T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COVID-19'A KARŞI NÖTRALİZAN VE ANTİ-İDİYOTİPİK ANTİKORLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Gamze KILIÇ

0000-0001-5137-668X

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)
Doç. Dr. Fatıma YÜCEL
(Eş Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

COVID-19'A KARŞI NÖTRALİZAN VE ANTİ-İDİYOTİPİK ANTİKORLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Gamze KILIÇ

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
İkinci Danışman: Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

2019 yılında küresel halk sağlığı tehdidi oluşturan COVID 19 hastalığı tüm dünyaya yayıldığında, yoğun olarak tanı, tedavi ve korunma amaçlı araştırmalara öncelik verilmiştir.

Monoklonal antikorlar (mAb'ler) klinik olarak birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, COVID-19'a karşı geliştirilen nötralizan antikorlar (nAb), kullanılarak, SARS CoV-2 S yüzey proteinini (S/RBD) taklit eden anti-idiyotipik monoklonal antikorların geliştirilmesi ve *in-vivo* sistemde etkinliğinin araştırılması yönünde çalışmalar gerçekleştirildi.

Tez sürecinde, SARS-CoV-2'nin Spike proteininin RBD'sine özgü nötralizan özellik gösteren anti-SARS-CoV-2 monoklonal antikorları (MAM-H9, MAM-E6) geliştirildi. Bu antikorlar ve COVID-19 geçirip iyileşme gösteren insan serumdan saflaştırılan antikorlar hem bütün formda hem de papain enzimi ile kesilerek elde edilen Fab fragmanlarına karşı hibridoma teknolojisi kullanılarak anti-idiotipik monoklonal antikor (aid-mAb) üretim çalışmaları yapıldı. Füzyon çalışmaları sonucunda elde edilen, on iki aid-mAb arasında, altı tanesi *in vivo* sistemde etkinlik testine alındı. Bu antikorlar içinden 3 tanesinin (E6G7, H7E5 ve H8H3) RBD molekülü ile immünize edilmiş farelerden elde edilen antikorlarla karşılaştırıldığında, RBD molekülünün antijenik özelliklerini taklit edebildiği, ACE-2 reseptörüne spesifik olarak bağlandığı, RBD ile ACE-2 arasındaki etkileşimi bloke edebildiği gösterildi.

Tez çalışmasında ayrıca, SARS CoV-2 S Yüzey Proteinini (S) taklit eden fare kökenli aid-mAb geliştirme çalışmalarına ek olarak Türkiye'de ilk kez gerçekleştirilmiş olan tavşan kökenli mAb geliştirme çalışmaları yapıldı.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, Monoklonal antikor, Anti-idiyotipik monoklonal antikorlar, Hibridoma teknolojisi.
2024, xiii+184 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF NEUTRALIZING AND ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES AGAINST COVID-19

Gamze KILIÇ

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatıma YÜCEL

In 2019, when the COVID-19 disease, posing a global public health threat, spread world wide, priority was given to intensive research for diagnosis, treatment, and prevention.

Monoclonal antibodies (mAbs) are clinically used in the diagnosis and treatment of various diseases. In this study, neutralizing antibodies (nAbs) developed against COVID-19 were used to develop anti-idiotypic monoclonal antibodies that mimic the SARS-CoV-2 Spike surface protein (S/RBD) and to investigate their efficacy in an in-vivo system.

During the thesis process, anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies (MAM-H9, MAM-E6) with neutralizing properties specific to the Spike protein's RBD of SARS-CoV-2 were developed. These antibodies, as well as antibodies purified from the serum of recovered COVID-19 patients, were used to produce anti-idiotypic monoclonal antibodies (aid-mAbs) using hybridoma technology, both in whole form and as Fab fragments obtained by papain enzyme digestion. Among the twelve aid-mAbs obtained from fusion studies, six were subjected to efficacy testing in an in-vivo system. Three of these antibodies (E6G7, H7E5, and H8H3) were shown to mimic the antigenic properties of the RBD molecule, specifically bind to the ACE-2 receptor, and block the interaction between RBD and ACE-2 when compared to antibodies obtained from mice immunized with the RBD molecule. This findings form the basis for evaluating the selected anti-idiotypic antibodies as vaccine candidates against SARS-CoV-2.

Additionally, in the thesis study, apart from the development of mouse-derived aid-mAbs mimicking the SARS-CoV-2 Spike Surface Protein (S), rabbit-derived mAb development studies, which were carried out for the first time in Turkey, were also conducted.

Keywords: SARS-CoV-2, Monoclonal antibody (mAb), Anti-idiyotype mAb, Hybridoma technology.
2024, xiii+184 pages.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının tamamlanmasında bana destek olan herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

Öncelikle, bu çalışmanın her aşamasında bana rehberlik eden, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan eş danışman hocam Doç. Dr. Fatıma YÜCEL'e minnettarlığımı ifade etmek isterim. Ayrıca, tez çalışmam boyunca bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a tüm öğrenim hayatım boyunca gösterdiğiniz sabır ve anlayışınız için teşekkür etmek isterim.

Bu çalışma sırasında desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşım Serpil BAYRAKTAR ve çok kıymetli abim Harun KOCAAĞA'ya teşekkür etmek isterim. Zor zamanlarda yanımda olan, motivasyonumu artıran ve bu süreci daha keyifli hale getiren herkese teşekkürler.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için bana imkân sunan proje yürütücüsü Dr. Aylin BAHADIR, TÜBİTAK MAM Biyolojik Tespit ve Tanı Teknoloji Laboratuvarı sorumlusu Dr. Esin AKÇAEL ve tüm TÜBİTAK Yaşam Bilimleri Başkan Yardımcılığı araştırmacılarına teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Mehtap BÜRTEK, babam Abidin BÜRTEK ve kardeşim Yunus Emre BÜRTEK'e en derin teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yanımda oldunuz ve bana inandınız. Sizlerin desteği, bu zorlu yolculukta bana güç verdi.

Ve en önemlisi, bu yolculukta varlığıyla benim en büyük motivasyonum olan kızım Umay Gökçen'e, her zaman yanımda olan, sabrı ve anlayışı ile her zaman bana destek olan eşim Furkan KILIÇ'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Bana olan inancın, verdiğin sevgi ve destek, bu tez çalışmasının her aşamasında bana güç verdi. Zorluklarla karşılaştığımızda gösterdiğin sabır ve motivasyon, bu sürecin çok daha anlamlı ve katlanılabilir olmasını sağladı. Her şey için teşekkür ederim, siz benim en büyük destekçimsiniz.

Gamze KILIÇ
24/06/2024

Bu çalışma TÜBİTAK 1004 (T1004-18AG020) "COVID-19'a Karşı Nötralizan Antikor Geliştirilmesi "(2020) projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 5
2.1. SARS-CoV Virüsü Genel Özellikleri 5
2.1.1. SARS-CoV virüsü sınıflandırması 5
2.1.2. Koronavirüs yapısı 6
2.1.3. Koronavirüs yaşam döngüsü 8
2.2. SARS-CoV-2 Varyantları 10
2.3. Viral Proteinin Antijenitesi 13
2.4. Antikor-Antijen Kavramı 14
2.5. Monoklonal Antikor Üretimi 17
2.5.1. Hibridoma teknolojisi 18
2.5.2. SARS-CoV-2 ve monoklonal antikorlar 20
2.5.3. SARS-CoV-2 ve nötralizan monoklonal antikorlar 21
2.5.4. SARS-CoV-2 ve anti-idiyotipik monoklonal antikorlar 24
2.6. Antikor Fragmenti Oluşturulması 27
2.6.1. Proteolitik enzimler 27
2.6.2. Monoklonal antikorların enzimatik sindirimi 28
2.7. COVID-19'un Önlenmesi İçin Aşı Adaylarının Geliştirilmesi 32
2.7.1. Tam inaktive edilmiş viral aşı 33
2.7.2. Canlı-zayıflatılmış viral aşı 34
2.7.3. mRNA aşıları 35
2.7.4. Viral vektör aşıları 35
2.7.5. Viral DNA tabanlı aşılar 36
2.7.6. Alt Birim aşıları 37
2.7.7. Anti-idiyotipik aşılar 38
3. MATERYAL ve YÖNTEM 40
3.1. Kullanılan Hücre Hatları ve Canlı Materyaller 44
3.2. Ticari SARS-CoV-2 Antijenlerin Temini ve Stok Hazırlanması. 45
3.3. Protein Görüntüleme Yöntemleri 45
3.3.1. SDS-PAGE yöntemi 45
3.3.2. Native- PAGE yöntemi 47
3.3.3. Zimogram jel yöntemi 47
3.3.4. Gümüş boyama yöntemi 48
3.3.5. Commassie blue boyama 49
3.3.6. Western Blot yöntemi 50
3.4. ELISA Yöntemleri 51
3.4.1 Dolaylı ELISA yöntemi 52
3.4.2. Direkt ELISA yöntemi 54

3.4.3. Yarışımlı RBD nötralizan ELISA yöntemi 55
3.4.4. Yarışımlı ACE-2 nötralizan ELISA yöntemi 56
3.5. Protein İşaretleme Yöntemleri 57
3.5.1. Biyotin ile işaretleme yöntemi 58
3.5.2. HRP ile işaretleme yöntemi 58
3.6. Deney Hayvanlarının Bağışıklanması Yöntemi 59
3.6.1. Balb/c cinsi farelerin bağışıklanması 60
3.6.2. Yeni Zelanda cinsi tavşanların immünizasyonu 61
3.7. Antikorları Proteolitik Kesim ile Fragmentlere Ayırma Yöntemleri 61
3.7.1. Papain enzimi ile antikor fragmentasyonu 62
3.7.2. Fisin enzimi ile antikor fragmentasyonu 63
3.7.3. Yerli enzim ile antikor fragmentasyonu 63
3.8. *Bacillus subtilis* 168 E6-5 Proteaz Enzimi Saflaştırma Yöntemi 64
3.8.1. Aktivite gösteren proteaz enziminin konsantre edilmesi yöntemi 65
3.8.2. Jel filtrasyon kromatografi yöntemi 66
3.9. Fare Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi ve Hibridoma Yöntemi 67
3.9.1. Fare (Balb/c) orijinli F0 myeloma hücrelerinin hazırlanması 68
3.9.2. Hücrelerin sayım yöntemi 69
2.9.3. Rapel uygulaması 70
3.9.4. Besleyici hücrelerin hazırlanması 70
3.9.5. Fare (Balb/c) orijinli dalak hücrelerinin hazırlanması 71
3.9.6. Fare orijinli dalak-myeloma hücrelerinin birleştirilmesi (PEG aracılı füzyon) 72
3.9.7. Hücrelerin dondurulması, muhafaza edilmesi 73
3.9.8. Hibrit hücrelerin tesbiti, pozitif klon seçilimi ve tek düşürme çalışmaları 73
3.10. Tavşan Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi ve Hibridoma Yöntemi 74
3.10.1. 240E1:1 myeloma hücrelerinin hazırlanması 76
3.10.2. Tavşan orjinli dalak hücrelerinin hazırlanması 76
3.10.3. Tavşan orjinli dalak-myeloma hücrelerinin birleştirilmesi, füzyon işlemi 77
3.11. Kolon Kromatografisi ile Protein Saflaştırma Yöntemi 77
3.11.1. Hibridoma hücrelerinin geniş ölçek üretilmesi 79
3.11.2. Antikor isotiplerinin tayini 79
3.11.3. Amonyum sülfat ile protein çöktürme yöntemi 79
3.11.4. Diyaliz yöntemi 80
3.11.5. Protein A kolon kromatografisi ile antikorların saflaştırılması 80
3.11.6. IgM kolon kromatografisi ile antikorların saflaştırılması 81
3.11.7. Protein G kolon kromatografisi ile saflaştırılması 82
3.11.8. Antikor konsantrasyonun belirlenmesi 82
3.11.9. Antikorların konsantre edilmesi 83
3.11.10. Fab fragmanlarının saflaştırma yöntemi 83
4. BULGULAR 84
4.1. SARS-CoV-2 Antijenine Karşı Fare Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi 84
4.1.1. İmmünizasyonda kullanılan SARS-CoV-2 antijenlerinin temin ve karakterizasyonu 84
4.1.2. Deney hayvanlarının immünizasyonu 85
4.1.3. İmmün yanıtın kontrolü 86
4.1.4. Füzyon sonuçları 90
4.1.5. Monoklonal antikorların çapraz reaksiyon kontrolü 92

4.1.6. Hibrid hücrelerin tek düşürme çalışmaları 94
4.2. Fare Anti-SARS-CoV-2 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması ve Karakterizasyonu 96
4.2.1. İmmünoglobulin alt gruplarının belirlenmesi 96
4.2.2 Kolon kromatografisi 97
4.2.3. Protein saflığının belirlenmesi (gümüş boyama) 99
4.2.4. Protein konsantrasyon tayini 99
4.2.5. Antijen yanıtlarının belirlenmesi (Western Blot ve ELISA) 100
4.3. Konvalesan Serumdan İnsan Antikorlarının Elde Edilmesi 103
4.3.1. Serumdan poliklonal antikorların saflaştırılması 104
4.4. Antikorların Nötralizasyon Kabiliyetlerinin Gösterilmesi 105
4.4.1. RBD proteinlerinin HRP enzimi ile işaretlenmesi 106
4.4.2. Yarışımlı RBD nötralizasyon ELISA testi 107
4.5. Anti-SARS-COV-2 Antikorlarının Papain Enzimi ile Proteolitik Kesimi 108
4.5.1. Papain enzimi ile antikor kesim protokolünün antikor:enzim konsantrasyonunun optimizasyonu 108
4.5.2. Papain enzimi ile antikor kesim protokolünün zaman optimizasyonu 112
4.5.3. Antikor fab fragmanlarının saflaştırılması 114
4.5.4. Fab fragmanlarının idiyotip bölgelerinin etkinliğinin gösterilmesi 116
4.6.Anti-SARS-CoV-2 Antikorlarının Diğer Proteolitik Enzimlerle Kesim Çalışmaları; Fisin Enzimi ile Antikor Kesimi 119
4.6.1. Fisin enzimi ile antikor kesim protokolünün Antikor:Enzim konsantrasyonunun optimizasyonu 120
4.7. Anti-SARS-CoV-2 Antikorlarının Yerli ve Yeni *Bacillus* suşundan İzole Edilen Enzim ile Antikorların Proteolitik Olarak Kesilmesi 122
4.7.1. Yerli ve yeni *Bacillus* suşundan enzimin saflaştırılması 122
4.7.2. Yerli ve Yeni *Bacillus* suşundan izole edilen enzimi ile antikor sindirim protokolünün Antikor:Enzim konsantrasyonunun optimizasyonu 124
4.8. SARS-CoV-2 Fare Anti-İdiyotipik Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi 129
4.8.1. Deney hayvanlarının immünizasyonu 129
4.8.2. İmmünizasyon gruplarının oluşturulması 130
4.8.3. İmmün yanıtın kontrolü 130
4.8.4 Füzyon çalışmaları 133
4.9. SARS-CoV-2 Fare Anti-id Monoklonal Antikorların Saflaştırılması 136
4.10. Anti-İdiyotip Antikorların Nötralizasyon Kabiliyetlerinin Gösterilmesi 140
4.10.1. ACE2 proteinlerinin biotin enzimi ile işaretlenmesi 140
4.10.2. Yarışımlı ACE-2 nötralizasyon ELISA testi 141
4.11. Anti-İdiyotip Antikorların *İn Vivo* Etkinliklerinin Gösterilmesi 142
4.12.SARS-CoV-2 Tavşan Anti-İdiyotipik Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi 145
4.12.1. Deney hayvanlarının immünizasyonu 146
4.12.2. İmmünizasyon gruplarının oluşturulması 146
4.12.3. İmmün yanıtın kontol edilmesi 146
4.12.4.Hibridoma teknolojisi ile tavşan monoklonal antikorların geliştirilmesi 148
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 151
KAYNAKLAR 163
ÖZGEÇMİŞ 184

