir KWT hücre dizisi oluşturulmuştur. Çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay
15 boyunca normal koşullar altında kültürlendikten sonra, çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir. Üç renkli bir FACS analizi, K562'den kaynaklanan CD14, WIL2NS'den kaynaklanan CD19 ve primer efektör T yardımcı hücreden kaynaklanan CD4 ko-ekspresyonunu tanımlamak üzere kullanılmıştır. KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin hücre boyamasına yönelik protokol
20 esasen KMW çapraz soy tri-hibridleri için açıklananla aynı olmuştur (Bölüm 4.1.3). CD4⁺ efektör T hücrelerinden türetilen KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin FACS profilleri, Şekil 19'da gösterilmektedir. KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin büyük çoğunluğu, miyelomonositik, B ve T lenfoid soylarının karışık fenotipik özelliklerini sergilemiştir. KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %100'ü, primer efektör T hücresinden türetilen, T lenfoid
25 soyunun bir markörü olan, hücre yüzeyindeki CD4⁺ü eksprese ederken, bu hücrelerin %54'ü, WIL2NS'nin immortal hücresinden türetilen B soyu markörü CD19 için eş zamanlı olarak pozitif olmuştur ve bu CD4⁺CD19⁺ hücrelerinin %24'ü, immortal miyelomonositik progenitör hücre dizisi K562'den türetilen CD15 için pozitif olmuştur.

30 **Bir immortal miyeloid hücreden (K562), bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS) ve bir çift pozitif T hücresinden oluşturulan bir KWT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi**

Çift pozitif T hücreleri (CD4⁺CD8⁺ hücreleri), bir KWT çapraz soy tri-hibrit dizisini oluşturmak üzere kullanıldığında, primer timositlerden türetilen CD4 ve CD8'in ekspresyon

profili de analiz edilmiştir. CD profiline yönelik protokol esasen, fare anti-insan CD8-FITC antikor, fare anti-insan CD19-FITC antikor yerine kullanılması haricinde CD4⁺ T hücrelerinden türetilen KWT çapraz soy tri-hibritler için yukarıda açıklananla aynı olmuştur. Çift pozitif (CD4⁺CD8⁺) T hücrelerinden türetilen çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin tipik CD ekspresyon profilleri, Şekil 20’de gösterilmektedir. Sonuçlar, KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %99’unun, CD4⁺ için pozitif olduğunu ve %69’unun, CD8 için pozitif olduğunu göstermiştir, CD4⁺ hücrelerinin %26’sı, CD15 miyelomonositik hücre markörü için pozitif ve CD8⁺ hücrelerinin %23’ü, CD15 için pozitif, bu da CD4⁺CD8⁺CD15⁺ hücrelerinin, toplam hücre popülasyonunun yaklaşık %23’ünü temsil ettiği anlamına gelmektedir (hücrelerin neredeyse %100’ü CD4⁺ olduğu için, çift pozitif CD8⁺CD15⁺ popülasyon, CD4 için pozitif olacaktır). CD4⁺ efektör T hücrelerinden türetilen KWT tri-hibritde olduğu gibi, CD19⁺ hücreleri, CD15’i ko-eksprese edenlerin %22’si ile toplam hücre popülasyonunun %52’sini temsil etmiştir. Bu şekilde, tüm CD15⁺ hücre popülasyonu, ortalama %22-23 olan CD4, CD8 ve CD19’u ko-eksprese etmiştir.

Bir immortal miyeloid hücreden (K562), bir immortal lenfoid hücreden (WIL2NS) ve CD5 pozitif antijen deneyimli T hücresinden oluşturulan bir KWT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi

CD5 pozitif antijen deneyimli T hücreleri, bir KWT çapraz soy tri-hibrit dizisini oluşturmak üzere kullanıldığında, CD5 ekspresyonu analiz edilmiştir. KWT hibrit hücreleri, fare anti-insan CD19 ve fare anti-insan CD5 antikorları arasındaki floresan konjüгатlarının tersine çevrilmesi haricinde WTM çapraz soy tri-hibritlerin analizi için kullanılanla aynı protokolü kullanarak fare anti-insan CD19-FITC ve fare anti-insan CD5-PE antikorları ile işaretlenmiştir (Bölüm 4.6). Şekil 21’de gösterilen sonuçlar, KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %90’ının, antijen deneyimli T hücresinden kaynaklanan CD5 için pozitif olduğunu ve CD5 hücrelerinin %49’unun, WIL2NS hücrelerinden (B hücreleri) kaynaklanan CD19 için pozitif olduğunu göstermiştir. Bu çapraz soy tri-hibrit hücreler arasından CD19⁺ hücrelerinin toplam yüzdesi yaklaşık %56 olmuştur.

4.5. İki immortal lenfoid hücreden (WIL2NS) ve bir primer monositten çapraz soy tri-hibrit üretimi – WMM

Bu tipte çapraz soy tri-hibrit üretimi, iki immortal lenfoid hücrelerin (WIL2NS) ve bir primer insan monositin somatik hücre hibridizasyonu ile oluşturulmuştur. Çapraz soy tri-ibrid, seri numaradan önce WWM olarak işaretlenmiştir.

5 4.5.1. WWM çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre preparasyonu

WIL2NS hücre dizisi, Bölüm 4.1.1’de açıklananla aynı prosedürde kültürlenmiştir.

Belirli yapılandırmalarda, Bölüm 1.1.3’te açıklandığı gibi oluşturulan CD71⁺ ile zenginleştirilmiş hücre popülasyonları kullanılmıştır. İnsan monositler, dalaktan, periferik kandan veya umbilikal kordon kanından kaynaklanan karışık lenfositlerden izole edilmiştir. Monositlerin izolasyonu, CD14 markörünün ekspresyonuna ve bazı durumlarda, öncesinde Bölüm 1.3.3.1.1’de açıklandığı gibi FACS veya manyetik tanecikler olarak CD16 ekspresyonunun düşük seviyelerine bağlı olmuştur. Farklı lenfoid dokulardan monositler kullanıldığında, hibridizasyon parametrelerinde veya ortaya çıkan çapraz soy tri-hibridlerde herhangi bir fark olmadığı görülmektedir.

4.5.2. WWM çapraz soy tri-hibrit üretiminin hücre hibridizasyon protokolü

WWM çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre hibridizasyon protokolü, KBT çapraz soy tri-hibrit üretimi için kullanılabenzer olmuştur (bkz. Bölüm 4.2.2).

4.5.3. WWM çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

25 CD markörlerinin ekspresyonu

Bir WWT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay boyunca normal koşullar altında kültürlendikten sonra (bkz. Bölüm 1.1), çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir.

30

Fare anti-insan CD19-FITC ve fare anti-insan CD14-PE antikorları ile çift boyama veya işaretleme işlemi, meydana gelen çapraz soy tri-hibridin çapraz soy markör ekspresyonunun profilini çıkarmak üzere uygulanmıştır. Şekil 22a, bu tarz çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin bir tipik CD profilini göstermektedir. Onkojene bağlı markörü CD19’un ekspresyonunun, çapraz

soy tri-hibrit hücrelerinde sabit olduğu görülmüştür. Hücrelerin belirli bir oranı (%23.5) yüzeylerinde CD14'ü eksprese ederken, kalan %72.7, CD14'ün yüzey ekspresyonu için negatif olmuştur.

5 4.6. İnsan olmayan memeli hücreleri kullanarak çapraz soy tri-hibrit üretimi

Aşağıdaki örnek, çapraz soy tri-hibridlerin, insan hücrelerinden, özellikle fare hücrelerinden başka memeli hücreleri kullanılarak oluşturulabildiğini göstermektedir. Aynı prensibin, diğer memeli hücrelerden çapraz soy tri-hibridlerin üretiminde uygulanabildiği anlaşılmaktadır.

10

4.6.1. Bir immortal fare lenfoid hücreden, bir primer fare lenfoid hücreden ve bir primer fare monositlerden çapraz soy tri-hibrit üretimi

Bu bölüm, bir immortal fare B lenfoid hücreden (Sp2), bir primer fare T hücresinden ve bir primer fare monositlerden bir çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin oluşturulmasını açıklamaktadır. Çapraz soy tri-hibrit dizisi, bir seri numaradan önce STmMm olarak işaretlenmiştir.

15

4.6.1.1. STmMm çapraz soy tri-hibrit üretime yönelik hücre preparasyonu

STmMm çapraz soy tri-hibridlerin oluşturulmasında kullanılan Sp2 hücrelerinin preparasyonu, öncesinde Bölüm 1.1.4'de açıklanmıştır. Periferik kandan türetilen CD11b⁺CD90⁺B220⁺CD49b⁺NK1.1⁺Ly6G^{low} monositlerini; dalaktan veya periferik kandan türetilen fare yardımcı T hücrelerini (CD4⁺); dalaktan veya periferik kandan türetilen fare sitotoksik T hücrelerini (CD8⁺); ve dalaktan veya periferik kandan türetilen çift pozitif T hücrelerini (CD4⁺CD8⁺) içeren primer fare hücreleri, bu deneylerde kullanılmıştır. Dalaktan ve periferik kandan çeşitli primer fare lenfoid hücrelerin izolasyonu öncesinde açıklanmıştır (Bölüm 1.3.5).

25

4.6.1.2. STmMm çapraz soy tri-hibrit üretime yönelik hücre hibridizasyon protokolü

30

STmMm çapraz soy tri-hibrit üretime yönelik hücre hibridizasyon protokolü, ortamın AC elektrik alanlarının ve darbelerinin çeşitlendirilmesinin haricinde WTM çapraz soy tri-hibrit üretimi için kullanılabilecek benzer olmuştur (bkz. Bölüm 4.3.2). Bu deneylerde kullanılan hibridizasyon ortamı, %0.2 BSA ile takviye edilen 265 mM sorbitol, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.4

mM CaCl₂ ve 0.3 mM Mg(C₂H₃O₂)₂'den (Sigma) oluşmuştur. 0.5 MHz ve 65-75 kV/m bir AC alanı, her birisinin 70 µsaniye bir darbe genişliğine ve 250-280 kV/m mukavemetine sahip olduğu bir 3 saniyelik aralıkta üç kare darbenin silsilesi ile eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Yeni oluşturulan çapraz soy tri-hibrit hücrenin stabil bir dizisinin geri kazanımına ve oluşturulmasına yönelik protokoller, Bölüm 4.1.2'de açıklanmıştır.

4.6.1.3. STmMm çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

Bir Sp2 hücresinin, bir primer T hücresinin ve bir monositin hücre hibridizasyonundan türetilen bir STmMm hücre dizisi oluşturulmuştur. Çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay boyunca normal koşullar altında kültürlendikten sonra (bkz. Bölüm 1.1), çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir. Bu primer T hücreleri, hibridizasyon için kullanıldığında üç renkli bir FACS analizi, Sp2 hücrelerinden kaynaklanan CD138'in, primer fare monositlerinden kaynaklanan CD11b'in ve primer fare T hücrelerinden kaynaklanan CD4'ün ko-ekspresyonunu doğrulamak üzere kullanılmıştır.

Özet olarak, %5 BSA içeren PBS'de 1x10⁶ hücre/ml konsantrasyonunda 100 µl STmMm çapraz soy tri-hibrit hücre, 100 µl PBS'de askıya alınmıştır ve fare CD138-PE, CD11b-FITC ve CD4-PerCP (BD Pharmingen) veya uygun izotip kontrolüne, işaretlenmiş sıçan monoklonal antikorlarla 30 dakika boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. PBS ile kapsamlı yıkamadan sonra, işaretlenmiş hücreler, FACSCalibur akış sitometresi ve CellQuest Pro yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

STmMm çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin FACS profilleri, Şekil 47'de gösterilmektedir. B soyunun immortal hücrelerinden türetilen CD138 ekspresyon seviyelerinin, çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu arasında tutarlı olduğu görülürken, primer hücrelerden kaynaklanan markörlerin ekspresyonlarının değişkenlik gösterdiği görülmüştür. Bu belirgin örnekte, CD4 veya CD11B'yi CD138 ile ko-eksprese etmemiş olan hücrelerin nispeten küçük bir yüzdesi mevcuttur (bkz. Şekil 47a ve b). STmMm hücreleri, CD4 ve CD11b'nin ko-ekspresyonu için analiz edildiğinde (bkz. Şekil 47c), hücrelerin yaklaşık %82'si de analiz edilmiştir. Etkili bir şekilde, hücre popülasyonunun %82'si, CD4 veya CD11b'yi ko-eksprese etmeden CD138 pozitif olan hücrelerin sadece %5'i ile tüm üç CD markörlerini eksprese etmiştir. Bu popülasyonlar arasından her birisi, FACS, MACS veya tek hücreli klonlama ve benzeri gibi standart teknikler ile izole edilebilmektedir ve kültür içi homojeniteyi sürdürürken

birbirlerinden farklı fenotipik özellikleri işleyen ayrı çapraz soy tri-hibrit kültürlerine genişletilebilmektedir.

5 Sitotoksik CD8 pozitif lenfositler, STmMm tri-hibridlerin oluşturulmasında kullanıldığında, sıçan anti-fare CD8-PerCp antikorları, tri-hibrit hücrelerinin elde edilmesinde CD ko-ekspresyonu için anti-CD4-PerCp yerine kullanılmıştır. Şekil 48'den görüldüğü üzere, tri-hibrit hücrelerinin %97 ila 100'ü, CD138 için pozitif olurken (Şekil 48a ve b), bu hücrelerin %56 veya %57'si, CD8 (Şekil 48b) veya CD11b'yi (Şekil 48a) ko-eksprese etmiştir. Tri-hibrit popülasyonunun en az %40'ı, tüm üç markörü CD138, CD8 ve CD11b'yi eksprese etmiştir (Şekil 48c).

Çift pozitif CD4⁺CD8⁺ T hücrelerinin durumunda, birinci analiz, sitotoksik T hücrelerinde olduğu gibi aynı şekilde uygulanmıştır. Şekil 49, tri-hibridinde elde edilmesinde CD138, CD11b ve CD8 ekspresyonunun FACS profilini göstermektedir. Tri-hibrit hücrelerinin %98-100'ü, tüm üç soy markörü için pozitif olan tüm popülasyonun %57-60'ı ile CD138 için pozitif olmuştur (Şekil 49c). CD138 ve CD8'in ko-ekspresyonu, hücrelerin %93'ünde tespit edilmiştir (Şekil 49b). İkinci adımda, tri-hibrit hücreleri, CD8 ve CD4'ün ko-ekspresyonu için denetlenmiştir. Hücreler, sıçan anti-fare CD8-PE ve sıçan anti-fare CD4-FITC antikorları (BD Pharmingen) ile işaretlenmiştir. Şekil 50, CD8 ve CD4 ekspresyonunun FACS profilini göstermektedir. Tri-hibrit hücrelerinin %95'i, yüzeyde CD8'i eksprese ederken, hücrelerin sadece %50'si, aynı anda CD4'ü ko-eksprese etmiştir. Önemli ölçüde, pratik olarak tüm CD4 pozitif popülasyon, CD8 için pozitif çıkmıştır.

4.6.2. İki immortal fare lenfoid hücrelerinden ve bir primer fare monositin çapraz soy tri-hibrit üretimi

Bu örnek, iki immortal fare B lenfoid hücreden (Sp2) ve bir primer fare monositin bir çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin oluşumunu detaylandırmaktadır. Çapraz soy tri-hibrit dizisi, bir seri numaradan önce SSMm olarak işaretlenmiştir.

30

4.6.2.1. SSMm çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre preparasyonu

SSMm çapraz soy tri-hibridlerin oluşturulmasında kullanılan Sp2 hücrelerinin preparasyonu, öncesinde Bölüm 1.1.4'te açıklanmıştır. Periferik kandan türetilen primer fare CD11b⁺CD90⁻

B220⁺CD49b⁺NK1.1⁻Ly6G^{-/low} monositleri, bu deneylerde kullanılmıştır. Periferik kandan primer fare monositlerinin izolasyonu öncesinde açıklanmıştır (Bölüm 1.3.5).

4.6.2.2. SSMm çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre hibridizasyon protokolü

5

SSMm çapraz soy tri-hibrit üretimine yönelik hücre hibridizasyon protokolü, STmMm çapraz soy tri-hibrit üretimi için kullanılabenzer olmuştur (bkz. Bölüm 4.6.1.2).

4.6.2.3. SSMm çapraz soy tri-hibrit durumunun onaylanması

10

Bir SSMm çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay boyunca normal koşullar altında kültürlendikten sonra (bkz. Bölüm 1.1), çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonu, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir.

15 Sıçan anti-fare CD138-PE ve sıçan anti-fare CD11b-FITC antikorları (BD Pharmingen) ile çift boyama veya işaretleme işlemi, meydana gelen çapraz soy tri-hibridin çapraz soy markör ekspresyonunun profilini çıkarmak üzere uygulanmıştır. Şekil 51, bu tarz çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin bir tipik CD profilini göstermektedir. Onkojene bağlı markör CD138'in ekspresyonunun, C138 için negatif olan hücrelerin sadece %7'si ile çapraz soy tri-hibrit
20 hücrelerinde sabit olduğu görülmüştür. Hücrelerin büyük bir oranı (%70) ayrıca yüzeylerinde CD11b'yi eksprese ederken, CD138 pozitif hücrelerin kalan %23'ü, CD11b'nin yüzey ekspresyonu için negatif olmuştur.

4.7. İnsan ve insan olmayan memeli hücreleri kullanarak çapraz soy kimerik tri-hibrit üretimi

25

Bu örnek, insan ve insan olmayan, spesifik olarak fare gibi memeli hücreleri kullanarak çapraz soy kimerik tri-hibridlerin oluşumunu detaylandırmaktadır. Aynı prensibin, diğer memeli hücrelerden çapraz soy tri-hibridlerin üretiminde uygulanabildiği anlaşılmaktadır.

30

4.7.1. Bir immortal fare lenfoid hücreden, bir immortal insan lenfoid hücreden ve bir primer fare veya insan monositinden çapraz soy kimerik tri-hibrit üretimi

Bir immortal fare B lenfoid hücreden (Sp2), bir immortal insan B lenfoid hücreden (WIL2NS) ve bir primer fare veya insan monositin bir çapraz soy kimerik tri-hibrit hücrenin oluşturulması. Çapraz soy tri-hibrit dizisi, fare monositin kullanıldığı SWMm ve insan monositin kullanıldığı SWMh olarak işaretlenmiştir. Her bir durumda, tri-hibridinin

5 kısaltılmış adını bir seri numara takip etmiştir.

4.7.1.1. SWMm ve SWMh çapraz soy kimerik tri-hibrit üretime yönelik hücre preparasyonu

10 SWMm ve SWMh çapraz soy kimerik tri-hibridlerin oluşturulmasında kullanılan Sp2 ve WIL2NS hücrelerinin preparasyonu, öncesinde sırasıyla Bölüm 1.1.4 ve Bölüm 1.1.3'te açıklanmıştır. Periferik kandan türetilen primer fare CD11b⁺CD90⁻B220⁻CD49b⁻NK1.1⁻Ly6G⁻/low monositleri, bu deneylerde kullanılmıştır. Periferik kandan primer fare monositlerinin izolasyonu öncesinde açıklanmıştır (Bölüm 1.3.5). İnsan monositler, dalaktan, periferik

15 kandan veya umbilikal kordon kanından kaynaklanan karışık lenfositlerden izole edilmiştir. Monositlerin izolasyonu, CD14 markörünün ekspresyonuna ve bazı durumlarda, öncesinde Bölüm 1.3.3.1.1'de açıklandığı gibi FACS veya manyetik tanecikler olarak CD16 ekspresyonunun düşük seviyelerine bağlı olmuştur. Farklı lenfoid dokulardan monositler kullanıldığında, hibridizasyon parametrelerinde veya ortaya çıkan çapraz soy tri-hibridlerde

20 herhangi bir fark olmadığı görülmektedir.

4.7.1.2. SWMm ve SWMh çapraz soy kimerik tri-hibrit üretime yönelik hücre hibridizasyon protokolü

25 SSMm ve SWMh çapraz soy tri-hibrit üretime yönelik hücre hibridizasyon protokolü, STmMm çapraz soy tri-hibrit üretimi için kullanılabenzer olmuştur (bkz. Bölüm 4.6.1.2).

4.7.1.3. SWMm ve SWMh çapraz soy kimerik tri-hibrit durumunun onaylanması

30 SWMm ve SWMh çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi, 6 ay boyunca normal koşullar altında kültürlendikten sonra (bkz. Bölüm 1.1), çapraz soy tri-hibrit hücre popülasyonları, soya özgü CD markörlerinin ekspresyonu için analiz edilmiştir.

İnsan CD71 ve fare TfR ekspresyonuna yönelik çift boyama işlemi, meydana gelen tri-hibridlerin kimerizmini oluşturmak üzere uygulanmıştır. Şekil 52, insan ve fare transferin reseptörler için pozitif olan hücrelerin %100'ü ile bu tarz analizin tipik FACS profillerini göstermektedir. Bu, fare ve insan hücre bölünme kontrollerinde tri-hibrit güven olduğunu göstermektedir.

Primer monositlerin fare veya insan kaynağına bağlı olarak, sıçan anti-fare CD138-PE ve sıçan anti-fare CD11b-FITC antikorları (BD Pharmingen) veya sıçan anti-fare CD138-PE ve fare anti-insan CD14-FITC antikorları (BD Pharmingen), elde edilen çapraz soy kimerik tri-hibridlerinin çapraz soy markör ekspresyonunun profilini çıkarmak üzere uygulanmıştır. Şekil 53, bu tarz çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin tipik CD profillerini göstermektedir. Fare Sp2 hücreden türetilen onkojene bağlı markör CD138'in ekspresyonu, monositlerin fare veya insan kaynağına bağlı olduğu görülmüştür. Fare CD138 pozitif hücrelerin yüzdesi, SWMm tri-hibridlerde %84'ten, SWMh tri-hibridlerde %29'a düşmüştür. Fakat, SWMh kimerik tri-hibrit hücrelerinin %96'ı, WIL2NS'den türetilen insan C19 için pozitif olurken (bkz. Şekil 54), SWMm kimerik tri-hibride hücrelerin hiçbirisi insan CD19'u eksprese etmemiştir.

Örnek 5

5. CD markörlerinin dağıtımına bağlı olarak spesifik çapraz soy fenotipleri ile hücrelerin çapraz soy tri-hibridlerinin zenginleştirilmesi

Aşağıdaki Bölüm, farklı fenotipik özelliklere bağlı olarak çapraz soy tri-hibrit hücre dizilerinin alt dizilerinin oluşturulmasına dair bir örneği sağlamaktadır. Yaklaşım, soya özgü hücre yüzeyi markörlerinin analizine, soya özgü markörlerin hücre içi ekspresyonuna, soya özgü markörlerin RNA transkriptlerinin mevcudiyetine, karyotiplemeye ve/veya soya özgü proteinlerin salgılanmasına bağlı olmuştur. Arzu edilen özelliklere sahip çapraz soy tri-hibrit hücreleri, FACS ile genel popülasyondan izole edilmiştir. Aşağıdaki örnek, CD14'ün ekspresyonuna bağlı iki tri-hibrit popülasyona sahip olan bir WWM çapraz soy tri-hibride bağlı olmuştur: pozitif ve negatif. Fakat, örnek, seçilen belirgin çapraz soy tri-hibride veya marköre herhangi bir şekilde kısıtlı değildir.

WWM çapraz soya tri-hibrit hücreleri, CD14 pozitif ve CD14 negatif fraksiyonlara sınıflandırılmıştır ve her bir fraksiyon, 3 aylığına kültürde ayrı bir şekilde genişletilmiş ve

sürdürülmüştür. Şekil 22b, çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %95'inden fazlasının, CD14 ekspresyonunu tuttuğunu ve bu esnada, Şekil 22c'deki hücre popülasyonunun, CD14 için negatif olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu, aynı çapraz soy tri-hibrit dizisinden türetilen farklı homojen hücre popülasyonlarının izole edilmesi ve oluşturulmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

RT-PCR vasıtasıyla çapraz soy tri-hibridin onaylanması

Oluşturulan alt dizilerin çapraz soy tri-hibrit yapısını doğrulamak için, orijinal çapraz soy tri-hibrit hücreleri, CD19⁺CD14⁺ ile zenginleştirilmiş alt kültür ve CD14 negatif alt kültür, CD14 için RT-PCR deneylerine tabi tutulmuştur. İnsan CD14⁺ monositleri, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol hücreleri, öncesinde açıklandığı gibi FACS kullanılarak periferik kandan izole edilmiştir (Bölüm 1.3.3).

Özet olarak, toplam RNA, RNeasy kiti (RNeasy Mini kit, Qiagen) kullanılarak kültürlenmiş hücrelerden hazırlanmıştır. cDNA sentezi, üretici protokölüne göre cDNA-kiti (Amersham Pharmacia) ile uygulanmıştır ve PCR, esasen Sewing ve meslektaşları tarafından açıklandığı gibi uygulanmıştır. PCR reaksiyon karışımı, agaroz jel (%2) elektroforezi ile analiz edilmiştir ve etidyum bromür boya ile görselleştirilmiştir. Oligonükleotid primer çiftleri, 450 bp bir PCR ürününün güçlendirilmesi için 5'-primer 5'- CAACTCGCCTGCCTTTTCC - 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1) ve 3'-primer 5' GATTCCCGTCCAGTGTTCAGG - 3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2) sekanslarına sahip olmuştur.

Şekil 23'te gösterildiği üzere, RT-PCR, orijinal WWM kültürünü içeren hücrelerde ve orijinal WWM kültürünün CD14⁺ ile zenginleştirilmiş alt kültürde CD14 mRNA transkriptlerinin mevcudiyetini ortaya çıkarmıştır. CD14 mRNA ayrıca WWM alt kültüründen yoksun yüzey CD14'ünde insan CD14⁺ monositlerinininki ile kıyaslanabilir bir seviyede tespit edilmiştir.

Örnek 6

6. Karyotipleme

Çapraz soy tri-hibridlerin karyotiplemesi, çapraz soy tri-hibridlerin sitojenik özelliklerini oluşturmak, ayrıca hibrit kaynaklarını onaylamak üzere uygulanmıştır.

