

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ
BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI
PROJE DETAY RAPORU

PROJE ADI: Nipah, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi ve Hanta Virüslerine Karşı Çoklu Epitop İçeren Yerli Aşı Geliştirme

TAKIM ADI: VACCIGENE

TAKIM ID: 58380

DANIŞMAN ADI: Dr. Özkan Fidan

FİKİR KATEGORİSİ

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Proje tek bir aşı ile Hanta, Nipah ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) virüslerini hedef almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, bu virüsler %50'lerden %75'lere varan ölüm oranlarına sahiplerdir [1, 2, 3]. Ayrıca Hanta ve KKKA virüsleri Türkiye'de yaygın olarak görülürken, Nipah virüsü dünya çapında pandemi riski yüksek olan virüsler listesindedir [4]. Virüslerin ölüm oranlarının yüksek olması, Türkiye'de ve dünyada görülme sıklığının ciddi olması ve bu virüslerin kesin aşı ve ilaçlarının olmaması nedeni ile proje için bu virüsler seçildi. Proje, potansiyel salgın ya da pandemi riski taşıyan bu virüslerin yol açtığı hastalıklara; düşük maliyetli, yüksek koruyuculuk sağlayan ve üç virüsü de hedef alacak şekilde çoklu epitop içeren protein bazlı yerli ve milli bir aşı geliştirmeyi amaçlamaktadır (Figür 1). Her virüsün çeşitli epitoplarını içeren iki farklı gen dizisi tasarlanacaktır. *In silico* ortamda denenen epitopların hepsi bağışıklık için en uygun olanlardır. Vücuda giren bu epitoplar, bağışıklık sistemi tarafından tanınacak ve olası bir virüs kapma durumunda bağışıklık hareketine geçecektir. İlave olarak tasarlanacak ikinci bir gen dizisi, aşının ikinci dozunu oluşturabilmesi ya da ilk doza ilave edilmesi hedeflenmektedir. Böylece, çeşitli epitoplar kullanıldığı için aşının bağışıklık tarafından tanınma ve antikor oluşturma ihtimali yani aşının koruyuculuğu yüksek oranda artacaktır. Aşı, hayvan ve insan deneylerinden başarıyla geçmesi halinde satışa hazır hale gelecektir. Vücuda kan ve dil altı yolları ile başarı oranına göre bir veya iki doz halinde verilmesi planlanmaktadır.

2. Problem/Sorun:

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, Nipah virüsü hem insandan insana hem de hayvandan insana bulaşma özelliğine sahiptir. Asemptomatik belirtiler gösterebilirken, ağır akut solunum yolu hastalıklarına ve beyin iltihabına neden olabilir. Bu nedenle, Nipah, %75 ölüm oranı ile DSÖ'nün öncelikli hastalıklar listesinde yerini almıştır. KKKA virüsü ise keneler aracılığıyla bulaşıp %88 oranında belirti göstermezken %40'lık bir ölüm oranına sahiptir. Ayrıca, ateş ve ağrı gibi bazı semptomlara da sebep olabilmektedir. Kemirgenler yoluyla bulaşma gösteren ve Pulmoner ve Hemorajik Renal Sendromu'na sebep olan Hantavirüsleri ise kusma, ağrı ve ateş gibi semptomlarla kendini göstermektedir. Buna ek olarak %50'ye varan ölüm oranıyla ülkemizde görülen riskli bir viral hastalıktır. Bu üç viral hastalığın herhangi bir tedavi yöntemleri ve aşıları olmadığı için insanlığı tehdit etmektedir. COVID-19 pandemisi, viral hastalıkların hem ciddi halk sağlığı sorunlarına sebep olduğunu hem de toplumları sosyal, eğitim ve ekonomik alanlarda olumsuz etkilediklerini ortaya koymuştur. Bu kapsamda, Nipah, KKKA ve Hanta virüsleri de potansiyel bir problem olarak çözüm beklemektedir [1, 2, 3].

3. Çözüm

Nipah, KKKA ve Hanta virüslerinin uygun epitopları birleştirilerek yapay bir gen dizisi elde edilecektir. Hanta virüsünün Türkiye'de en çok görülen varyantı (*strain*) da dahil olmak üzere [4] beş varyantına (Hantaan, Dobrava- Belgrade, Seoul, Gou virüs ve Amur) uygun ortak