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler		**Açıklamalar**
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikroliter
^{0}C	:	Derece

Kısaltmalar		**Açıklamalar**
A	:	Amper
ACE-2	:	Anjiotensin dönüştürücü Enzim-2
Aid	:	Anti-idiyotip
Aid-mAb	:	Anti-idiyotipik monoklonal antikor
AP	:	Alkalen fosfataz
APC	:	Antijen sunan hücreler
APS	:	Amonyum persülfat
BCA	:	Bikronik asit testi
Bp	:	Baz çifti
CDR	:	Tamamlayıcılık belirleme bölgesi
CH1	:	Sabit ağır zincir 1
CH2	:	Sabit ağır zincir 2
CH3	:	Sabit ağır zincir 3
CL	:	Sabit hafif zincir
CO_2	:	Karbon dioksit
COVID-19	:	Yeni koronavirüs hastalığı
CTD	:	C-Terminal alanı
dH_2O	:	Deiyonize su
DMEM	:	Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiriboz nükleik asit
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	:	Enzim bağımlı immünosorbent test
EP	:	Zarf protein
ER	:	Endoplasmik retikulum
EtOH	:	Etil alkol
EUA	:	Acil kullanım yetkisi
EUL	:	Acil kullanım listesi
F(ab')2	:	Divalent antikor fragmenti
Fab	:	Antijen bağlama bölgesi fragmenti
FBS	:	Fetal bovin serum
Fc	:	Kristalleşebilen bölge fragmenti
FCA	:	Freund tam adjuvant
FDA	:	Amerikan gıda ve ilaç dairesi

FIA	:	Freund eksik adjuvant
g	:	Gram
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksit
HAT	:	Hikoksantin-aminopterin-timidin
HRP	:	Yabanturbu peroksidaz
HT	:	Hipoksantin-timidin
Ig	:	İmmünoglobulin
IgA	:	İmmünoglobulin A
IgG	:	İmmünoglobulin G
IgM	:	İmmünoglobulin M
Kb	:	Kilobaz
kDa	:	Kilodalton
Kg	:	Kilogram
L	:	Litre
M	:	Molar
mAb	:	Monoklonal antikor
MetOH	:	Metil alkol
mg	:	Milligram
mL	:	Mililitre
mM	:	Millimolar
MP	:	Membran protein
Mpro	:	Ana proteaz
MW	:	Moleküler ağırlık
ng	:	Nanogram
NP	:	Nukleocapsit protein
NTD	:	N-Terminal alanı
PBS	:	Fosfat tuz tamponu
PBS-T	:	Fosfat tuz tamponu-tween 20
PEG	:	Polietilen glikol
pH	:	Hidrojen potansiyeli
PLpro	:	Papain benzeri proteaz
PSA	:	Penisillin-streptomicin-amfiterisin B
Rpm	:	Revolutions per minute
TMB	:	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
U	:	Enzim Unitesi
V	:	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Coronoviridae virüs sınıflandırması (Rehman ve ark. 2020'den değiştirilerek alınmıştır)	5
Şekil 2.2.	SARS-CoV-2 virüsünün yapısal proteinleri.	6
Şekil 2.3.	SARS-CoV-2 virüsünün hücreye endozomal giriş mekanizması	9
Şekil 2.4.	SARS-CoV-2 virüsünün hücre yüzeyi giriş mekanizması	10
Şekil 2.5.	SARS CoV-2 varyantları (Flores-Vega ve ark. 2022)	11
Şekil 2.6.	SARS-CoV-2 ile karşılaştıktan sonra bağışıklık tepkisi gelişiminin dinamikleri (Slabakova ve ark. 2022'den değiştirilerek alınmıştır)	13
Şekil 2.7.	Epitop ve paratop bölgelerinin ilişkisi	14
Şekil 2.8.	Antikorların afinite ve avidite özellikleri	15
Şekil 2.9.	İmmünoglobulin genel yapısının gösterilmesi	16
Şekil 2.10.	Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi	19
Şekil 2.11.	SARS-CoV-2 virüsünün nötralizan antikorlar ile bloklanması	22
Şekil 2.12.	Anti-idiyotipik antikorlar	25
Şekil 2.13.	SARS-CoV-2 anti-idiyotip antikor oluşumu.	27
Şekil 2.14.	İmmünoglobulin çeşitleri (Rojas ve Apodaca, 2002)	29
Şekil 2.15.	Tam antikor yapısının papain enzimi ile sindirimi sonrası fragmentlerin oluşumu	30
Şekil 2.16.	Tam antikor yapısının pepsin enzimi ile sindirimi sonrası fragmentlerin oluşumu.	30
Şekil 2.17.	Tam antikor yapısının fisin enzimi ile sindirimi sonrası fragmentlerin oluşumu.	31
Şekil 2.18.	SARS-CoV-2 aşı geliştirme çalışmalarında kullanılan teknolojiler.	33
Şekil 3.1.	Dolaylı ELISA yöntemi	53
Şekil 3.2.	Direkt ELISA yöntemi.	55
Şekil 3.3.	Yarışımlı RBD nötralizan ELISA yöntemi	56
Şekil 3.4.	Yarışımlı ACE-2 nötralizan ELISa yöntemi	57
Şekil 3.5.	Hücre sayım formülü.	69
Şekil 3.6.	Fare myeloma hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüleri.	70
Şekil 3.7.	Besleyici hücrelerin mikroskop altındaki görünümü	71
Şekil 3.8.	Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor geliştirme basamakları	72
Şekil 4.1.	S1 proteinlerinin gümüş boyama görüntüsü	85
Şekil 4.2.	İmmünize edilen balb/c cinsi dişi fareler	86
Şekil 4.3.	5 µg S1 proteini (Acro Biosystems, S1N-C52H3) ile immünize farelerin antikor yanıtları.	87
Şekil 4.4.	4 µg S1 proteini (Sino Biological, 40591-v08b1) ile immünize farelerin antikor yanıtları	88
Şekil 4.5.	5 µg RBD proteini (Acro Biosystems, SPD-C5255) ile immünize farelerin antikor yanıtları.	89
Şekil 4.6.	Füzyonun 10. gününde gözlenen farklı büyüklüklerdeki hibrit hücreleri	92
Şekil 4.7.	SARS CoV-2 S1 antijenine spesifik yanıt veren monoklonal antikorların çapraz reaksiyon ELISA test sonuçları	93

Şekil 4.8.	Hibritlerin antijen ilgisinin ELISA ile gösterilmesi	94
Şekil 4.9.	6E6 ve 4H9 hibritlerinin tek klon düşürme çalışmaları	95
Şekil 4.10.	Tek düşen kolonilerin mikroskop altındaki görünümü	96
Şekil 4.11.	Tek düşürme sonrası hibritlerin alt izotiplerinin gösterilmesi	97
Şekil 4.12.	4H9 ve 6E6 monoklonal antikorlarının saflaştırma grafiği	98
Şekil 4.13.	Saflaştırılan fraksiyonların gümüş boyama ile gösterilmesi	99
Şekil 4.14.	BCA testi ile belirlenen anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM ve anti-SARS-CoV-2 S1 H9 MAM monoklonal antikorlarının konsantrasyonları	100
Şekil 4.15.	Anti-SARS-CoV-2 mAblarının commassie blue boyama ile gösterilmesi.	101
Şekil 4.16.	Anti-SARS-CoV-2 mAblarının western blot ile gösterilmesi.	102
Şekil 4.17.	Saflaştırılan monoklonal antikorların ELISA ile antijen yanıtlarının gösterilmesi.	103
Şekil 4.18.	İnsan konvalesan serumundan saflaştırılan fraksiyonların ELISA ile test edilmesi.	104
Şekil 4.19.	Saflaştırılan insan serumuna ait elüsyon fraksiyonlarının gümüş boyama ile gösterilmesi.	105
Şekil 4.20.	200 ng kaplı anti-SARS-CoV-2 MAM E6 mAb'ının RBD-HRP etkileşimi.	106
Şekil 4.21.	Antikorların RBD nötralizasyon kabiliyetlerinin ELISA ile gösterilmesi.	107
Şekil 4.22.	Papain enzimi ile farklı oranlarda sindirilen antikorların gümüş boyama ile gösterilmesi	109
Şekil 4.23.	Liyofilize fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb'ının papain enzimi ile proteolitik kesimi	110
Şekil 4.24.	Liyofilize fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb'ının papain enzimi ile proteolitik kesimi	111
Şekil 4.25.	Liyofilize insan anti-SARS-CoV-2 FY pAb'ının papain enzimi ile proteolitik kesimi	111
Şekil 4.26.	Farklı zaman aralıklarında durdurulan reaksiyonlar sonrası antikor:enzim komplekslerinin gümüş boyama ile gösterilmesi	113
Şekil 4.27.	Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb'ının enzimatik sindirim sonrası saflaştırılan Fab fragmanlarının gümüş boyama ile gösterilmesi	115
Şekil 4.28.	Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb'ının enzimatik sindirim sonrası saflaştırılan Fab fragmanlarının gümüş boyama ile gösterilmesi	115
Şekil 4.29.	İnsan anti-SARS-CoV-2 Fy pAb'ının enzimatik sindirim sonrası saflaştırılan Fab fragmanlarının gümüş boyama ile gösterilmesi	116
Şekil 4.30.	Fab fragmentlerinin antijen yanıtlarının dolaylı ELISA ile gösterilmesi	117
Şekil 4.31.	Anti-Sars-Cov-2 antikorlarının ilgili Fab fragmentleri ile karşılaştırmalı gümüş boyama görüntüsü	118
Şekil 4.32.	Antikorların ilgili Fab fragmentleri ile karşılaştırmalı gümüş boyama görüntüsü	119
Şekil 4.33.	Fisin ile kesilen monoklonal antikorların gümüş boyama ile gösterilmesi	120

Şekil 4.34. Fisin ile kesilen monoklonal antikorların western blot ile gösterilmesi 121
Şekil 4.35. Saflaştırılan enzim fraksiyonlarının 280 nm'de spektrofotometrik okuması 122
Şekil 4.36. Enzim fraksiyonlarının gümüş boyama ile gösterilmesi 123
Şekil 4.37. Tirozin standartlarının hazırlanması ve enzim aktivasyon değerinin belirlenmesi (µg/ml) 123
Şekil 4.38. Saflaştırılan fraksiyonların zimogram jel görüntüsü 124
Şekil 4.39. Yerli enzim kullanılarak antikorun enzimatik sindirimin süresinin western blot ile belirlenmesi 125
Şekil 4.40. Yerli enzim kullanılarak antikorların enzimatik olarak sindiriminin western blot görüntüsü 127
Şekil 4.41. Farklı enzim:antikor sindirim oranlarının western blot görüntüsü 128
Şekil 4.42. Farklı enzim:antikor sindirim oranlarının western blot görüntüsü 128
Şekil 4.43. Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9, fare anti-SARS-CoV-2 MAM E6 ve insan SARS-CoV-2 FY tam yapıdaki antikorlar ile immünize edilen farelerin ACE-2 yanıtlarına ait dolaylı ELISA test sonuçları 131
Şekil 4.44. Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9, fare anti-SARS-CoV-2 MAM E6 ve insan SARS-CoV-2 FY Fab fragmentleri ile immünize edilen farelerin ACE2 yanıtlarına ait dolaylı ELISA test sonuçları 132
Şekil 4.45. Füzyon çalışmaları sonrası elde edilen hibrit hücrelere ait monoklonal antikorların antijenik yanıtlarının dolaylı ELISA ile gösterilmesi 135
Şekil 4.46. Geliştirilen aid-monoklonal antikorlara ait kolon kromotografisi sonrası saflaştırma fraksiyonlarının absorbans 280 nm okumaları ve dolaylı ELISA yanıtlarının birlikte gösterimi 138
Şekil 4.47. Anti-idiyotip monoklonal antikorların konsantrasyon tayini 139
Şekil 4.48. ACE-2-Biyotin konjugat proteininin çalışma konsantrasyonunun direkt elısa ile belirlenmesi 141
Şekil 4.49. Anti-id monoklonal antikorların RBD Nötralizasyon kabiliyetlerinin yarışımlı ACE-2 nötralizasyon ELISA ile gösterilmesi 142
Şekil 4.50. Antikorların RBD proteinini nötralize edebilme yüzdeleri. 142
Şekil 4.51. Anti-idiyotipik monoklonal antikorlarının in vivoda anti-RBD yanıtı oluşturma etkinliklerinin gösterilmesi 144
Şekil 4.52. Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mab ve insan anti-SARS-CoV-2 FY pAb ile immünize edilen tavşan immün yanıtlarının dolaylı ELISA ile gösterilmesi 147
Şekil 4.53. Tavşan dalağının çıkarılması 147
Şekil 4.54. Tavşan dalağından splenositlerin izolasyonu 148
Şekil 4.55. Tavşan 240E1:1 myeloma hücre hattının mikroskop altında görünümü 149
Şekil 4.56. Tavşan hibridoma hücrelerinin mikroskop altında görünümü 148