6.1. Orijinal hücre dizilerinin karyotiplemesi

Bir örnek olarak, K562 ve WIL2NS hücre dizilerinin hücreleri, orijinal hücre dizilerinin herhangi bir kromozomal instabilitesini kaydetmek üzere erken ve geç geçişler için karyotiplenmiştir. Sunulan bir hücre dizisi, örneğin K562 dizisi için, yeni erimiş bir dizinin karyotipi, birkaç boyunca normal kültür koşulları altında sürdürülen bir hücre dizisinininkine benzer olmuştur.

Şekil 24 ve 25, sırasıyla K562 ve WIL2NS hücrelerinin bir tipik karyotipini göstermektedir. Her iki durumda, 400bphs'de toplam 20 G bantlı metafaz hücreleri incelenmiştir.

Karyotipleme sonuçları, K562 hücre dizisinin, bir triploid özelliğe sahip olan, bir başka ifadeyle çeşitli kromozom anormalliklerine sahip modal sayıda 69 kromozoma sahip olan tek bir klonu içermiştir. Buna karşın, K562 hücreleri ile kıyaslandığında WIL2NS hücre dizisi, ayrı şekilde taşıyıcı kromozom anormalliklerle 47 ila 48 gibi bir kromozom sayısına sahip olan beş diploid klonu içermiştir. WIL2NS hücre dizisindeki klon temsili, aşağıdaki gibidir:

CLONE 1 %10'unu oluşturmaktadır

CLONE 2 %55'ini oluşturmaktadır

CLONE 3 %10'unu oluşturmaktadır

CLONE 4 %20'sini oluşturmaktadır

CLONE 5 %5'ini oluşturmaktadır

Tablo 2 (aşağıda), K562 ve WIL2NS hücre dizilerinin kompleks karyotiplerini özetlemektedir. İki hücre dizisi arasında herhangi bir paylaşılan anormallik yoktur. WIL2NS hücre dizisinin tüm klonlarında mevcut kromozom anormallikleri mavi ile vurgulanmaktadır.

Adı Klon Krom	K562 1 (100%) 69	WIL2-NS				
		1 (10%) 47	2 (55%) 47	3 (10%) 48	4 (20%) 47	5 (5%) 47
5	1				del(1)(q32;q42)	del(1)(q32;q42) der(1)t(1;3)(p34;q42)
	2	inv(2)(q33;q35)				
	3	-3				
	4					
	5	+der(5)t(5;7)(q11.2;?)				
10	6	dup(6)(p21;p23)				
	7					
	8		der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)
	9	-9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)				
	10	der(10)t(3;10)(p21;p24)				
15	11					
	12					
	13	-13, add(13)(p11.1)	+13	+13	+13x2	+13
	14	-14	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)
	15					
15	16					
	17	add(17)(p13)x2	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)
	18	der(18)t(1;18)(p32;q23)				
	19					
	20	-20				
15	21	der(21)t(1;21)(q12;p11.1)		der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)
	22	-22				
	XY	XX, -X	XY	XY	XY	XY
	Masküler	+mar1, mar2, +mar3, +mar4, +mar5				

6.2. Protein ekspresyonu için kullanılan çapraz soy tri-hibridlerin karyotiplemesi

Üç farklı soydan immortal ve primer hücrelerin çeşitli kombinasyonlarından türetilen ve arzu edilen proteinlerin ekspresyonu için kullanılan çapraz soy tri-hibridler karyotiplenmiştir. Bu karyotipler, çapraz soy tri-hibridlerin oluşturulmasında kullanılmış olan orijinal immortal hücre dizilerinininki ile kıyaslanmıştır.

6.2.1. KBT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin karyotiplenmesi

K562 immortal miyeloid hücre dizisinden ve primer B ve T lenfositlerinden türetilen iki KBT çapraz soy tri-hibrit dizileri karyotiplenmiştir. Aktive B hücrelerinden (CD20⁺CD72⁺) ve CD ekspresyonu özelliklerine bağlı çeşitli hücre tiplerine sahip çift pozitif T hücrelerinden (CD4⁺CD8⁺) türetilen KBT çapraz soy tri-hibrit (Bölüm 4.2.3) ayrıca kıyaslama için karyotiplenmiştir. Şekil 26, KBT-1 dizi olarak adlandırılan, K562 + B(CD19⁺) + T(CD4⁺) hibridizasyonundan türetilen KBT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin bir tipik karyotipini

göstermektedir. Modal sayıda 66 kromozoma sahip olan KBT1'in tek hücreli bir klonunun triploidin yakınında olduğu gösterilmektedir.

5 KBT-2 dizisi olarak adlandırılan, K562 hücresinin, B (CD20⁺CD72⁺) hücresinin ve T (CD4⁺CD8⁺) hücresinin hücre hibridizasyonundan türetilen bir KBT çapraz soy tri-hibrit dizisi karyotiplendiğinde, KBT-2 dizisinin karyotiplemesinin (önce Bölümde CD ekspresyonlarının bir varyasyonu gösterilen dizi), triploide yakın olan dört klondan oluştuğu keşfedilmiştir. Klon 1, Klon 2, Klon 3 ve Klon 4, hücre popülasyonunun sırasıyla %45, %30, %15 ve %10'unu temsil etmiştir. Klon 4, modal sayıda 66 kromozoma sahip olurken, diğer 10 klonlar, modal sayıda 67 kromozoma sahip olmuştur. Şekil 27, KBT-2 dizisinin klonları arasından birisinin bir karyotiplemesini göstermektedir.

KBT-1 ve KBT-2 dizilerinin karyotiplmeleri, Tablo 3'te özetlenmektedir. Tablonun birinci kolonu, kromozom sayısını göstermiştir. del(3)(p14), der(4)t(4;?)(q25;?), 15 +der(7)t(7;mar3)(q10;q10) ve der(X)t(X;?;?)(q13;?;?) gibi bazı kromozomal değişimler, primer lenfoid hücrelerinin alt tipine bakılmaksızın tüm çapraz soy tri-hibridler ile paylaşılmaktadır, fakat K562 hücreleri ile paylaşılmamaktadır.

20 Tablo 3. Farklı primer lenfoid hücre alt tiplerinden türetilen KBT-1 ve KBT-2'nin ve bir onkojen kaynağı olarak K562 miyeloid hücre dizisinin karşılaştırmalı bir analizinin bir kısa açıklaması. KBT-1 ve KBT-2 çapraz soy tri-hibrit dizileri ile paylaşılan K562 dizisinin kromozom anormalliklerine mavi ile vurgu yapılmaktadır. KBT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin klonları arasında paylaşılan, fakat orijinal K562 hücre dizisi olmayan kromozom anormalliklerine kırmızı ile vurgu yapılmaktadır. 25 Bazı KBT çapraz soy tri-hibridlerde mevcut olan ve K562 dizisinden türetilen kromozom anormalliklerine yeşil ile vurgu yapılmaktadır.

Adı Klon Krom	K562 1 (100%) 69	WIL2NS				
		1 (10%) 47	2 (55%) 47	3 (10%) 48	4 (20%) 47	5 (5%) 47
1					der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42) der(12)t(20q42)
2	der(12)t(20q42)					
3						
4						
5	der(12)t(20q42)					
6	der(12)t(20q42)					
7						
8		der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42) der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42) der(12)t(20q42)
9	der(12)t(20q42)					
10	der(12)t(20q42)					
11						
12						
13	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)
14	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)
15						
16						
17	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)
18	der(12)t(20q42)					
19						
20						
21	der(12)t(20q42)		der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)	der(12)t(20q42)
22						
XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY
Markörler	der(12)t(20q42) der(12)t(20q42)					

6.2.2. KWT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin karyotiplemesi

5

K562 immortal miyeloid hücre dizisinden, WIL2NS immortal B lenfoid hücre dizisinden ve bir primer T lenfositten türetilen üç KWT çapraz soy tri-hibrit dizileri karyotiplenmiştir. CD ekspresyon özelliklerine bağlı olarak (Bölüm 4.4.3) çeşitli hücre tipleriyle çift pozitif T hücrelerinden ($CD4^+CD8^+$) (KWT-3 olarak adlandırılmaktadır) türetilen KWT çapraz soy tri-hibrid, kıyaslama için karyotiplenmiştir.

10

Şekil 28, 29 ve 30, sırasıyla KWT-1, KWT-2 ve KWT-3 çapraz soy tri-hibrit dizilerinin tipik karyotiplerini göstermektedir. Her bir durumda, 400bphs'de toplam 20 G bantlı metafaz hücreleri analiz edilmiştir. KWT-1, heksaploide yakın olan tek bir klonu içermiştir ($6n = 138$ kromozom). Kromozomların modal sayısı, karyotipik heterojenite ile 129 ila 140 kromozom aralığında olmuştur, bir başka ifadeyle tüm analiz edilmiş hücreler, bazı kromozom anormalliklerini paylaşmıştır. KWT-2, heksaploide yakın olan tek bir klonu içermiştir.

15

Kromozomların modal sayısı, karyotipik heterojenite ile 135 ila 145 kromozom aralığında olmuştur. KWT-3, hiperpentaploid ($n>115$) olan üç klonu içermiştir. Klon 1, Klon 2 ve Klon 3, hücre popülasyonunun sırasıyla %55, %20 ve %25'ini temsil etmiştir. KWT çapraz soy tri-hibridlerin karyotipleri, K562 ve WIL2-NS hücre dizilerinin genetik özelliklerinin, oluşturulmaları esnasında kullanılan primer T hücresi tipine bakılmaksızın tüm KWT çapraz soy tri-hibridlerde tutulduğunu onaylamıştır. Tablo 4, bu KWT çapraz soy tri-hibridlerinin (bir başka ifadeyle, KWT-1, KWT-2 ve KWT-3 dizileri) karyotiplerinin karşılaştırmalı bir analizini özetlemektedir.

- 10 Tablo 4. Farklı tipte primer T hücrelerinden türetilen KWT çapraz soy tri-hibridlerin karşılaştırmalı bir analizi. K562 hücre dizisi ile paylaşılan KWT çapraz soy tri-hibridlerde kromozom değişimlerine kırmızı ile vurgu yapılmaktadır. KWT çapraz soy tri-hibridler ve WIL2NS hücre dizisi arasında paylaşılan kromozom değişimlerine mavi ile vurgu yapılmaktadır. Çapraz soy tri-hibridlerin farklı alt tipleri arasında, ne
- 15 K562 hücre dizisi ne de WIL2NS hücre dizisi olmadan paylaşılan değişimlere yeşil ile vurgu yapılmaktadır.

Adı Alt dizi Klon Krom	K562	WIL2 NS			KVT				
		1 (100%) 69	2 (55%) 47	3 (10%) 48	CD4+ 1 (100%) 129-140	CD3+CD5+ 1 (100%) 135-142	CD4+CD8+		
							1 (55%) 124-139	2 (20%) 125-131	3 (25%) 131-132
1				-1	-1	-1	-1	-1	
2	inv(2)(q33q35)			-2, inv(2)(q33q35)	-2, inv(2)(q33q35)	+2, +2, inv(2)(q33q35)	+2, +2, inv(2)(q33q35)	ider(2)(q10)inv(2)(q33q35)	
3	-3			-3, -3	-3, -3	-3	-3	-3	
4				-4, der(4)t(4;7)(q35;7)	-4, der(4)t(4;7)(q35;7)				
5	+der(5)t(5;7)(q11;2;7)			+der(5)t(5;7)(q11;2;7)	+5, +der(5)t(5;7)(q11;2;7)	+der(5)t(5;7)(q11;2;7)	+der(5)t(5;7)(q11;2;7)	+der(5)t(5;7)(q11;2;7)	
6	dup(6)(p21;p23)			+6, dup(6)(p21;p23)	+6, +dup(6)(p21;p23)	+6, +dup(6)(p21;p23)	+6, +dup(6)(p21;p23)	+6, +dup(6)(p21;p23)	
7				+7, +inv(7)(p13p22)	+inv(7)(p13p22)	+inv(7)(p13p22)	+inv(7)(p13p22)	+inv(7)(p13p22)	
8		der(8)t(8)(p32;p23)	der(8)t(8)(p32;p23)	der(8)t(8)(p32;p23)	der(8)t(8)(p32;p23)	der(8)t(8)(p32;p23)	der(8)t(8)(p32;p23)	der(8)t(8)(p32;p23)	
9	-9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)			-9, -9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)	-9, -9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)	del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)	-9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)	-9, del(9)(p13), der(9)t(9;9)(p12;q22)	
10	der(10)t(3;10)(p21;p24)			+der(10)t(3;10)(p21;p24)	+der(10)t(3;10)(p21;p24)	+10, +10, +der(10)t(3;10)(p21;p24)	+10, +10, +der(10)t(3;10)(p21;p24)	+10, +10, +der(10)t(3;10)(p21;p24)	
11									
12				-12	-12				
13	+13, add(13)(p11)	+13	+13x2	add(13)(p11)	add(13)(p11)	+13, +13, add(13)(p11)	+13, +13, add(13)(p11)	+13, +13, add(13)(p11)	
14	-14	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	-14, -14, der(14)t(5;14)(p10;p12)	-14, -14, der(14)t(5;14)(p10;p12)	-14, der(14)t(5;14)(p10;p12)	-14, der(14)t(5;14)(p10;p12)	-14, der(14)t(5;14)(p10;p12)	
15				-15	-15				
16									
17	add(17)(p13)p2	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	-17, dup(17)(q22)p2, add(17)(p13)p2	-17, dup(17)(q22)p2, add(17)(p13)p2	dup(17)(q22q23), add(17)(p13)p2, +add(17)(p13)	dup(17)(q22q23), add(17)(p13)p2, +add(17)(p13)	dup(17)(q22q23), add(17)(p13)p2, +add(17)(p13)	
18	der(18)t(1;18)(p32;q23)			-18, -18	-18, -18	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)	der(18)t(1;18)(p32;q23)	
19						+19	+19	+19	
20	-20				+20	-20	-20	-20	
21	der(21)t(1;21)(q12;p11)	der(21)t(3;21)(q21;p11)	der(21)t(3;21)(q21;p11)	der(21)t(1;21)(q12;p11)	der(21)t(1;21)(q12;p11)	der(21)t(1;21)(q12;p11)	der(21)t(1;21)(q12;p11)	der(21)t(1;21)(q12;p11)	
22	-22			-22	-22				
XY	XY, X	XY	XY	XY, XY, X, X	XY, XY, X, X	XY	XY	XY	
Markörler	+mar1, mar2, +mar3, +mar4, +mar5			+mar1, mar2x2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar11	+mar1, mar2x2, +mar3, +mar4, +mar5, +mar9, +mar11	+mar1, mar2, +mar3, +mar4x2, +mar5x2	+mar1, mar2, +mar3, +mar4x2, +mar5x2	+mar1, mar2, +mar3, +mar4x2, +mar5x2	

6.2.3. WWM çapraz soy tri-hibrit dizilerinin karyotiplemesi

5

İki immortal B lenfoid hücrelerinden (2 WIL2NS dizisi) ve primer monositlerden (CD14⁺) türetilen bir WWM çapraz soy tri-hibrit dizisi karyotiplenmiştir. CD14⁺ hücreleri için zenginleştirilmiş bu çapraz soy tri-hibridin alt dizisi de karyotiplenmiştir. Şekil 31A ve 31B, sırasıyla orijinal WWM çapraz soy tri-hibridin ve CD14⁺ ile zenginleştirilmiş alt dizisinin karyotiplerini göstermektedir. Her bir durumda, 400bphs'de toplam 20 hücreden G bantlı metafaz kromozomlar analiz edilmiştir. Orijinal WWM çapraz soy tri-hibrid, 11 hücrede (%55) bulunan, modal sayıda 47 kromozoma sahip olan tek bir baskın klonu içermiştir. Fakat, analiz edilmiş, geriye kalan 9 hücre, triploide yakından (rastgele kromozom kaybıyla) tetraploide yakın (rastgele kromozom kaybıyla) aralıktadır. Bu hücrelerden herhangi birisi arasında herhangi bir tutarlılık olmamıştır. Öte yandan, CD14⁺ ile zenginleştirilmiş WWM çapraz soy tri-hibridin karyotipi, 19 hücrede tespit edilen tek bir klonal anormalliği

15

göstermiştir. Sadece bir tetraploid hücre tespit edilmiştir.

Tablo 5 WWM çapraz soy tri-hibrit dizilerinin karyotiplerlerinin karşılaştırmalı analizini özetlemektedir. WIL2-NS hücreleri ile paylaşılan kromozomal özelliklere mavi ile vurgu yapılmaktadır.

İsmi	WIL2-NS					WWM	
Çifti	1 (10%)	2 (55%)	3 (10%)	4 (20%)	5 (5%)	CD14+	CD14+en
Krom	47	47	48	47	47	55%	95%
ŞKrom	47	47	48	47	47	47	47
1				del(1)(q32q42)	del(1)(q32q42)		
2					der(1)t(1;3)(p34;q42)		
3							
4							
5							
6							
7							
8	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)	der(8)t(1;8)(p32;p23)
9							
10							
11							
12							
13	+13	+13	+13x2	+13	+(13)(q10)	+13	+13
14	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)	der(14)t(5;14)(p10;p12)
15							
16							
17	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)	dup(17)(q22)
18							
19							
20							
21		der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)	der(21)t(3;21)(q21;p11.1)
22							
XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY

Örnek 7

10

7. PCR ile EBV genomunun tespiti

PCR deneyleri için ve sunulan bir çapraz soy tri-hibrit hücre dizisi için, genomik DNA, çapraz soy tri-hibridin 5×10^6 hücresinden ekstrakte edilmiştir. Üretici talimatlarına göre, MOLT-4 hücreleri, negatif kontrol olarak kullanılırken, CO 88BV59-1, QIAamp DNA Micro kit (Qiagen) kullanılarak pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kalitatif PCR deneyinde, EBV genomunun BamHI W bölgesi, spesifik primerlerler güçlendirilmiştir. Yukarı yönde ve aşağı yönde primer sekansları, sırasıyla 5'-CAAGAACCCAGACGAGTCCGTAGAA-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3) ve 5'-AAGAAGCATG-TATACTAAGCCTCCC-3', (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4) olmuştur (Kimura, ve ark., 1999). 10 ng ekstrakte DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 200 µM dNTP, 0.6 µM her bir primeri ve 0.5 U Taq polimerazı (Lomb Life Science) içeren reaksiyon karışımına eklenmiştir. 95°C'de 2 dakika boyunca ilk denatürasyondan sonra, 95°C'de 15 saniye ve

20

60°C’de 1 dakikalık 28 döngü, GeneAmp PCR sistemi 9600 (Perkin Elmer) kullanılarak uygulanmıştır. Güçlendirilmiş numuneler, %2 bir agaroz jelinde ayrılmıştır.

Yukarıdaki deneylerden sonuçlar, mevcut buluşta oluşturulan tüm çapraz soy tri-hibritlerin, EBV genomu için negatif olmasının keşfedildiğini göstermiştir.

Örnek 8

8. Mikoplazma Testi

10

Kullanılan herhangi bir hücre dizisine ve mevcut buluşta oluşturulan çapraz soy tri-hibrit dizilerindeki mikoplazma testleri, üreticinin talimatlarına göre bir mikoplazma PCR tespit kiti (Lomb Scientific) kullanılarak uygulanmıştır. Testten sonuçlar, tüm hücre dizileri ve çapraz soy tri-hibritler, mikoplazmasız olmasının keşfedildiğini göstermiştir.

15

Örnek 9

9. Çapraz soy tri-hibrit ekspresyon sisteminde ve karakterizasyonlarında proteinlerin ekspresyonu

20

Mevcut buluşta yapılandırılan tri-hibrit çapraz soy hücre sistemi, kısıtlayıcı olmayacak şekilde proteinler, peptitler, karbonhidratlar, lipidler ve bunların kimerik molekülleri gibi biyolojik moleküller dahil bir biyolojik aralığının preparasyonu için kullanılabilir. Spesifik olarak, biyolojik numuneler, sitokinleri, büyüme faktörü hormonları reseptörleri veya kimerik molekülleri veya bunların fragmanlarını içerebilmektedir. Teknikte tecrübe sahibi kişi, tri-hibrit çapraz soy hücrelerinden eksprese edilen bir protein gibi arzu edilen bir biyolojik molekülün, salgılanabildiğini, membrana bağlı olabildiğini veya her ikisinin olabildiğini anlayacaktır. Teknikte tecrübe sahibi kişi, çeşitli protein alt birimlerinin, örneğin immünoglobulin ekspresyonu ve daha spesifik olarak monoklonal antikor üretimi gibi çapraz soy tri-hibrit hücrelerinde ko-eksprese edilebildiğini anlayacaktır. Teknikte tecrübe sahibi kişi, tri-hibrit çapraz soy hücrelerinin ayrıca, işlevsel protein veya peptit fragmanları, örneğin immünoglobulinlerin durumunda Fab, Fab', F(ab')₂ gibi fragmanlar ve tek zincirli Fv fragmanları dahil Fv fragmanlarının bir aralığını eksprese etmek üzere kullanılabildiğini anlayacaktır.

30

Arzu edilen proteinin ekspresyonu, arzu edilen proteini eksprese eden bir partner hücresi ile tri-hibrit hücrenin somatik hücre hibridizasyonu ile tri-hibrit hücre sisteminde tamamlanabilmektedir (Bölüm 9.1). Alternatif olarak, tri-hibrit hücreler, arzu edilen bir proteinin ekspresyonuna olanak sağlamak üzere geleneksel gen transfeksiyonu protokollerine tabi tutulabilmektedir (Bölüm 9.2.1 ve 0.2.2). Bir diğer yapılandırmada, tri-hibrit hücreler, somatik hücre hibridizasyonunu veya geleneksel gen transfeksiyonunu veya her ikisini kullanarak çok sayıda hedef proteini eş zamanlı olarak eksprese edebilmektedir (Bölüm 9.3).

Aşağıdaki örnekler, çapraz soy tri-hibrit hücrelerinde farklı tipte protein sayısının bir ekspresyonunu göstermektedir. Örnekler ayrıca, belirli bir farklılaştırılmış hücre tipine özgü proteinlerin, aynı çapraz soy tri-hibrit hücrelerde (örn. immünoglobulin ve CD54) eksprese edilebildiğini göstermektedir.

9.1. Arzu edilen bir proteini eksprese eden bir hücre ile tri-hibrit çapraz soy hücrenin hibridizasyonu

9.1.1. İnsan GM-CSF'nin ekspresyonu

CD14 pozitif hücreler (Bölüm 5'te açıklanmaktadır) için zenginleştirilmiş WWM çapraz soy tri-hibrit dizisi, bu belirgin örnekte bir partner hücre dizisi olarak kullanılmıştır. Bölüm 1.3.3.1.1'de açıklandığı gibi izole edilen aktive insan CD4 pozitif lenfositleri, insan GM-CSF'nin bir kaynağı olarak kullanılmıştır. Elektriksel hücre hibridizasyon prosedürü esasen Bölüm 4.3.2'de açıklandığı gibi WWM çapraz soy tri-hibridlerinin oluşturulması için kullanılanla aynı olmuştur. WWM ve CD4+ kültürlü T hücrelerinin meydana gelen hibridi stabil hale geldikten sonra, bir hücre dizisi olarak sürdürülmüştür ve ProGM olarak işaretlenmiştir.

İnsan GM-CSF ekspresyonunun sonuçları

ProGM süpernatantları, sandviç tipi ELISA ile insan GM-CSF için test edilmiştir. 96 hazneli bir ELISA plakası (Corning), gece boyunca 4°C'de 10 µg/ml miktarında 50 µl saflaştırılmış tavşan poliklonal anti-GM-CSF antikoru ile kaplanmıştır. Antikor çözeltisinin çıkarılmasından sonra, plakalarda kalan protein bağlayıcı bölgeler, %5 BSA (%5 BSA-PBS) içeren 10 µl PBS ile bloke edilmiştir. Daha sonrasında, ProGM hibrit hücre dizisinden 50 µl

bir kültür süpernatantı, haznelere eklenmiştir ve 37°C’de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. %0.05 Tween 20’yi (Tween-PBS) içeren PBS ile üç defa yıkamadan sonra, 1 saat boyunca oda sıcaklığında 10µg/ml miktarda 50 µl tavşan anti-GM-CSF antikoru ile inkübe edilmiştir. Tween-PBS ile 3 defa yıkamadan sonra, oda sıcaklığında 2 saat boyunca 200 kat seyreltilmiş
5 bir peroksidaz konjüge anti-tavşan immünoglobulin ile inkübe edilmiştir. Tween-PBS ile üç defa durulamadan sonra, nihai reaksiyon, ABTS ve %0.01 hidrojen peroksidaz ile inkübe edilerek görselleştirilmiştir. 415nm’de absorbans ölçülmüştür. Rekombinant insan GM-CSF, bir standart olarak kullanılmıştır. Tüm analizler, verilen bir numune için iki kopya olarak tamamlanmıştır. Sonuçlar, ProGM, optimize olmayan kültür koşulları altında 0.7 ila 1.1
10 µg/ml/10⁶ aralığında insan GM-CSF’yi ürettiğini göstermiştir.

Western blotu ve immüno çöktürme ile ProGM hibriden türetilen hGM-CSF karakterizasyonu, ProGM hibridinin, insan lenfositler ile doğal olarak salgılanan glikoformlara benzer glikoprotein formları sergileyen tamamen insan GM-CSF’yi ürettiğini
15 onaylamıştır. ProGM hibriden toplanan süpernatantlar, analizden önce 10 kat seyreltilmiştir. 0.1 µg/ml konsantrasyonda Western blotu analizi (Millipore) ve biyotinitle sıçan anti-insan GM-CSF antikoru (R&D systems) yönelik immünoblot NC membranları, Western blot tespiti için kullanılmıştır. Şekil 32’de, ProGM hibrit (şerit 4) ile salgılanan hGM-CSF’nin Western Bblotu, PHA’sı aktive insan lenfosit kültür (şerit 2) ile salgılanan GM-CSF olarak
20 formlarının aynı heterojenitesini sergilemiştir. ProGM ve lenfosit kültürlerinde eksprese edilen GM-CSF’nin moleküler ağırlıklı dağılımı, 18kDa ila 35kDa aralığında olmuştur. Asparajin kalıntılarına karbonhidrat zincirlerinin eklentisini sergileyen tunikamisin mevcudiyetinde, daha yüksek moleküler ağırlıklı moleküller (bir başka ifadeyle, 35 kDa) tespit edilmemiştir, bu da gözlemlenen heterojenitenin, farklı bir glikosilasyon derecesinden
25 kaynaklandığını göstermektedir (şerit 5). PHA’sı aktive lenfositler ile veya ProGM hibrit ekspresyon sisteminde üretilen GM-CSF formlarının moleküler ağırlıkları, E.coli’den türetilen GM-CSF’den daha yüksek olmuştur (Şerit 6).