epitoplar kullanılacaktır [5]. Kısaca; Nipah, KKKA ve Hanta (beş varyant) virüsleri için ikişer çeşit epitop kullanılacaktır. Kullanılacak epitopların her biri, *in silico* ortamda test edilerek seçilen en iyi epitoplardandır [5, 6, 7, 8]. Bu epitoplar MHC-I, MHC-II, B ve T hücre reseptörleri ile son derece uyumlu epitoplardır. Epitopların arasına uygun "linker" dediğimiz bağlantı fragmantları eklenecektir (EAAAK ve GGGGS). Ek olarak, bağışıklık sistemini harekete geçirme [9] ve hücreye epitopları tanıtmaya [10] konusunda önemli rolleri olan adjuvanlar ile gen dizisi desteklenecektir (CxTB ve LT-IIc) (Figür 1). Daha sonra, gen dizisinden elde edilen protein biyoinformatik araçlar kullanılarak yarı ömür, hidropatikliğin genel ortalaması (GRAVY), alifatik indeksi ve kararsızlık indeksi gibi değerler açısından ExPasy ve Swiss Prot araçlarıyla test edilecektir [11]. Aynı şekilde ikinci bir gen dizisi daha hazırlanacak ve bu dizi aynı virüslerin farklı ve etkili diğer epitoplarını içerecektir. Oluştururken herhangi bir sorun olmaması adına bu özel gen dizileri şirketlerden sipariş edilecektir. Elde edilen genler, uygun restriksiyon enzimleri ile kesilecek ve ardından aynı enzimler sayesinde pET-28b [12] adlı ekspresyon vektörüne klonlanacaktır. Klonlanan bu vektör, protein ekspresyonu için *Escherichia coli* BL21(DE3) bakterisine elektroporasyon yöntemi ile aktarılacaktır. Daha sonra, bu bakteriler uygun ortamda çoğaltılacaktır. Ekspres edilen proteinler, bakterilerden izole edilecektir. Ardından SDS-PAGE deneyi ve Western blot analizi ile proteinlerin bazı özellikleri test edilecektir [13]. Bu analizlerden sonra proteinlere, uygun dengeleyiciler (stabilizer) eklenerek tam anlamıyla bir aşı elde edilmiş olacaktır. Ardından, aşı güç testine tabi tutulduktan sonra hayvan deneyleri için kullanıma hazır hale getirilecektir. Hayvan deneyleri için Erciyes Üniversitesi Aşı Araştırma ve Geliştirme Merkezi gibi alanında uzman kurumlarla anlaşılacaktır. Aşı, bu deneyleri başarı ile geçtiğinde klinik denemeler için Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB)'na başvuru yapılacaktır daha sonra şişeleme için alanında uzman ilaç firmaları ile anlaşılacaktır. En son adım olarak da insan deneyleri, faz 1, 2 ve 3 aşamaları için genç ve orta yaşta sağlıklı insanlar seçilecektir. Kullanımı için herhangi bir sorun görülmediği takdirde bu aşılar 60 yaş üstü, kronik hastalığı olanlar ve alerjisi olan insanlar üzerinde denenecektir. Olumlu sonuçlar alındığı takdirde aşı halkın kullanımına açılacaktır. Aşı, insanlara kan yoluyla ya da dil altına sıvı formda verilecektir. Elde edilen iki farklı protein aynı miktarda karıştırılarak bir şişede toplanacaktır ya da ikinci diziyi içeren aşı ayrı bir doz olarak hastaya verilecektir (Figür 2).

4. Yöntem

01. Yapay çoklu-epitop genin tasarımı ve testi

Nipah, KKKA ve Hanta virüslerinin aşı üretimine en uygun epitoplarını bulmak için makale taraması yapılmıştır. Makaleler, *in silico* ortamda toksisite, etkinlik, guanin-sitozin (GC) içeriği, antijenite, hidrofobiklik (%), alerjenite, nüfus kapsamı (%), çözünürlük gibi değerler açısından her bir potansiyel epitopu test etmişlerdir. Aralarından bağışıklık tarafından tanınabilecek ve bağışıklığı harekete geçirebilecek seviyede olan epitoplar seçilmiş ve makalelerde bunlar açıkça belirtildi. Belirtilen ve özenle seçilen bu epitoplar arasından projenin amacına uygun olanlar seçildi. Bu epitop dizilerinin başına ve sonuna bağışıklık sistemini tetikleyici adjuvanlar eklendi (Figür 1) (CxTB ve LT-IIc). Bu adjuvanlar sayesinde aşının

bağışıklık tarafından bulunma şansı artacaktır. Bu epitoplar ve adjuvanların arasına “linker” dediğimiz protein kodlamayan bağlantı fragmantları eklendi (EAAAK ve GGGGS). Bu fragmantlar sayesinde eklenen epitoplar birbirine bağlanacak ve belirli bir uzaklık sağlayarak proteinlerin birbirine temasını en aza indirecektir. Epitopların birleşmesi sonucunda oluşan proteinin pH, yarı ömür, hidropatikliğin genel ortalaması (GRAVY), alifatik indeksi ve kararsızlık indeksi gibi özellikleri Expasy ProtParam ve Swiss Prot biyoinformatik araçlarla test edilmiştir. Elde edilen verilen; pH değeri 8.18, memeli vücudunda (in vitro) yarı ömür 30 saat, GRAVY değeri -0.071, kararsızlık indeksi 33.35, alifatik indeksi 86.08 şeklindedir ve protein kararlı haldedir. Bu değerler bir proteinin aşı yapımı için uygun olduğunu göstermektedir. Epitop dizimizin iki ucuna restriksiyon enzimleri XhoI (3’ yönü) ve NheI (5’ yönü) eklenir. Swiss Model ile proteinin kuarterner yapısı modellenir (Figür 3). Son olarak, proteini saflaştırmak için kullanılacak olan nikel afinite kromatografi metodu için proteini sentezleyecek olan vektördeki DNA’ya histidin etiketi eklenir.

02. Yapay genin transformasyonu ve ekspresyonu

Hazırlayıp sipariş edilen gen, temin edilecek pET-28b ekspresyon vektörüne XhoI ve NheI restriksiyon enzimleri kullanılarak klonlanır. Genimizi içeren plazmitin, *Escherichia coli* BL21(DE3) bakterisine transformasyonu elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirilir. Besin yönünden zengin, sıkça kullanılan ve kanamisin içeren LB agarda 37°C’de bir gün boyunca bakterilerin inkübasyonu gerçekleştirilir. Daha sonra, transformasyonu tamamlanmış koloninin kanamisin içeren LB besiyerine inokülasyonu gerçekleştirilir ve bakteriler 37°C’de inkübe edilir. Bu inkübasyondan sonra, bakteriler %1 konsantrasyon oranıyla taze besiyerine alınır ve kültür ortamında OD600 değeri 0.5-0.6 değerlerine ulaşmaya kadar büyütülür. Bakteriler bu değere ulaştıktan sonra indükleme metodu uygulanır. Bunun için, bakterilere aktardığımız genin ekspresyonunu indüklemek amacıyla besiyerine izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG), son konsantrasyon 1 mM olacak miktarda eklenir. İnkübasyondan bir gün sonra, bakteriler santrifüj yöntemi ile pellet olarak elde edilir. Elde edilen pelletin SDS (sodyum dodesil sülfat)-jel loading buffer ile tekrardan süspansiyonu yapılır ve bu solüsyon 100°C’de 3 dakika boyunca ısıtılır. Isıtma işleminden sonra solüsyona bir dakikalık maksimum hızda santrifüj işlemi uygulanır. Daha sonra, oda sıcaklığına getirilen pellet %15’lik SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel) ile analiz edilir ve sonuçlara göre proteinin 39 kDa olduğu doğrulanmış olur [13, 14].