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve sarf malzeme listesi	40
Çizelge 3.1.	Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve sarf malzeme listesi (devam)	41
Çizelge 3.2.	Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzeme listesi	42
Çizelge 3.2.	Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzeme listesi (devam)	43
Çizelge 3.2.	Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzeme listesi (devam)	44
Çizelge 3.3.	Deneysel çalışmalarda kullanılan canlı materyaller	44
Çizelge 3.4.	Ticari antijenlerin hazırlanması	45
Çizelge 3.5.	SDS-PAGE jel elektroforez çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanışı	46
Çizelge 3.6.	SDS-PAGE yürütme jeli bileşenleri	46
Çizelge 3.7.	Native jel bileşenleri	47
Çizelge 3.8.	Zimogram analizinde kullanılan tamponlar	48
Çizelge 3.9.	Zimogram jel bileşenleri	48
Çizelge 3.10.	Gümüş boyama çalışmalarında kullanılan tamponlar	49
Çizelge 3.11.	Commassie blue boyama için kullanılan tamponlar	50
Çizelge 3.12.	Western blotlama çalışmalarında kullanılan tamponlar	51
Çizelge 3.13.	ELISA çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanması	52
Çizelge 3.14.	Dolaylı ELISA bileşenlerinin kullanım konsantrasyonu ve miktarları	54
Çizelge 3.15.	İmmünizasyon çalışmalarında kullanılan tamponlar	59
Çizelge 3.16.	Fare immünizasyon çalışmalarında kullanılan immünojenler ve uygulama dozları	60
Çizelge 3.17.	Tavşan immünizasyon çalışmalarında kullanılan immünojenler ve uygulama dozları	61
Çizelge 3.18.	Antikor kesim çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanması	62
Çizelge 3.19.	Papain enzimi için uygulanan reaksiyon süresi	63
Çizelge 3.20.	Fisin enzimi için uygulanan reaksiyon süresi	63
Çizelge 3.21.	Enzimatik reaksiyon için kullanılan sindirim tamponu değişkenleri	64
Çizelge 3.22.	Antikor kesim çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanması	65
Çizelge 3.23.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan tamponlar	68
Çizelge 3.24.	Tavşan monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında kullanılan tamponlar.	75
Çizelge 3.25.	Antikorları saflaştırma çalışmalarında kullanılan tamponlar.	78
Çizelge 4.1.	SARS-CoV-2 immünizasyon sonrası gerçekleştirilen füzyon çalışmalarına ait sayısal veriler ve elde edilen hibridoma sayıları	90
Çizelge 4.2.	Antikorların RBD proteinini nötralize edebilme yüzdeleri	107
Çizelge 4.3.	Yerli ve yeni enzimin antikor sindirimi çalışılmalarında kullanılan tampon içerikleri	125

Çizelge 4.4. Yerli ve yeni enzimin antikor sindirimi çalışılmalarında kullanılan tampon içerikleri 2 126
Çizelge 4.5. Füzyon çalışmalarına ait bilgiler 133
Çizelge 4.6. Monoklonal antikorların immünoglobulin alt izotipleri 136
Çizelge 4.7. Tavşan füzyon çalışmalarının bilgisi 148

1. GİRİŞ

Koronavirüsler, insanlarda ciddi solunum yolu hastalıklarına neden olan, hayvanlardan insanlara bulaşabilen zoonotik bir virüs ailesidir. Bu virüs ailesi, Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS-CoV) ve Ağır Akut Solunum Sendromu (SARS-CoV) gibi pandemilere yol açabilme potansiyeline sahiptir. 2019'un sonlarında, Çin'in Wuhan şehrinde başlayan ve hızla dünya çapında yayılan COVID-19 pandemisi, SARS-CoV-2 virüsü tarafından tetiklenmiştir. Bu virüs, koronavirüsler arasında yüksek ölüm oranları ve bulaşıcılık özellikleriyle dikkat çekmektedir (Zhu ve ark., 2020; Huang, C. ve ark., 2020; Wang, Q. ve ark., 2020).

Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan'da sebebi açıklanamayan pnömoni olguları ortaya çıkmaya başlamış ve yapılan araştırmalar sonucunda bu pnömoni vakalarının daha önceden tanımlanan yeni bir tip koronavirus olduğu belirlenmiştir. Koronavirus hastalığı 2019'a (veya COVID-19) sebep olan yeni tip Betakoronavirus geçici olarak "2019 yeni koronavirus (2019-nCoV)" olarak adlandırılmış ve daha sonra Uluslararası Virüslerin Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından "şiddetli akut solunum sendromu koronavirus 2 (SARS-CoV-2)" olarak yeniden isimlendirilmiştir. Bir dizi solunum yolu enfeksiyonuna sebep olan ve hızla tüm kıtalara yayılan COVID-19, 17 Şubat 2020'de Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) ve ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından yapılan gözetim uyarınca, beş ana kıtada 29 ülke arasında 71 333 vaka rapor edildi ve neredeyse hepsi Çin'de olmak üzere 1 775 ölüm vakası ile ölüm oranı ise %2–2,3 arasında belirtilmiştir (Wang, C. ve ark., 2020). SARS-CoV-2 tarafından tetiklenen COVID-19 pandemisinin yol açtığı yüksek vaka ve ölüm oranları nedeniyle, dünya genelinde bu salgına karşı etkili olabilecek aşı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar büyük bir önem kazanmıştır.

COVID-19 pandemisine karşı mücadelede aşı geliştirme çalışmalarının yanı sıra, virüsü nötralize edebilen antikorlar üzerine de araştırmalar yapılmaktadır. Bu antikorlar, virüsün hücrelere bağlanmasını ve dolayısıyla enfeksiyonu engelleyebilir. Özellikle, SARS-CoV-2'nin hücre yüzeyi reseptörü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE-2) ile etkileşime giren Spike proteinine karşı geliştirilen nötralizan antikorlar, virüsün insan hücrelerine girişini engelleyerek enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisi açısından potansiyel bir strateji sunmaktadır (Xu ve ark., 2020).

Bu bağlamda, SARS-CoV-2'ye karşı nötralizan antikorlar ve anti-idiyotipik antikorlar üzerine gerçekleştirilen çalışmalar dikkate değerdir. Nötralizan antikorlar, virüsün hücrelere bağlanmasını engelleyerek veya virüs parçacıklarını doğrudan nötralize ederek enfeksiyonu önleyebilir (Strohl ve ark., 2022). Öte yandan, anti-idiyotipik antikorlar, birincil antikorların (nötralizan antikorların) antijen bağlayıcı bölgelerine karşı geliştirilen ikincil antikorlardır (Liu ve ark., 2022). Bu antikorlar ise virüsün antijenik bölgelerinin taklit edilmesi yoluyla, bağışıklık sistemini eğitebilir ve virüse karşı koruyucu bir yanıt oluşturabilir (Klasse ve ark., 2020). Dolayısıyla, anti-idiyotipik antikorlar, alternatif bir aşı geliştirme stratejisi olarak kullanılabilmektedir. Bu yaklaşımın amacı, virüse karşı doğrudan etki gösteren antikorlar yerine, virüsün antijenik yapısını taklit ederek bağışıklık sisteminin virüse karşı aktif bir yanıt geliştirmesini sağlamaktır.

Mart 2020'de yapılan bir çalışma, SARS-CoV-2 virüsünü nötralize eden ilk insan nötralizan antikorunun geliştirildiğini duyurmuş ve bu antikorların virüsün insan hücrelerine bağlanmasını engellediğini göstermiştir (Pinto ve ark., 2020). Bu çalışmalar, COVID-19 'a karşı mücadelede nötralizan ve anti-idiyotipik antikorların geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Antikorlar, vücudun savunma sisteminin önemli unsurları olan B hücreleri tarafından üretilen özel proteinlerdir. Bu proteinler, virüs ve bakteri gibi yabancı mikroorganizmaları tanıyarak onları etkisiz hale getirebilir veya vücudun bağışıklık yanıtını harekete geçirebilir. Antikorların bu yeteneği, yabancı mikroorganizmalardaki belirli moleküllere spesifik olarak bağlanmaları sayesinde mümkündür. Günümüzde, belirli bir antijene karşı geliştirilen monoklonal antikorlar, laboratuvar ortamında yüksek miktarda üretilebilmektedir. Monoklonal antikor (mAb) üretimine dair ilk çalışmalar 1975 yılında başlamış ve hala gelişmeye devam etmektedir (Kohler, G., ve Milstein, 1975; Galfre ve Milstein, 1982). Bu çalışmalar aynı antijene yönelik farklı antikorları üretebilen hibrid hücre hatlarının elde edilebileceğini ortaya koymuştur. Monoklonal antikor teknolojisinin temeli, tek bir epitope özgü antikor üretebilen hibrid hücre hatlarının oluşturulması üzerine kuruludur. Bu hücre hatları, immunize edilmiş hayvanların dalak ve lenf düğümlerinden alınan antikor üreten B hücreleri ile myeloma hücrelerinin birleştirilmesiyle elde edilmektedir. Her bir hibrid hücre, genetik olarak aynı olup, ürettikleri monoklonal antikorlar ile tanımlanır. Monoklonal antikorların özgünlüğü,

homojenliği ve sürekli olarak üretilebilir oluşu, onları tanı amaçlı kitlerden hedefe yönelik tedavilere kadar geniş bir uygulama alanında değerli kılar. SARS-CoV-2'ye karşı nötralizan ve anti-idiyotipik antikorların geliştirilmesi ile pandemiyle mücadelede önemli bir yol olarak görülmektedir. Bu yaklaşımlar, virüsün hücrelere girişini engelleyerek veya bağışıklık sistemini virüse karşı eğiterek, enfeksiyonun önlenmesi ve tedavisi için yeni ve etkili stratejiler sunmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında yapılacak olan tez çalışmasının temel amacı, hibridoma teknolojisi kullanılarak SARS-CoV-2 virüsünün Spike proteininin Reseptör Bağlanma Bölgesi (RBD) bölümünü taklit eden anti-idiyotipik monoklonal antikorlar geliştirmek ve bu antikorların potansiyel bir anti-idiyotipik aşı adayı olarak kullanımını in vivo sistemde araştırmaktır. Bu hedef doğrultusunda, çalışma öncelikle farelerin SARS-CoV-2'nin Spike proteininin S1 ve RBD alt birimleri ile immunizasyonu ile başlanmıştır. Bu aşamada, immünizasyon öncesinde ticari kaynaklardan elde edilen SARS-CoV-2 protein/antijen örneklerinin saflık derecelerinin belirlenmesi amacıyla, ELISA ve Western Blot gibi immünolojik analiz teknikleri kullanılmıştır.

İmmünizasyon sürecini takiben, hibridoma teknolojisi kullanılarak S1 ve RBD'ye özgül primer antikor üreten B hücreleri ile myeloma hücrelerinin füzyonu gerçekleştirilmiştir. Bu süreç, özgül antikor üreten hibrid hücre klonlarının izolasyonu ve kültürlenmesi ile sonuçlandırılmıştır. Daha sonra, bu primer antikorlara karşı özgül olan ikincil (anti-idiyotipik) mAb'lerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Anti-idiyotipik mAb'ler, RBD'nin ACE-2 reseptörü ile etkileşimini taklit edebilme potansiyeline sahip olacak şekilde tasarlanmış ve bu sayede virüs girişini bloke eden ve/veya virüse karşı koruyucu bir immün yanıtı tetikleyebilen bir aşı adayı molekül olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir.

Anti-idiyotipik antikorlar, hibridoma teknolojisi kullanılarak geliştirilmiş ve elde edilen antikorların nötralizasyon etkinlikleri, in vitro deneylerle gösterilecektir. Bu aşamada, antikorların RBD'yi taklit edebilme kapasitelerinin yanı sıra, ACE-2 reseptörü ile etkileşimlerini bloke edebilme potansiyelleri de yarışımlı ELISA testi ile incelenmiştir. Son olarak, anti-idiyotipik mAb'lerin in vivo etkinliği, fare model sistemlerinde değerlendirilmiştir. Bu modellerde, antikorların SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı

koruyucu etkinliği ve immunojenik potansiyeli incelenmiştir. Bu in vivo çalışmalar, antikorların potansiyel bir aşı adayı olarak kullanımı için gerekli immünolojik bellek yanıtını tetikleyip tetikleyemediğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmanın nihai hedefi, RBD proteinini taklit eden anti-idiyotipik antikorların, SARS-CoV-2'ye karşı etkin bir bağışıklık yanıtı oluşturabilecek yeni nesil aşı adayları olarak potansiyellerini ortaya koymaktır. Bu yaklaşım, aşı geliştirme sürecinde yenilikçi bir strateji sunarak, COVID-19 gibi pandemik hastalıklara karşı daha hızlı ve etkili müdahalelerin önünü açmayı hedeflemektedir. Anti-idiyotipik antikorların kullanımı, aynı zamanda, virüsün mutasyonlara uğraması durumunda bile geniş spektrumlu koruma sağlama potansiyeline sahiptir, bu durum bu stratejiyi mevcut ve gelecekteki pandemilere karşı önemli bir araç haline getirecektir. Bu çalışma ile elde edilen bulguların, SARS-CoV-2'ye karşı mücadelede yeni bir yol haritası sunması ve aşı geliştirme çalışmalarına katkıda bulunması beklenmektedir.

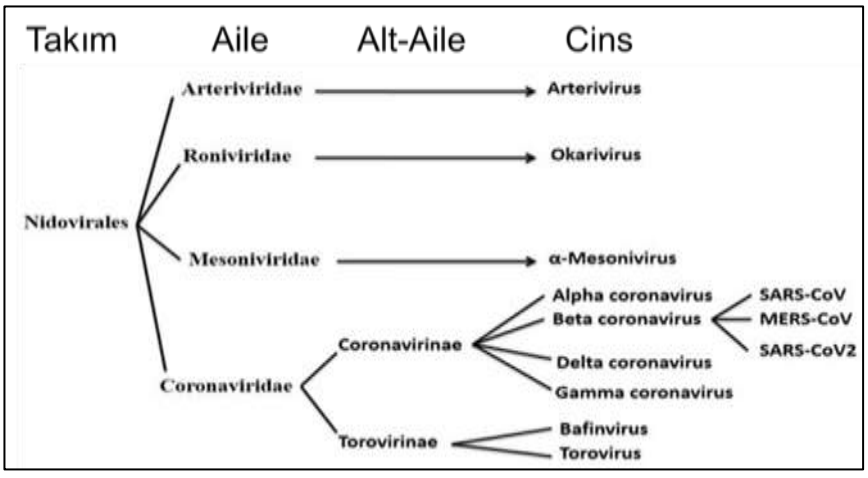
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. SARS-CoV Virüsü Genel Özellikleri

SARS-CoV virüsü diğer adıyla koronavirüsler zarflı, pozitif iplikçiğe sahip, tek sarmallı RNA virüsleridir. Koronavirüs, *Coronaviridae* ailesi ve *Orthocoronavirinae* alt ailesinin ortak adıdır. Bu alt aile *alfakoronavirüs*, *betakoronavirüs*, *gammakoronavirüs* ve *deltakoronavirüs* olan dört cinse ayrılmaktadır.