10 µg/ml tunikamisin ile takviye edilen veya takviye edilmeyen kültürlü ProGM hibridinin
30 süpernatantları toplanmış ve sırasıyla E.coli türevi insan veya fare GM-CSF’ye karşı yükselen sıçan anti-insan GM-CSF antikoru veya tavşan anti-fare GM-CSF antikoru ile 40°C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Protein A-Sfroz (Invitrogen) eklenmiştir ve ayrıca oda sıcaklığında 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Geri kazanılan reçine, 0.15 M NaCl, %0.5 NP-40, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ile boylu boyunca yıkanmıştır. Bağlı proteinler, Laemmli

numune tamponu ile çözülmüştür ve SDS-PAGE'ye tabi tutulmuştur. Şekil 33'de gösterildiği üzere, ProGM hibridi ile salgılanan GM-CSF'nin moleküler ağırlığı, doğal yollarla oluşan formlara benzer 18kDa ila 35kDa aralığındadır. Bu heterojenite, iki N-glikosilasyon ve bir kaç 0-glikosilasyon bölgelerde farklı glikosilasyondan kaynaklanmaktadır. Tunikamisin mevcudiyetinde, daha yüksek moleküler ağırlık bantları tespit edilmezken, düşük moleküler ağırlıklı (18-22kDa) proteinler toplanmıştır. Bu veri, ProGM hibridinden türetilen hGM-CSF'nin, insan glikoprotein olarak salgılandığını onaylamaktadır.

9.1.2. İnsan immünoglobulinlerin ekspresyonu

FACS ile belirlendiği gibi fenotipik markörlerle antijen deneyimli T hücresinden (CD3⁺CD5⁺) türetilen ve Bölüm 6.2.2'de açıklandığı gibi karyotiplenen KWT çapraz soy tri-hibrit dizisi (KWT-2 olarak adlandırılmaktadır), elektriksel hücre hibridizasyonu vasıtasıyla insan immünoglobulinin ekspresyonu için kullanılmıştır. Spesifik olarak, KWT-2 çapraz soy tri-hibridi, bu belirgin örnekte bir partner hücre dizisi olarak kullanılmıştır. Bölüm 1.3.3'de açıklandığı gibi izole edilen primer CD40 aktive IgM pozitif veya IgG pozitif B hücreleri, insan Ig'nin bir kaynağı olarak kullanılmıştır. Elektriksel hücre hibridizasyon prosedürü esasen Bölüm 4.2.2'de açıklandığı gibi KWT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin oluşturulması için kullanılanla aynı olmuştur. Meydana gelen hibridlerin stabil hale gelmesinden sonra, ProIM veya ProIG hücre dizileri olarak sürdürülmüş ve işaretlenmiştir (bkz. Bölüm 1.1).

İnsan immünoglobulin ekspresyonunun sonuçları

ProIM ve ProIG'den süpernatantlar, daha öncesinde açıklanan ELISA vasıtasıyla IgM veya IgG mevcudiyeti için analiz edilmiştir (bkz. Bölüm 1.3.3) Hücreler, hazne başına 1×10^5 hücrede yuvarlak tabanlı 96 hazneli plakalarda tohumlanmıştır ve 24 saat boyunca standart koşullar altında kültürlenmiştir. Hücre sayımı ve canlılığı, hemasitometre kullanılarak ve tripan mavisinin hariç tutulması ile tamamlanmıştır. Sonuçlar, Tablo 6A ve 6B'de özetlenmektedir. Her bir değer, üç bağımsız ölçümün ortalama $\pm$ SD olarak verilmektedir.

Tablo 6A. ProIM hücrelerinin hücre büyümesi ve IgM üretimi

Deney	Canlı hücre yoğunluğu (Hücre/ml)	IgM üretimi (ng/ml)	IgM üretkenliği (ng/ 10^4 hücre/24 saat)
1	1.2×10^5	310 ± 12.3	26.7
2	1.4×10^5	512 ± 20.1	36.6

3	1.1×10^5	298 ± 10.5	27.1
4	1.2×10^5	387 ± 15.1	32.3
5	1.5×10^5	701 ± 23.4	46.7

Tablo 6B. ProIG hücrelerinin hücre büyümesi ve IgG üretimi

Deney	Canlı hücre yoğunluğu (Hücre/ml)	IgG üretimi (ng/ml)	IgG üretkenliği (ng/ 10^4 hücre/24 saat)
1	8.0×10^4	84 ± 5.9	10.5
2	8.1×10^4	85 ± 3.7	10.5
3	8.0×10^4	76 ± 4.3	9.5
4	8.2×10^4	89 ± 6.1	10.9
5	8.2×10^4	82 ± 4.3	10.0

IgG alt sınıfları ve hafif zincirli alt tipler, biyotinile fare anti-insan IgG1 (klon HP6069), IgG2 (klon HP6002), IgG3 (klon HP6047), IgG4 (klon HP6025) (ICN Biomedicals) ve biyotinile keçi anti-insan kappa ve lambda zinciri (Biosource) kullanılarak tespit edilmiştir. Bağlı biyotinile antikor, ALP konjügel streptavidin ile tespit edilmiştir.

Sonuçlar, sırasıyla ProIM ve ProIG hücreleri ile üretilen IgM ve IgG'nin, κ hafif zincire sahip olduğunu ve IgG'nin, IgG2 sınıfından olduğunu sergilemiştir.

9.1.3. İnsan CD54'ün ekspresyonu

İnsan CD54 ekspresyonuna yönelik metodoloji

FACS ile belirlendiği gibi fenotipik markörlerle olgun T yardımcı hücresi ($CD4^+$) türetilen ve Bölüm 6.2.2'de açıklandığı gibi karyotiplenen KWT çapraz soy tri-hibrit (KWT-1 olarak adlandırılmaktadır), elektriksel hücre hibridizasyonu vasıtasıyla insan CD54'ün ekspresyonu için kullanılmıştır. Spesifik olarak, KWT çapraz soy tri-hibrid, bu belirgin örnekte bir partner hücre dizisi olarak kullanılmıştır. Bölüm 1.3.3'de açıklandığı gibi izole edilen primer insan CD54 pozitif T hücreleri, insan CD54 molekülünün bir kaynağı olarak kullanılmıştır. Hibridizasyon prosedürü, KWT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin oluşturulması için kullanılanla esasen aynı olmuştur (bkz. Bölüm 4.4.2). Meydana gelen hibrit stabil hale geldikten sonra, standart kültür koşulları altında bir hücre dizisi olarak sürdürülmüştür (bkz. Bölüm 1.1) ve ProCD54 olarak işaretlenmiştir.

hCD54 ekspresyonunun sonuçları

ProCD54 hücrelerinin yüzeyinde CD54'ün ekspresyonu, bir FACS analizi kullanılarak doğrulanmıştır. Orijinal KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinin %100'ü, yüzeylerinde CD4'ü eksprese ederken (bkz. Şekil 19), ProCD54 hücre yüzeyindeki CD4 ekspresyonu, meydana gelen hücre dizisinin stabilitesi için bir referans olarak kullanılmıştır. Özet olarak, 100 µl tam bölenler başına 1×10^5 hücre, Bölüm 1.3.3.1'de açıklananla aynı protokolden sonra (CD54⁺ T hücrelerinin izolasyonu) fare anti-insan CD54-FITC ve fare anti-insan CD4-PE antikorları ile işaretlenmiştir. ProCD54 hücrelerinin yüzeyinde CD4 ve CD54 ekspresyonunun tipik profili, Şekil 34a'da gösterilmektedir. CD4 ekspresyonu seviyeleri, KWT çapraz soy tri-hibrit hücrelerinininkinden bir şekilde daha düşük olduğu görülmesine rağmen, orijinal ProCD54 hücrelerinin yaklaşık %72'si, CD54 için pozitif olurken, hücrelerin %100'ü, CD4 ekspresyonunu tutmuştur. Uygun kapılar ayarlandıktan sonra, CD54 ekspresyonunun orta ila yüksek seviyelerine sahip CD4⁺CD54⁺ hücre popülasyonu (toplam hücre popülasyonunun yaklaşık %42'si), kapılanmış ve sınıflandırılmıştır (Şekil 34a). Sınıflandırılmış hücreler, standart kültür ortamında yeniden askıya alınmıştır ve birkaç ay boyunca kültürde sürdürülmüştür. Meydana gelen alt dizi, ProCD54EX olarak işaretlenmiştir. Alt dizi, bu Bölümde önceden açıklananla aynı protokolü kullanan CD4 ve CD54 ekspresyonu için analiz edilmiştir. ProCD54EX yüzeyinde CD4 ve CD54 ekspresyonunun tipik profili, Şekil 34b'de gösterilmektedir. Şekilden görülebildiği üzere, hücrelerin en az %98'i, standart koşullar altında 6 aylık kültürden sonra CD4 ve CD54'ün ekspresyonunu sürdürmüştür. Hatta, CD54 ekspresyonu, orta seviyelerde homojen hale gelmiştir.

ProCD54 ve ProCD54EX, üreticinin talimatlarına göre insan CD54 (ICAM-1) ELISA (R&D systems) kullanılarak doku kültürü süpernatantlarında çözülebilir bir CD54 mevcudiyeti için analiz edilmiştir. Süpernatantlar, kültürde 7. günde en az 3 defa toplanmıştır. KWT çapraz soy tri-hibrit partner hücre dizisinin süpernatantları, bir negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm ölçümler, iki kopya halinde aynı numune ile tamamlanmıştır. Özet olarak, mikrotitre plakaları, insanda çözünür ICAM-1'e karşı yönlendirilen bir mürin monoklonal antikor ile kaplanmıştır. Uygun seyreltide kontrol, numuneler veya standartlar ile inkubasyondan sonra, insanda çözünür ICAM-1'e, bir yabanturpu peroksidaz (HRP) konjügel poliklonal antikorları eklenmiştir. Süstratın eklentisinden ve çözeltinin durdurulmasından sonra, her bir haznenin optik yoğunluğu, 450 nm'ye ayarlanan bir mikroparka okuyucu kullanılarak 30 dakika içerisinde belirlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 7'de özetlenmektedir.

Tablo 7. KWT çapraz soy tri-hibrit partner hücre dizi, ProCD54 ve ProCD54EX hücre dizilerindeki çözünür CD54'ün (ICAM-1) bir konsantrasyon aralığı

Hücre dizisi	En düşük konsantrasyon, ng/ml	En yüksek konsantrasyon, ng/ml
KWT	0	0
ProCD54	420	1320
ProCD54EX	910	2870

ProCD54 ve ProCD54EX'ten akan çözülebilir CD54'ün moleküler ağırlığı, jel elektroforezi ve Western blot analizi ile belirlenmiştir. Özet olarak, süpernatantlarda protein konsantrasyonu, protein deneyi (R&D systems) ile belirlenmiştir ve 1.8 mg/ml miktara ayarlanmıştır. Elektroforez, SDS-PAGE ile uygulanmıştır. Toplam 30 ml numune, azaltıcı olmayan numune tamponundaki jele yüklenmiştir. Elektroforezden sonra, proteinler, bir poliviniliden diflorür membrana (Bio-Rad) aktarılmıştır. Blotlanmış membran, TBS-Tween tamponunda (TBST) yağsız süt (%5) ile bloke edilmiştir ve 2 saat boyunca bir fare anti-insan ICAM-1 antikoru ile (TBST'de 1:100 seyreltide) karıştırılmıştır. Numuneler, TBST ile yıkandıktan sonra, HRP'ye bağlı ikincil reaktif, keçi anti fare IgG (1:10,000 seyrelti) eklenmiştir. TBST ile tekrar yıkandıktan sonra, membran, su ile durulanmıştır. Tüm inkubasyonlar, oda sıcaklığında uygulanmıştır. Şekil 35, sCD54'ün, insan serumunda tespit edilen çözünür CD54'üne tekabül eden yaklaşık 82kDa tekli türler olarak ProCD54 ve ProCD54EX'in süpernatantlarında mevcut olduğunu göstermektedir.

ProCD54 ve ProCD54EX hücrelerinde insan CD54 için mRNA ekspresyonu RT-PCR ile doğrulanmıştır. Toplam RNA, ticari kit kullanılarak ekstrakte edilmiştir ve gen ekspresyonunun RT-PCR tespiti, öncesinde Bölüm 5'te açıklandığı gibi uygulanmıştır. Ayarlanan bir insan ICAM-1 primeri [sens, 5'-CCGGAAGGTGTATGAACTG-3'; (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 5) anti-sens, 5'-TCCATGGTGATCTCTCCTC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6)], deneysel ve kontrol RNA numunelerinden ters transkribe edilen cDNA'yı problamak üzere kullanılmıştır. Siklofiline yönelik bir primer çift, bir iç kontrol olarak her bir deneye dahil edilmiştir [sens, 5'-TGTTCTTCGACATTGCCGTCGAC-3'; (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7) anti-sens 5'-GCATTGCCATGGACAAGATGCCAGGA-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8)]. PCR reaksiyon ürünleri, etidyum bromürü içeren Tris-asetat tamponunda %3 agaroz jellerde elektroforezlenmiştir ve UV ile indüklenmiş floresan bantları fotoğraflanmış ve dijitalleştirilmiştir. Şekil 36, ProCD54 ve ProCD54EX'te insan ICAM-1'ye yönelik mRNA'nın bir RT-PCR analizini göstermektedir. Hücre yüzeyinde CD54'ü eksprese etmeyen

KWT çapraz soy tri-hibrit hücreleri de ICAM-1 geninin oldukça düşük transkripsiyonunu göstermektedir.

9.2. Arzu edilen bir proteini kodlayan bir gen ile tri-hibrit çapraz soy hücre dizisinin transfeksiyonu

Spesifik genler, vektör aracılı gen aktarımını içeren bir dizi geleneksel teknikler vasıtasıyla kültürlenmiş hücrelere dahil edilebilmektedir. Mevcut buluşun bir yapılandırmasında, tri-hibrit çapraz soy hücreleri, arzu edilen bir proteini kodlayan bir gen ile geçici olarak transfekte edilmiştir. Bu, RNA veya protein gibi gen ürünlerinin, DNA alım saatleri içerisinde elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Mevcut buluşun alternatif bir yapılandırmasında, tri-hibrit çapraz soy hücresi, arzu edilen bir proteini kodlayan bir gen ile stabil olarak transfekte edilmiştir. Bu, konak hücre kromatine entegre edilen plazmid vektör DNA'yı içermektedir.

9.2.1. Geçici transfeksiyon

FACS tarafından belirlendiği üzere (bkz. Bölüm 4.2.3) B ve T hücre fenotipik markörlerini paylaşan çapraz soy tri-hibrit hücrelerin. %100'ü ile olgun B hücresinden (CD19⁺) ve olgun T yardımcı hücresinden (CD4⁺) türetilen ve Bölüm 6.2.1'de açıklandığı gibi karyotiplenmiş KBT çapraz soy tri-hibrid, gen transfeksiyon deneyleri için kullanılmıştır. Arzu edilen bir protein ile bir çapraz soy tri-hibrit dizisinin hücrelerinin geçici transfeksiyonunun bir örneği olarak, bir KBT çapraz soy tri-hibridin hücreleri, insan IL-4 reseptör alfa zinciri (hIL4-R α) ile transfekte edilmiştir.

Yöntem

Bir kemik iliği numunesinden PBML hücrelerinin preparasyonu, Bölüm 1.3.1'de açıklanmıştır. hIL4-R α cDNA, standart kültür koşulları altında 24 saat boyunca 100 ng/ml rekombinant insan IL-4 (R&D systems) ile inkübe edilmiş toplam 1×10^6 PBML hücreden klonlanmıştır. Toplam RNA ekstrakte edilmiştir (RNeasy Mini Kit, Qiagen) ve cDNA, First Strand cDNA saflaştırma kiti (Amersham Pharmacia) kullanılarak sentezlenmiştir. PCR, hIL4-R α cDNA'yı güçlendirmek üzere kullanılmıştır. Amplifikasyon, sens primer 5'-AGGGGCGCGCAGATAATTAAA-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 9) ve anti- sens primer 5'-AGTGGGGCCAATCACCTTCATA-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10) ile

uygulanmıştır. İç yuvalanmış bir PCR, hIL4-R α fragmanına iki BamHI kısıtlama bölgesini eklemek üzere kullanılmıştır [sens primer 5'-GGATCCGCGCAGATAATTAAAGA-3', (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11) anti-sens primer 5'-GGATCCAAATCACCTTCATACCAT-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12].

- 5 Güçlendirilmiş cDNA seyreltilmiş ve 94°C'de 1 dakika, bundan sonra 94°C'de 20 saniyelik, 59°C'de 45 saniyelik, 72°C'de 3 dakikalık 31 döngü olan bir ilk denatürasyona tabi tutulmuştur. IL4R cDNA fragmanı, klonlama vektörü pGEM-T'ye (Promega) ligatlanmıştır ve JM109 kompetent hücrelere (Promega) transfekte olmuştur. Plazmid DNA, bir Plazmid Mini Kit (Qiagen) kullanılarak hazırlanmıştır.

10

Elektroporasyon için, 350 μ l tam TC ortamında askıya alınan 7×10^6 KBT hücreleri (bkz. Bölüm 1.1), 30 μ g cDNA plazmid ile karıştırılmıştır. Transfeksiyon, bir Eurogentec Easyject Pulser'den tek bir darbe (25 kV/m, 1050 μ F, 34-37 msaniye darbe genişliği) ile uygulanmıştır. Daha sonrasında, hücreler, 100 ng/ml rekombinant hIL4 ile takviye edilen tam TC ortamında

15 altı hazneli doku kültürü plakalarında inkübe edilmiştir.

20

Hücre ekstraktları, transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra donma-çözülme prosedürü ile hazırlanmıştır. Transfekte olmayan KBT ve PBML hücreleri, sırasıyla bir negatif kontrol ve bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Hücre ekstraktlarının toplam protein içeriği, Bio-Rad protein deneyi (Bio-Rad Laboratories) kullanılarak belirlenmiştir. Hücre ekstraktlarının eşit miktarları (yaklaşık 2 mg), Sapharose 4B hızlı akışında (Sigma) çözülmemiş 20 mg protein A kullanılarak 3 μ g anti-hIL4-R α zinciri (BD Pharmingen 551894) ile immüno çöktürülmüştür. İmmüno çökelti, seyrelti tamponunda iki defa yıkanmıştır (TSA çözeltisinde %0.1 Triton X-100 ve bovin hemoglobin, bir defa TSA çözeltisinde ve diğeri, Laemmlı tamponu ile

25 çözölmüş, kaynamış ve TRIS-glisin %4 ila %12 SDS-PAGE vasıtasıyla çözölmüş 0.05 M TRIS-Cl (pH 6.8) çözeltisinde. TSA çözeltisi, 0.01 M TRIS-Cl (pH 8.0), 0.14 M NaCl ve %0.025 sodyum azid içermiştir). Bazı deneylerde, hücre ekstraktlarının 75 μ g protein içeriği, öncelikli immüno çöktürme olmadan SDS-PAGE vasıtasıyla doğrudan çözölmüştür.

30

Western blot analizleri, proteinleri, poliakrilamid jellerden 25 mM TRIS, 192 mM glisin, %0.1 SDS, 100 μ M sodyum vanadat ve %20 metanol içeren TRIS-glisin tamponunda 2 saat boyunca 25 V'de Hybond-ECL nitroselüloz membranlara (Amersham) aktararak uygulanmıştır. Blotlar, bloke edici tampon ile 1 saat işlem görmüştür (%2.5 yağsız kuru süt, 10 mM TRIS-Cl [pH 7.5], 100 mM NaCl ve %0.1 Tween 20) ve bir saat daha bloke edici

tamponda 2 µg/ml fare anti-hIL4-Rα antikorı ile inkübe edilmiştir. Antikor bağlantısı, yabanturpu peroksidaz ile konjüge koyun anti-fare immünoglobulin ile 1 saat boyunca blotları inkübe ederek, bundan sonra iyodine sübstrat ile 1 dakikalık bir inkubasyon ve daha sonrasında geliştirilmiş kemilüminesan tespiti ile tespit edilmiştir.

5

Sonuçlar

Şekil 37, transfeksiyondan 24, 48 ve 72 saat sonra hIL4-Rα zinciri ile geçici olarak transfekte edilen bir KBT çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinden hücre ekstraktlarının bir Western blotu analizini göstermektedir. hIL4-Rα zinciri, transfeksiyondan 24 saat sonra hIL4-Rα zinciri ile transfekte edilen KBT hücrelerinde tespit edilmiştir ve hIL4-Rα zincirinin ekspresyon seviyeleri, transfeksiyondan 48 ve 72 saat sonra progresif olarak artmıştır. Transfekte olmayan KBT hücreleri, hIL4-Rα zinciri için bir negatif kontrol olarak hareket etmiştir. hIL4-Rα cDNA'ya yönelik preparasyon için kullanılan insan PBML hücrelerinden hücre ekstraktları, hIL4-Rα zinciri için bir pozitif kontrol olarak hareket etmiştir.

15

9.2.2. Stabil transfeksiyon

Arzu edilen bir protein ile bir çapraz soy tri-hibrit hücre dizisinin hücrelerinin stabil transfeksiyonunun bir örneği olarak, bir KBT hücre dizisinin hücreleri, insan İnterlökin 2 (hIL-2) geni ile transfekte edilmiştir.

20

Yöntem

RSV uzun terminal tekrar sekanslarının kontrolü altında bir sıçan preproinsülin II genini içeren hIL-2 ekspresyon vektörü pBC12/RSV/IL2 (IS), transfeksiyon için kullanılmıştır. Tüm insülin öncü bölge ve bir dönüşüm başlatma kodonunu kodlayan insülin sekansları dahil edilmiştir. Bu kimerik hIL-2 mRNA, doğal hIL-2 öncüyü ve başlatma kodonunu (Cullen, 1988) içeren hIL-2 mRNA'nın ürettiğinden önemli ölçüde daha fazla hIL2 proteini üretmektedir.

30

Dihidrofolat redüktaz gen sekansları (dhFr), SV40/dhFr gen fragmanı ile ligasyon vasıtasıyla pBC12/RSV/IL2 vektörüne eklenmiştir (Subramani ve ark., Mol. Cell. Biol. 1:854, 1981), bu da SV40 virüs erken bölge promoterinin kontrolü altında bir tüm mürin dhFr genini içeren ve

hIL-2 ve dhFr genlerinin, aynı yönlendirmeye konumlandırıldığı pBC12/RSV/IL-2/dhFr plazmidi ortaya çıkarmaktadır.

Transfeksiyondan önce, kültürlenmiş KBT hücreleri, 90 dakika boyunca 0.1mM polisiklik
5 aromatik hidrokarbon rasemik 3a, 4b-dihidroksi-la, 2a-epoksi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [c]
fenantren (B[c]PHDE) ile mutageneza tabi tutulmuştur (Carothers ve ark., Proc. Natl. Acad.
Sci 87:5464-68, 1990). dhFr- klonlarının seçimi, hipoksantin ve timidine bağlı olmuştur ve 6
günlük bir ekspresyon sürecini takip etmiştir (Urlaub ve ark., Proc. Natl. Acad. Sci. 77(7):
4216-20, 1980). Elde edilen dhFr'si eksik KTB hücreleri (KBTdhFr-), 10^{-4} M hipoksantin ve
10 10^{-5} M timidin ile takviye edilen standart ortamda sürdürülmüştür.

Transfeksiyonda, kültürlenmiş KBTdhFr- hücreleri, PBS ile üç defa yıkanmıştır ve 0.8 ml
PBS'de yeniden askıya alınmıştır. 60 µg pBC12/RSV/IL2/dhFr vektörü, hücre
süspansiyonuna eklenmiştir ve süspansiyon, bir plastik elektroporasyon küvetine aktarılmıştır
15 ve 10 dakika boyunca buzda inkübe edilmiştir. Elektroporasyon, bir Gen-pulser
elektroporasyon birimi (Bio-Rad) ile bir standart elektroporasyon protokolü kullanılarak 75
kV/m ve 25 µF'da uygulanmıştır. Darbe işleminden sonra, küvet, 10 dakika boyunca buzda
inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonrasında şişelere aktarılmıştır ve hipoksantin ve timidin
içermeyen standart ortamda kültürlenmiştir. Canlı hücreler, tek hücre klonlama tekniği
20 kullanılarak klonlanmıştır (bkz. Bölüm 1.1.2) ve oluşturulan diziler, hIL-2 salgısı için
değerlendirilmiştir.

Sonuçlar

25 Transfekte KBT (KBT TR-IL2) hücrelerinde hIL-2 mRNA ekspresyonu, hIL-2'ye özgü
primerler ile PCR vasıtasıyla doğrulanmıştır. Manyetik manyetik tanecik sınıflandırma işlemi
vasıtasıyla (Bölüm 1.3.3.5'de açıklandığı gibi) PBML'den elde edilen insan CD8⁺ T hücreleri
ve Jurkat hücre dizisi, Klon E6-1, bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. K562 hücreleri ve
transfekte olmayan KBT hibrit hücreleri, negatif kontroller olarak kullanılmıştır. Toplam
30 RNA, üretici talimatlarına uyularak RNeasy Mini kitinde (Qiagen) çeşitli işlemlerden sonra
transfekte KBT hücrelerinden ekstrakte edilmiştir. Aşağıdaki primerler, yayınlanmış
sekanslara bağlı olarak kullanılan hIL-2 primer olmuştur (Wang ve ark, 1989):

5'primer = 5'-GAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCC-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 13)

3'primer = 5'-TGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAG-3' (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 14)

5

Amplifikasyon, 35 döngü uygulanmıştır. PCR döngüleri, 94°C'de 40 saniyeden oluşmuştur, hIL2 için tavlama sıcaklığı 55°C olmuştur, bunu 72°C'de 40 saniyeliğine bir uzantı takip etmiştir. PCR ürünleri, etidyum bromür ile %2 agaroz jellerde görselleştirilmiştir. Sonuçlar, Şekil 38'de sunulmaktadır. Ekspresyon seviyeleri, CD8⁺ insan T lenfositlerinden ve Jurkat hücrelerinden elde edilenlere benzerdir. Transfekte olmayan KBT hücreleri ve K562 hücreleri, negatif kontroller olarak kullanılmıştır.