03. Proteinin Western blot analizi

SDS-PAGE deneyinden sonra proteinlerin varlığı tespit edilir ve sırada Western blot yöntemi ile istediğimiz proteinin antikorlar sayesinde analizi doğrulanması var. Her bir virüs antikoru için ayrı membran hazırlamak gerekeceği için toplamda 3 membran üzerinden deney yürütülür. Poliviniliden florür (PVDF) membranları, metanolde bir dakika beklettikten sonra distile suda membranlar yıkanır ve sonra transfer buffer içerisine yerleştirilir, membranlar kullanılabildiği kadar orada bekletirler. Ortalama 39 kDa’luk bir protein elde etmeyi beklediğimiz için yarı-kuru transfer gerçekleştirilir. SDS-PAGE jelde elde edilen işaretleyici (marker) ile proteinler, hazırlanan PVDF membrana yarı-kuru transfer sistemi kullanılarak aktarılır. Transferden sonra membranlar, PBS-T içinde %1 yağsız kuru süt ile 37°C’de 1 saat süreyle bloke edilir. Daha sonra birincil antikor seçimi sırasında Hanta, Nipah ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

virüslerinin birincil antikorları kullanılır. Her membran için farklı bir virüs antikorunu kullanılır ve üç membran da bir gece antikorlarla inkübe edilir. Daha sonra bağlanmamış antikorların yıkanıp atılması için TBS ile 30 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde bekletilir. Bu işlem üç defa tekrar edilir. İkincil antikorların uygulanması sırasına geldiğimizde 1 saat boyunca 37°C’de uygulama gerçekleştirilir. Bağlanmamış ikincil antikorların yıkanıp atılması için yine membranlar TBS içinde 30 dakika boyunca bekletilir. İşlem üç defa tekrar edilir. Membranların görüntülenmesi için membranlar üzerine ECL (gelişmiş kemilüminesans) dökülür ve 5 dakika boyunca karanlıkta bekletildikten sonra kemilüminesans ya da kolorimetrik ile görüntüleme yapılır [13].

04. Proteinin hazırlanması

Western blot analizinde istenen proteinin varlığı tespit edildikten sonra sırada, kalan bakterilerden proteinin toplanması ve hazırlanması var. Rekombinant proteini elde etmek için bakteri hücreleri hasat edilir ve 6000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Daha sonra, hücrelerin ayrılan pellet kısmı PBS (Fosfat Tampon Salin) ile yıkanır. Pellet yıkandıktan sonra lizozim, TritonX ve Tris-HCl içeren liziz buffer ile tekrar süspanse edilir. Süspansiyondan sonra, hücreler 15 dakika boyunca 30°C’de inkübe edilir. Daha sonra, sonikasyon ile hücreler parçalanır ve 10,000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüjden elde edilen pellet, 3 M üre içeren 1 mM NaCl, %0,5 TritonX-100 ve %2 sodyum deoksikolat ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra, pellet 8 M üre içeren 2 mM EDTA, 5 mM β -Merkaptoetanol ve 50 mM Tris-HCl ile süspanse edilir. Elde edilen süspansiyon 3000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj ile elde edilen süpernatantta bulunan histidin etiketli rekombinant proteinleri saflaştırıp elde etmek amacıyla, süpernatantın Ni²⁺-NTA (nikel-nitrilotriasetik asit) agaroz metal küreler (bead) ile 4°C’de 1 saat boyunca inkübasyonu gerçekleştirilir. Ardından, süpernatant 1060 g’de 1 dakika boyunca santrifüj edilir. Metal kürelere bağlanan proteinler liziz buffer ve 10 mM imidazol içeren yıkama buffer ile onar dakikalık inkübasyon arasıyla üçer defa yıkanır. Yıkama işleminden sonra, proteinler 4°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilir. Daha sonra, proteinlerin liziz buffer ve 500 mM imidazol içeren elüsyon buffer ile proteinlerin metal kürelerden ayrıştırılma işlemi gerçekleştirilir. Nikel afinite kromatografisi işleminden sonra, ayrıştırılan proteine 50 mM sodyum asetat buffer solüsyonunun içinde 48 saatlik bir diyaliz işlemi uygulanır. Ardından, proteinin katyon değiştirici kolona aktarılması ile rekombinant proteini elde etmek için son saflaştırma işlemi uygulanmış olur. Bu adımların ardından elde ettiğimiz protein SDS-PAGE ile analiz edilir ve uzun süre korunması amacıyla -20°C’de %25-50 (w/v) gliserol ya da etilen glikol içeren solüsyonda saklanır [13, 15].