2.1.1. SARS-CoV virüsü sınıflandırması

Koronaviridae sınıflandırması (Şekil 2.1.), 3C benzeri proteinaz (nsp5), nidovirüs RdRp'ye bağlı nükleotidil transferaz (nsp12); RNA bağımlı RNA polimerazı (nsp12); çinko bağlayıcı bölge (nsp13); HEL1, süper aile 1 helikaz (nsp13) olmak üzere beş birleştirilmiş alanın alanın filogenetik analizlerine dayanır. Bu analizler, hizalamalar ve patristik mesafeler kullanılarak yapılan hiyerarşik kümelemeleri içerir. Aile, *Letovirinae* ve *Orthocoronavirinae* olmak üzere iki alt aileye ayrılır ve daha sonra dört cinse bölünür (ICTV, 2021). Bir virüs, bu korunan replikaz alanlarında *Coronaviridae* ailesindeki herhangi bir türle %46'dan fazla dizi benzerliği paylaşıyorsa, tanımlanmış cinse sınıflandırılır, aksi takdirde yeni bir cins temsilcisi olarak kabul edilir. Korunan replikaz alanlarında %90'dan fazla amino asit dizisi benzerliği olan virüsler aynı türün varyantları olarak kabul edilir (ICTV, 2011).

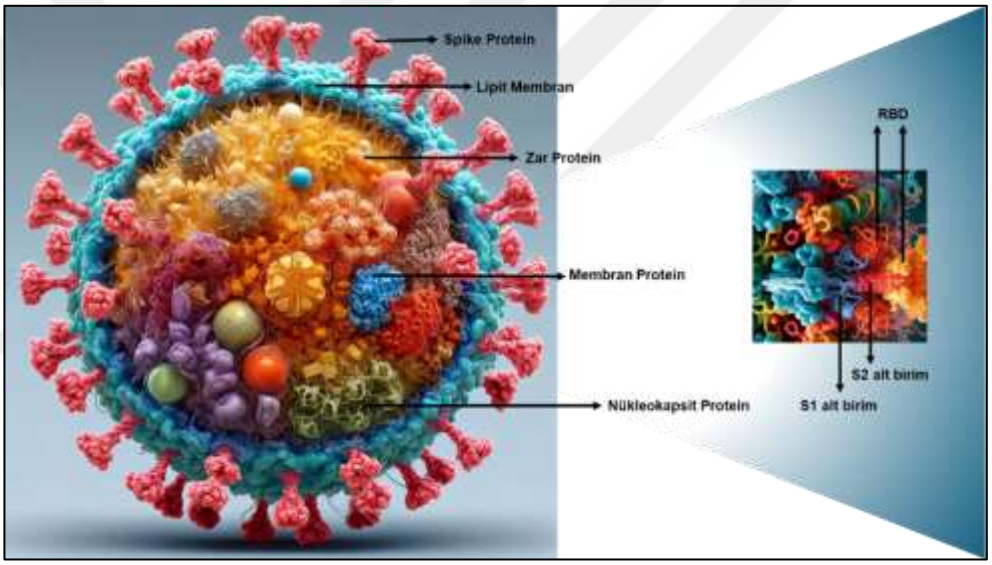


Şekil 2.1. Coronoviridae virüs sınıflandırması (Rehman ve ark., 2020'den değiştirilerek alınmıştır)

2.1.2. Koronavirüs yapısı

Koronavirüsler, elektron mikroskobundaki görününtülerinden esinlenerek isimlendirilir. Büyük küresel yüzeyleri, birer taçı andıran çıkıntılı proteinlerle kaplıdır. Latince "corona" kelimesi, bu ve benzer özellikteki virüsleri adlandırmak için kullanılmıştır. Koronavirüsler, zarla çevrili küresel parçacıklardır ve çapları genellikle 50 ila 200 nanometre arasındadır.

Koronavirüs parçacıkları dört yapısal proteini içerir: spike (S, spike) protein, membran (M, membrane) protein, zar (E, envelope) protein ve nükleokapsid (NP, nucleocapsid) proteinidir (de Wit ve ark., 2016) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. SARS-CoV-2 virüsünün yapısal proteinleri

Başak (Spike) protein (S), SARS-CoV-2'nin yüzeyinde çıkıntı yapan ve virüsün ev sahibi hücreye ilk bağlanma noktası olan homo-trimerik bir glikoproteindir. Bu protein, yaklaşık %77 oranında SARS-CoV S proteinine benzerlik gösterir ve virionun hücrelere girişi için insan ACE-2 reseptörüne bağlanmaktadır (Wang, Q. ve ark., 2020; Zhou, P. ve ark., 2020). 1.273 amino asit uzunluğundaki S protein, S1 ve S2 olmak üzere iki ana alt birimden oluşur (Şekil 2.2.). S1 alt birimi, reseptör tanıma ve bağlanmada, S2 alt birimi ise virüs ile hedef hücre zarlarının füzyonunda rol oynar. S proteininin RBD yapısı, reseptör bağlanmasının belirleyicilerini geçici olarak gizleyen veya açığa çıkaran menteşe hareketleri yapar (Walls ve ark., 2020; Wrapp, D. ve ark., 2020). Bu konformasyonel

değişkenlik, Coronaviridae ailesinde korunmuş gibi görünmektedir (Li, F., 2016). S proteininin S1/S2 sınırında, RRAR (Arjinin-Arjinin-Alanin-Arjinin) olarak dört amino asitlik bir ekleme bulunur ve bu ek, bir furin proteaz kesme yerini oluşturur. Bu ek kesme yeri, SARS-CoV-2'nin daha hızlı yayılmasında ve daha yüksek enfeksiyon oranında önemli bir rol oynamış olabilir (Walss ve ark., 2020). Koronavirüslerin reseptör tanıması, türler arası bulaşıcılık, patojenite ve ev sahibi tropizmi açısından kritik bir belirleyicidir (Li, F., 2016). SARS-CoV antikorlarının, SARS-CoV-2 RBD'leri ile çapraz tepki verebildiği gösterilmiştir (Wang, C. ve ark., 2020; Yuan ve ark., 2020). Dolayısıyla, S proteininin RBD'si, antikor aracılı nötralizasyon, aşı geliştirme ve diğer antiviral stratejiler için önemli bir hedeftir (Du ve ark., 2009).

Nükleokapsit (N) proteini, viral RNA'yı helikal ribonükleokapsit (RNP) içine paketleyen ve virionların montajı sırasında diğer yapısal proteinlerle etkileşime giren önemli bir yapısal proteindir (Chang, C. ve ark., 2013; He ve ark., 2004; Zhao, X. ve ark., 2008). Yüksek oranda üretilen ve güçlü bir şekilde immünojenik olan N proteini, aşı geliştirme için etkili bir hedeftir (Padron-Regalado, Shang ve ark., 2005; Zeng ve ark., 2020). SARS-CoV-2 N proteini, iki yüksek oranda korunmuş bölge içerir: N-terminal RNA bağlama bölgesi (N-NTD; 46–174) ve C-terminal dimerizasyon bölgesi (N-CTD; 247–364), bunlar serin/arginin zengini ve yoğun şekilde fosforile bir bağlayıcı bölge ile ayrılır (Kang ve ark., 2020; Ye ve ark., 2020).

SARS-CoV-2 N proteinin kristal yapıları, N-NTD ve N-CTD'nin SARS-CoV yapılarına benzer olduğunu ve N proteini oligomerizasyonunun gRNA'nın kapside paketlenmesi için gerekli olduğunu gösterir (Kang ve ark., 2020; Dinesh ve ark., 2020; Chen C. ve ark., 2007; Huang, Q. ve ark., 2004; Tan ve ark., 2006; Zhou, M. ve Collisson, 2000; Fan ve ark., 2005; Yu ve ark., 2006). N proteininin oligomerizasyonu ve nükleokapsit oluşumu üzerine olan etkileri IBV (Infectious Bronchitis Virüs) N proteini için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Fan ve ark., 2005; Jayaram ve ark., 2006). Önerilen çoklu kendiliğinden birleşme, virion içinde sıkı paketleme için nükleokapsitte eğrilik oluşturmak için gereklidir. Esnek bağlayıcı bölge, viral gRNA'nın bu alt birimler tarafından sarılmasını sağlayacak şekilde NTD ve CTD fibrillerinin birbirine yakın durmasını sağlayabilir (Jayaram ve ark., 2006).

Membran (M) and Zarf (E) proteinleri, Koronavirüsler, ERGIC'in (Endoplasmic-Reticulum–Golgi Intermediate Compartment, Endoplazmik-Retikulum-Golgi Ara Bölgesi) lümenlerinde toplanır ve ekzositoz yoluyla salınır (Ujike ve ark., 2015). Yapısal proteinler M, E ve S, taşıma sinyal dizilerine sahip olup ER'de (Endoplazmik-Retikulum) birikirler. Bu proteinlerin ve ribonükleoprotein kompleksinin etkili bir şekilde dâhil edilmesi, yeni virion parçacıklarının olgunlaşması ve toplanması için esastır (Satarker ve ark., 2020). M ve E proteinleri, virionun bağlanmasını düzenlemede ana rol oynarlar. Her iki protein de β-koronavirüslerde korunmuş ve SARS-CoV homologlarıyla %90'dan fazla dizilim benzerliği taşırlar.

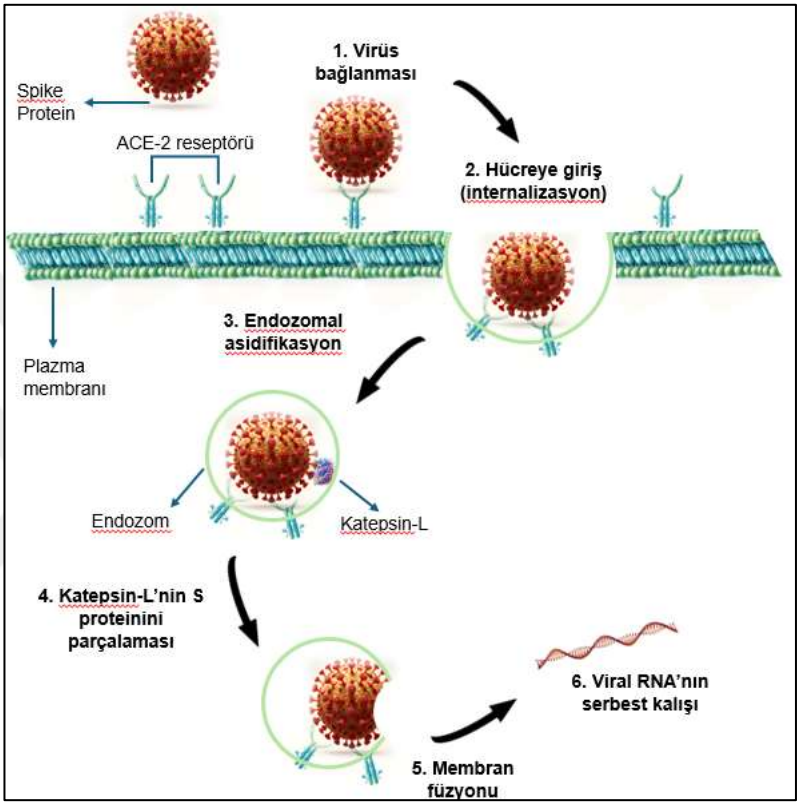
SARS-CoV-2 M proteini, tip III transmembran bir glikoprotein olan 222 amino asit uzunluğunda ve en bol bulunan yapısal proteindir. M proteini, üç ana bölgeye sahiptir: N-terminal ektodomeni, ardından üç transmembran sarmalı (TMH1-TMH3) ve C-terminal endodomeni. M proteini, kendisiyle (homotipik) ve diğer yapısal proteinler S, E ve N ile (heterotipik etkileşim) etkileşir. (Ujike ve ark., 2015).

2.1.3. Koronavirüs yaşam döngüsü

Koronovirüs hücre içerisine iki farklı mekanizma kullanarak girebilir Bunlar endozomal giriş mekanizması ve hücre yüzeyi giriş mekanizmasıdır (Jackson ve ark., 2022).

Endozomal giriş mekanizması (Şekil 2.3.), ilk aşamada, SARS-CoV-2'nin yüzeyinde bulunan Spike proteinleri, konak hücrelerin yüzeyindeki ACE-2 reseptörlerine bağlanır. Ardından, S-proteini ve ACE-2 reseptörü arasındaki bağlanma, hücrede bir sinyal mekanizmasını tetikler. Bu sinyal, hücre membranının virüsü içine alacak şekilde bükülmesine ve virüsü endositoz adı verilen bir süreçle hücre içine çekmesine neden olur. Endositoz ile vrüs, hücre zarından içeri çekildikten sonra, endozomal kesecikler içinde hapsolur. Bu kesecikler, hücre içindeki bir dizi vesikül taşıma sisteminin bir parçasıdır. Endozomal kesecikler, hücre içinde daha asidik bir ortam oluşturmak için pH'larını düşürürler. Bu düşük pH, endozom içindeki katepsin L aktivasyonunu sağlar. Bu enzim virüsün S-proteinini parçalar ve konformasyonel değişikliklere yol açar. Parçalanma ile S-proteininde meydana gelen değişiklikler, viral zarın endozomal zar ile kaynaşmasını kolaylaştırır.

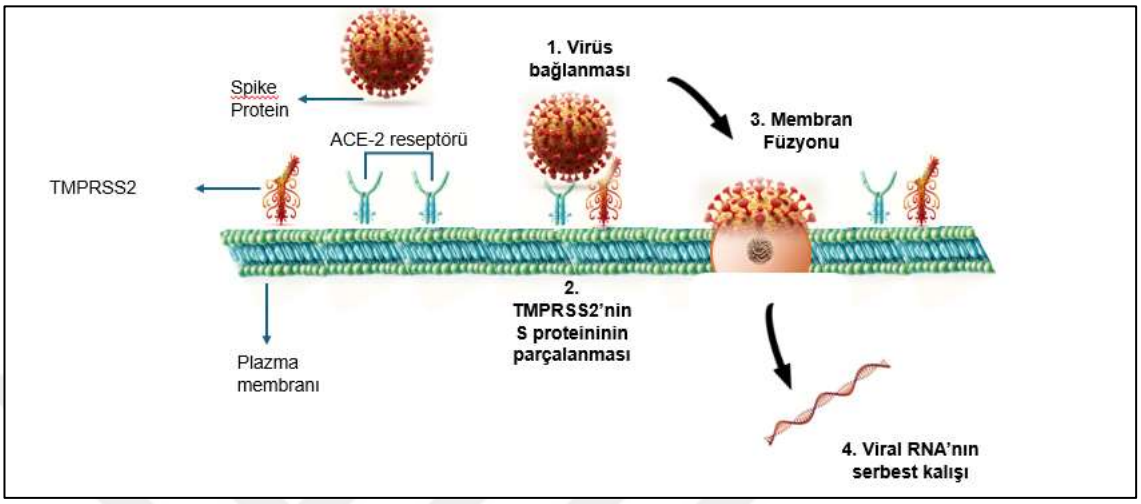
Bu füzyon, virüsün genetik materyalinin (RNA) endozomal kesecikten hücre sitoplazmasına salınmasına olanak tanır. Füzyon sonucunda, virüsün RNA genomu hücre sitoplazmasına serbest bırakılır. Bu RNA, hücredeki ribozomlar tarafından kullanılarak virüsün yeni kopyalarının üretimi için gerekli proteinlerin sentezini başlatır. (Fehr ve Perlman, 2015; V'kovski ve ark., 2021).