Hücre içi IL-2, üretici talimatlarına göre BD FastImmune™ CD4 hücre içi IL-2 Tespit Kiti (BD Pharmingen) kullanılarak tespit edilmiştir. FACS analizleri, bir BD FACSCalibur kullanılarak uygulanmıştır. İlk olarak, CD4⁺ hücreleri, öne saçılmaya ve floresan eşliğine, ayrıca öne ve yana saçılmaya bağlı olarak kapılanmıştır. Bundan sonra, CD69 (aktive CD4⁺ T hücreleri) ve hücre içi IL-2 ekspresyonuna bağlı olarak kapılanmış popülasyonun analizi gelmiştir. KBT TR-IL2 hücrelerinde IL-2 ekspresyonunun bir FACS profili, Şekil 39'da gösterilmektedir. Transfekte olmayan KBT hücreleri, bir kontrol olarak kullanılmıştır. KBT hücrelerinin yaklaşık olarak %41'i, CD69 aktivasyon molekülü için pozitif olmuştur. KBT TR-IL2 hücrelerinin %92'si, hücre içi hIL-2 (R1+R2) için pozitif boyalı olmuştur. hIL-2 negatif hücreleri, CD69 pozitif popülasyonun parçası olurken, CD69 negatif hücreler, hücre içi hIL2 olmuştur.

Otuzuncu günde ve transfeksiyondan dokuz gün sonra hIL-2 salgıları, ELISA tarafından doğrulanmıştır. Özet olarak, 1×10^6 hIL-2 transfekte KBT hücreleri, 24 saat boyunca 37°C'de 24 hazneli bir doku kültürü plakasında inkübe edilmiştir. Süpernatant toplanmıştır ve hIL-2 aktivitesi, hIL-2 ELISA kiti (R&D systems) ile ölçülmüştür. Süpernatantlar, hIL-2 ELISA kitinin tespit aralığına uyacak şekilde seyreltilmiştir. Rekombinant hIL-2 (R&D systems), bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ELISA analizi, $660 \text{ ng}/10^6$ hücre/24 saat ila $3300 \text{ ng}/10^6$ hücre/24 saat aralığında hIL-2 salgı oranlarını göstermiştir.

hIL2 ve salgılayıcı hIL2 ile stabil olarak transfekte edilen, meydana gelen KBT hücre dizisi, ProL2 olarak işaretlenmiştir.

9.3. Hibridizasyonu ve transfeksiyonu birleştiren hedef proteinlerin eş zamanlı ekspresyonu

Tri-hibrit sistemini kullanan eş zamanlı protein ekspresyonunun bir örneği olarak, tri-hibrit hücreler, hIgM'yi eksprese etmek için insan IgM⁺CD25⁺ B lenfositleri hibridize edilmiştir, daha sonrasında hIL-2 ile stabil transfeksiyon gerçekleşmiştir. hIgM ve hIL-2'yi stabil bir şekilde eksprese eden hibrit hücre sistemi, hIL-4Rα ile geçici transfeksiyona daha fazla tabi tutulmuştur. Bu örnekte, hIgM, birinci proteini temsil etmiştir, hIL-2, ikinci eş zamanlı olarak eksprese edilmiş proteini temsil etmiştir ve hIL-4Rα, üçüncü eş zamanlı olarak eksprese edilmiş proteinini temsil etmiştir. Alternatif olarak, tri-hibrit hücreler, hIL-2 ile stabil bir şekilde transfekte edilmiştir, daha sonrasında insan shIgM⁺CD25⁺ B hücreleri ile somatik hücre hibridizasyonu gerçekleşmiştir. hIL-2 ve hIgM'nin, hibrit hücre sisteminden eksprese edilmesinin onaylanmasından sonra, hibrit hücre sistemi, hIL-4Rα ile geçici transfeksiyona tabi tutulmuştur. Bu örnekte, hIL-2, birinci proteini temsil etmiştir, hIgM, ikinci eş zamanlı olarak eksprese edilmiş proteini temsil etmiştir ve hIL-4Rα, üçüncü eş zamanlı olarak eksprese edilmiş proteinini temsil etmiştir.

9.3.1 Hücre Ayrılması

FACS tarafından belirlendiği üzere (bkz. Bölüm 4.2.3) B ve T hücre fenotipik markörlerini paylaşan çapraz soy tri-hibrit hücrelerin %100'ü ile olgun B hücresinden (CD19⁺) ve olgun T yardımcı hücresinden (CD4⁺) türetilen ve Bölüm 6.2.1'de açıklandığı gibi karyotiplenmiş KBT çapraz soy tri-hibrid, bu deneylerde kullanılmıştır. Bazı durumlarda, Bölüm 9.2.2'de açıklanan mutagenез sürecinden türetilen ve 10⁻⁴M hipoksantin ve 10⁻⁵M timidin ile takviye edilen standart ortamda sürdürülen dhFr'si eksik KBR hücreleri (KBTdhFr-), deneylerde kullanılmıştır. Ayrıca, hIL-2 transfekte hücre dizisi KBT TR-IL2 de (bkz. Bölüm 9.2.2) bazı durumlarda kullanılmıştır. Bölüm 1.3.3'te açıklandığı gibi PBMC'den izole edilen ve Bölüm 2.2'de açıklandığı gibi CD40 yolu vasıtasıyla aktive olan primer CD40 aktive sIgM pozitif B hücreleri, hibridizasyon için insan sIgM B hücrelerinin bir kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu belirgin deneyler için, sIgM⁺ B hücrelerinin izolasyonu da eş zamanlı yüzey ekspresyonuna bağlı olmuştur.

kültürde 5 gün sonra FACS kullanılarak CD25'in (insan IL-2 reseptörü) CD8⁺T hücreleri, Bölüm 1.3.3.5'de açıklandığı gibi MACS CD4 Multisort kiti kullanılarak timuslardan izole

edilmiştir.

9.3.2 Bir birinci proteinin üretimi veya bir ikinci proteinin birlikte üretimine yönelik somatik hücre hibridizasyonu

5

Bir BT hücresi veya KBTdhFr- hücresi veya dizisi KBT TR-IL2 hücresi ve shIgM⁺CD25⁺ B hücresi (bellek B hücrelerinin alt kümesi) arasındaki elektrik hücre hibridizasyon prosedürü, Bölüm 4.4.2’de açıklandığı gibi KBT çapraz soy tri-hibrit dizilerinin oluşturulması için kullanılanla esasen aynı olmuştur. Elde edilen hibridler stabil hale geldikten sonra, Bölüm 1.1’de açıklandığı gibi sürdürülmüştür. Elde edilen hibrit vasıtasıyla shIgM ve CD25’in ko-ekspresyonu, FACS analizi (bkz. Şekil 62) vasıtasıyla doğrulanmıştır ve hIgM üretimi, ELISA tarafından analiz edilmiştir. KBT TR-IL2 hücrelerinin, shIgM⁺CD25⁺ B hücresi ile hibridizasyon için kullanıldığı durumlarda, hIL-2 üretimi de hIgM ile eş zamanlı olarak analiz edilmiştir.

15

9.3.3 İkinci protein ile stabil transfeksiyon

Somatik hücre hibridizasyonu, hIL-2 ile sistemin stabil transfeksiyonundan önce uygulandığında, hIgM üretici sistem, Bölüm 9.2.2’de açıklanan metodoloji kullanılarak hIL-2 ile transfeksiyona tabi tutulmuştur. hIgM ve hIL-2’nin eş zamanlı üretimi, ELISA vasıtasıyla doğrulanmıştır.

20

9.3.4 Üçüncü protein ile geçici transfeksiyon

hIgM ve hIL-2 salgılayan bir stabil hibrit sistemi, Bölüm 9.2.1’de açıklananla aynı yaklaşım kullanılarak hIL-4Ra geni ile elektroporasyon vasıtasıyla geçici olarak transfekte edilmiştir. hIgM, hIL-2 ve hIL-4Ra’nın birlikte üretimi, ELISA tarafından onaylanmıştır.

25

Sonuçlar

30

Aynı hibrit hücre sisteminin hücreleri tarafından eş zamanlı olarak eksprese edilen ve birlikte üretilen üç proteinin üretim seviyesi, Tablo 7a’da ve Tablo 7b’de özetlenmektedir. Analiz için, hücreler, hücreler, bir proteinin ekspresyonu için 0.5×10^5 hücre/ml, iki proteinin ekspresyonu için 1.2×10^5 hücre/ml ve üç proteinin ekspresyonu için 3.2×10^5 hücre/ml

yoğunluğuna 24 hazneli plakada büyütülmüştür. Üç proteini eş zamanlı olarak üretilen sadece sistem değildir, ayrıca birinci proteinin üretim seviyesi de, ikinci proteinin ko-ekspresyonundan sonra artmıştır ve üçüncü proteinin ekspresyonu ile daha fazla güçlendirilmiştir. Aynı şekilde, ikinci proteinin üretimi, üçüncü proteinin ekspresyonu ile

5

Tablo 7a. Birinci ekspresyon yöntemi olan somatik hibridizasyon ile aynı hibrit hücre sistemi tarafından eş zamanlı olarak eksprese edilen proteinlerin tipik üretim seviyeleri

Üretim seviyesi	Bir proteinin ekspresyonu	İki proteinin ekspresyonu	Üç proteinin ekspresyonu
hIgM, ng/ml/24 saat	3,382±284	12,547±593	33,891±835
hIL-2, ng/ml/24 saat		18,524±660	74,012±1,034
hIL-4Ra, ng/ml/24 saat			13,892±791

Tablo 7b. Birinci ekspresyon yöntemi olan stabil transfeksiyon ile aynı hibrit hücre sistemi tarafından eş zamanlı olarak eksprese edilen proteinlerin tipik üretim seviyesi

Üretim seviyesi	Bir proteinin ekspresyonu	İki proteinin ekspresyonu	Üç proteinin ekspresyonu
hIL2, ng/ml/24 saat	3,22±284	19,875±843	81,124±1,435
hIgM, ng/ml/24 saat		5,321±476	18,067±613
hIL-4Ra, ng/ml/24 saat			12,766±897

Örnek 10

10

10. ProGM hibrit üretimine yönelik serum içermeyen kültür koşullarına adaptasyon

Ticari üretim için ProGM hibrit hücrelerinin dayanıklılığını sergilemek için, kültür hacmi, 1.2 L çalışma hacmine sahip döner şişelere ölçeklendirilmiştir ve bir serum içermeyen ortam için kültürel olarak uyarlanmıştır.

15

Metodoloji

20

ProGM hibridin en yüksek hGM-CSF üretici klonları, FCS içeriğinin, %7.5, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5 ve 0'a kademeli olarak azalması ile serum içermeyen bir ortamda büyümek üzere uyarlanmıştır. Sadece yukarıdaki hGM-CSF'nin en dayanıklı hücre büyümesini ve üretimini gösteren alt kültürler, ardışık düşük serum ortamlarına aktarılmıştır. Her bir seçilmiş alt

kültür, depolama için %5 DMSO ile standart ortamlarımızda dondurulmuştur. İki serum içermeyen kültür ortamı, adaptasyon amaçları için kullanılmıştır. Ticari olarak mevcut belirlenmiş serum ve protein içermeyen ortam Hybri-Max (Sigma) veya Excel (JHR), bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır. Hücre canlılığı, 7. günde tripan mavisinin hariç tutulması ile değerlendirilmiştir. hGM-CSF konsantrasyonu, aynı gün ELISA ile belirlenmiştir.

Sonuçlar

Serum içermeyen kültür koşullarına adaptasyonun sonuçları, Tablo 8’de sunulmaktadır.

Tablo 8. Serum içermeyen koşulda ProGM ile hGM-CSF üretimi

Serum İçeriği (%)							
	10.0	7.5	5.0	2.5	1.0	0.5	0
Maksimum hücre yoğunluğu (x10 ⁶ hücre/ml)	1.8	1.0	1.0	0.8	0.6	0.5	0.5
HGM-CSF konsantrasyonu (µg/ml)	0.911	1.431	1.412	2.345	3.971	4.231	3.825
Üretim (µg/ml/10 ⁶ hücre)	0.5	1.431	1.412	2.93	6.62	8.46	7.65

ProGM hibridin tüm alt kültürlerinde, hGM-CSF üretimi, serum ve protein içeriğinin azaltılması ile artmıştır. Serum içermeyen kültürlerde düşük hücre yoğunluğuna rağmen, serum içermeyen ortamda hGM-CSF miktarı, standart kültür koşulları altında elde edilenden yaklaşık olarak 4 kat daha yüksek olmuştur. Hücre konsantrasyonuna normalleştirildiğinde, hGM-CSF’nin üretim oranı, 15 kat artmıştır.

Örnek 11

11.1. Döner şişelerde üretim

Metodoloji

1.2 L çalışma hacmine sahip olan döner şişeler, 50 r.p.m’de karıştırılmıştır. Serum içermeyen ortamda (ProGMsf) büyümek üzere uyarlanan ProGM hibrit hücreleri, 1x10⁵ hücre/ml bir konsantrasyonda aşılanmıştır. Kültür, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir atmosferde 37°C’de inkübe edilmiştir. Ulaşılan maksimum hücre yoğunluğu, 5x10⁵ hücre/ml olmuştur. Canlı hücreler, tripan mavisini hariç tutma yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Günlük ortam

değişimleri, 9 güne kadar uygulanmıştır. Hücre süspansiyonu (600 ml), 10 dakika boyunca 1000 r.p.m.'de santrifüjlenmiştir, ortam çıkarılmış ve yeni ortam ile değiştirilmiştir ve hücreler, döner şişeye geri dönmüştür. Salgılanan hGM-CSF konsantrasyonu, ELISA tarafından belirlenmiştir. Her bir hazne, 1:500 oranında seyreltilen 100 µl sıçan anti-insan GM-CSF (R&D) ile kaplanmıştır. Hacim cinsinden %0.05 Tween 20 (PBS-T) içeren PBS ile yıkamadan sonra, 0.195-200 ng/ml aralığı boyunca hacim cinsinden PBS-%5 BSA'da 100 µl standart rhGM-CSF (Invitrogen) veya her bir 100 kat seyreltilmiş 100 µl numuneler, iki kopya halinde haznelere eklenmiştir. Tüm inkubasyonlar, 1 saat boyunca 37°C'de uygulanmıştır. Bundan sonra, plakalar, PBS-T ile yıkanmıştır ve PBS-BSA-T'de 1:1,000 seyreltilen 100 µl tavşan anti-insan GM-CSF (R&D) antikoru eklenmiştir ve inkubasyondan ve yıkama işleminden sonra, aynı tamponda 1:1,000 oranında seyreltilen 100 µl keçi anti-tavşan immünoglobulin-HRP konjüгатı eklenmiştir. Bir kez daha, plakalar inkübe edilmiş ve yıkanmıştır ve 100 µl sübstrat eklenmiştir. Optik yoğunluklar, 450nm'de ölçülmüştür.

15 Sonuçlar

ml başına 5×10^5 hücrenin nispeten düşük hücre yoğunluğu, ProGMsf'nin hücre büyümesine yönelik alt optimal kültür koşullarını göstermektedir. Daha yüksek yoğunlukları (10^6 hücre/ml civarında) elde etmek için glikoz içeriğini ve diğer takviyeleri içeren kültür koşullarının daha fazla optimizasyonu gerekebilmektedir. Laktat ve amonyum içeriğinin yakın takibi garanti altına alınmıştır. Alt optimal büyümeye rağmen, kültür süpernatantlarındaki hGM-CSF konsantrasyonu, ml başına 2.8 ila 4.2 µg aralığında olmuştur. Hücre yoğunluğuna ve süresine normalleştirildiğinde, ProGMsf, 24 saatliğine 10^6 hücre başına ml başına 0.6 ila 0.9 µg hGM-CSF arasında üretim oranları sergilemiştir. Kıyaslama için, CHO hücrelerinde 24 saatliğine 10^6 hücre başına ml başına 0.3 µg bir protein üretimi yüksek olarak düşünülmektedir.

11.2. ProGM hibrit hücre dizisi tarafından üretilen insan GM-CSF'nin saflaştırması

Metodoloji

ProGMsf kültüründen süpernatant, PM-10 membran (Amicon) ile 40°C'de yaklaşık olarak 10 kat konsantre edilmiştir. Numune konsantratu, immünoaffinite kolonuna yüklenmiştir, üretici protokolüne göre E.coli türeği insan GM-CSF'ye karşı sıçan anti-insan GM-CSF'yi, Affi-Gel 10'a (Bio-Rad) birleştirerek hazırlanmıştır, PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄,

1.5 mM KH_2PO_4) ile dengelenmiştir ve bağlı proteinler, 0.1 mM sodyum-sitrat, pH 2.8 ile ayrıştırılmıştır. Affinite kolonundan ayrıştırılan proteinler, RP 300 HPLC kolonuna yüklenmiştir ve 1 ml/dakika bir akış oranında 60 dakika boyunca %0-60 asetonitrit gradyanı ile ayrıştırılmıştır. Elde edilen elüsyon profili, Şekil 40'ta gösterilmektedir. RP-HPLC'den tam bölenler, ELISA, gümüş boyama ve Western blotu analizi için toplanmıştır.

Sonuçlar

Tablo 9, tipik iki adımlı saflaştırma işleminden hGM-CSF'nin geri kazanımını göstermektedir. Affinite kolonundan ilk geri kazanım sadece %59 olmuştur ve hGM-CSF'nin sadece %2'si, RPHPLC'den sonra kaybolmuştur. Affinite saflaştırmasından sonra düşük geri kazanımı hesaba katan bir dizi olasılık mevcuttur. hGM-CSF'nin %13'ü, akışla ve yıkama adımlarında kaybolurken, affinite kolonunun bağlama kapasitesi, ProGMsf'nin süpernatantlarında hGM-CSF miktarından daha düşük olabilmektedir. Düşük geri kazanım, ProGMsf hibrit tarafından üretilen hGM-CSF'nin glikosile formlarına kıyasla E.coli trevi hGM-CSF'ye karşı yükselen sıçan antikorlarının düşük affinitesinden kaynaklanabilmektedir. Nihai ürünlerdeki diğer potansiyel gelişme, daha iyi optimize bir elüsyon koşulunun gelişimi olacaktır. Şekil 41'de (bkz. Bölüm 12), RP-HPLC sonrasında toplanan fraksiyonların Western blotu, hGM-CSF'nin, fraksiyon 24-36 arasında ayrıştığını (24-36 dakikada ayrışmaktadır) göstermiştir. Yüksek moleküler ağırlıklı formlar (28-32kDa) fraksiyon 24 ila 27 arasında ayrışırken, düşük moleküler ağırlıklı moleküller (18-22kDa) fraksiyon 34 ila 36 arasında ayrışmaktadır. Bu kromatografik koşullar, özellikle yüksek ve orta moleküler ağırlıklı fraksiyonlarda hGM-CSF'nin farklı moleküler ağırlık formlarını tamamen çözmemiştir.

Gümüş boya ile elde edilen profil ve Western blotu profilleri esasen benzer olmuştur, bu da sadece hGM-CSF ile ilişkili proteinlerin affinite kolonuna bağlı olduğunu göstermektedir. Natif hGM-CSF'nin çeşitli moleküler ağırlıklı türleri gözlemlenmiştir.

Tablo 9. ProGMsf'den türetilen hGM-CSF iki adımlı saflaştırma

Numune	Hacim	ELISA ile hGM-CSF konsantrasyonu	Numunede toplam hGM-CSF	Verim
	ml	$\mu\text{g/ml}$	μg	%
ProGMsf'nin süpernatantı	60	3.825	229.5	100
Affinite kolon akışı	60	0.467	28.02	12
Yıkama adımı	10	0.112	1.12	0.5
Elüat	3	44.78	134.34	59

RP-HPLC immüno-deney pozitif fraksiyonları				
24	0.1	144.5	14.45	6.3
25	0.1	159.7	15.97	7.0
26	0.1	102.8	10.28	4.5
27	0.1	123.1	12.31	5.4
28	0.1	163.6	16.36	7.0
29	0.1	146.8	14.68	6.0
30	0.1	71.72	7.172	3.0
31	0.1	144	1.324	0.6
32	0.1	9.38	0.938	0.4
33	0.1	10.72	1.072	0.5
34	0.1	184.6	18.46	8.0
35	0.1	161.3.3	16.16	7.0
36	0.1	19.71	1.971	0.9
Toplam			131.15	57
Toplam verim				57

Örnek 12

12. Glikosidaz Sindirimi

5

Metodoloji

ProGMsf hibridinden türetilen saflaştırılmış insan GM-CSF, %1 SDS, 1M P-merkaptoetanol, 100 mM sodyum fosfat, pH 7.0'da 100°C'de 3 dakika boyunca ısıyla denatüre edilmiştir, 10 0.8U sekanslama dereceli PNGase F (Sigma) eklenmiştir ve 37°C'de artan süreçler için inkübe edilmiştir.

Sonuçlar

15 N-sindiriminin sonra Şekil 43'te görüldüğü üzere, ProGMsf hibridinden türetilen hGM-CSF formları, süreye bağımlı bir şekilde, E.coli'den türetilen hGM-CSF'nin yakınındaki konuma geçmiştir. Fakat, sindirim sonrasında bantların hiçbirisi, E.coli tarafından üretilen glikosile olmayan forma tekabül etmemiştir. Bu sonuçlar, ProGMsf hibridinden türetilen hGM-CSF'nin, N- ve O-glikosilasyon bölgelerinde glikosile olduğunu ve moleküler ağırlık dağılımına, 20 heterojen glikosilasyonunun yol açtığını göstermektedir. hGM-CSF'nin tüm moleküllerinde O-glikosilasyonunun bu bulgusu, korunmamış O-glikosilasyon bölgelerinin immunojenite açısından önemlidir; O-glikosilasyondan yoksun olan rekombinant insan GM-CSF'nin, klinik çalışmalarda antikorlar geliştirdiğini bildirilmiştir.

Veriler, ProGMsf hibrit hücreleri, N-glikosilasyon bölgelerine göre hGM-CSF'nin üç sınıfını; glikosile her iki bölgeye (25-35kDa, 2N-tipi) sahip molekülleri; glikosile iki bölgeden birisine (20-25kDa, 1N-tipi) sahip moleküllerini; ve glikosile hiçbir bölgeye (18-20kDa, ON-tipi) sahip olmayan molekülleri salgıladığını göstermektedir.