05. Proteinin, KKKA, Nipah ve Hanta Virüsünün aşı immünojeni olarak etkinliğinin ölçülmesi

05.a. In vitro güç testi (potency test)

Etkinlik testi ile klinik etkinlik arasındaki korelasyon, aşı kullanımının temelini oluşturur. Alternatif yöntemler arasında deneysel hayvan ikamesi ve serolojik ikame yer alır. İlk yöntem, orijinal kullanıcılar yerine benzer klinik semptomları olan hayvanları kullanmak ve bu hayvan aşısının etkinliğini dolaylı olarak test etmektir. Serolojik yöntemde ise aşının etkinliği,

aşılardan sonra antikor titre düzeyi saptanarak değerlendirilir. Bu yöntem, virüsleri nötralize etme deneylerini ve ELISA'nın her türünü içerir. Aşının gücünün test ederken doğrudan ELISA (Enzim bağlı immünosorbent deneyi), dolaylı ELISA, doğrudan sandviç ELISA, dolaylı sandviç ELISA teknikleri uygulanabilir. Bu test için öncelikle üç virüs için de monoklonal antikor (MAb) satın alıp alınamayacağına bakılır eğer imkân dahilinde değilse bu antikorları laboratuvar ortamında üretilir. Bunun için üç hamster her birine farklı bir virüs düşecek şekilde üç virüsle enfekte edilir. Hamsterların asit sıvısından monoklonal antikor (MAb) elde edilir ve afinite kromatografisi ile saflaştırılır. Daha sonra sandviç ELISA metodu kullanılır. Bir plakanın 96 oyuğunun her birine karbonat-bikarbonat tamponu ile seyreltilmiş 0.1 ml MAb (0.9 ug/oyuk) ilave edilir. 37°C'de 18 saat inkübasyondan sonra, plaka PBS ile yıkanır ve bir bloke edici solüsyon ilave edilir. İnkübasyondan sonra plaka, %0.05 Tween-20 (PBS-Tween) ile takviye edilmiş PBS ile yıkanır. Virüslerin seri iki kat seyreltmeleri iki kopya halinde (0.1 ml/kuyucuk) yapılır. Plaka inkübe edilir ve ardından yıkanır. Bağlı virüs epitopları, 0.1 ml peroksidaz-konjuge MAb'nin eklenmesiyle saptanır. İnkübasyondan sonra fazla konjugat yıkanarak uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu daha sonra her bir kuyucuğa ilave edilir. Oda sıcaklığında 30 dakika beklettikten sonra 5 N H₂SO₄ solüsyonu eklenir ve 492 nm ve 630 nm'de optik yoğunluk (OD) bir SJ otomatik okuyucu ile ölçülür. ELISA titre, (Virüs içeren reaksiyonlarındaki ortalama OD değerleri) — (kontrol reaksiyonlarındaki ortalama OD değerleri) olarak ifade edilir. Bu işlemlerin hepsi üç virüse ayrı ayrı uygulanır [16].

05.b. Hayvan aşılama ve deneyleri

Hanta ve Nipah virüsleri için ortak olan denek hayvanı Syrian hamster iken KKKA için STAT-1 sinyal yolağı eksik olan bir fare modeli uygundur. KKKA Syrian hamsterları enfekte edemese de canlıda antikor oluşmasını sağlar. Bu yüzden de ilk hayvan deneyleri için Syrian hamster ortak model olarak kullanılabilir. Syrian hamsterlar üç farklı gruba ayrılır ve deneyin 0. ve 14. gününde Grup 1'de bulunan hamsterların her birine 1.0 ml aşı enjekte edilir. Grup 2'deki hamsterlara ise sadece adjuvanlar enjekte edilir. Grup 3 ise kontrol grubu olur ve herhangi bir tedavi almazlar. Hayvanların her birinden enjeksiyondan önce ve sonra düzenli aralıklarla kan örneği alınır ve ELISA testine maruz bırakılır. Böylece antikor varlığı tespit edilir. Hayvan deneylerine geçildiği zaman, aşılanmış hamsterlar yaklaşık 0.1 ml'lik toplamda 0.3 ml'lik üç virüsü de içeren solüsyonlar ile enfekte edilir. 7 gün boyunca canlılar klinik işaretler ve ölüm oranı açısından günlük olarak incelenir. Mevcut aşılarla, hayatta kalma oranı test grubunda %70'i geçmeli ve kontrol grubunda %20'den az olmalıdır [13].

06. Klinik çalışmalar

Klinik çalışmalar üç aşamalı bir süreçtir. Faz I sırasında, küçük gruplara deneme aşısı yapılır. Faz II' de klinik çalışma genişletilir ve aşı, amaçlanan kişilerle benzer özelliklere (yaş ve fiziksel sağlık gibi) sahip kişilere verilir. Faz III' te aşı binlerce kişiye verilir ve etkinlik ve güvenlik açısından test edilir. Faz I çalışması, sağlıklı insanlarda güvenliğini değerlendirmek için aşı adayının tanıtılmasından oluşur. Bir aşının faz I deneyinde her aday aşı ile ya da bir kontrol grubuyla- tipik olarak plasebo grubu- deneye tabi tutulur. Birincil gözlem, güvenliğin (olumsuz bir olayın yokluğu) tespiti ve bir bağışıklık tepkisinin kanıtı içindir. Aşının veya plasebonun uygulanmasından sonra, antikor üretimi, sağlık sonuçları (hedeflenen enfeksiyon veya başka

bir enfeksiyondan kaynaklanan hastalık gibi) hakkında veri toplanır. Deneme protokolünü takiben, tedavi ve kontrol grupları arasında sonuçlarda gözlemlenen farklılıkların istatistiksel önemini ölçmek için belirtilen istatistiksel test yapılır. Aşının yan etkileri de not edilir ve bunlar, aday aşının Faz II denemesine geçip geçmeyeceğine dair verilen karara katkıda bulunur. Faz II' ye geçiş, küçük bir sağlıklı gönüllü kohortunda Faz I' den elde edilen immünojenik ve toksisite sonuçlarına dayanır. Faz II, daha çeşitli insan gruplarındaki reaksiyonları belirlemek ve farklı programları test etmek için aşı hedef popülasyonunda (~ yüzlerce insan) daha sağlıklı gönüllülerden oluşur. Benzer şekilde, Faz III denemeleri, toksisiteyi, immünojenisiteyi ve doz denemelerini çok daha büyük bir ölçekte izlemeye devam eder. Aşı, onaya ve ardından genel üretime sunulmadan önce doğal hastalık koşullarında güvenli ve etkili olduğu gösterilmelidir. [17, 18].