Şekil 2.3. SARS-CoV-2 virüsünün hücreye endozomal giriş mekanizması

Hücre yüzeyi giriş mekanizması (Şekil 2.4.), SARS-CoV-2, yüzeyindeki Spike proteini konak hücreye bağlandıktan sonra bu bağlanma, virüsün hücreye girmesi için gerekli olan ilk adımdır. Daha sonra ACE-2 reseptörüne bağlanan S-proteini, hücre yüzeyinde bulunan TMPRSS2 (Transmembran Serin Proteaz 2) adlı bir enzim tarafından tanınır ve bu enzim tarafından kesilir. Bu proteolitik kesim ile S-proteininde konformasyonel değişiklikler olur. TMPRSS2'nin kesmesi, S-proteinini aktif hale getirir ve bu protein, hücre zarına füzyon yapabilecek duruma gelir. Kesim, S1 ve S2 alt birimlerinin ayrılmasını sağlar ve S2 alt biriminde bulunan füzyon peptidinin açığa çıkmasına neden olur. Aktive olan S-proteini, viral zarın konak hücrenin plazma zarı ile füzyon yapmasını sağlar. Bu füzyon, viral zar ve hücre zarı arasında bir açıklık oluşturarak virüsün genetik materyalinin (RNA)

hücre sitoplazmasına geçmesine olanak tanır. Bu RNA, hücre ribozomları tarafından kullanılarak virüsün yeni kopyalarının üretimi için gerekli proteinlerin sentezini başlatır (Jackson ve ark., 2022; V'kovski ve ark., 2021; Bestle ve ark., 2020).

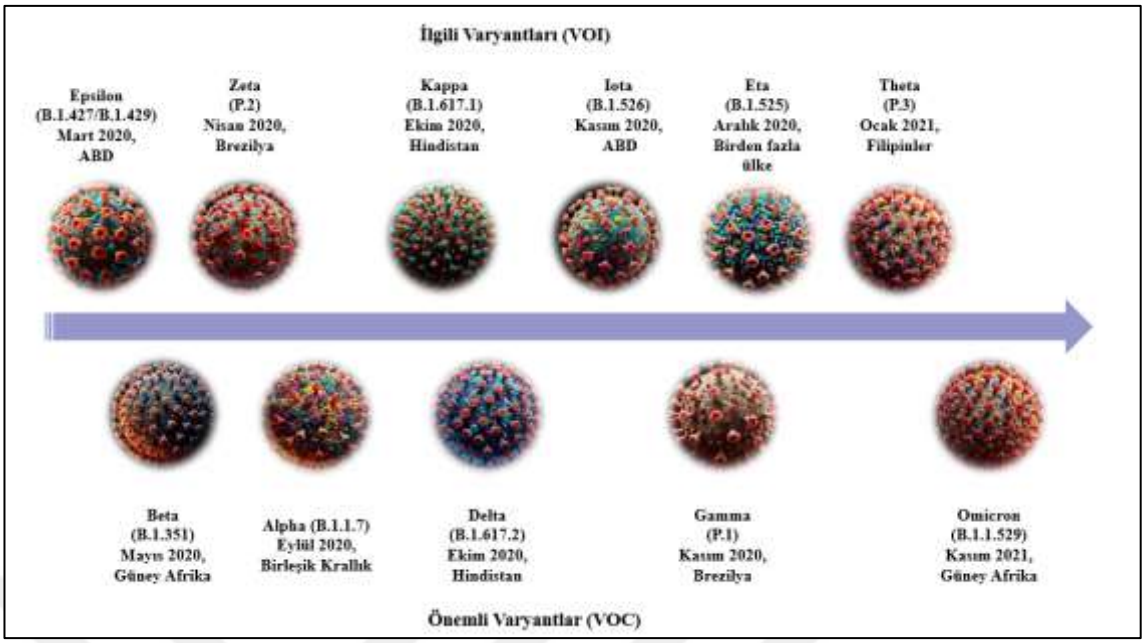


Şekil 2.4. SARS-CoV-2 virüsünün hücre yüzeyi giriş mekanizması

TMPRSS2 aracılığıyla gerçekleşen hücre yüzeyinden giriş mekanizması, SARS-CoV-2'nin hücrelere hızlı ve doğrudan girmesine olanak tanır. Bu mekanizma, virüsün hızlı yayılmasını ve enfeksiyonun hızla başlamasını sağlar. TMPRSS2'nin bu süreçteki kritik rolü, potansiyel tedavi hedefleri arasında yer alır; TMPRSS2 inhibitörleri, virüsün hücrelere girişini engelleyebilir ve enfeksiyonun yayılmasını yavaşlatabilir.

2.2. SARS-CoV-2 Varyantları

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC), gelişen bu manzara karşısında, varyantları İlgili Varyantlar (VOI) ve Önemli Varyantlar (VOC'lar) olmak üzere kategorilendirmiştir (Şekil 2.5.). Bu sistemli yaklaşım, çeşitli varyantların daha hedefli kamu sağlığı yanıtlarına olanak tanıyarak, SARS-CoV-2 varyantlarının küresel sağlık krizi üzerindeki etkisini etkili bir şekilde yönetmeyi ve azaltmayı amaçlamaktadır (Flores-Vega, 2022).



Şekil 2.5. SARS CoV-2 varyantları

VOI'ler ise virüsün bulaşma kapasitesi, zarar verme potansiyeli üzerinde değişikliklere neden olan belirli genetik belirteçlere sahiptir; doğal yolla ya da aşılamayla kazanılan antikorlara karşı direnç gösterme, tespitten sıyrılma kabiliyeti veya mevcut tedavi yöntemleri ve aşıların etkinliğinde düşüş gibi etkileri bulunur. VOI'lar arasında Epsilon (B.1.427 ve B.1.429); Zeta (P.2); Eta (B.1.525); Theta (P.3); Iota (B.1.526); Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) ve Mu (B.1.621) yer alır.

Küresel kamu sağlığına artan tehdit olan SARS-CoV-2 varyantlarının ortaya çıkması, COVID-19 pandemisini kontrol etme çabaları için önemli bir zorluk oluşturmuştur. Bu varyantlar arasında, artan bulaşıcılık potansiyeline, aşı veya terapötik müdahalelere karşı azalmış duyarlılığa ve daha yüksek virülansa sahip olma potansiyeline sahip bir alt küme, VOC'lar olarak belirlenmiştir. Bu varyantlar Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) ve Omicron (B.1.1.529)'dur. VOC'lar, artmış virülans veya bulaşıcılık, aşılamadan veya önceki enfeksiyondan gelen antikorlar tarafından azalmış nötralizasyon, tespit edilme kaçınılırlığı veya aşı etkinliliğinin azalması gibi özellikler gösterir.

Alfa varyantı (B.1.1.7), ilk olarak Aralık 2020'nin sonlarında Birleşik Krallık'ta tanımlanmış ve hızla artan bulaşıcılığıyla ün kazanmıştır; önceki SARS-CoV-2 varyantlarından %43 ila %82 daha yüksek bir bulaşıcılığa sahip olduğu belirtilmiştir.

Aralık 2020'nin sonuna gelindiğinde, Alfa varyantı varlığını Birleşik Devletler'de de gösterdi ve bu, küresel etkisinin başlangıcını işaret etmiştir (Volz ve ark., 2021; Galloway ve ark., 2021).

Beta varyantı (B.1.351), Ekim 2020'de Güney Afrika'da görülen varyant, birçok spike mutasyonuyla öne çıkmış ve COVID-19'un ikinci dalgasında önemli bir rol oynamıştır. Beta varyantının Ocak 2021'in sonuna kadar ABD'de tespit edilmiş olması, yüksek bulaşma riski ve iyileşen/ aşı sonrası serumlarla ve monoklonal antikor tedavisiyle nötralizasyona karşı azalmış duyarlılık nedeniyle endişeleri artırmıştır (Cerutti ve ark., 2021; Tegally ve ark., 2021).

Gama varyantı (P.1), Aralık 2020'de Brezilya'da keşfedilen ve Ocak 2021'de ABD'de rapor edilen varyant, iyileşen/aşı sonrası serumlar ve monoklonal antikor tedavisine karşı potansiyel olarak azalmış nötralizasyon göstermiş ve SARS-CoV-2 varyantları manzarasını daha da karmaşık hale getirmiştir (Faria ve ark., 2021).

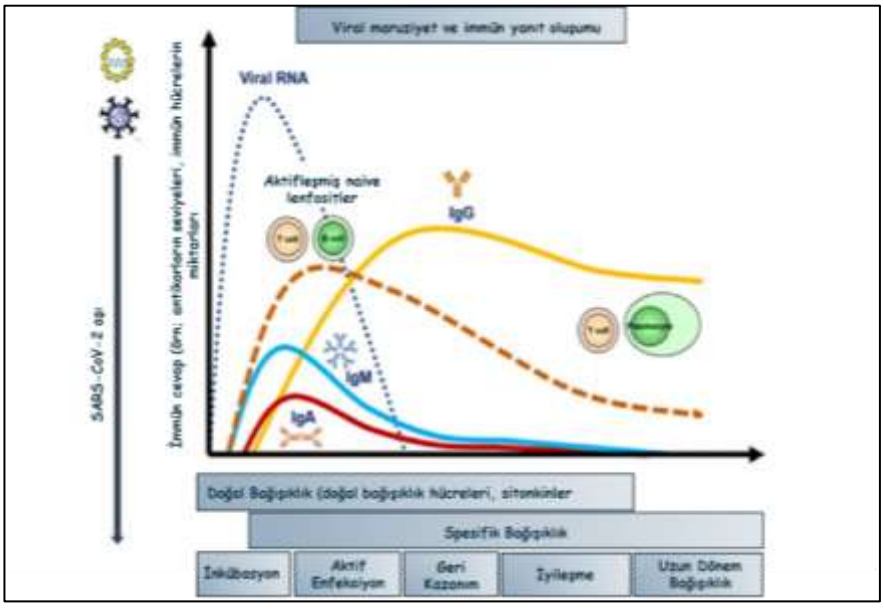
Delta varyantı (B.1.617.2), ilk olarak Aralık 2020'de Hindistan'da tanımlanan varyant Nisan 2021'de Hindistan'daki yıkıcı ikinci dalganın katalizörü olarak ün kazanmıştır. Başlangıçta bir VOI olarak sınıflandırılan, ancak hızla küresel yayılması nedeniyle WHO'nun Mayıs 2021'de bir VOC olarak yeniden sınıflandırılmasına neden olan bu son derece bulaşıcı varyant, Birleşik Devletler ve Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde yayıldı (Lele ve ark., 2024).

Omicron varyantı (B.1.1.529), VOC'lar listesine en son eklenen varyant, 24 Kasım 2021'de ilk olarak Güney Afrika'da bildirilmiştir. İki gün içinde WHO, Omicron'u bir VOC olarak ilan etmiş hatta Delta varyantını aşan yüksek mutasyon yüküne dikkat çekmiştir. İtalyan bilim adamlarının 3D görüntü analizi, insan hücrelerine viral giriş için kritik olan spike (S) proteininde yoğun mutasyonları vurgulamıştır. Omicron varyantının vakaları hızla küresel olarak yayılmış, geniş çapta endişe yaratarak birçok ülkede sıkı seyahat kısıtlamalarını tetiklemiştir.

Bu VOC'ların sürekli olarak izlenmesi ve anlaşılması, her geçen gün değişen viral manzara karşısında halk sağlığı önlemlerini uyarlamak ve aşılama stratejilerini iyileştirmek için hayati öneme sahip hale gelmiştir (WHO 2021; Sankaran ve ark., 2021).

2.3. Viral Proteinin Antijenitesi

SARS-CoV-2 genomu, S proteini, M proteini ve E proteininden oluşan zarfta bulunan NP proteini ile ilişkilidir. Bu üç yapısal proteinin açığa çıkmasıyla bunların antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından yakalanabileceğinden ve humoral tepkileri daha kolay tetikleyebileceğinden şüphelenilmiştir. Ancak araştırmacılar, NP proteininin aynı zamanda güçlü humoral bağışıklık tepkisini de tetikleyebileceğini bulmuştur. İyileşen COVID-19 hastalarında B hücresi epitoplarının tanımlanmasıyla antikor bağlanma profilleri, S ve NP proteinindeki epitopların baskın olduğunu, ardından M proteininin geldiğini, ancak E proteininde epitop bulunmadığı gösterilmiştir (Heffron ve ark., 2021). SARS-CoV-2'ye ilk maruz kalmanın ardından semptomlar bir ila on dört gün içinde gelişmektedir. Spesifik SARS-CoV-2 karşıtı IgM ve IgG antikor seviyeleri kademeli olarak artmaktadır. IgM antikoru semptomların ortaya çıkmasından üç gün sonra tespit edilebilmekte ve iki ila üç hafta içinde zirveye ulaşmaktadır. IgA ve IgG antikorları da semptom başlangıcından dört gün sonra tespit edilebilmekte ve iki hafta sonra en yüksek düzeyine ulaşmaktadır (Lee, C. ve ark., 2020). Antikor yanıtı ile ilgili bir Kohort çalışmasında hem IgG hem de IgM için anti-RBD seropozitifliği çoğu hasta örneğinde anti-NP'den daha erken olduğu gözlemlendi. (To ve ark., 2020) (Şekil 2.6.).