5

Referanslar

- Ainai ve ark., Hum Antibodies 15:139-154, 2006
- Airolidi ve ark, Cancer Research 61:1285-1290, 2001
- 10 Blackwood ve ark, Science 281: 60-63, 1998
- Boerner ve ark, J. Immunol. 147: 86-95, 1991;
- Carothers ve ark, Proc. Natl. Acad. Sci 87:5464-68, 1990
- Christensen ve ark J Biol. Chem. 282(27): 19463-19472
- Cullen, B. R., 1988. DNA, 7: 645-650
- 15 Durocher ve ark, Nucleic Acids Res 30(2):e9, 2002;
- Durocher ve ark, Nucleic Acids Res 30(2):e9, 2002;
- Feizi Nature 314: 53-54, 1985;
- Girard ve ark, Cytotechnology 38:15-21, 2002;
- Gramer ve ark, Biotechnology 13 (7):692, 1995
- 20 Hartman ve ark, J Immunol 164: 944-953, 2000;
- Hosoi ve ark, Cytotechnology 7: 25-32, 1991
- Hosoi ve ark, Cytotechnology 7: 25-32, 1991
- Hosoi ve ark, Cytotechnology 7: 25-32, 1991
- Hur ve ark, Cell Prolif 38: 35-45, 2005;
- 25 Jordan ve ark, Cytotechnology 26:39-47, 1998;
- Jordan ve ark, Cytotechnology 26:39-47, 1998;
- Kalantarov ve ark, Hum Antibodies 11: 85-96, 2002;
- Karpas ve ark, Proc Natl Acad Sci USA 98:1799-1804, 2001
- Kimura H. ve ark, 1999. J Clin Microbiol 37: 132-136
- 30 Kirman ve ark, Hybrid. Hybridomics 21: 405-414, 2002;
- Kohler, G and Milstein, C. Nature, 256, 495-497 1975
- Li ve ark, Proc Natl Acad Sci USA 103(10):3557-3562, 2006
- Li ve ark, Proc Ntl Acad Sci USA 95: 3650-3654, 1998;

- Mahaworasilpa, T. L. (1992). Cell Electro-Dynamics: The mechanics of living cells in intense alternating electric fields. PhD Thesis, University of New South Wales, Sydney, Australia
- Marika ve ark, *Curr Opin Genet Dev* 11(2): 205-208, 2001
- 5 McIlroy D, Autran B, Cheynier R, ve ark. *J Virol.*; 69:4737-4745 1995
- Meissner ve ark, *Biotechnol Bioeng* 75(2):197-203, 2001
- Miyaji ve ark., *Cytotechnology* 4: 173-180, 1990;
- Miyaji ve ark., *Cytotechnology* 4: 39-43, 1990;
- Miyaji ve ark, *Cytotechnology*, 3: 133-140, 1990;
- 10 Neil, G. A. and Zimmermann, U *Electro, Meth. Enzymol* 220, 174 1993 Parham ve ark, *Cytotechnology*, 35:181-187, 2001
- Paulson ve ark, *J. Biol. Chem.* 264: 10931-10934, 1989
- Pham ve ark, *Biotechnol Bioeng* 84(3):332-42, 2003
- Pohl, H. *Dielectrophoresis*, Cambridge University Press, London 1978
- 15 Rademacher ve ark, *Annu Rev Biochem* 57: 785-838, 1988
- Satoh ve ark, *Cytotechnology* 18:162-172, 1996
- Satoh ve ark, *Cytotechnology* 13: 79-88, 1993
- Satoh ve ark, *Cytotechnology* 13: 79-88, 1993
- Schlaeger ve ark, *Cytotechnology* 30:71-83, 1999
- 20 Shinkawa ve ark, *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473, 2003
- Sugimoto ve ark, *J Virol* 73:9690-9691, 1999;
- Toda ve ark, *J Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 787:197-206, 2003.
- Traggiai ve ark, *Nat Med* 10: 871-875, 2004
- Urlaub ve ark, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77(7): 4216-20, 1980
- 25 van Dijk ve ark, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:368-374, 2001
- Wang, A. M., Doyle. M. V., and Mark. D. F. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 86: 9717-9721, 1989
- Wojciezsyn, J. W. ve ark, *J. Cell. Biol.*, 96, 151-159, 1983
- Zafiropoulos ve ark, *J. Immunol. Methods* 200: 181-190, 1997
- 30 Zimmermann, U. (1982). *Biochim. Biophys. Acta.* 694, 227-277

SEKANS LİSTESİ

	<110> Stephen Sanig Araştırma Enstitüsü	
	<120> Hibrid hücrelerinin üretimine yönelik yöntemler	
5	<130> 50356WOP00	
	<160> 14	
	<170> Patent versiyonu 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Homo sapiyen	
	<400> 1	
	cacactcgcc tgccttttcc	20
15	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiyen	
20	<400> 2	
	gattcccgtc cagtgtcagg	20
	<210> 3	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	

38263.01

	<400> 3 caagaaccca gacgagtcg tagaa	25
5	<210> 4 <211> 25 <212> DNA <213> Homo sapiens	
10	<400> 4 aagaagcatg tatactaagc ctccc	25
15	<210> 5 <211> 19 <212> DNA <213> Homo sapien	
20	<400> 5 ccggaaggtg tatgaactg	19
25	<210> 6 <211> 19 <212> DNA <213> Homo sapien	
30	<400> 6 tccatggtga tctctctc	19
	<210> 7 <211> 23 <212> DNA <213> Homo sapien	

38263.01

<400> 7
tggtcttcga cattgccgac gac 23

<210> 8

5 <211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapien

10 <400> 8
gcatttgcca tggacaagat gccagga 27

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Homo sapien

<400> 9
aggggcgcgc agataattaa a 21

20 <210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapien

25 <400> 10
agtggggcca atcaccttca ta 22

<210> 11

<211> 23

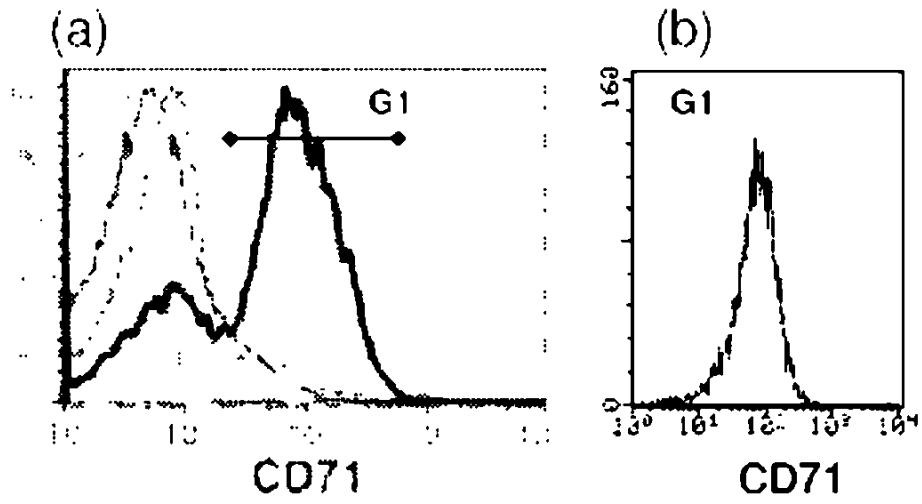
30 <212> DNA

<213> Homo sapien

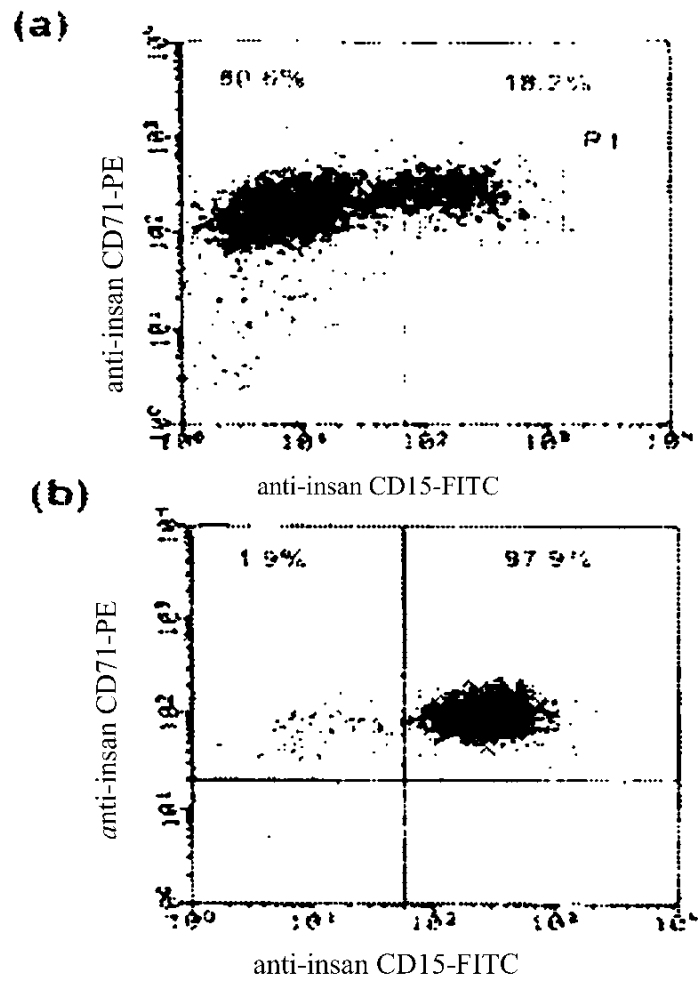
<400> 11
ggatccgcgc agataattaa aga 23

	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Homo sapiyen	
	<400> 12	
	ggateccaaat caccttcata ccat 24	
	<210> 13	
10	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiyen	
	<400> 13	
15	gaatggaatt aataattaca agaatecc 28	
	<210> 14	
	<211> 24	
	<212> DNA	
20	<213> Homo sapiyen	
	<400> 14	
	tgtttcagat cccttagtt ccag 24	
25		

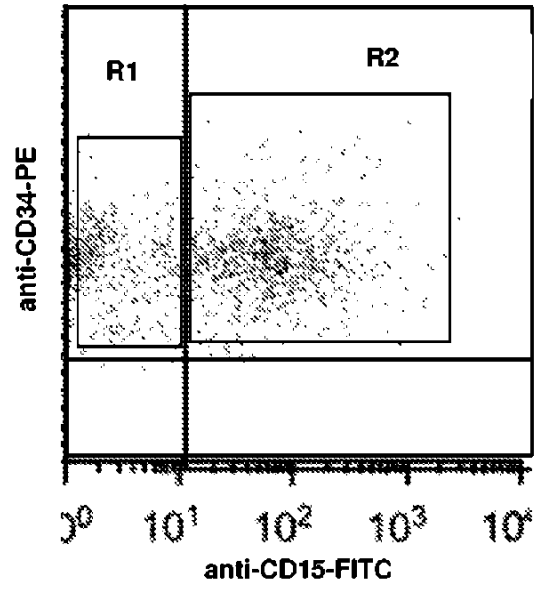
Şekiller



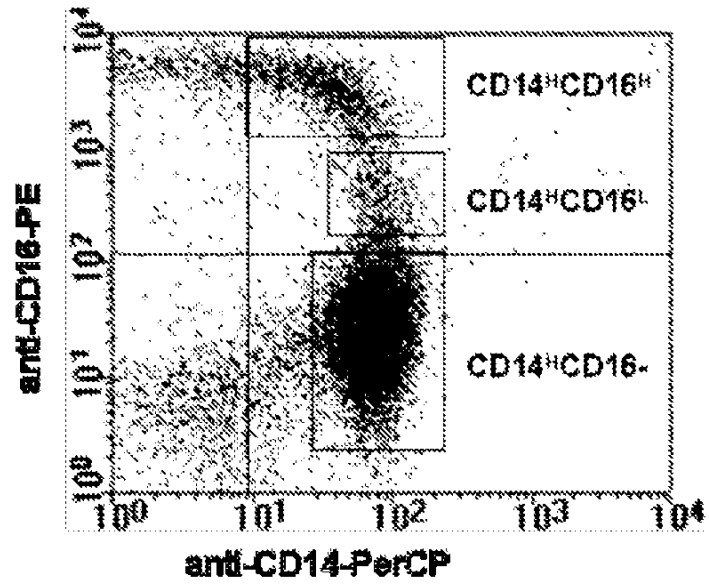
Şekil 1.



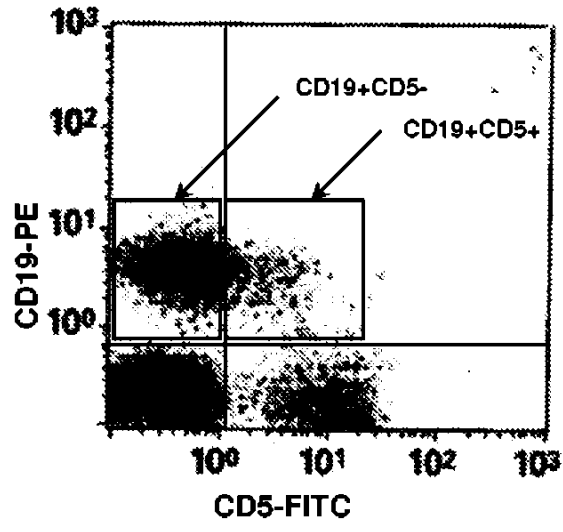
Şekil 2.



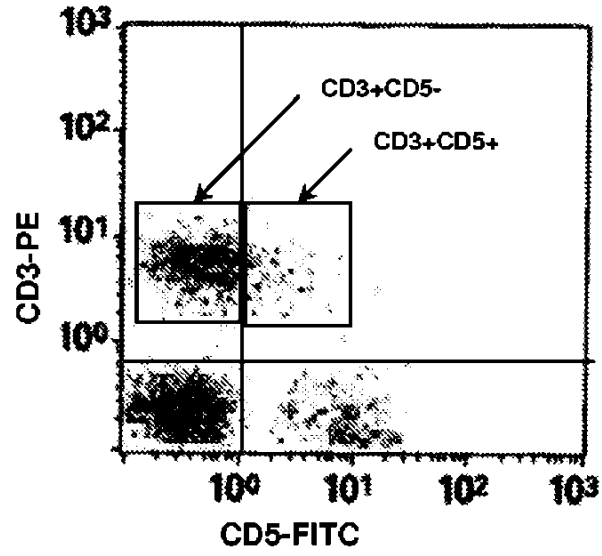
Şekil 3



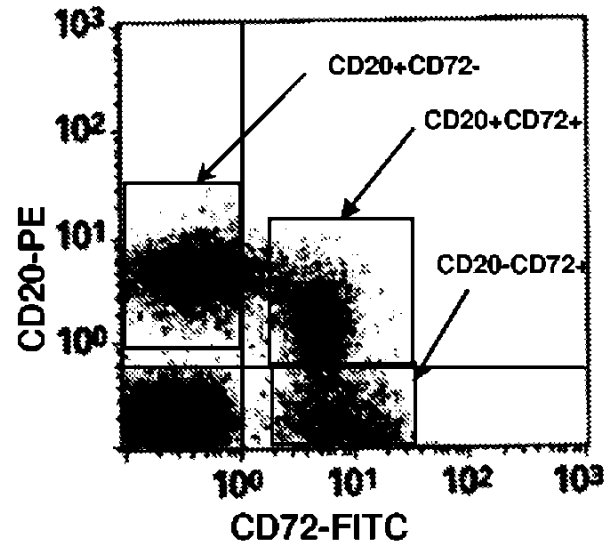
Şekil 4.



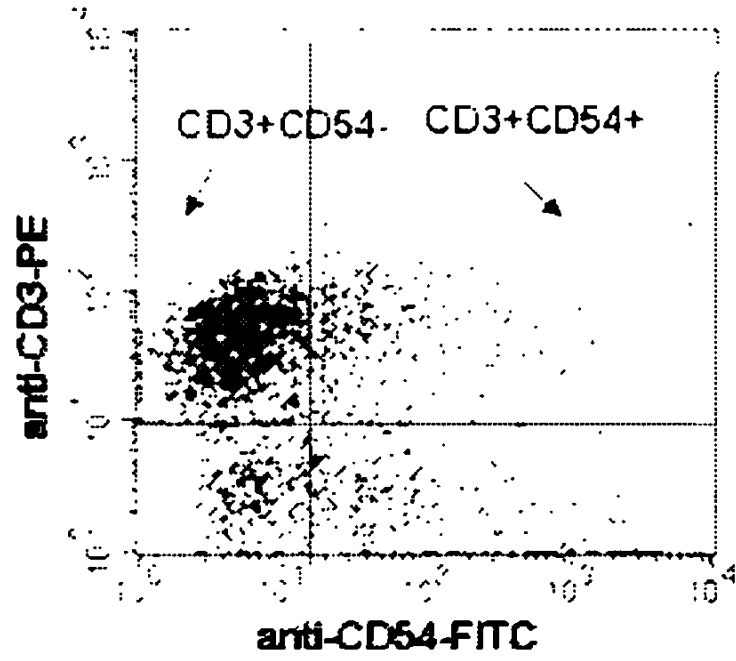
Şekil 5.



Şekil 6.

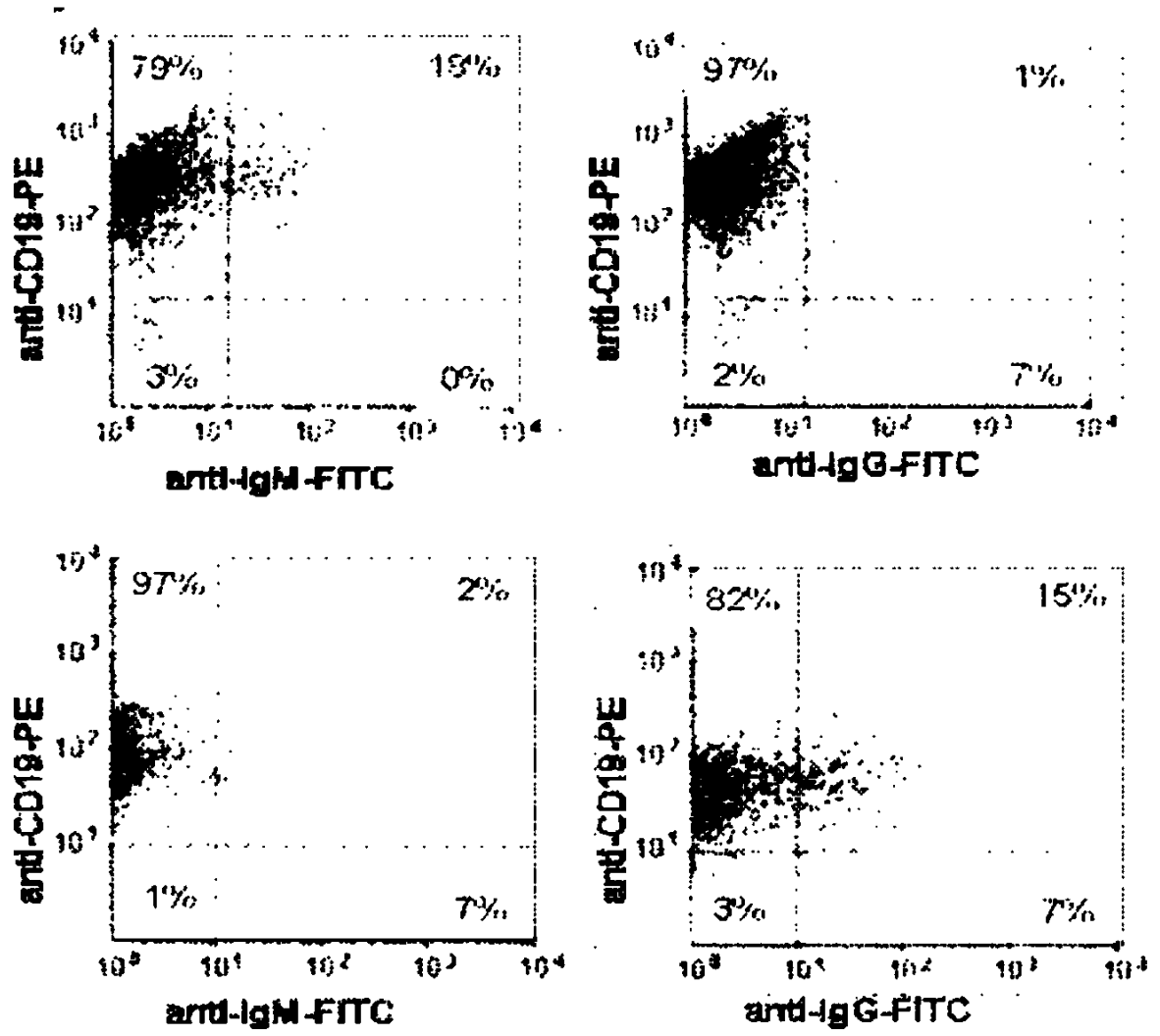


Şekil 7.

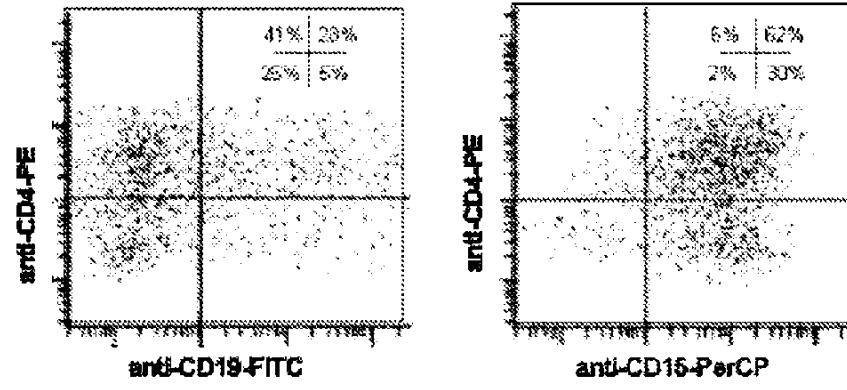


Şekil 8.

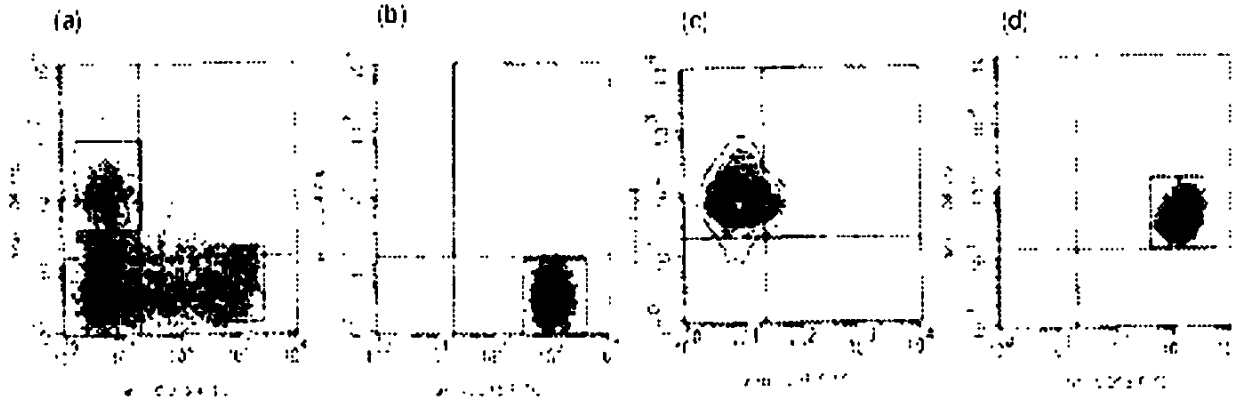
(A) Gün 5



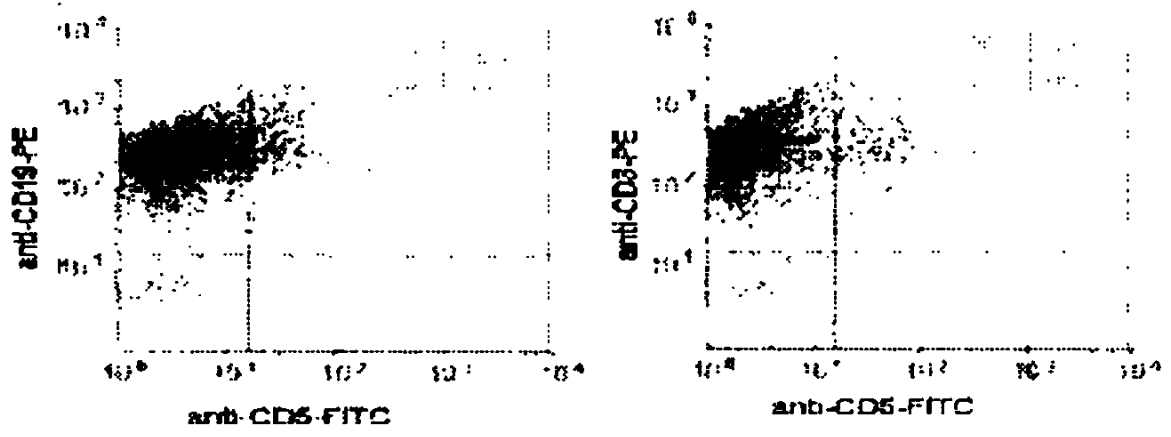
Şekil 9.



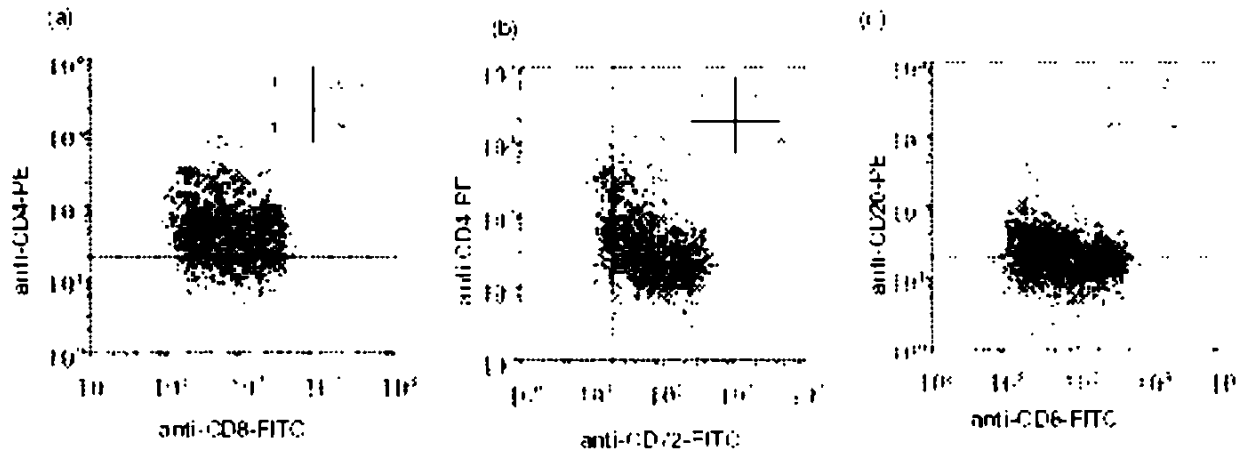
Şekil 10.



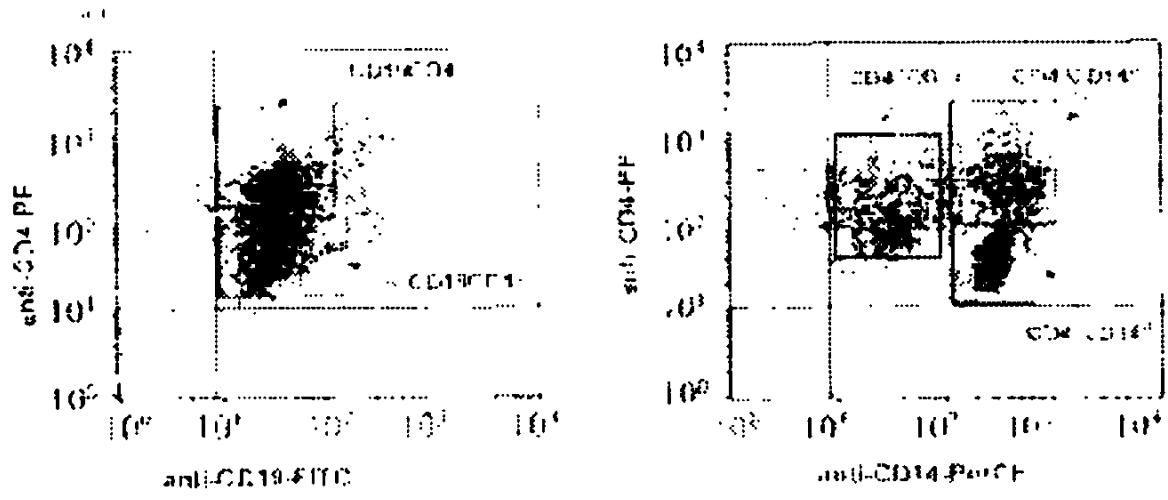
Şekil 11.