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Bahsi geçen virüsler için tedaviyi destekleyici bazı ilaçlar bulunmaktadır, fakat hiçbir virüsün resmi bir aşısı bulunmamaktadır. Projede, üç virüse aynı anda aşı geliştirmek hedeflenmektedir. Ayrıca bu aşıya Hanta virüsünün 5 (beş) varyantı dahildir. Kısaca proje; Nipah, KKKA ve Hanta (5 varyantı) virüsleri ile savaşmaktadır. Aşının koruyuculuğunu arttırmak adına ilk dizide bulunmayan epitoplara içeren ikinci bir gen dizisi tasarlanacaktır. Bu sayede epitop çeşitliliği artacak ve bağışıklık sistemi tarafından virüslerin daha çeşitli epitoplara tanınması sağlanacaktır. Şimdiye kadar tek bir aşıda bu kadar çok virüs aynı anda hedeflenmemiştir. Ayrıca yapılan araştırmalar doğrultusunda projedeki gibi birden fazla gen dizisi tasarlayarak aşı kalitesini arttıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönleriyle projemiz bir ilk olacaktır. Nipah ve KKKA virüslerine tasarlanan aşılarından biri rekombinant antijen aşısı iken diğeri hücre kültürü aşısıdır. Bu aşılar henüz onay alacak seviyeye gelmemişlerdir. Hanta Virüsü için ise resmi bir aşı çalışması bulunmamaktadır. Ayrıca, protein bazlı tasarlayacağımız bu aşı, geleneksel aşı yöntemlerinden farklı olarak bir patojen içermez bu yüzden daha güvenli ve daha ekonomiktir. Ek olarak, aşı korkusu olanlar için dil altı seçeneği hep mevcut olacaktır. Projenin en önemli yönü ise, üç farklı virüsün epitoplalarının bir proteinde toplanarak aşı yapılmasıdır. Bu, dünyada ilk ve tek, yerli ve milli bir aşı çalışması olacaktır.

6. Uygulanabilirlik

Projemiz, fikrimizin deneysel ve analitik araştırmalarımız ile desteklenmesiyle 3. teknoloji hazırlık seviyesini tamamlamış bulunmaktadır. Gen tasarlandıktan sonra verilen siparişin elimize ulaşması yaklaşık bir ay sürecektir. Daha sonra genin bakteriye transforme edilip hasat edilmesi ise yaklaşık bir ay sürmektedir. Hasadın ardından elde edilen genin Western blot analizi yapılır. Son olarak proteinin hazırlanmasıyla prelinik öncesi deneyler dört ay gibi bir sürede tamamlanmış olacaktır. Bir sonraki aşama olan ve protokolünü halihazırda hazırlamış olduğumuz laboratuvar ortamındaki prelinik deneysel çalışmalarının yaklaşık üç ayda tamamlanması ile projemiz, 4. teknoloji hazırlık seviyesine ve deneysel çalışmalardan elde

edilen verilerin çevresel şartlarda denenmesi ve doğrulanması ile sonraki teknoloji hazırlık seviyelerine ulaşacaktır. Elde ettiğimiz genin başarısını ölçmek için gerçekleştirilmesi gereken *in vitro* ve *in vivo* deneyler bu aşamalarda gerçekleştirilecektir. Hazırlanan aşının canlılarda meydana getireceği bağışıklık tepkileri bu deneyler ile gözlemlenebilir. Daha sonra, bu deneylerden elde edilen sonuçlara göre aşının gönüllü insanlar üzerinde ve uzmanlar eşliğinde klinik deneyleri gerçekleştirilecektir. Bağışıklık tepkileri ölçüleceğinden dolayı en kritik ve zaman alan aşama klinik deneyler olacaktır. Gönüllü kişilerin yaş, cinsiyet, hastalık geçmişi gibi özellikleri bu aşamada dikkate alınacak ve bu özelliklere göre doz ayarlaması yapılacak ve klinik deneylerin gidişatı sonuçlara göre belirlenecektir. Bu parametreler göz önüne alınarak aşının kullanım için uygunluğu tespit edilecektir. Uygun görülmesi hâlinde hazırlanan aşı, hastane ve sağlık ocakları gibi uygun ortamlarda uzmanlar eşliğinde insanlara kan veya dil altı yoluyla verilecektir. Yaygın görülen ve pandemi riski bulunan virüsler için tasarladığımız bu aşının, kolayca taşınabilir bir formda olması sayesinde başta ülkemizde olmak üzere hedef kitlemizde ayrıntılı şekilde açıkladığımız yaklaşık 20'den fazla ülkede kullanılması beklenmektedir. İki farklı gen dizisi tasarladığımız için aşının insanlar üzerindeki koruyuculuğunun yüksek olması bu yüzden de dünya çapında ciddi bir başarı yakalaması beklenmektedir. Üç virüsü hedef alan bu aşının, bu kadar çok ülkede gerekli olması sebebiyle devletimize bilim ve tıp alanında sağlayacağı katkıların yanında büyük bir ekonomik fayda sağlayacağını da ön görmekteyiz. Uluslararası bir pazara sahip olan bu projemiz, ülkemize üst düzeyde bir döviz akışı gerçekleştirirken aynı zamanda kurulacak tesis ile ülkemizin ihtiyacı olan istihdamı sağlayacaktır. Projemiz karma aşı statüsünde olduğundan ve rekombinant protein içerdiğinden dolayı yurtdışı satışı için beş dozu en az 50- 60 dolar civarında bir fiyatlandırmaya tabi tutulacaktır [19]. Aşı projelerinin ulaşabileceği pazar payı için bir karma aşı örneği verecek olursak; difteri, boğmaca ve tetanos (DTP) aşı pazarının 2019 yılında 4,758,8 milyon dolar değerinde olduğu ve %5,1'lik bir tahmini büyüme ile 2027 yılına kadar 7.054,4 milyon dolara ulaşması beklenmektedir [20].