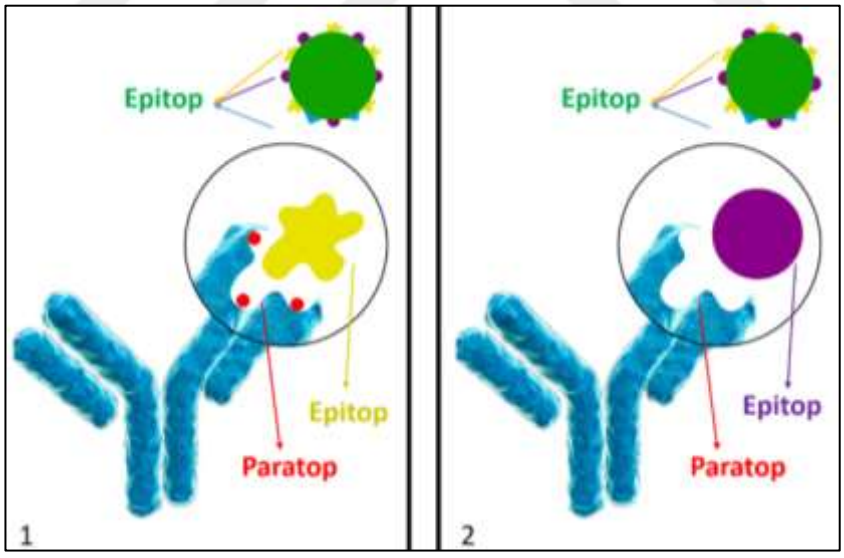
Şekil 2.6. SARS-CoV-2 ile karşılaştıktan sonra bağışıklık tepkisi gelişiminin dinamikleri (Slabakova, 2022'den değiştirilerek alınmıştır)

2.4. Antikor-Antijen Kavramı

Antijenler (Ag), vücudumuza yabancı olan her türlü belirteçlere (bakteri, virüs, mantar, toksin vb) karşı bağışıklık sistemi tarafından antikor üretimine yol açan yabancı moleküllerdir.

Antikorlar (Ab), bağışıklık sisteminin onu yok etmek üzere programlanmış olan B hücreleri tarafından kanda dolaşan yabancı maddeleri tanıyarak bunları etkisiz hale getiren glikoprotein yapıda moleküllerdir.

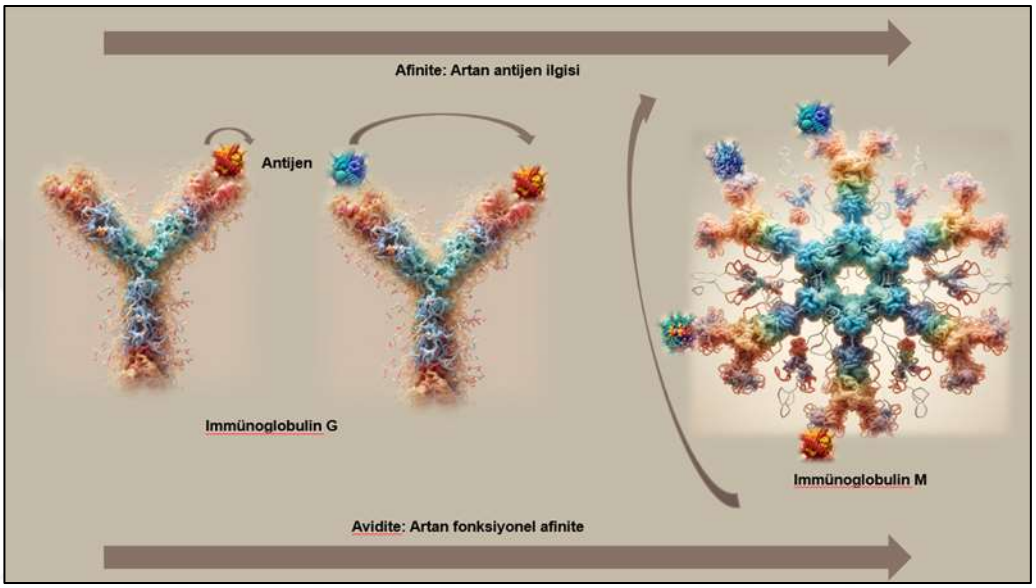
Antijen ile antikor birleşmesi, yüksek özgüllükte tersinir biyokimyasal bir protein-protein birleşmesi reaksiyonudur. Bu birleşme; epitop denilen antijenik determinant grupları ile antikorun aminoterminal kısmındaki paratop determinant grupları arasındaki sıkı temasa bağlı olarak gerçekleşir (Şekil 2.7.). Determinantlar tam olarak uygun değilse birleşme yavaş ve gevşek olur. Antijen-antikor birleşmesi spesifik ve selektif bir olaydır. Çünkü belli bir antikor, değişik antijenler karşısında seçici olarak sadece kendisine uyan antijenle birleşir.



Şekil 2.7. Epitop ve paratop bölgelerinin ilişkisi

Antijen ile antikor arasındaki birleşme amino asitlerinin, kovalent (ortak elektron çiftleri ile oluşan) bağlar aracılığı ile değil, elektrostatik, Van der waals kuvveti, hidrojen bağları ve hidrofobik bağlar gibi nisbeten zayıf ve kısa menzilli güçlerle etkileşmesi sonucu sağlanır.

Bağlanma enerjisinin büyüklüğü, antijen ile antikorun bağlanma bölgesi arasındaki uyuma bağlıdır ve bu, antikorun o antijene olan afinitesi olarak adlandırılır. "Afinite" terimi genellikle antijenik olarak homojen bir molekül (örn. hapten) için tek bir antikor bölgesini ifade eder. Proteinler birçok antijen determinantı içerdiğinden, "avidite" terimi genellikle bu tür moleküller tarafından indüklenen heterojen antikorların antijen bağlamasını karakterize etmek için kullanılır (Actor ve ark., 2012) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Antikorların afinite ve avidite özellikleri

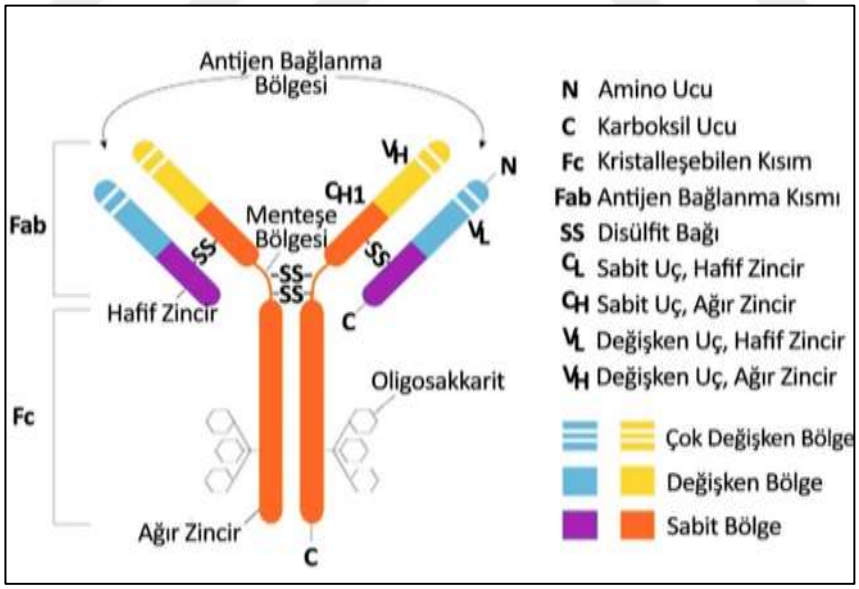
Antikorların ortalama afinitesi (aviditesi), çoğu immünokimyasal teknikte önemli bir yönüdür. Antijen immünoassaylerinde yüksek afiniteli antikorları kullanır. Bu, özellikle radyoimmünoassay'de testin hassasiyetinin esas olarak kullanılan antikorların afinitesine bağlı olduğu durumlarda önemlidir. Düşük afiniteli antikorlar antijenleri saflaştırmak için daha uygundur. Bu, düşük afiniteli antikorun antikor-antijen kompleksinin nispeten hafif koşullar altında ayrılmasına izin verdiği için böyledir. Antikorlar çözünmez bir matrise bağlandığında, aviditede önemli değişiklikler olmaz (Ruoslahti, 1976).

Jerne'nin antijen-antikor etkileşimleri hipotezi (Jerne, 1974), memeli bağışıklık sisteminin, antikorlar ve onların anti-antikorları (anti-idiyotipik antikorlar) oluşan bir ağdan oluştuğunu anlamamızı sağladı. Antikor molekülünün antijen bağlama bölgesi (antikoru benzersiz yapan) bireyin bağışıklık sistemi tarafından tanınabilir ve molekülün

değişken bölgesinin genleri tarafından kodlanan bölümleri tanıyan antikorları indükleyebilir.

Deneyler, bu kavramın deneysel sistemlerdeki geçerliliğini, bir anti-idiyotipin bir virüse özgü antijen olarak bir aşı olarak kullanılabileceği fikrine yol açmıştır (Finberg ve Ertl, 1986).

Antikorlar, bağışıklık sistemimizde önemli bir rol oynayan Y şeklindeki simetrik globulinlerdir. Bu moleküller, antijen bağlayıcı bölge (Fab) ve kristalize olabilen bölge (Fc) fragmanlardan oluşur (Şekil 2.9.). Antikorlar, farklı antijen bağlama özelliklerini sergileyebilecek çeşitli adsorpsiyon mekanizmalarını uygular. Örneğin, Fab-up (Fc'ye yakın) konfigürasyonuna sahip antikorlar, Fab-down (Fab'a daha yakın), yan (Fc veya Fab'lardan birine daha yakın) ve düz (Fc'ye ve iki Fab'a daha yakın yüzeye) konfigürasyonlarındaki antikorlara kıyasla daha yüksek tanıma performansı gösterebilir. Bu nedenle, hareketsizleştirilmiş antikorların spesifik tanıma işlevlerini ve yönelimlerini doğru bir şekilde düzenlemek, modifiye edilmiş yüzeyler geliştirmek için kritik öneme sahiptir (Wang, L. ve ark., 2023).



Şekil 2.9. İmmunoglobulin genel yapısının gösterilmesi

Antikor-antijen etkileşimleri, bağışıklık sisteminin temel mekanizmalarından birini oluşturur ve birçok immünojenik molekülün (antijen) tanınması ve bağlanmasında önemli bir rol oynar. Bu etkileşimler, hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılan immüno-

screening gibi uygulamalarda kritik bir öneme sahiptir. Monoklonal antikorlar, yüksek spesifiklikleri sayesinde, antijenleri hedef alabilir ve çeşitli işaretleyiciler kullanılarak tespit edilebilir (Mukerjee ve ark., 1998).

Antijenler, vücudun bağışıklık yanıtını uyaran patojenler (örneğin, virüsler, bakteriler, mantarlar) ve alerjenler (örneğin, polen, sporlar, gıda katkı maddeleri) olarak iki genel kategoriye ayrılır.

Antikor ve antijen arasındaki bağlanma enerjisinin büyüklüğü, bağlanma siteleri arasındaki uyuma, yani antikorun afinite derecesine bağlıdır. (Absolom ve ark., 1986). Atomic force microscopy (AFM) kullanılarak yapılan bir çalışma, IgG antijeni ve anti-IgG antikoru arasındaki spesifik etkileşimleri gözlemleyerek, bağlanma sayıları, alanları ve süreci sırasındaki konformasyonel değişiklikleri açığa çıkarmıştır, bu da teknolojinin çeşitli antikor-antijen etkileşimlerini ve biyo-makromoleküler sistemleri incelemek için potansiyelini vurgulamıştır (Zhang, P C. ve ark., 1997).

Antikor-antijen kompleksini birleştiren kuvvetler, güçlü kovalent bağlar yerine zayıf etkileşimlerdir (Reverberi, R. ve Reverberi, L., 2007). Ayrıca, artırıcı antikorlar olarak bilinen antikorların, antikor-antijen ve idiotipik-anti-idiotipik antikor etkileşimlerini güçlendirebileceği ve bağışıklık yanıtında düzenleyici ve efektör roller oynayabileceği belirtilmiştir (Nemazee ve Sato, 1982).

Bu etkileşimlerin anlaşılması, antikorların ve aşıların tasarımına yön vermede kritik öneme sahiptir. Antijen-antikor etkileşimlerinin özellikleri hakkında derinlemesine bilgi edinmek, hastalıkların daha etkili bir şekilde teşhis edilmesi ve tedavi edilmesine olanak tanır.

2.5. Monoklonal Antikor Üretimi

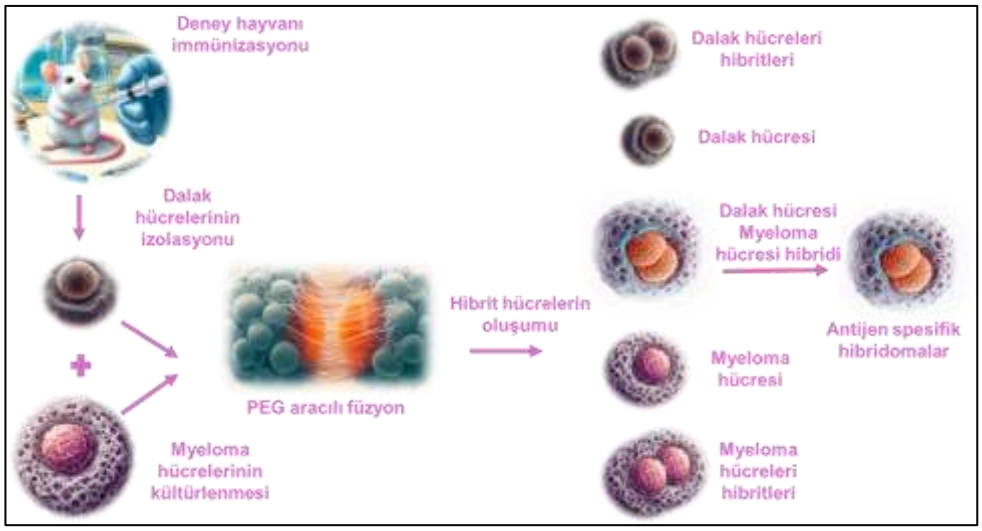
Monoklonal antikorlar (mAb'ler), belirli bir epitope özgü immünoglobulinlerdir ve genellikle antikor üretiminden sorumlu plazma hücrelerini klonlayarak üretilirler (Kohler, G. ve Milstein, 1975). Poliklonal antikorlar ise, farklı B hücre klonları tarafından üretilen ve bir antijenin farklı epitoplarını tanıyabilen antikorların heterojen bir karışımıdır (Lee, L. ve ark., 2021). İlk monoklonal antikorlar, fare dalak hücrelerinin miyeloma hücreleriyle füzyonu sonucu elde edilen hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilmiştir.

Bu yöntemle üretilen fare kaynaklı monoklonal antikorlar, araştırma ve diagnostik alanlarda önemli bir yer tutmuştur.