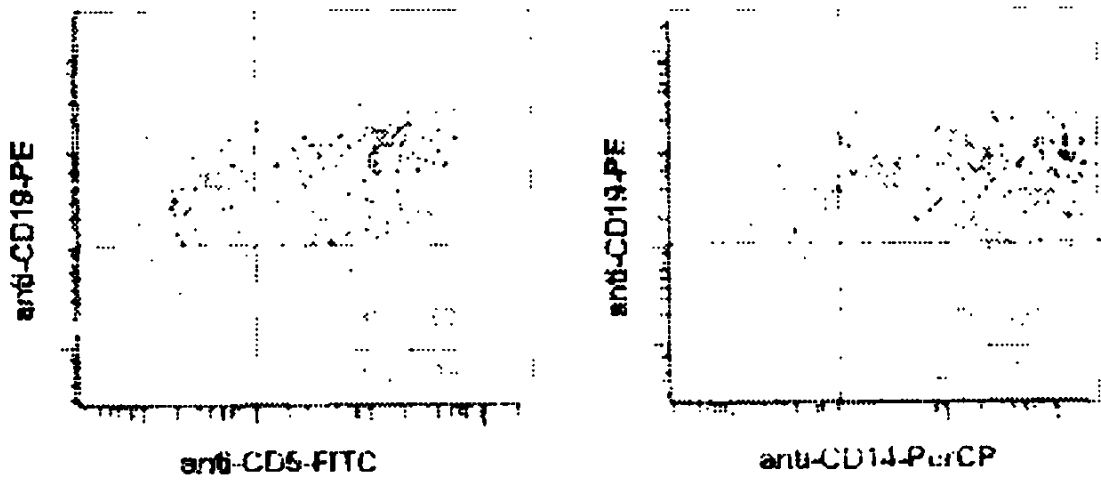
Şekil 12.



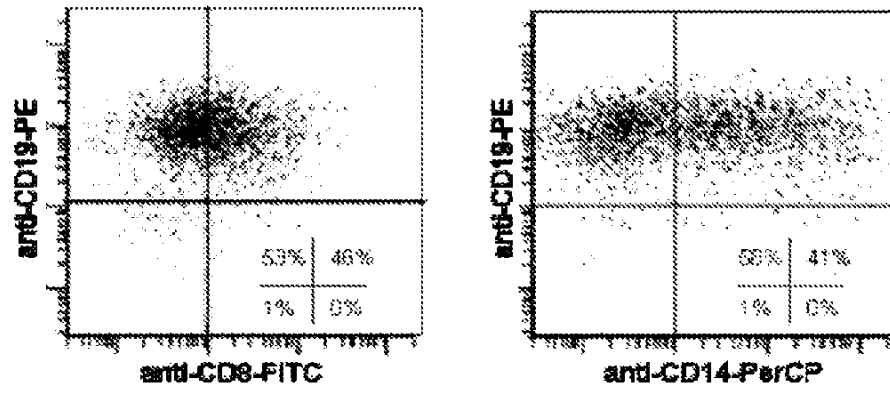
Şekil 13.



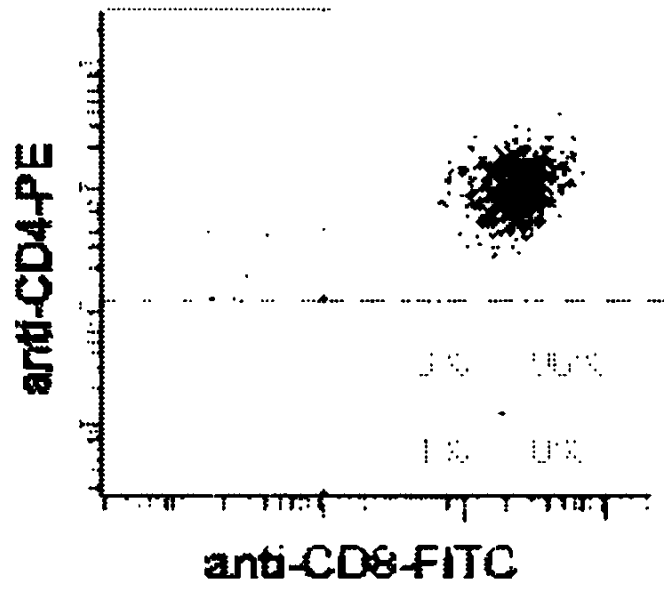
Şekil 14.



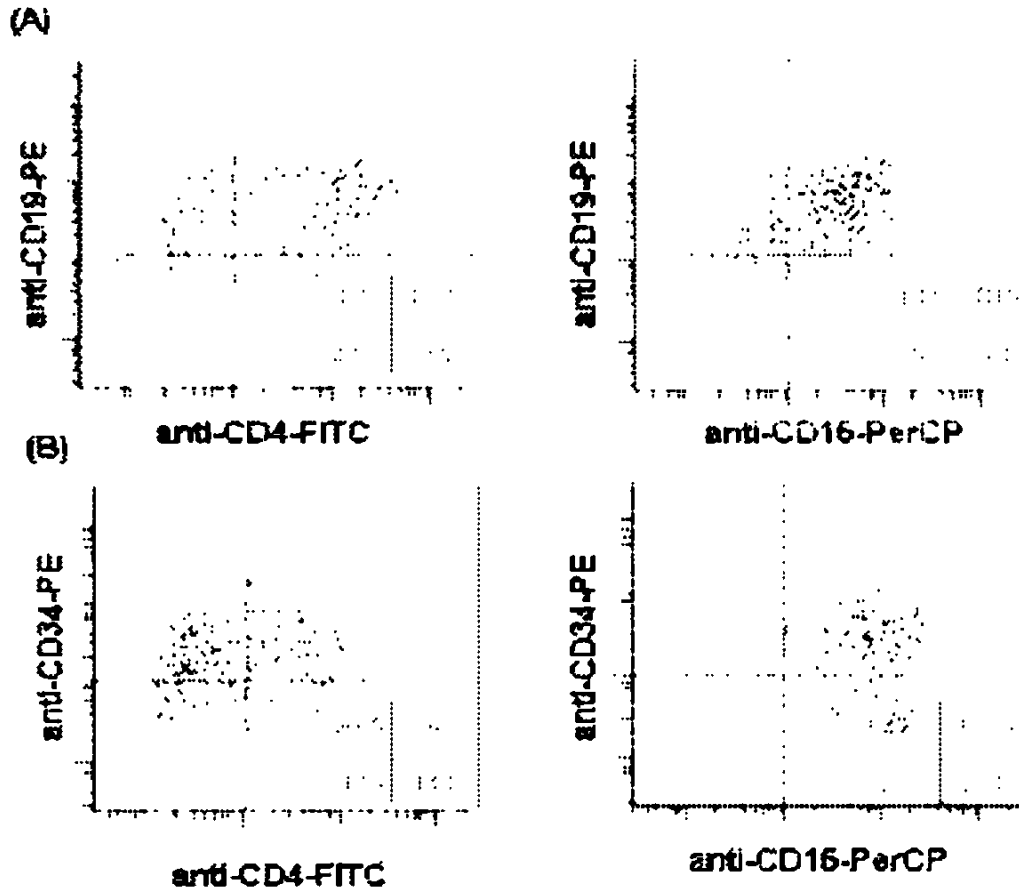
Şekil 15.



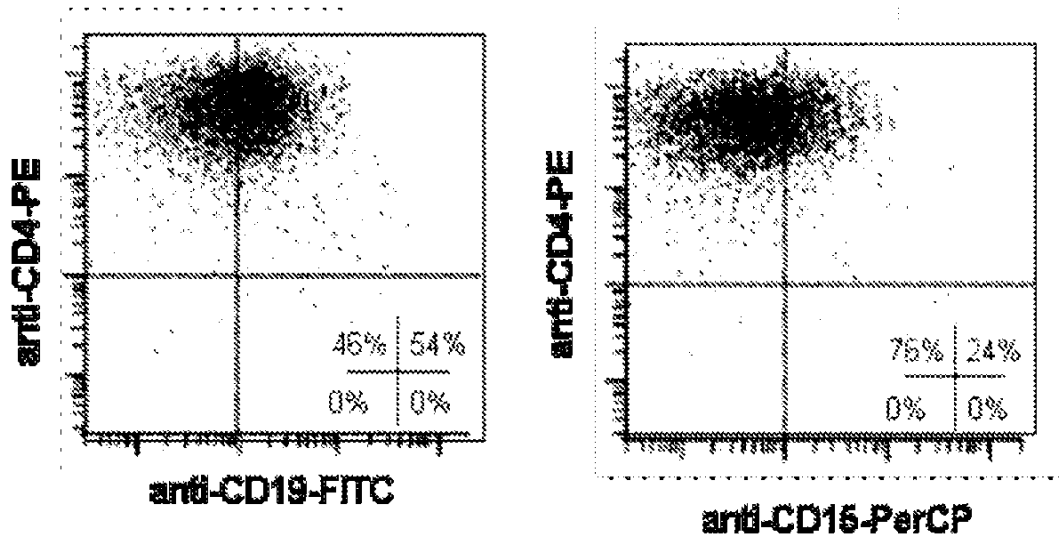
Şekil 16.



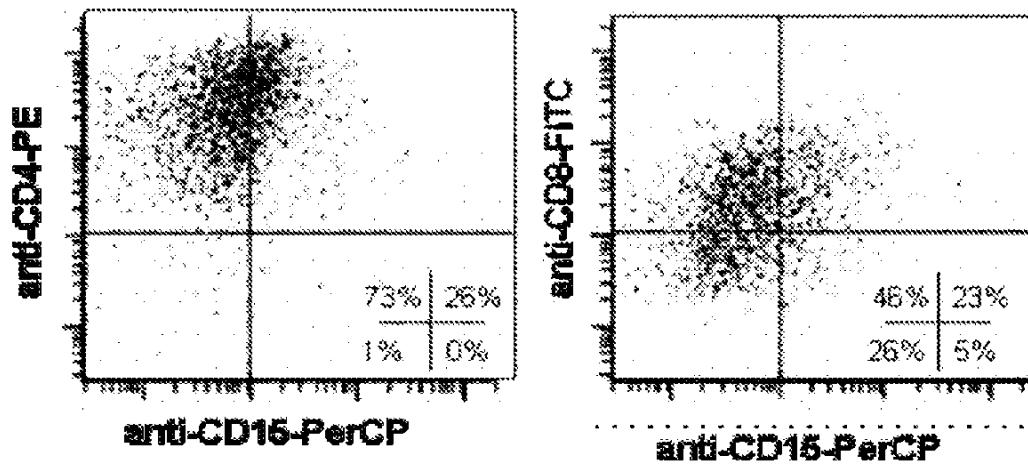
Şekil 17.



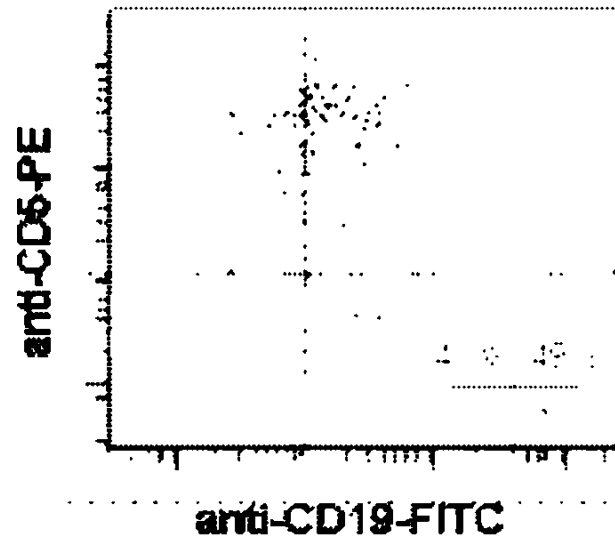
Şekil 18.



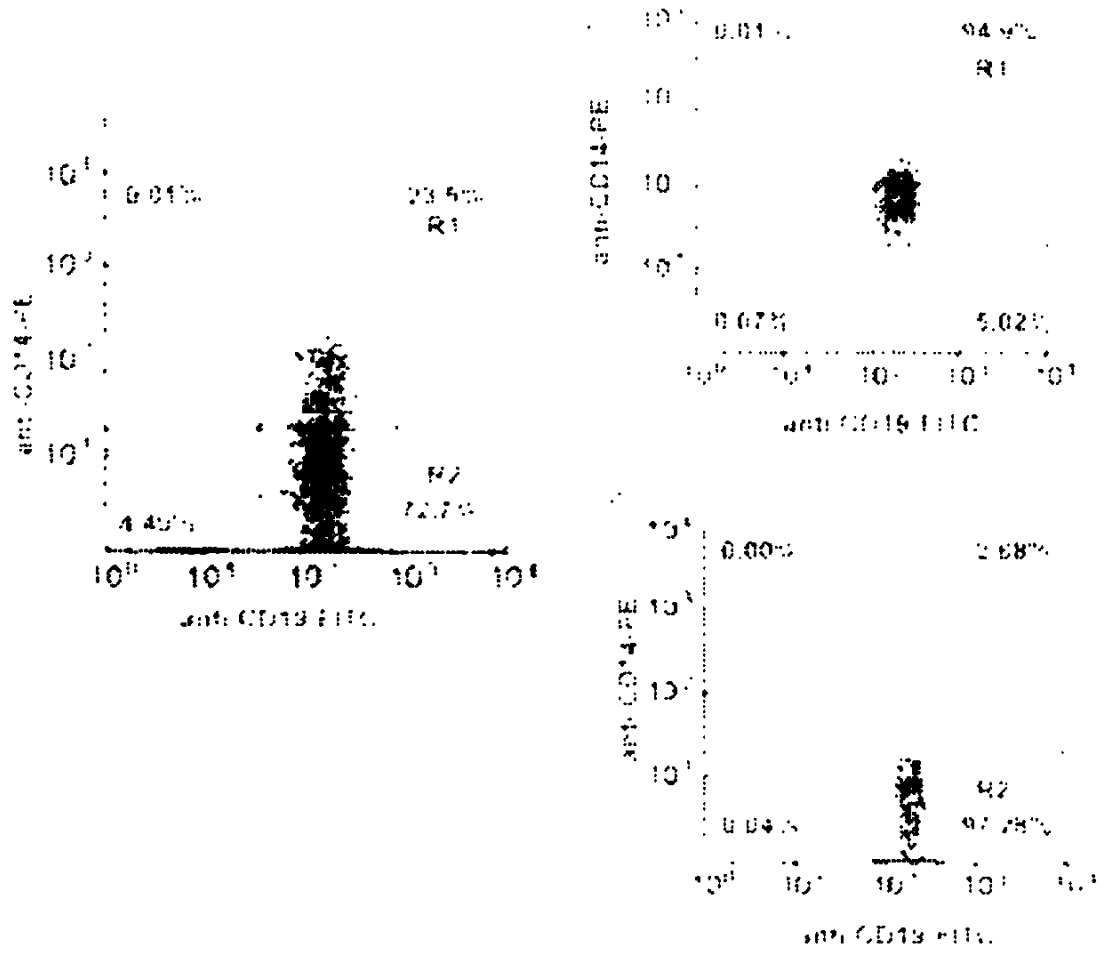
Şekil 19.



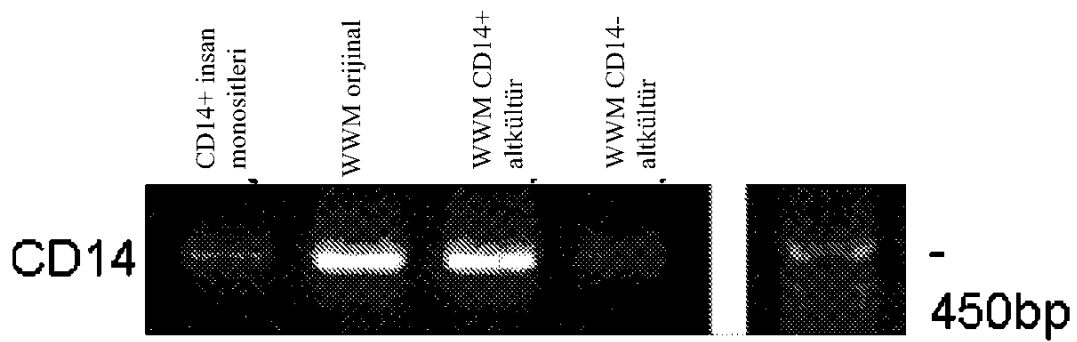
Şekil 20.



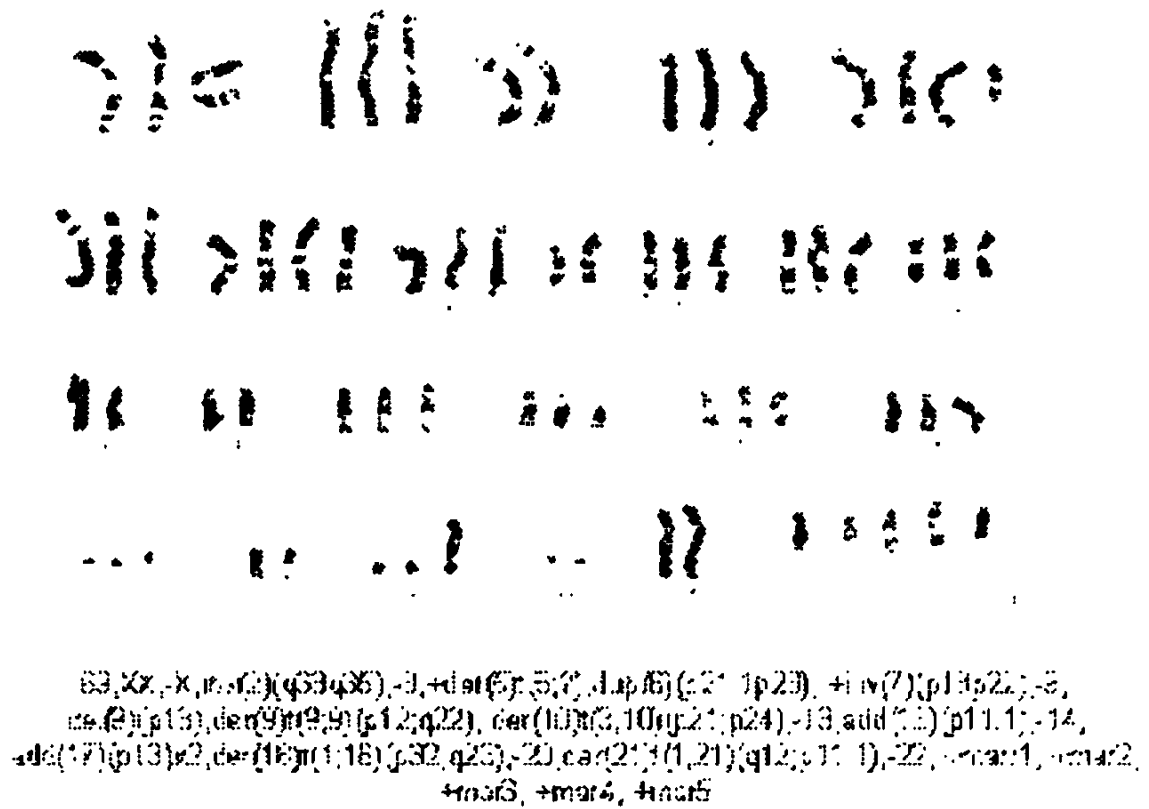
Şekil 21.



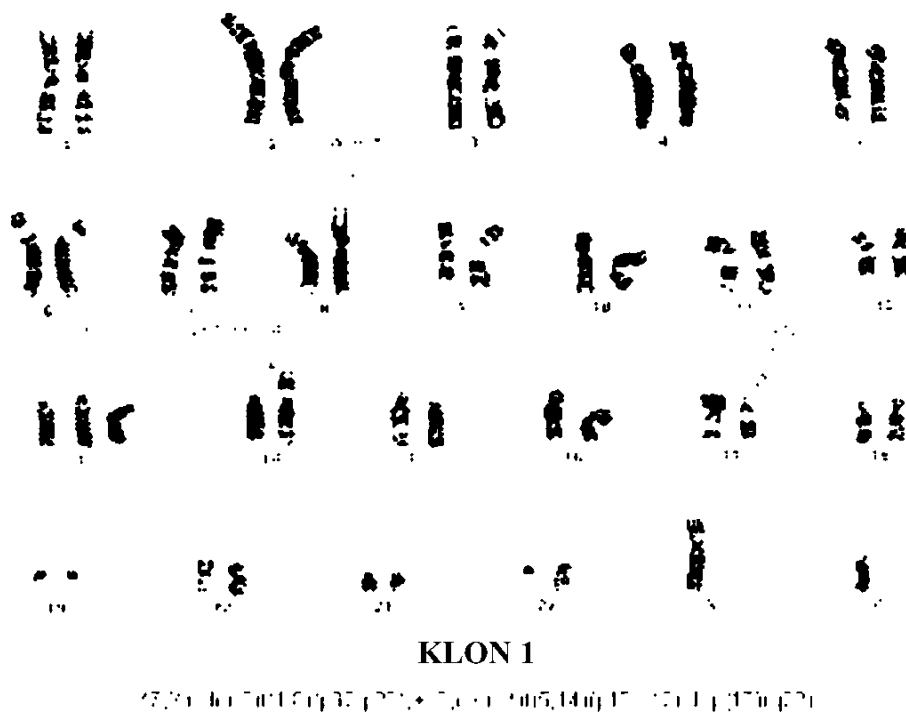
Şekil 22.



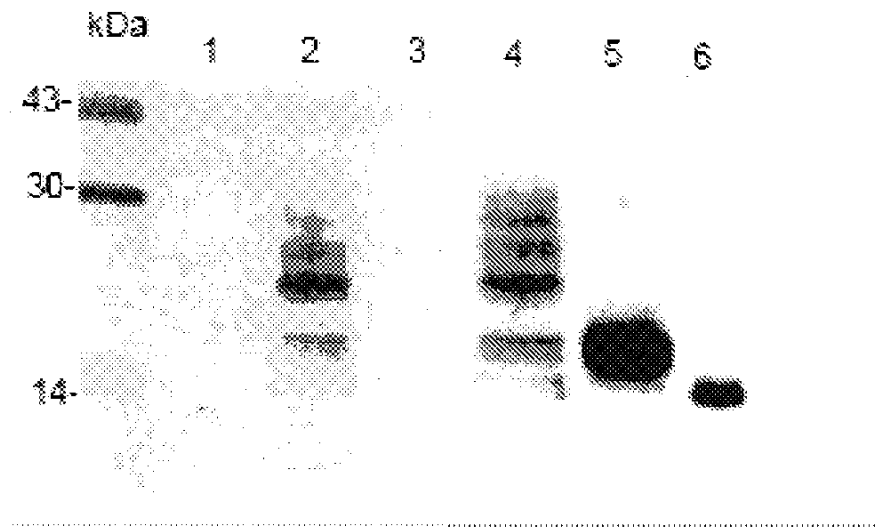
Şekil 23.



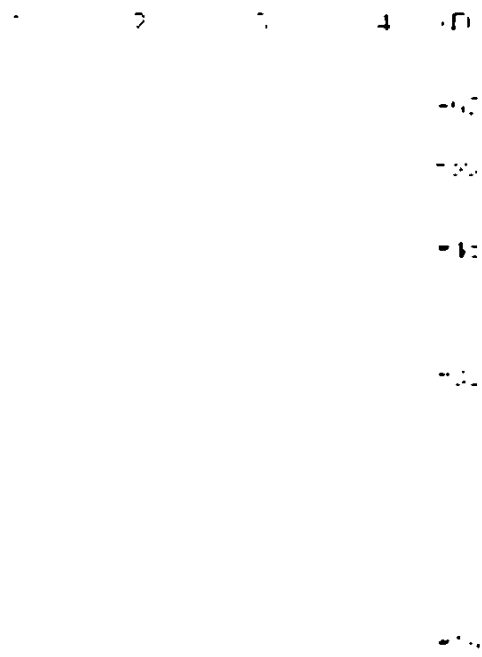
Şekil 24.



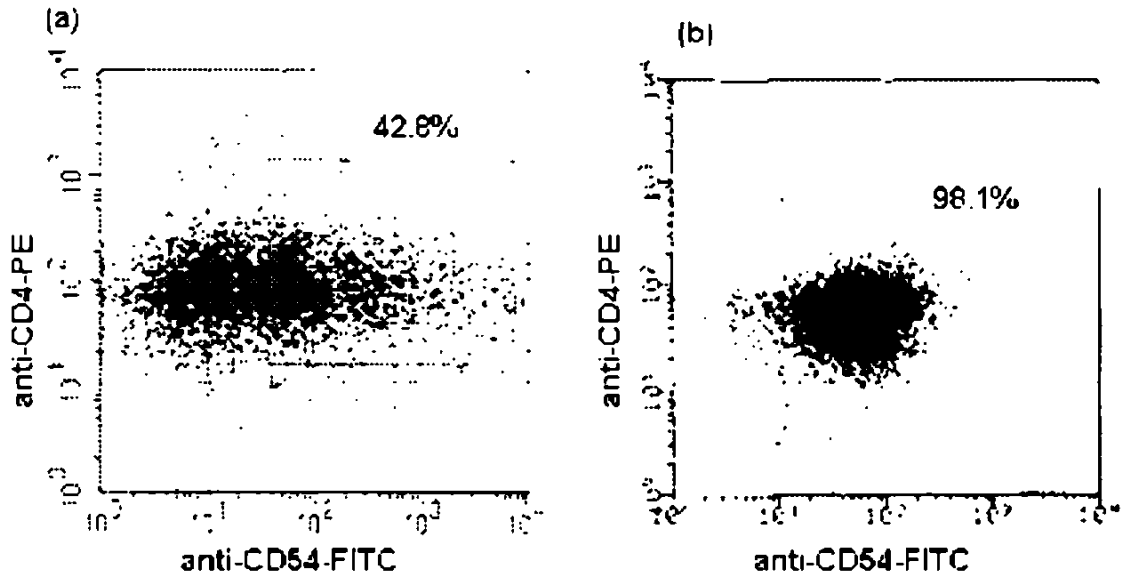
Şekil 25.