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

372 amino asitten oluşan gen dizisinin temini için 349 dolar kadar bir ücret verilmesi gerekiyor. Bunun dışında gerekli olan *E. coli* BL21(DE3) bakterileri ve deney için gereken kimyasallar ve cihazlar danışman hocamızın laboratuvarından karşılanacaktır. Ayrıca bu kimyasalların, genin siparişi ve antikorların satın alınması halinde maliyeti nasıl etkileyeceği Tablo 1'de gösterilmiştir. Hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar Erciyes Üniversitesi Aşı Araştırma ve Geliştirme Merkezi gibi uzman kurumlar elinde gerçekleşecektir. Proje ortaklığı söz konusu olduğu için bu aşamalarda bu kurumlarla anlaşılacak, en sonda şişeleme işlemleri için ise ilaç firmaları ile bir anlaşma imzalanacaktır. Pfizer tarafından geliştirilen COVID-19 aşısının araştırma geliştirme maliyeti 1 milyar dolar olarak açıklanırken Moderna'nın AR-GE harcamaları 955 milyon doları bulmuştur [21]. Bizim projemizin AR-GE maliyeti bu karşılaştırmaya göre çok daha düşük olacaktır. Preklinik çalışmalardan önceki deneylerin bitmesi ortalama dört ay gibi bir zaman alacaktır. Preklinik çalışmaların da ortalama üç ay kadar sürmesi beklenmektedir. Yaklaşık yedi aylık bir çalışmadan sonra klinik deneylere geçilecektir.

En zaman alıcı adım klinik çalışmalar olacaktır. Bu deneyler gönüllülük esasına dayalı olduğu için ortalama bir süre söylemek zor olacaktır (Figür 2).

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar)

Tokat, Sivas, Yozgat, Çorum ve Erzurum gibi Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) virüsü taşıma ihtimali yüksek olan kenelerin yaşadığı şehirlerdeki insanlar öncelikli konumda olacaktır. Aşılamaya başlarken de genç ve orta yaşta sağlıklı insanlar seçilecek ve aşının güvenilirliği kanıtlandıktan sonra alerjisi olan, 60 yaş üstü ve kronik hastalığı olan insanlar aşılanacaktır. Türkiye dışında ise İran, Rusya ve Özbekistan'da yoğun vakalar görülürken Asya'nın neredeyse tamamından orta şiddette KKKA vakası görülmektedir [22, 23]. Nipah virüsü ise Avustralya'da, Hindistan'da, Çin'de ve Tayland, Malezya ve Endonezya gibi Hint ve Kuzey Pasifik Okyanusu arasında yer alan ülkelerde salgına sebep olmuştur [1, 24]. Bu ülkelerde yaşayan vatandaşlar da kullanıcılar arasındadır. Hanta virüsü ise Zonguldak, Bartın, İstanbul, Ordu, Giresun ve Sivas bölgelerinde çoğunluktadır. Dünya'da ise İsveç, Norveç, Finlandiya, Almanya, Alaska, Amerika, Kanada, Uruguay, Paraguay, Bolivya, Brezilya, Şili, Arjantin, Çin ve Rusya gibi bölgelerde vakalar yoğun olarak görülürken, Avrupa Kıtasının kalan kısımlarında orta şiddette Hanta Virüsü vakası görülmektedir. Kullanıcılar arasında bu ülkelerde yaşayan insanlar da dahildir [25].

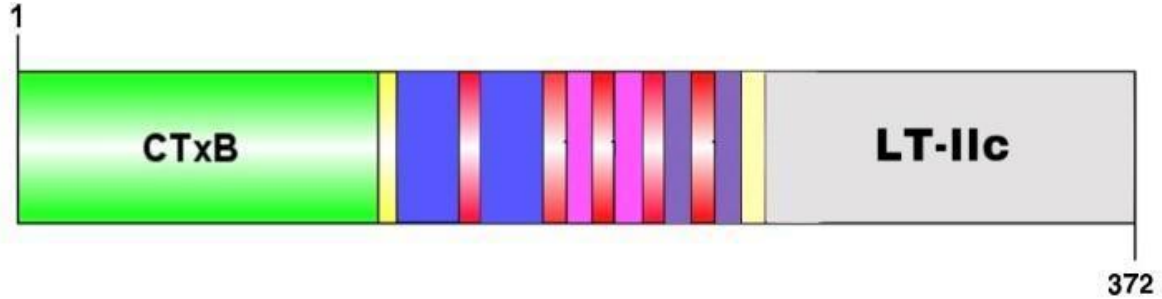
9. Riskler

Proje hayata geçirilirken oluşabilecek en temel risk:

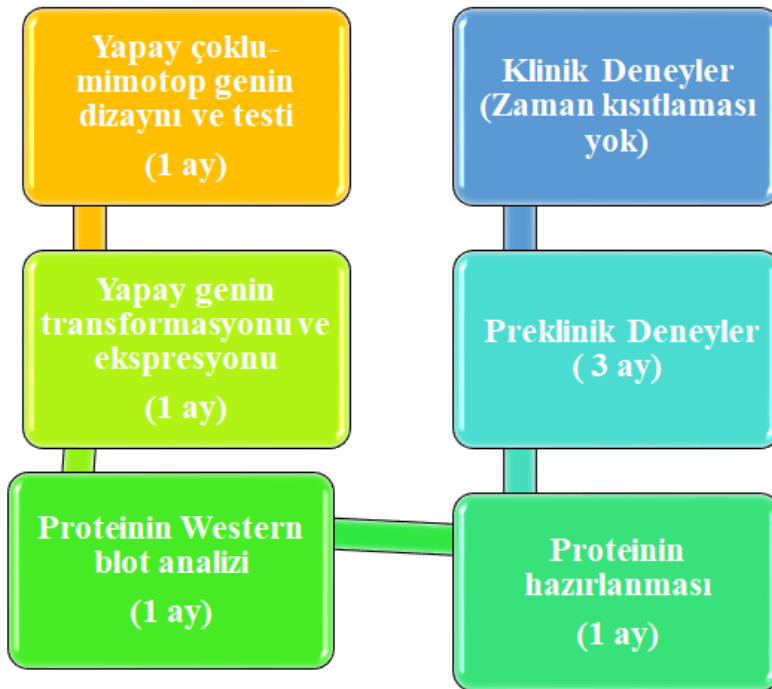
Epitoplara bağışıklık sistemini indükleyememesi olabilir. Bu riski en aza indirmek için sayısız literatür araştırması ve protein analizleri yapmış olsak da bu risk her zaman vardır. Böyle bir durum olması halinde, seçilen epitoplara dışında aynı kalite ve güçte uygun başka epitoplara seçilecek ve tekrardan yeni bir gen dizisi tasarlanacaktır. Kalan adımlar tekrarlanacaktır. Eğer istediğimiz protein ekspresyonunu elde edemezsek, yedekte bulunan gen dizimizi farklı bir plazmide klonlayabiliriz, kullandığımız kimyasallarda bir sorun olması ihtimaline karşı farklı laboratuvarlardan az miktarda kimyasal talep ederek elimizdeki kimyasallarda sorun olup olmadığını test edebiliriz, bakteride sorun varsa diye başka bir *E. coli* suşu deneyebiliriz, eğer sorun halen çözülemediyse son çare olarak inkübasyon süresi, konsantrasyon miktarı gibi bazı protokol adımlarını değiştirmeyi deneyebiliriz.

Laboratuvarda deney sırasında oluşabilecek güvenlik açığı ise en aza indirilecektir. Laboratuvar önlüğü, steril eldivenler ve ihtiyaç dahilinde koruyucu gözlük gibi kişisel koruyucu ekipmanlar olmadan deneye başlanmayacaktır. Bu ekipmanların dışında klasik laboratuvar kuralları geçerli olacaktır. Kullanılan cam beherin kırılması, kullanılan *E.coli*'nin kişinin üzerine bulaşması, Western blot ve SDS-PAGE deneylerinde kullanılan cam plakaların kırılması, yine bu deneylerdeki güç cihazının doğru kullanılmamasından ötürü oluşan elektrik sorunları, hayvan deneylerinde iğnenin kişiye batması ya da hayvan tarafından ısırılma söz konusu olabilir. Bu tür kırılmalar, ısırıklar, batmalar ve elektrik sorunları sırasında kişi yaralanırsa ilk yardım

gerekebilir fakat bunun dışında ilk yardım gerektirecek kadar büyük riskler mevcut değildir. Hesaplanan risk skoru $R < 21$ 'dir (düşük risk) (baz alınan kaynak: 26).



Figür 1: 372 amino asitten oluşan örnek iki gen dizisinden biridir. Adjuvanlar (yeşil ve gri bölgeler), bağlantı fragmantları (linker) (sarı ve kırmızı bölgeler) ve Nipah, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi ve Hanta virüsü epitopları (mavi, pembe ve mor bölgeler) bulunmaktadır.



Figür 2: Yöntemin özet halindeki diyagramı ve zaman planlaması

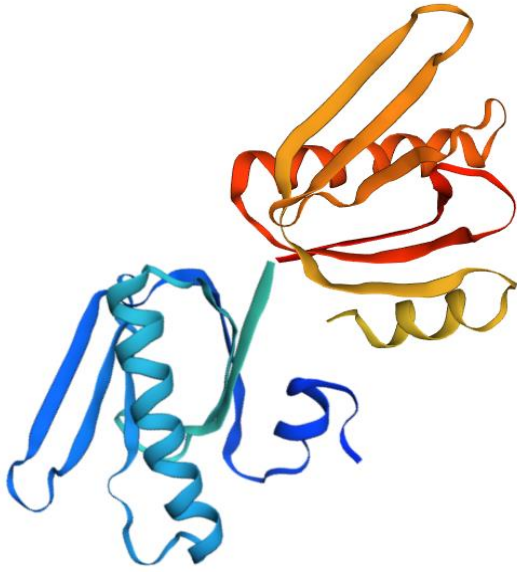


Figure 3: Tasarlanan proteinin Swiss Prot tarafından tahmin edilmiş kuaterner yapısı