1975'te tanımlanan monoklonal antikor üretim yöntemi, belirli bir antijenin epitopuna karşı özgül, tek tip antikor üreten hibridoma hücre geliştirilmesi teknolojisini içerir. Bu yöntem, öncelikle fareler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kohler, G. ve Milstein, 1975). Yöntem, immünize edilmiş bir fare dalağından alınan aktif B hücrelerinin, ölümsüz miyeloma hücreleri ile birleştirilmesi ve böylece hibrid hücrelerin oluşturulması esasına dayanır. Oluşturulan hibridoma hücreleri, hem laboratuvar ortamında (*in vitro*) hem de farelerde (*in vivo*) çoğaltılarak monoklonal antikor üretimi için kullanılır. Fare karın boşluğunda asitik sıvı içinde monoklonal antikor üretimi, klasik hücre kültürü yöntemlerine göre maliyet avantajı sunar. Günümüzde, üretimin laboratuvardan endüstriyel ölçeğe taşınması amacıyla hücre fabrikaları veya biyoreaktörler gibi sistemlerin kullanımı ve rekombinant fare monoklonal antikorların ekspresyon sistemleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Kelley, 2009). Monoklonal antikorların tanı ve tespit sistemlerinde kullanımları ile, kanser, otoimmün hastalıklar, transplantasyon sonrası immünsüpresyon ve bulaşıcı hastalıklar gibi alanlarda hedefe yönelik tedavilerde kullanılmalarını sağlayacak moleküler mühendislikte de önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Hansel ve ark., 2010).

2.5.1. Hibridoma teknolojisi

Hibridoma teknolojisi, monoklonal antikorlar üretmek için kullanılan en başarılı yöntemdir (Şekil 2.10.). Hibridoma hücreleri, sınırsız miktarda antikor üretirler ve değişken ağır zincir ve hafif zincirin doğal eşleşmesini korurlar.



Şekil 2.10. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi

Hibridoma teknolojisinin ilk adımı Balb/C farelerinin immünizasyonudur. Hedef antijen, Freund'un adjuvanıyla birlikte hayvanlara enjekte edilerek bağışıklık yanıtı indüklenir. Freund'un tam adjuvanı (FCA) genellikle yalnızca ilk immünizasyonda kullanılırken, Freund's un tamamlanmamış adjuvanı (FIA) sonraki immünizasyonlar için kullanılır. Füzyondan üç ila beş gün önce, antijene spesifik lenfositlerin sayısının artmasından kaynaklanan antikor titresini arttırmak için genellikle son bir takviye/rapel immünizasyon gerçekleştirilir. Antikor titresini test etmek için toplanan serum örneklerine ELISA testi yapılır. Hibridoma hücrelerinin ürettiği antikorların varlığını ve bu antikorların istenilen spesifik hedeflere (antijenlere) bağlanma yeteneklerini değerlendirmek için dolaylı ELISA testi kullanılır. Hibridomaları destekleyen büyüme faktörleri sağlamak amacıyla, hücre füzyonundan önce hücre kültüründe besleyici hücreler hazırlanır. Hibridomalar, sınırsız replikasyon yeteneğine sahip olan B hücre kökenli kanser hücreleri olan myeloma hücreleri ile lenfositler arasındaki füzyon/birleşme ile oluşturulur. Füzyon, Polietilen Glikol (PEG) adı verilen kimyasal bir ajan tarafından gerçekleştirilebilir. PEG, bilinmeyen bir mekanizma tarafından komşu hücrelerin membran füzyonunu indükler. Füzyon hücrelerinin birden fazla çekirdeği vardır. Füzyondan sonra, hibridomalar besleyici hücrelerle birlikte hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) adı verilen seçim ortamında kültürlenir. B hücreleri birkaç dönem proliferasyondan sonra ölecek ve miyelomalar HAT'ta DNA sentezinin engellenmesi nedeniyle hayatta kalamayacaktır. Sadece füzyon hibridomaları, HAT'ın varlığında büyüyebilirler. Daha sonra, hibridomalar her kuyuda birden fazla hücre elde edilen 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilir. Bu strateji,

hücrelerin daha hızlı büyümesi nedeniyle daha erken tarama gerektirir ve ardından tek hücre düşecek şekilde klonlama işlemi yapılır. Klonlama yapıldıktan bir ile iki hafta sonra, hibridomalar tarama için hazırdır. Antikorların varlığını test etmek için pozitif kuyulardan süpernatantlar toplanır. Pozitif süpernatantlar tanımlandıktan sonra, tekrar alt klonlama yapılır, çünkü aynı kuyuda birden fazla klon bulunabilir. Pozitif kuyudan hücrelerin seyreltilmesiyle, hücreler tek hücrelik klonlanmış şekilde daha fazla kuyuya izole edilir. Tek hücre klonlama, ilgi duyulan antikorların tek kolonilerden üretildiğinden ve gerçekten monoklonal olduklarından emin olunur (Kohler G. ve Milstein, 1975; Chong ve ark., 2005; Tomita ve ark., 2011).

2.5.2. SARS-CoV-2 ve monoklonal antikorlar

COVID-19 pandemisi sırasında, SARS-CoV-2'nin Spike proteinine yönelik monoklonal antikorlar (mAb'ler), tanı ve tedavi seçenekleri arasında önemli bir yer tutmuştur.

MAb'lar pandemide hem erken tanıda teşhis kitlerinin geliştirilmesinde hem de tedavide en çok kullanılan moleküller olmuştur. MAb'lerin pandemiye karşı terapötik kullanımlarını, yapısal özelliklerini, klinik çalışmalardan elde edilen onay sürecine katkıda bulunan verileri ve tedavi sonrası gelişen bağışıklık kaçış mekanizmalarının bilimsel olarak değerlendirilmesi, tedavi alternatifleri arasında oldukça önemli yer tutmuştur.

Tedavi amaçlı geliştirilen ilk monoklonal antikor (mAb), muromonab-CD3, 1986'da ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Barnes K., 2018) ve o günden bu yana, yılda ortalama on yeni mAb (çoğunlukla IgG1) piyasaya sürülmüştür. MAb'lerin tıbbi sektörde yoğun kullanımına bağlı olarak, 2025 yılına kadar yaklaşık 300 milyar dolar gelir elde edilmesi beklendiğinden pazar büyüklüğünün de orantılı olarak artacağı öngörülmektedir (El Abd ve ark., 2022). Bu antikorların büyük bir kısmı bulaşıcı olmayan hastalıklar (kanser vb) için kullanıma sunulmuş olmasına rağmen, COVID-19 pandemisi sırasında SARS-CoV-2'ye yönelik mAb araştırma ve geliştirme çabaları öne çıkmıştır. Pandeminin başlarında, tek başına veya kokteyl formunda (iki veya daha fazla mAb'nin birleşimi) kullanılan IgG mAb'ler, SARS-CoV-2'nin spike proteinine karşı en etkili antikor tedavi seçeneği olarak tanıtılmıştır (Tuccori ve ark., 2020). 22 Mart 2024 itibarıyla, Koronavirüs Antikor Veritabanı (CoV-AbDab), SARS-CoV, MERS-CoV ve

SARS-CoV-2'ye karşı 12 919 antikor ve nanokoru listelemektedir. COVID-19 pandemisinin başlangıcında, hastanede tedavi gören hastalar ve daha sonra ayakta tedavi gören hastalar için mAb tedavisi ve profilaksisine ilişkin pek çok randomize klinik çalışma başlatılmıştır ve bunların tümü genel olarak orta düzeyde etkinlik ve güvenlik göstermiştir.

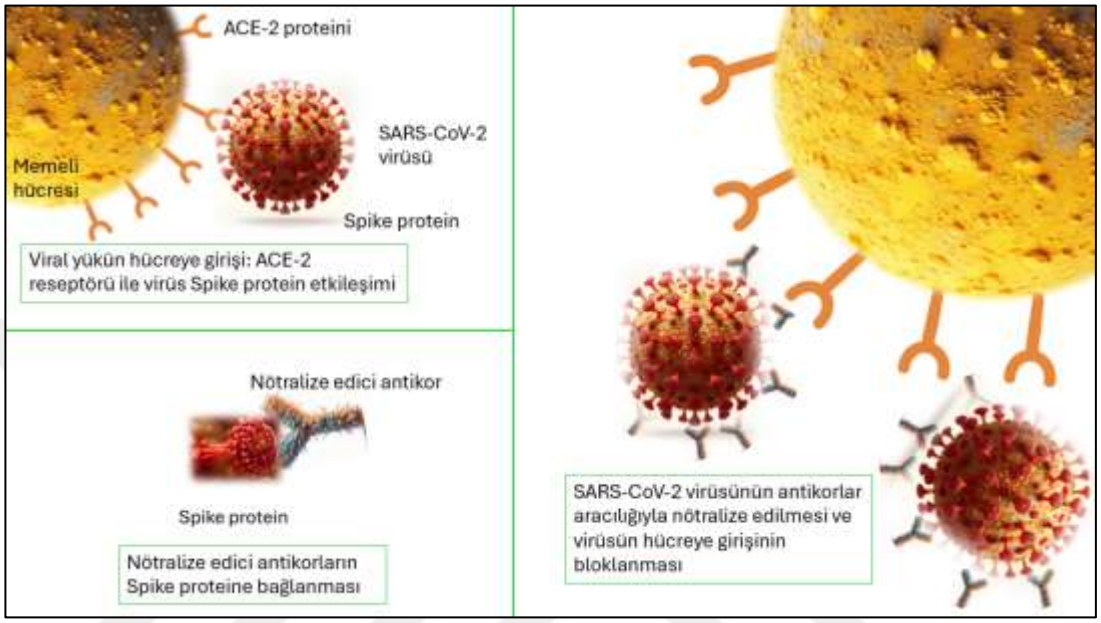
Monoklonal antikorlar, COVID-19 ile mücadelede tanı ve tedavi de önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir. Tedavi de etkinliği, enfeksiyon oranlarında azalma, ayakta tedavi gören hastalarda hastaneye yatışlarda azalma ve hastalığın ilerlemesi veya mortalitede azalma gibi çeşitli ölçütlerle belirlenmiştir. Bu tedaviler, özellikle seronegatif ve erken aşamada hastaneye yatırılan hastalarda etkili olmuştur, ancak bu etkiler genellikle %30 ila %40 arasında değişmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. Yapılan çalışmalara ek yenilikçi yaklaşımlar sergilen çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5.3. SARS-CoV-2 ve nötralizan monoklonal antikorlar

2019 koronavirüs hastalığı salgınının başlangıcından bu yana, SARS-CoV-2'yi hedef alan çok sayıda nötralize edici antikor geliştirildi ve klinik öncesi ve klinik çalışmalarda ümit vaat etmesi ile ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), çeşitli nötralize edici antikorlar için COVID-19 terapötikleri olarak acil kullanım izinleri (EUA'lar) yayınladı.

SARS-CoV-2, spike (S), nükleokapsid, membran ve zarf proteinleri gibi yapısal proteinleri içeren zarflı bir virüstür. Bu proteinler arasında, konakçı hücre yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE-2) ile etkileşime girerek virüsün hücreye girmesini sağlayan S proteini özellikle önemlidir (V'Kovski ve ark., 2021). Bu etkileşim, S proteini üzerindeki güçlü nötralize edici antikorların hedef aldığı ana mekanizmadır (Şekil 2.11.) ve bu antikorlar, enfeksiyonu önlemek için virüsün hücreye giriş sürecini engelleyebilir. S proteini, N-terminal alanı (NTD), RBD, füzyon peptidi ve iki heptad tekrar alanını içeren S 2 alt biriminden oluşur (Walls ve ark., 2020; Hoffmann ve ark., 2020; Ke, Z. ve ark., 2020; Turonova ve ark., 2020). Virüs hücreye girmeye çalışırken, bu protein trimerleri önemli konformasyonel değişikliklere uğrar; RBD'nin ACE-2 reseptörüne bağlanması ve ardından füzyon peptidinin aktivasyonu, virüs ile hücre membranının birleşmesini sağlayarak enfeksiyonun başlamasına neden olur (Cai ve ark., 2020; Henderson ve ark., 2020; Wrapp, D. ve ark., 2020). Bu süreç, nötralize edici

antikorların virüsün hücreye girişini engelleyebileceği ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önleyebileceği gibi potansiyel hedefler sunmaktadır. Şu ana kadar, RBD, NTD ve S 2 bölgesini hedef alan nötralize edici antikorların insan kullanımı için potansiyel adaylar olarak belirlendiği bildirilmiştir.



Şekil 2.11. SARS-CoV-2 virüsünün nötralizan antikorlar ile bloklanması

Proteinin RBD alanı, SARS-CoV-2'nin S proteininin geri kalan bölümüne kıyasla belirgin bir hareketlilik gösterir. Yapısal analizler, S proteinin ektodomenlerinin ve virüs parçacıklarının, tüm RBD'lerin "aşağı" (yatay) konumda olduğu (3-RBD-aşağı), bir (1-RBD-yukarı) veya iki (2-RBD-yukarı) RBD'nin "yukarı" (dikey) konumda olduğu üç farklı konformasyonu göstermiştir. RBD'nin ACE-2 ile etkileşime girmesi, S protein trimerlerinin konformasyonel değişikliklere uğramasına ve viral girişi tetiklemek için üç RBD'nin de yukarıda olduğu (3-RBD-yukarı) dengesiz bir duruma geçmesine neden olur (Cai ve ark., 2020; Henderson ve ark., 2020; Wrapp, D. ve ark., 2020). SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen nötralize edici antikor tepkilerinin çoğunun (%90 civarında) RBD'ye yönelik olduğu bulunmuştur (Piccoli ve ark., 2020) ve bu antikorlar genellikle yüksek nötralizasyon potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle, klinik denemelerdeki SARS-CoV-2 nötralize edici antikorların çoğu, RBD'ye yönelik antikorlardır. Ayrıca, RBD antikorları çapraz nötrleştirme kapasitelerine göre çapraz nötrleştirici olmayan ve çapraz nötrleştirici antikorlar olarak da sınıflandırılabilir. Bu ayrım, RBD antikorlarının diğer beta-

koronavirüslerle olan çapraz nötrleştirme yeteneklerine dayanır. Bu bilgiler, SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilecek antikorların, ilaçların ve aşıların tasarımında önemli bir yere sahiptir (Li, D. ve ark., 2021; Pinto ve ark., 2020; Wec ve ark., 2020; Martinez ve ark., 2021; Rappazzo ve ark., 2021).

Çapraz reaktivite içermeyen RBD nötrleştirici antikorlar, genellikle virüsün hücreye girişini sağlayan reseptör bağlanma motifini (RBM) hedef alır. Bu antikorlar, ACE-2 reseptörüyle doğrudan rekabet ederek SARS-CoV-2'nin hücrelere girişini engeller ve bu yüzden SARS-CoV-2'ye karşı yüksek derecede nötralizasyon sağlar. Bu antikorlar genellikle ACE-2 bağlanma bölgesinde bulunan spesifik epitoplara bağlanır ve virüsün hücreye bağlanmasını engelleyerek enfeksiyonu bloke eder. Diğer koronavirüslere karşı zayıf çapraz reaktivite gösterme eğilimindedirler, çünkü hedefledikleri epitoplar genellikle SARS-CoV-2'ye özgüdür (Barnes, C O. ve ark. 2020; Brouwer ve ark., 2020).