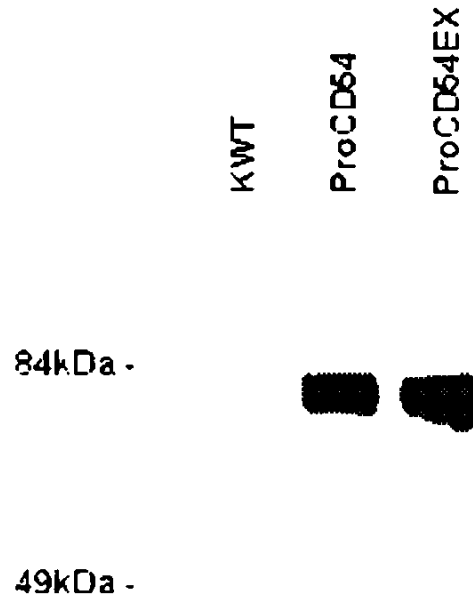
Şekil 32.



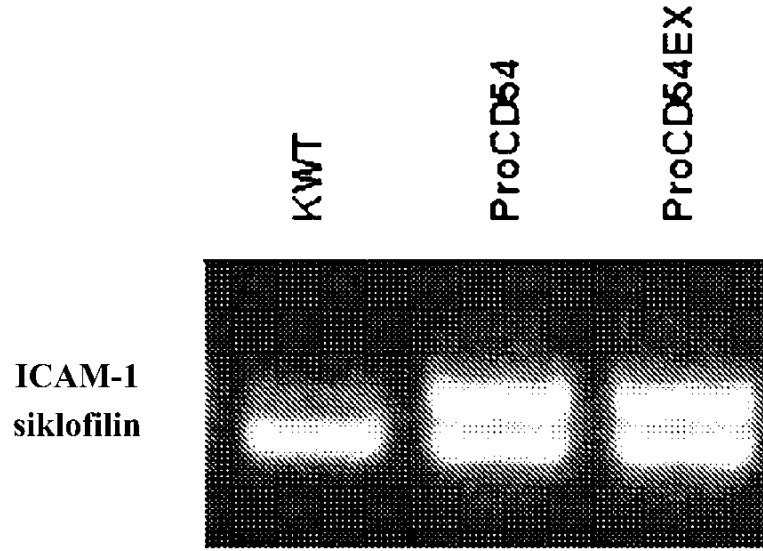
Şekil 33.



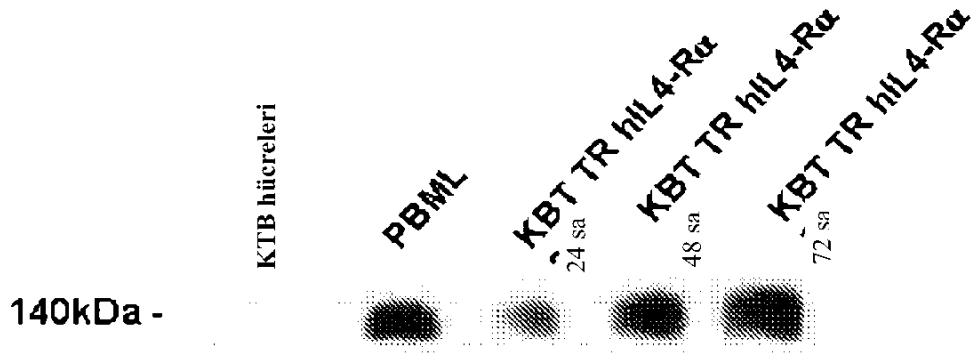
Şekil 34.



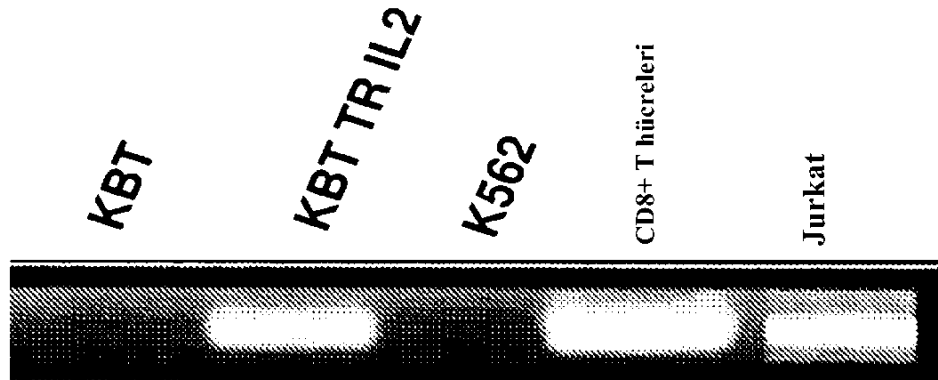
Şekil 35.



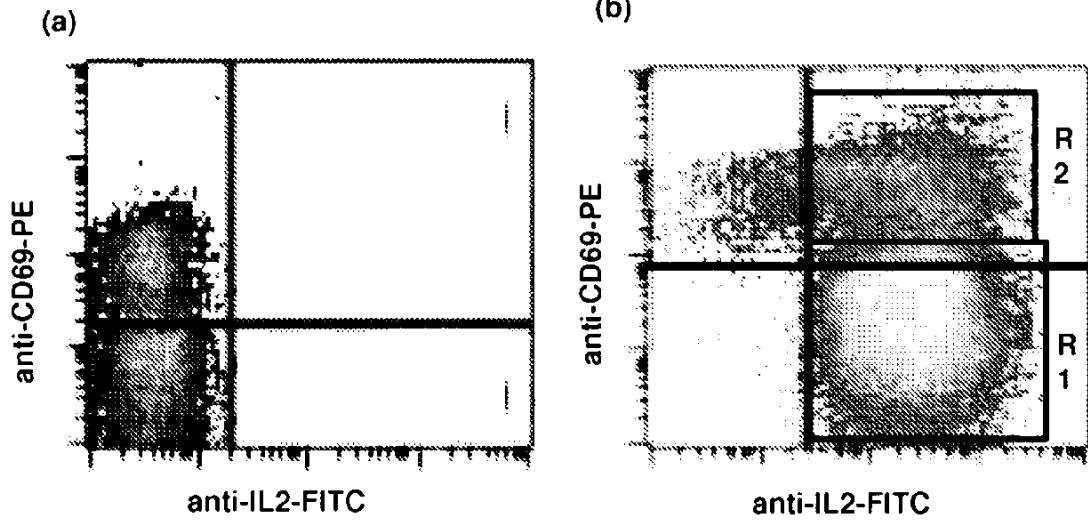
Şekil 36.



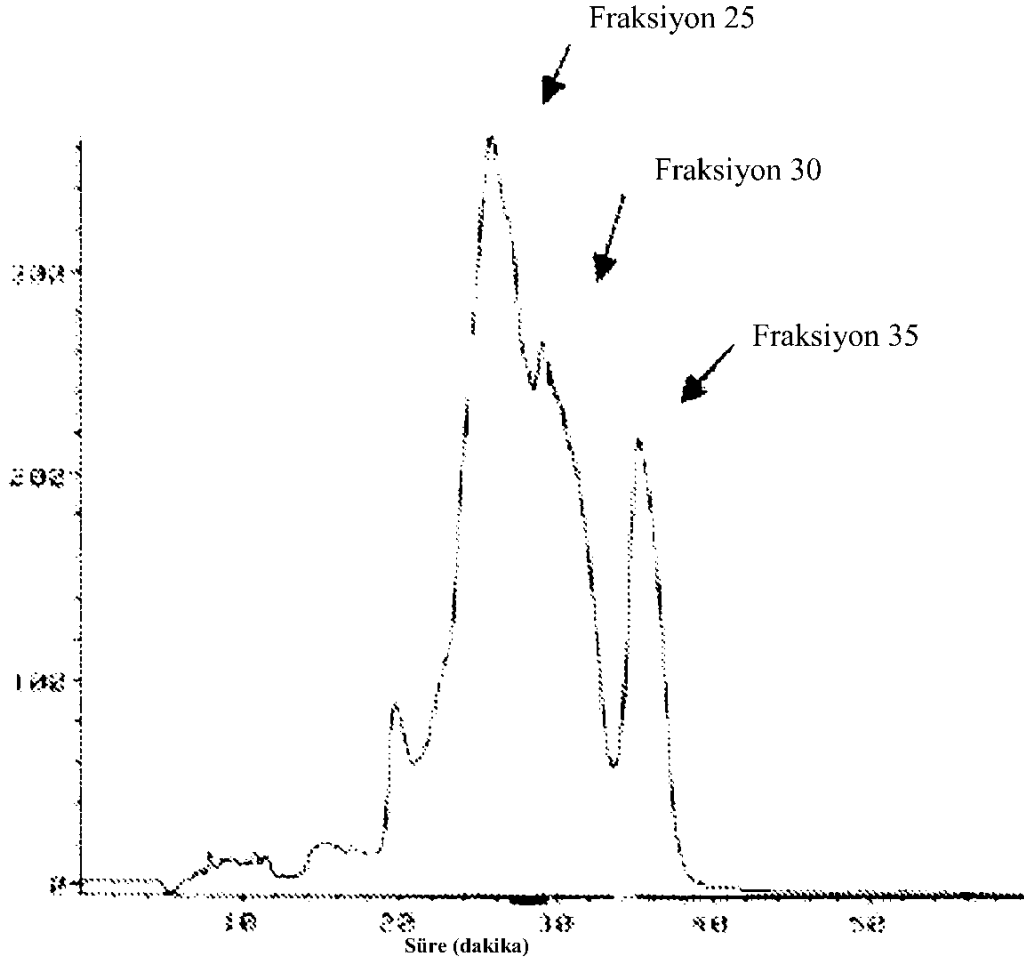
Şekil 37.



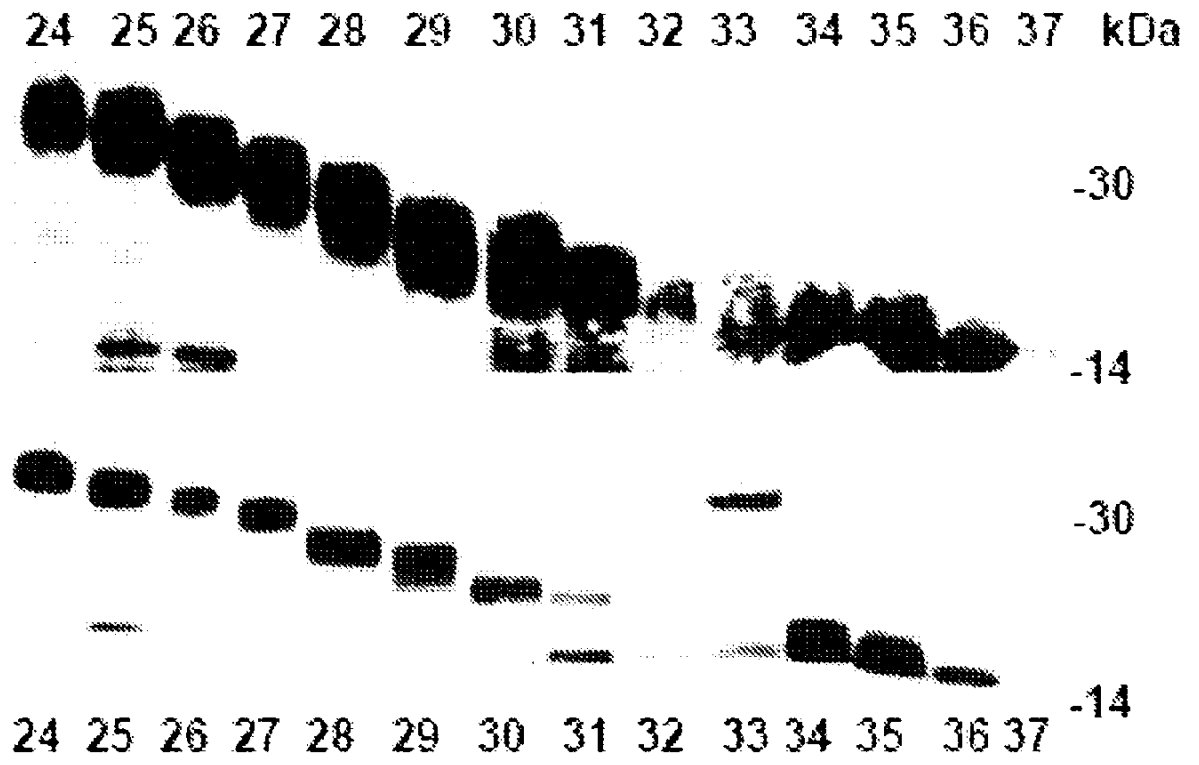
Şekil 38.



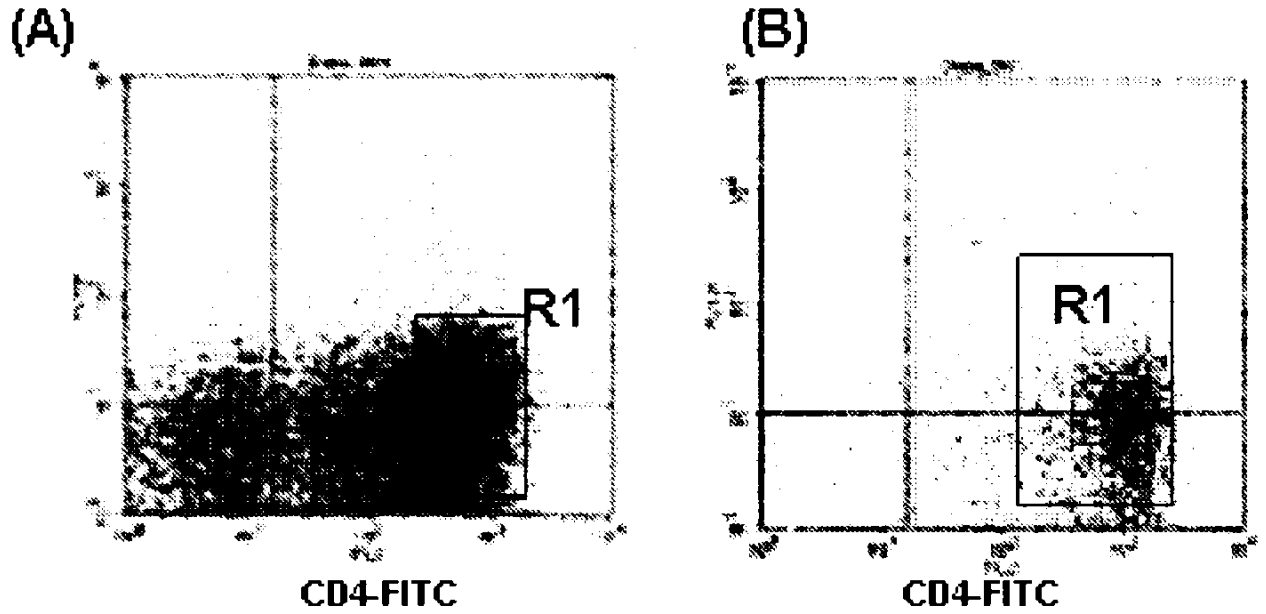
Şekil 39.



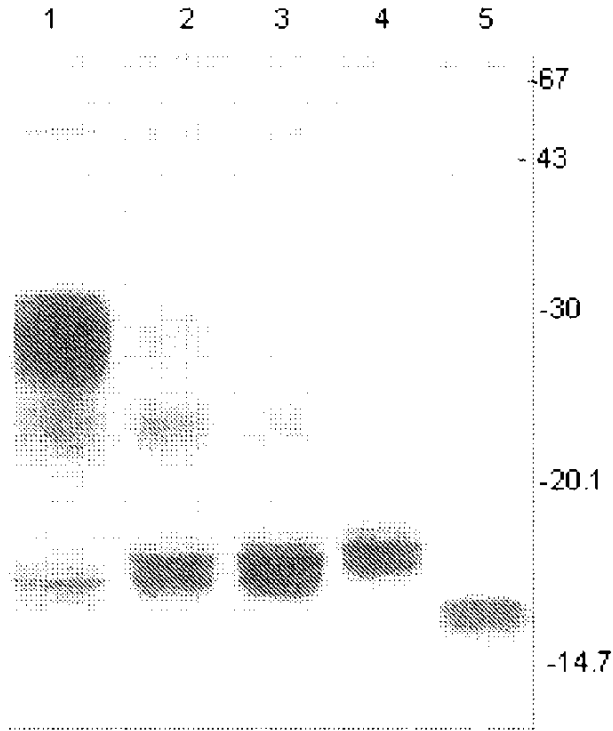
Şekil 40.



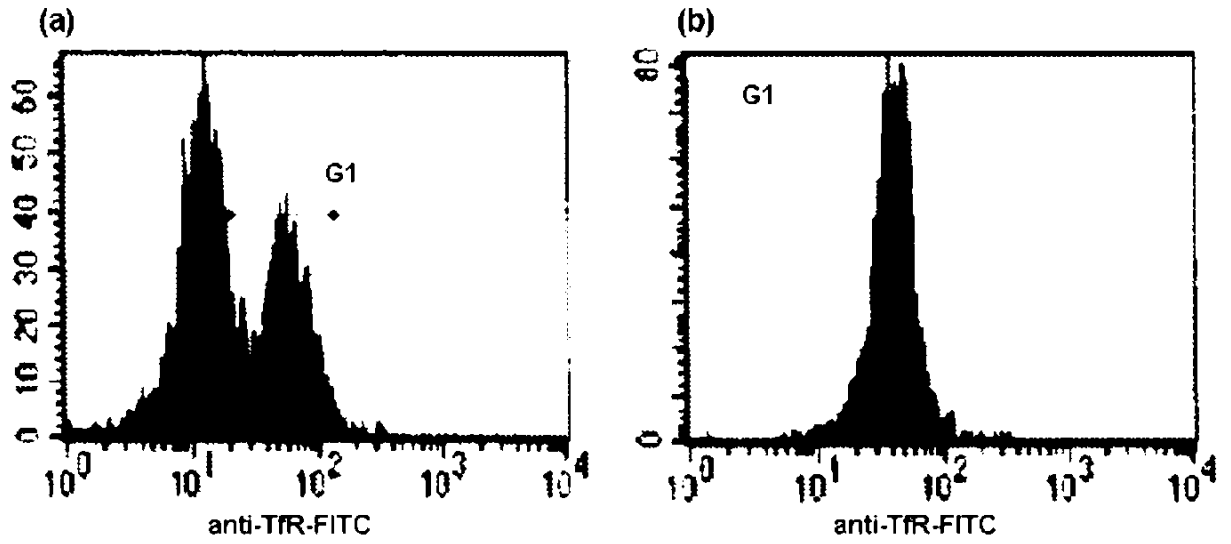
Şekil 41.



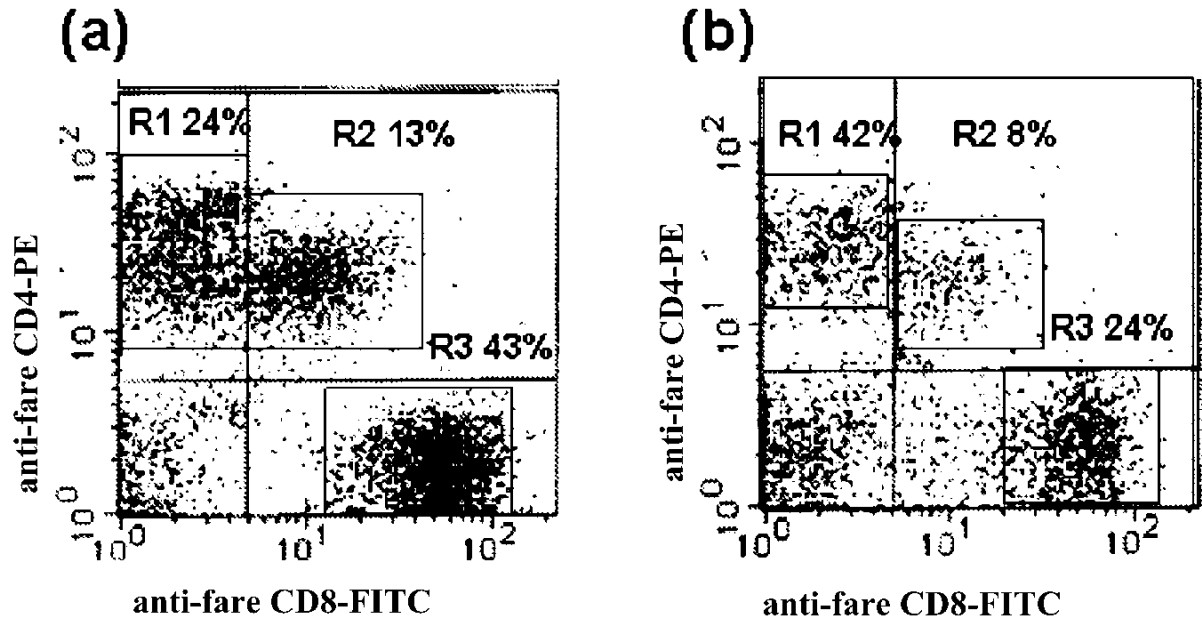
Şekil 42.



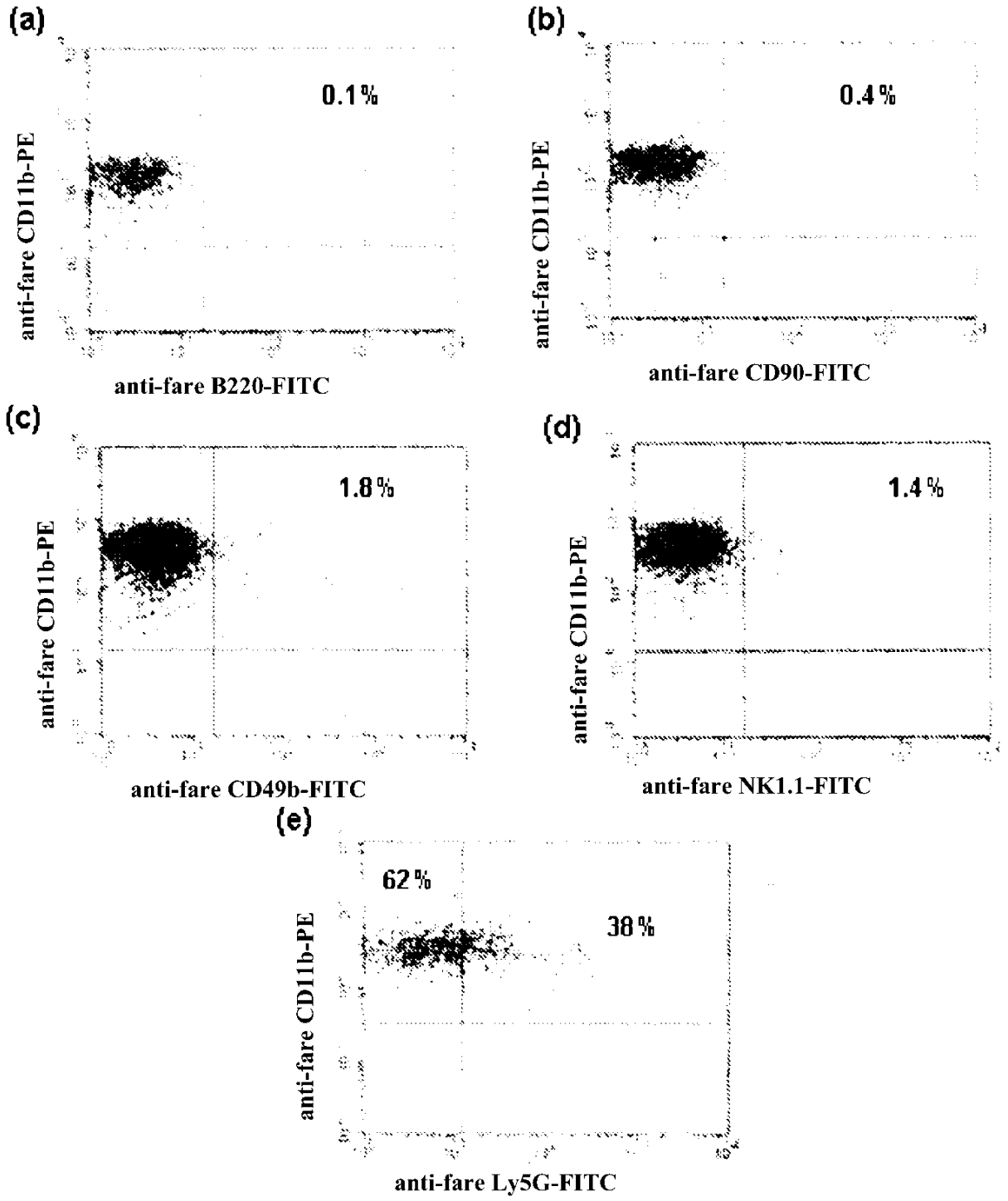
Şekil 43.



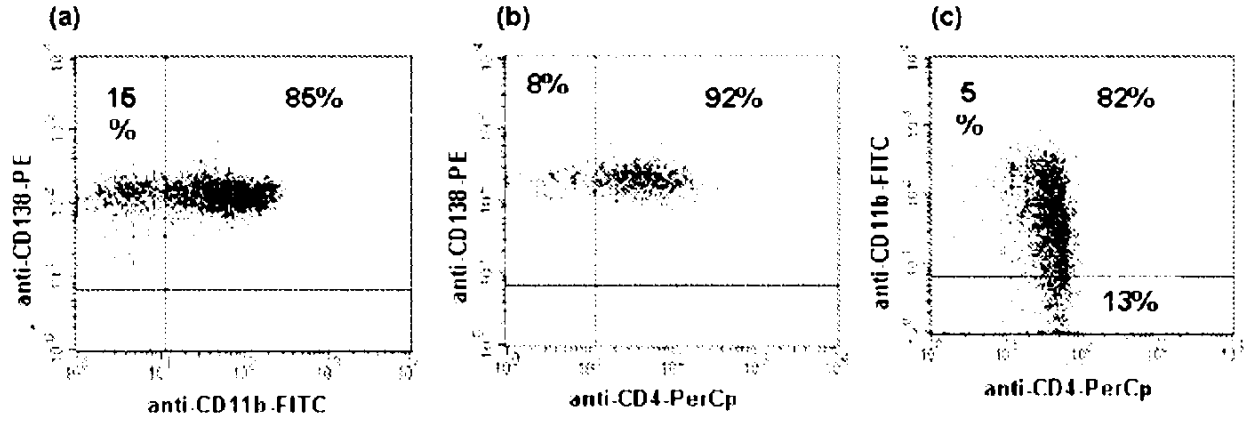
Şekil 44.