Tablo 1: Projenin kimyasallar açısından tahmini maliyetini gösteren tablo

Malzemeler	Miktar	Fiyat	Kullanım Yeri
Tasarlanan gen	4 mikrogram	349 dolar	Gen tasarımı
Hantavirüs MAb	200 uL	892 dolar	WB, ELISA
Nipah virüs MAb	3 mg	795 dolar	WB, ELISA
KKKA MAb	0,5 mg	605 dolar	WB, ELISA
LB Agar	250 g	86,83 dolar	Gen transformasyonu ve ekspresyonu
Western Blot kiti	50 deneme	180 dolar	WB
TBS	1 L	86 dolar	WB
PVDF membran	1 EA	422 dolar	WB
Tris-HCl	25 g	115 dolar	Protein hazırlama
Triton X	1 L	165 dolar	Protein hazırlama
PBS	100 g	14,77 dolar	WB, Potency, Protein hazırlama
H ₂ SO ₄	1 L	16,83 dolar	Potency test
TOPLAM		3.727,43 dolar	

10. Kaynaklar

- [1] World Health Organization. Nipah virus infection. https://www.who.int/health-topics/nipah-virus-infection#tab=tab_1
- [2] World Health Organization. Crimean Congo haemorrhagic fever. https://www.who.int/health-topics/crimean-congo-haemorrhagic-fever#tab=tab_1
- [3] World Health Organization (2019). Hantavirus Pulmonary Syndrome. <https://www.who.int/csr/don/23-January-2019-hantavirus-argentina/en/>
- [4] Özkan, A. T. (Ed.). (2011). Hantavirüs Sempozyumu. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68.
- [5] Sankar, S., Ramamurthy, M., Nandagopal, B., & Sridharan, G. (2017). Short peptide epitope design from hantaviruses causing HFRS. *Bioinformation*, 13(7), 231–236. <https://doi.org/10.6026/97320630013231>
- [6] Krishnamoorthy, P., Subasree, S., Arthi, U., Mobashir, M., Gowda, C., & Revanasiddappa, P. D. (2020). T-cell Epitope-based Vaccine Design for Nipah Virus by Reverse Vaccinology Approach. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 23(8), 788–796. <https://doi.org/10.2174/1386207323666200427114343>
- [7] High Pathogenicity And. (2019) Epitope - based peptide vaccine against glycoprotein G of Nipah henipavirus using immunoinformatics approaches | bioRxiv. Retrieved February 25, 2021, from doi: 10.1155/2020/2567957
- [8] Meilipaiti Yusufu, Alai Shalitanati. (2019) Immune responses in mice induced by multi-epitope DNA vaccine and protein vaccine of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. from doi: <https://doi.org/10.1101/719724>
- [9] Egc-Encoded Enterotoxins. (2021) Toxins | Free Full-Text | Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. Retrieved March 15, 2021, from
- [10] Nawar, H. F., Greene, C. J., Lee, C. H., Mandell, L. M., Hajishengallis, G., & Connell, T. D. (2011). LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family, exhibits potent immunomodulatory properties that are different from those induced by LT-IIa or LT-IIb. *Vaccine*, 29(4), 721–727. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.020>
- [11] <https://web.expasy.org/protparam/>
- [12] Gsl Biotech Llc. (2021) pET-28b(+) Sequence and Map. Retrieved March 1, 2021, from [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET and duet vectors \(novagen\)&plasmid=pET-28b\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET%20and%20duet%20vectors%20(novagen)&plasmid=pET-28b(%2B))
- [13] Wang, Y., Fan, H., Li, Y., Shi, Z., Pan, Y., & Lu, C. (2007). *Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus*. *Vaccine*, 25(22), 4447–4455. doi:10.1016/j.vaccine.2007.03.018
- [14] Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1st ed.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [15] Bhardwaj, N., Verma, V. K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2020). Cloning, expression and characterization of a thermo-alkali-stable xylanase from *Aspergillus oryzae* LC1 in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Protein Expression and Purification*, 168, 105551. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105551>

- [16] Gamoh, K., Senda, M., Itoh, O., Muramatsu, M., Hirayama, N., Koike, R., ... Minamoto, N. (1996). *Use of ELISA for in vitro Potency Test of Rabies Vaccines for Animal Use. Biologicals*, 24(2), 95–101. doi:10.1006/biol.1996.0012
- [17] <https://www.cdc.gov/vaccines/basics/test-approve.html>
- [18] Bloom, Barry R.; Lambert, Paul-Henri (2003). *The Vaccine Book*. Academic Press. ISBN 978-0-12-107258-2
- [19] <https://www.cdc.gov/vaccines/programs/vfc/awardees/vaccine-management/price-list/index.html>
- [20] <https://www.alliedmarketresearch.com/diphtheria-pertussis-and-tetanus-vaccine-market>
- [21] Kaplan D., Wehrwein P. (2021) The Price Tags on The COVID-19 Vaccine from <https://www.managedhealthcareexecutive.com/view/the-price-tags-on-the-covid-19-vaccines>
- [22] Leblebicioglu, H. & S. (2015). Consensus report: Preventive measures for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever during Eid-al-Adha festival. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 38. 10.1016/j.ijid.2015.06.029.
- [23] Bartolini, Barbara & Gruber, Cesare. (2019). Laboratory management of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infections: perspectives from two European networks. *Eurosurveillance*. 24. 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.5.1800093.
- [24] Park, Arnold & Radoshitzky, Sheli & Kuhn, Jens & Lee, Benhur. (2018). HENIPAVIRUSES.
- [25] New World Rats. (2021) Ecology | Hantavirus | DHCPP | CDC. Retrieved June 11, 2021, from <https://www.cdc.gov/hantavirus/technical/hps/ecology.html>
- [26] <https://isgrehberi.org/2018/08/07/fine-kinney-yontemi-ile-risk-degerlendirmesi/>