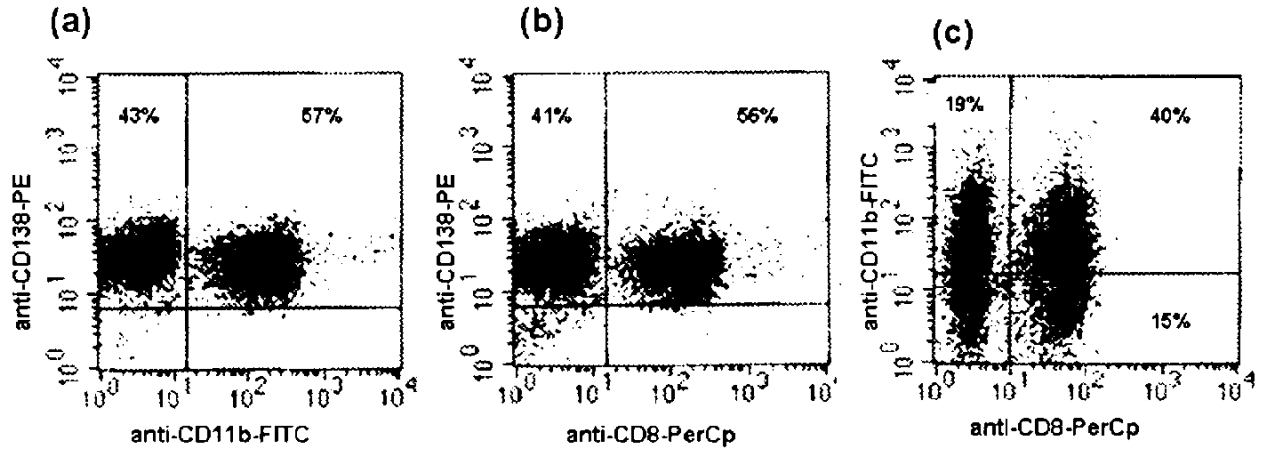
Şekil 45.



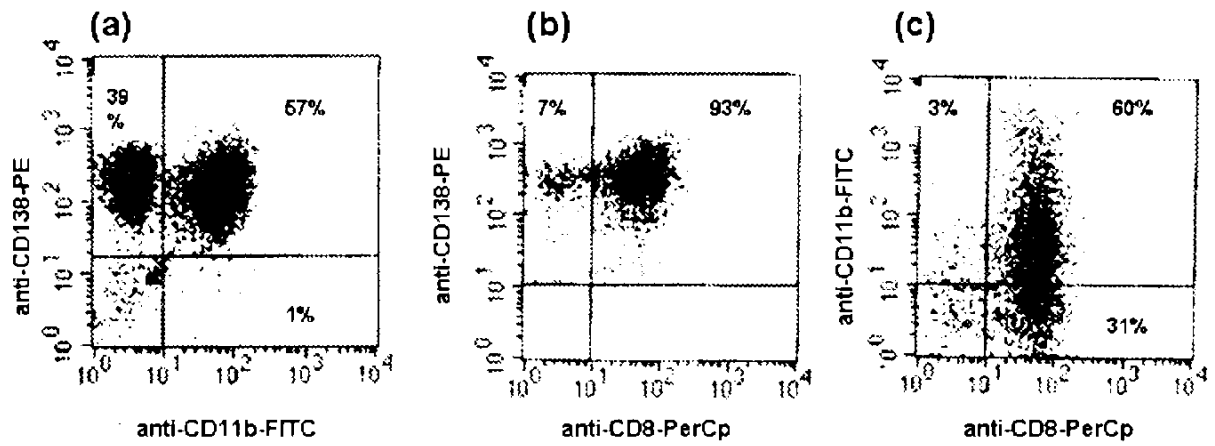
Şekil 46.



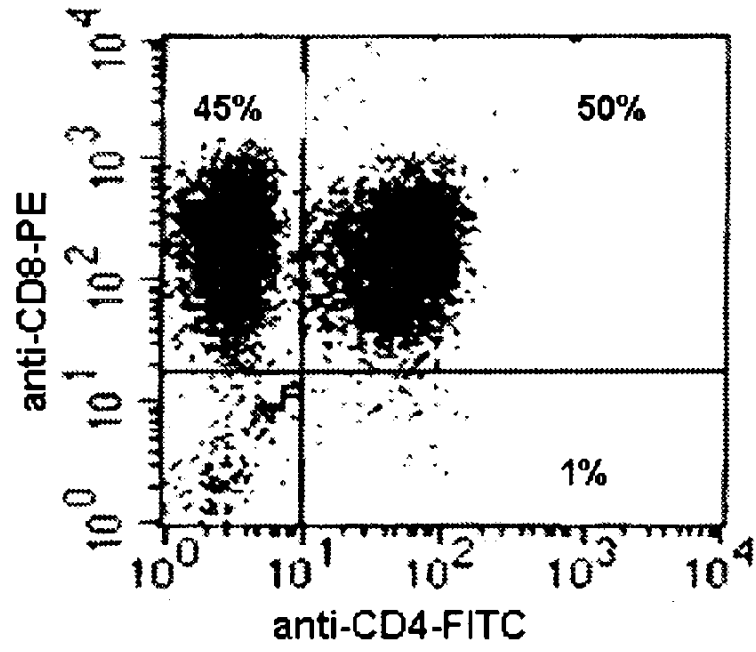
Şekil 47.



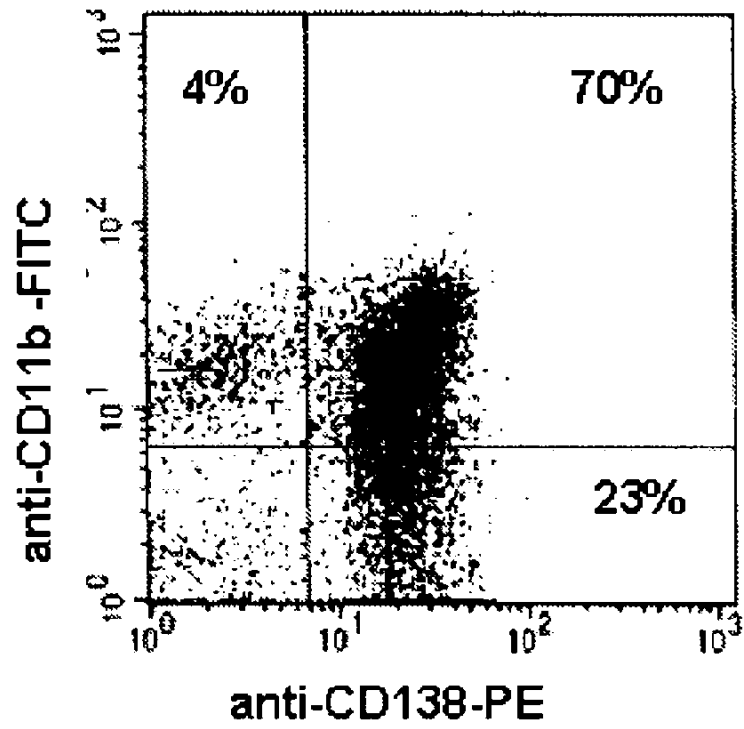
Şekil 48.



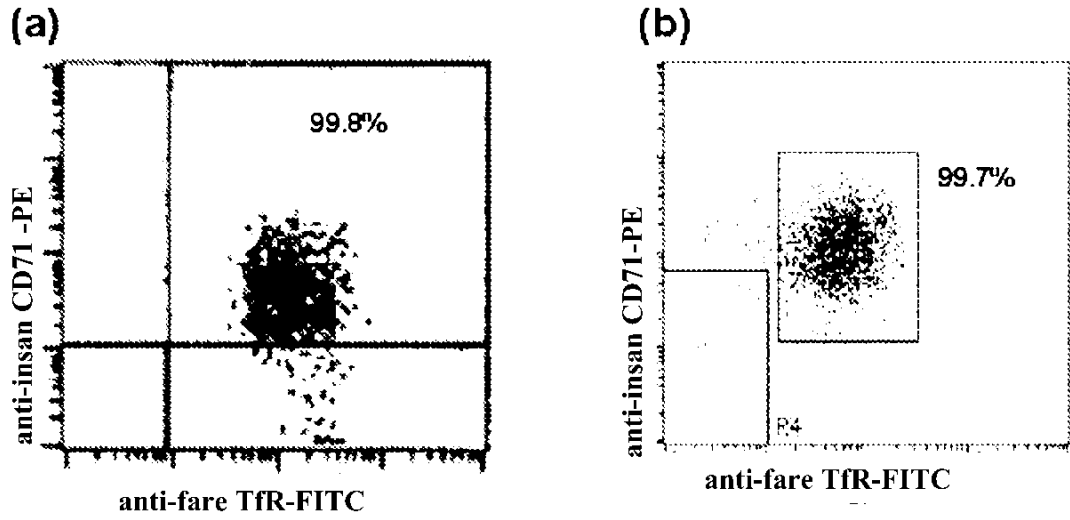
Şekil 49.



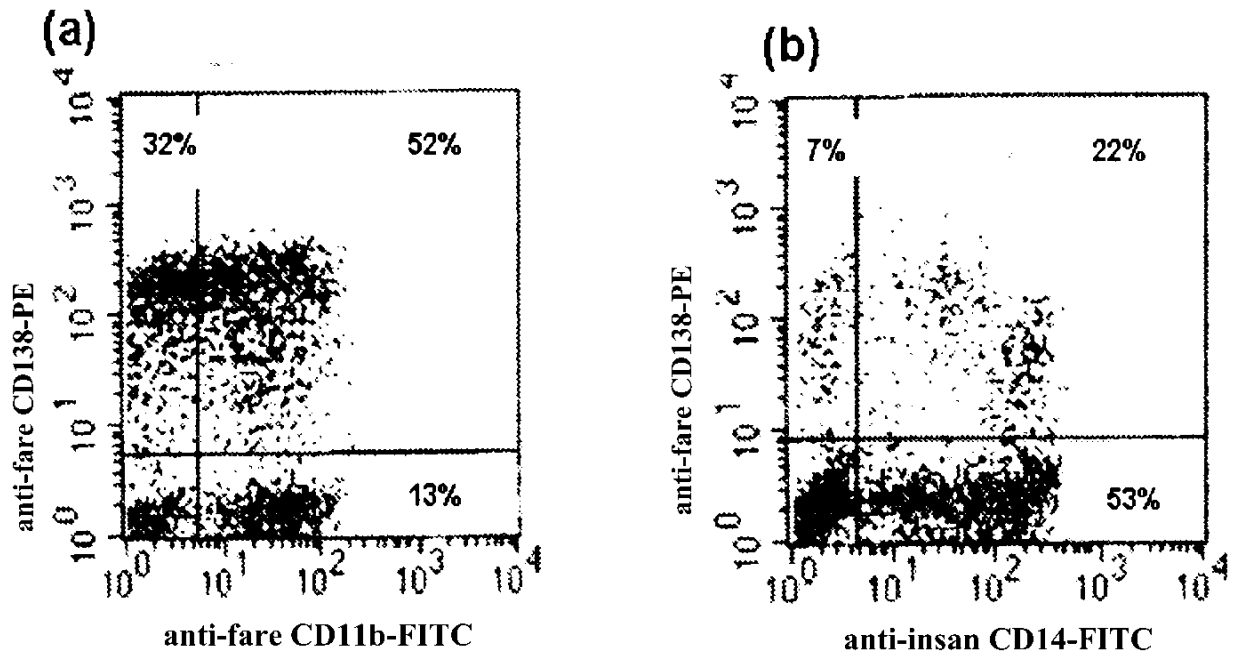
Şekil 50.



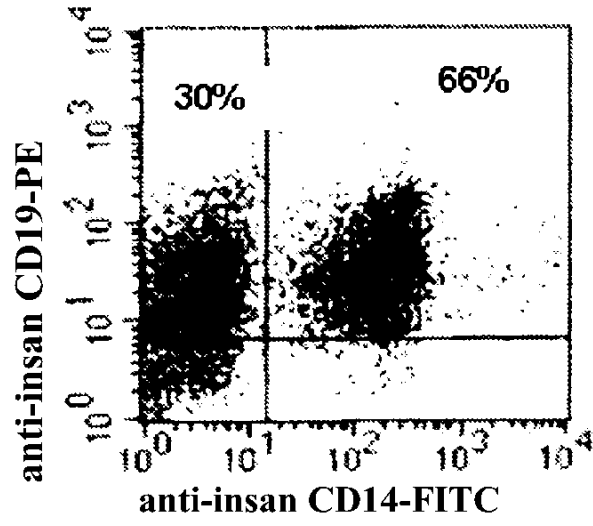
Şekil 51.



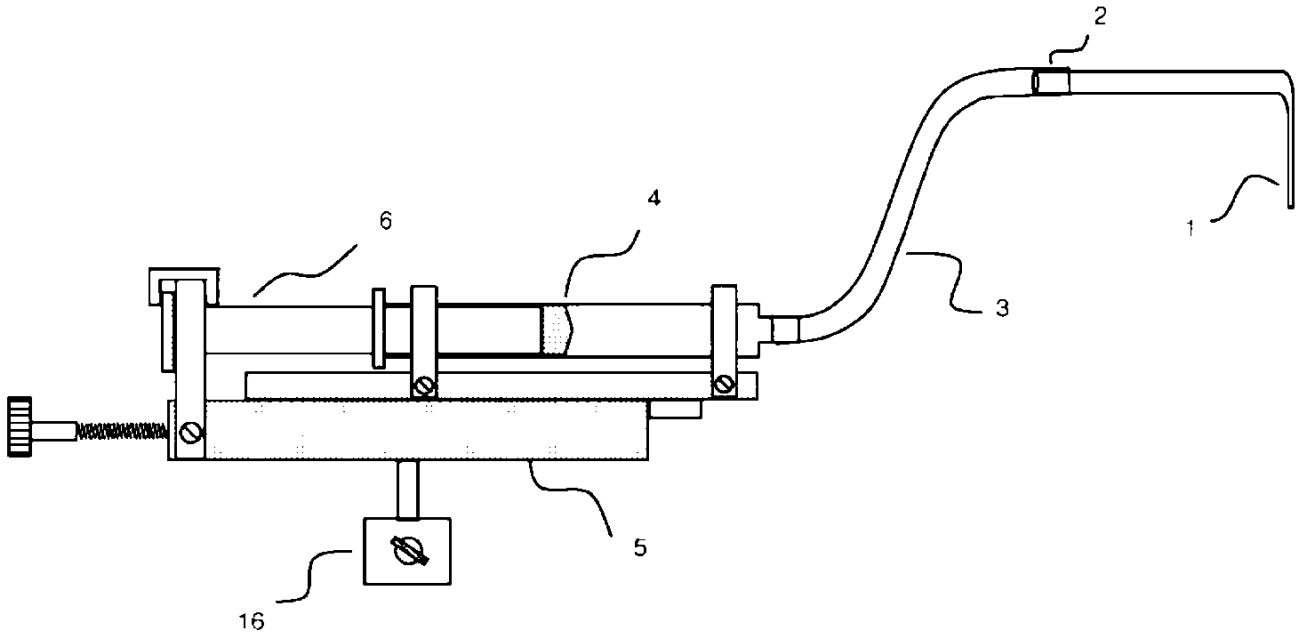
Şekil 52.



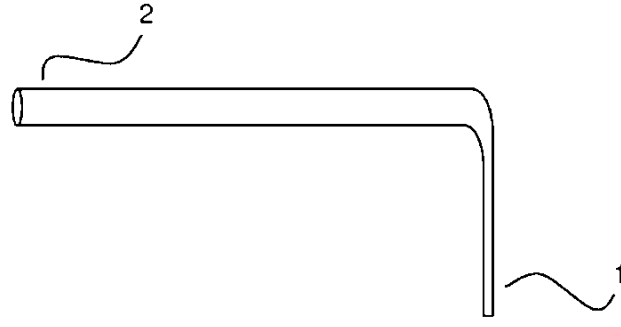
Şekil 53.



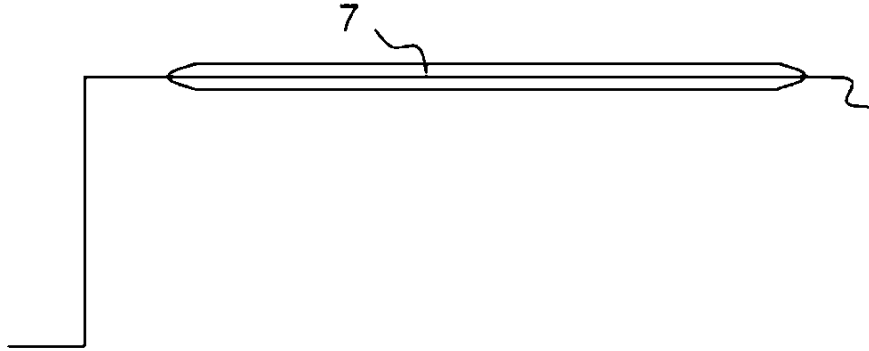
Şekil 54.



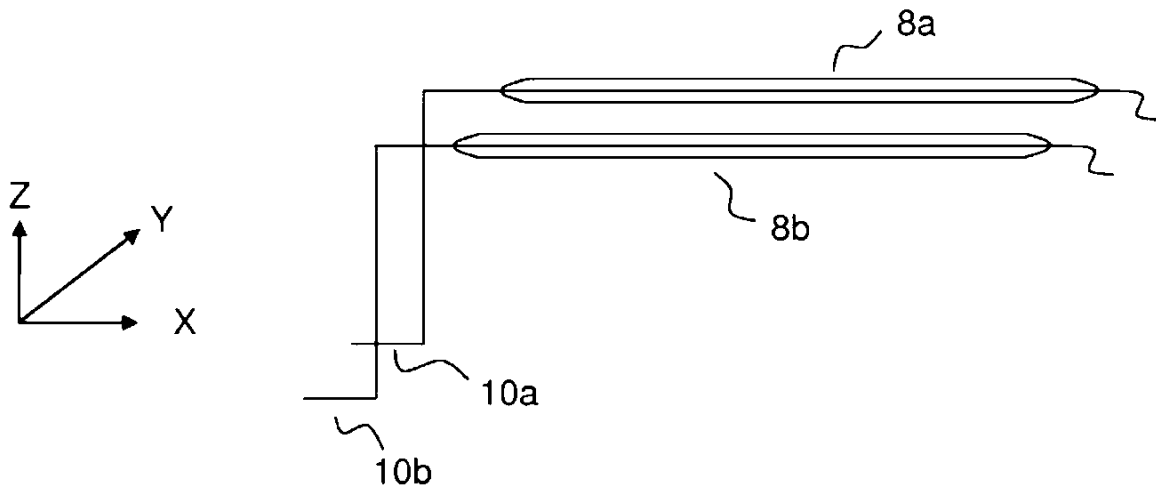
Şekil 55.



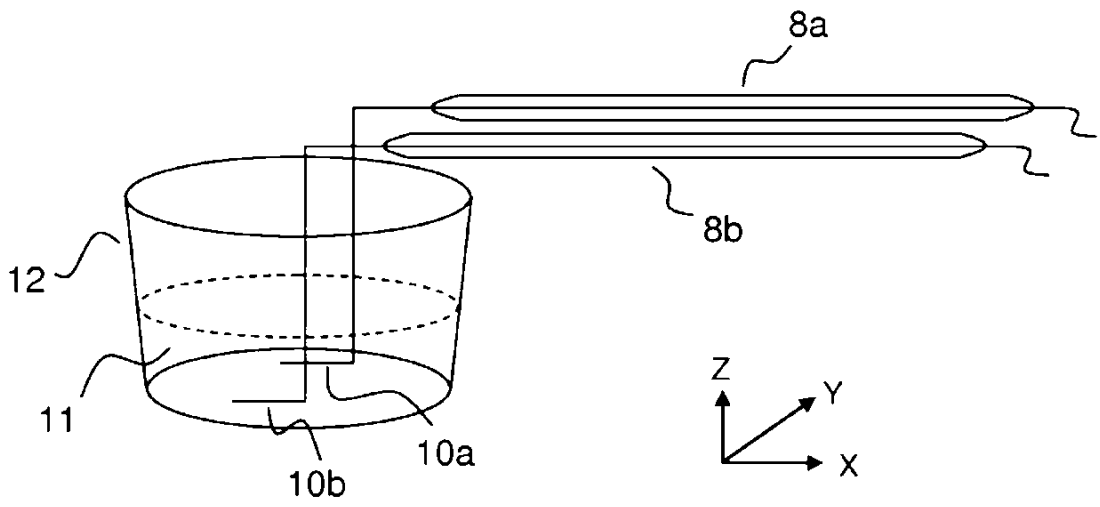
Şekil 56.



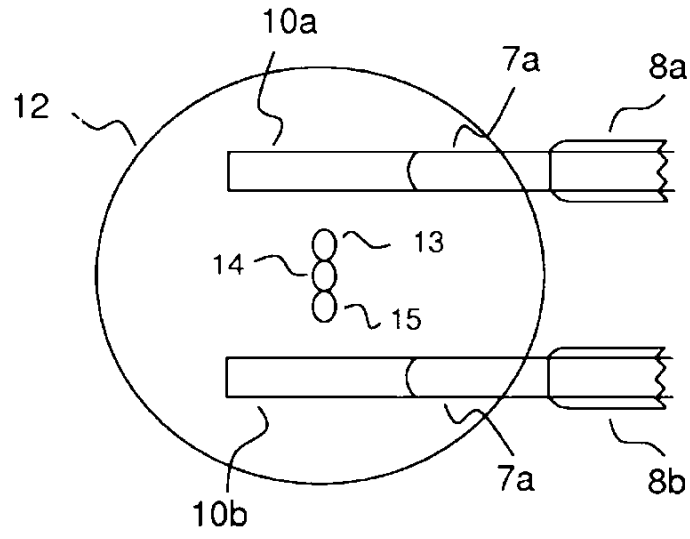
Şekil 57



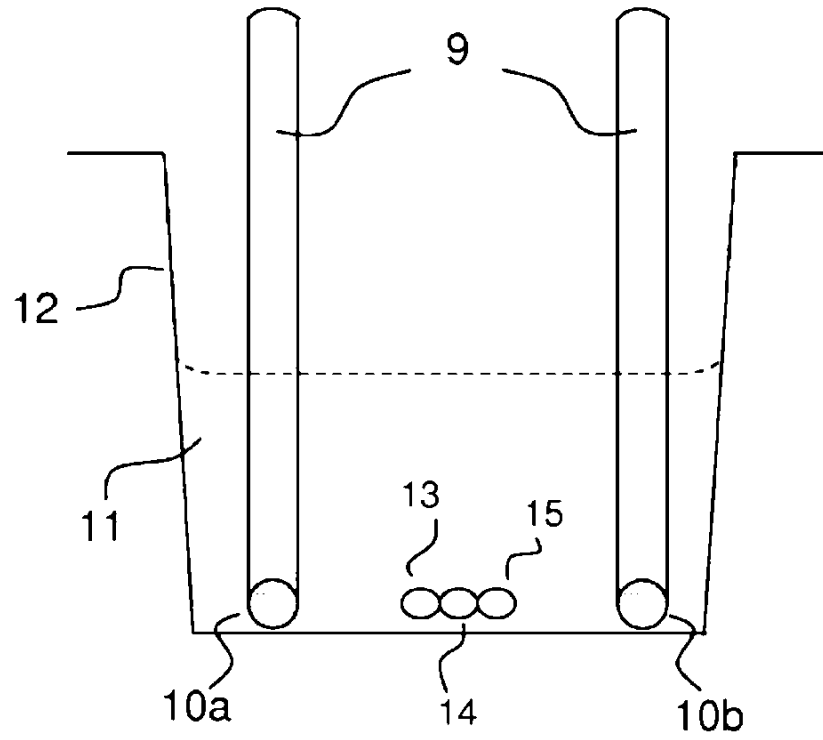
Şekil 58.



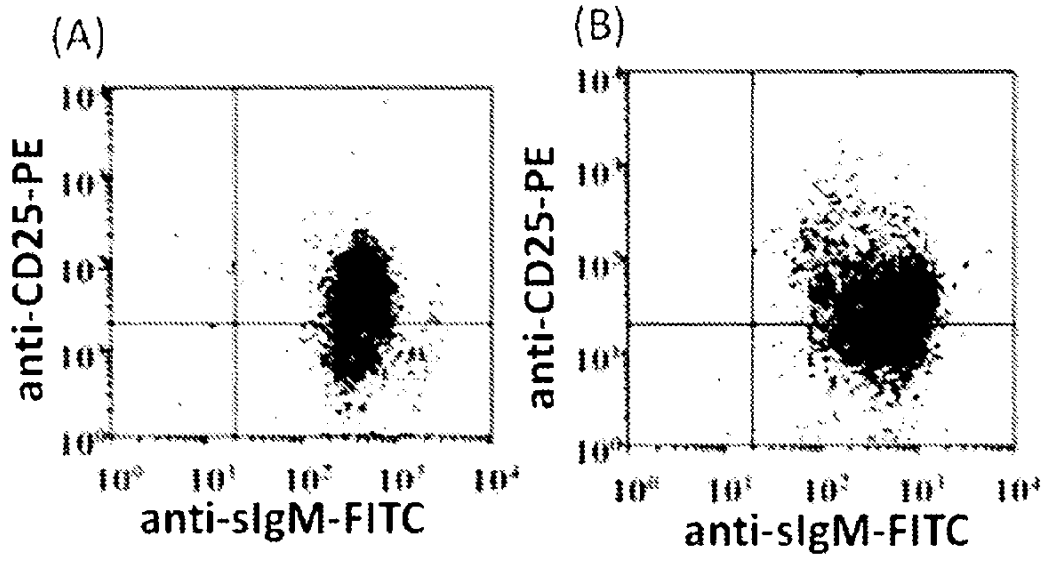
Şekil 59.



Şekil 60.



Şekil 61.



Şekil 62.