Öte yandan, çapraz nötraleştirici RBD antikorları, SARS-CoV-2 dâhil olmak üzere farklı koronavirüslere karşı geniş bir koruma sağlayabilen antikorlardır. Bu antikorlar, ACE-2 bağlanma bölgesinden farklı, daha korunmuş epitoplara bağlanır ve bu sayede birden fazla koronavirüse karşı etkili olabilirler. Çapraz nötrleştirici antikorlar, viral girişi engelleme yeteneklerini korurken, aynı zamanda farklı koronavirüsler arasında ortak olan yapısal motifleri tanıyarak çapraz reaktivite gösterirler. Bu antikorlar hem terapötik kullanım için önemlidir hem de çeşitli koronavirüslere karşı koruma sağlayabilecek aşı tasarımlarına rehberlik edebilir (ter Meulen ve ark., 2006; Yuan ve ark., 2020).

NTD antikorları, SARS-CoV-2'nin S proteininin N-terminal domeni (NTD) hedef alarak virüsün hücrelere girişini engelleyebilir. Bu antikorlar, genellikle ACE-2 etkileşimini doğrudan engellemezler; bunun yerine, S proteininin konformasyonel değişikliklerini önleyerek virüsün hücre ile birleşmesini bloke ederler (Wrapp, D. ve ark., 2020). NTD antikorları, aynı zamanda S proteininin çeşitli konformasyonlarına bağlanabilir ve virüsün nötralizasyonunda etkili olabilir (Chi ve ark., 2020). Bu antikorlar, yüksek nötralizasyon kapasitesine sahip olup virüs tehdidine karşı koruma sağlayabilir. Ancak, NTD'nin CoV'ler arasında değişken olması, bu bölgenin çapraz nötralizasyon için ideal bir hedef olmaktan ziyade, RBD antikorları ile kombinasyon halinde güçlendirilmiş antikor kokteyllerinde kullanılmasını daha olası kılar (Cerutti ve ark., 2021).

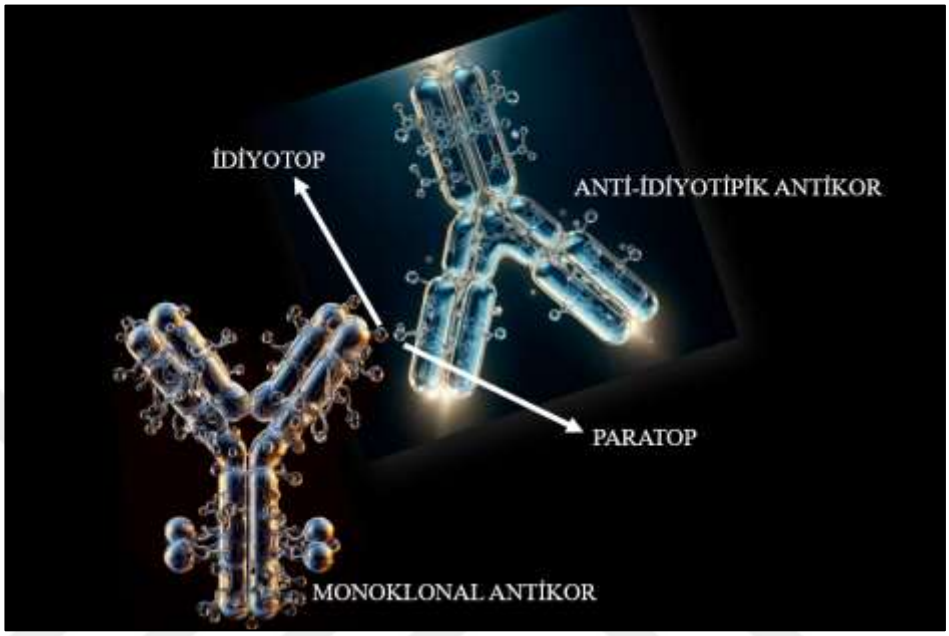
S 2 alt birimi, viral ve hücresel membranların birleşmesinde hayati bir rol oynar ve SARS-CoV-2'nin S proteininin en çok korunan bölümüdür. Yedi insan koronavirüsü arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda (Huang, Y. ve ark., 2021), S2'nin %63 ile %98 arasında bir dizi benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir, bu da onu çapraz koronavirüs nötralize edici antikorlar ve aşılar için potansiyel bir hedef haline getirmektedir. Ancak, şimdiye kadar elde edilen S 2'ye yönelik antikorların sınırlı nötralizasyon kapasitesi ve henüz herhangi bir *in vivo* koruma verisinin rapor edilmemiş olması, bu antikorların enfeksiyona karşı etkili koruma sağlayıp sağlayamayacağını belirsiz bırakmaktadır (Jennewein ve ark., 2021; Huang, Y. ve ark., 2021).

2.5.4. SARS-CoV-2 ve anti-idiyotipik monoklonal antikorlar

Monoklonal antikorlar hassas veya özgün değişken bölgeler içerir ve değişken (V) bölgesinin özellikleri antikorun idiyotipisini belirlemeden sorumludur. İdiotipin tam anlamı oldukça karmaşık olmakla birlikte, "antikorun değişken bölgesinin kesinleşmesinden sorumlu olan özellikleri" olarak düşünülebilir. Anti-idiyotip ek bir antikorun idiyotipik değişken alanlarına bağlanan antikordur (Kieber-Emmons ve ark., 2012). Bir antikorun idiyotipi, idiotopların bir koleksiyonu olarak düşünülebilir. Bu arada, az sayıda anti-idiotip, benzersiz bir antijenin bağlandığı şekilde idiyotipe bağlanır, bazı antijenik özelliklere sahip olabilirler (Kieber-Emmons ve ark., 2012; Naveed, A. ve ark., 2018).

Genel olarak hayvanlar, anti-idiotiplerin geliştirilmesi için belirli bir antijene özel antikorlarla immünize edilir. Biyokimyasal olarak antikorlar idiyotipik karşılıklarına göre tanımlanır (Şekil 2.12.). Antikorların fonksiyonel özellikleri özellikle idiyotip ifadesi ve antijen tanımlanması, antikorların yapısal organizasyonu tarafından belirlenir (Venturini ve ark., 2009). Rastgele sarmal ve ters dönüş döngülerinin her ikisi de tanıma konumlarıdır ve antijenik olabilir. Daha sonra, idiyotipik bölgeler ve antikorun birleşme bölgeleri tanım gereği büyük ölçüde örtüşmektedir. Çerçeve bölgeleri içinde idiyotipik bölgelerin var olduğu, değişken bölge içinde ise dönüş yapısını tersine çevirerek rol oynadıkları öngörülmüştür ve çalışmalar, çerçeve bölgelerinin idiotip ifadesinde tanıma bölgeleri olarak katkıda bulunduğunu doğrulamıştır (Vani ve ark., 2007; Naveed, A. ve ark., 2018). Anti-idiotipler, antijenin aşılayıcı idiyotipi eksprese eden antikora bağlanmasını bloke etme yeteneğine sahiptir. Antijen bağlanmasının anti-idiotip

tarafından bloke edilmesi, bir antijen olan anti-idiotipin aynı şekilde, hatta aynı yere bağlandığını göstermez. Antijen bağlanması, bir anti-idiyotipin antijen bağlanma yeriyle yakından ilişkili veya bu yeri kaplayan bir iditotipin bağlanması durumunda engellenebilir (Naveed, A. ve ark., 2018).



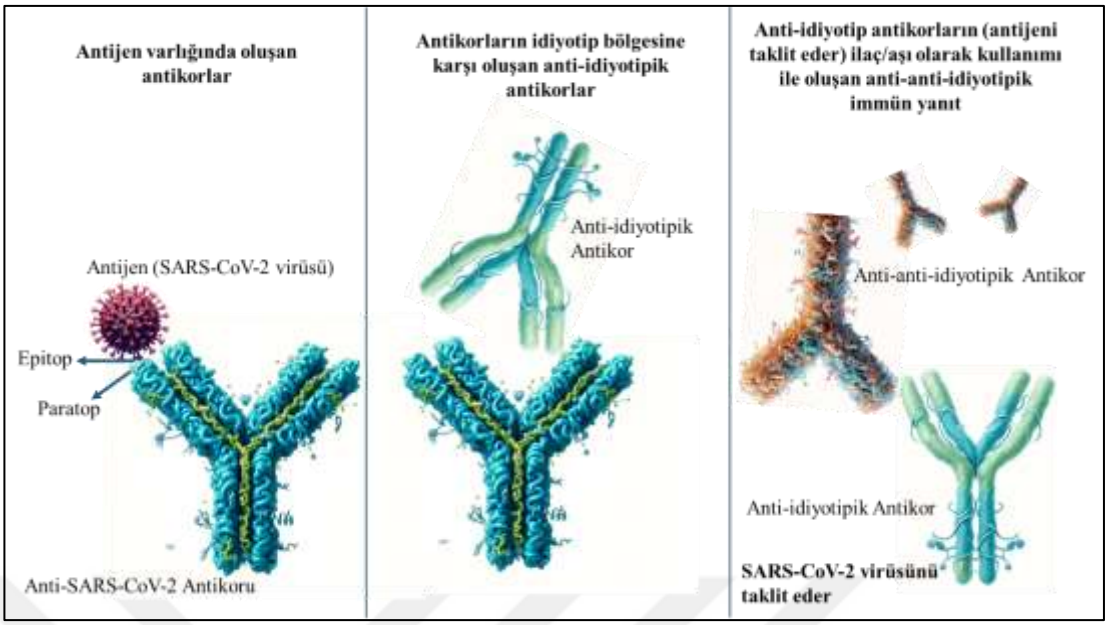
Şekil 2.12. Anti-idiyotipik antikorlar

Ligand-reseptör etkileşimlerinin engellenmesi için ortak bir yaklaşım, ligand için antikor geliştirmektir. İdiyotipe sahip olan antikorlar, ligand gibi hareket eden anti-idiyotları geliştirmek için kullanılabilir, çünkü bu antikorlar, ligandla etkileşimde "reseptör benzeri" dir. Bu şekilde üretilen anti-idiyotipler hem reseptör hem de idiyotipine bağlanma yetenekleriyle okunurlar, bu bağlanma, ligandın daha spesifik bir şekilde beklenen bir şekilde olur (Watts ve ark., 1988; Naveed, A. ve ark., 2018).

Her bir antikorun (Ab1 antikoru olarak adlandırılan) belirli bir antijene karşı indüklenen ve özgün olan bağlanma bölgelerinde (antijen bağlanma bölgeleri olarak da bilinir) immunojenik bölgeleri vardır. Bu, immünglobulin değişken, çeşitlilik ve birleştirme (VDJ) genlerinin genetik rekombinasyonu sonucunda benzersiz idiotoplar olarak adlandırılan ve bu nedenle özgün antikorların karşılaşmasıyla Ab1 antikorlarına karşı spesifik antikorlar indükleyen yeni ve dolayısıyla immunojenik amino asit dizilerine yol açar (Jerne, 1974). Bir benzer paradigma T hücreleri için de önerilmiştir. Ancak, bu düzenleyici immün yanıtların başka işlevleri de vardır. Bazı sonuç anti-idiyot (veya

"Ab2") antikorlarının paratopları veya antijen bağlanma bölgeleri, Ab1'e özgü olanlara yapısal olarak benzeyebilir. Böylece, Ab2 antikorunun antijen bağlanma bölgesi, Ab1 yanıtındaki başlangıçta hedeflenen antijenin tam bir aynası olabilir ve Ab2 antikorları hatta aşı çalışmalarında antijen yerine kullanılmak üzere incelenmiştir. Bununla birlikte, bu taklit nedeniyle, Ab2 antikorlarının aynı reseptöre bağlanma potansiyeli vardır ki bu da orijinal antijenin hedeflediği reseptöre bağlanabilirliği içerir. Normal hücrelerdeki orijinal reseptöre bağlanan Ab2 antikorlarının, özellikle orijinal antijenin kaybolduktan çok sonra, hücre üzerinde derin etkilere yol açma potansiyeli vardır. Bu immün hücre yanıtlarının düzenlenmesinin bu yönü, Plotz tarafından 1983'te viral enfeksiyondan sonra otoimmünite oluşumunun olası bir nedeni olarak önerilmiştir ve o zamandan beri anti-idiyot antikorların doğrudan transferi ile deneysel olarak desteklenmiştir (Plotz ve ark., 1983). Farelerde enterovirüs koxsaki virüs B3'e karşı oluşturulan Ab2 antikorları miyosit antijenlerine bağlanabilir ve otoimmün miyokardit'e neden olabilir. Ayrıca, viral antijenin aynasını sergileyerek, Ab2 tek başına virüs partikülünün zararlı etkilerini bile taklit edebilir, bu da bovine viral ishal virüs antijeni ile gösterilmiştir (Paque ve ark., 1991; Cleveland ve ark., 1983).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda odak spike (S) proteini üzerinde toplanır ve hücreye giriş, ACE-2 reseptörünün kritik kullanımıyla ilişkilidir. Anjiyotensin yanıtlarını düzenlemedeki kritik rolü nedeniyle, ACE-2 etkileşimi birçok fizyolojik etkiyi etkileyebilir. S proteininin kendisi, ACE-2 sinyalini çeşitli mekanizmalarla baskılama üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir ve ayrıca doğrudan toll benzeri reseptörleri tetikleyebilir ve iltihaplı sitokinler indükleyebilir. Anti-idiyotipik yanıtlar, ACE-2 fonksiyonunu etkileyebilir ve benzer etkilere neden olabilir (Şekil 2.13.). Ancak, SARS-CoV-2 aşılarına karşı antikor yanıtlarının ön klinik ve klinik değerlendirmeleri yalnızca Ab1 yanıtlarına ve virüsü nötralize etme etkinliğine odaklanmıştır. Potansiyel anti-idiotip yanıtların tanımlanması, yanıtların poliklonal doğası, dinamik kinetiğe ve hem Ab1 hem de Ab2 antikorlarının eş zamanlı varlığına bağlı olarak doğal zorluklara sahiptir (Xue, W. ve ark., 1991). Ayrıca, hücrelerde ve dokularda ACE-2 ekspresyonu değişken olabilir.



Şekil 2.13. SARS-CoV-2 Anti-idiyotip antikor oluşumu

2.6. Antikor Fragmenti Oluşturulması

Antikorların enzimatik sistemler de sindirimi yoluyla Fab ve F(ab')2 fragmentlerinin elde edilmesi, monoklonal antikorların (mAb) tam uzunluklu formlarının bioanalitik deneylerde deney reaktifi olarak kullanılmasının yanı sıra, belirli durumlarda mAb fragmentlerinin de gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, terapötik antikorların enzimatik sindirimini (enzimatik kesim) kullanarak monovalent Fab veya bivalent F(ab')2 fragmentlerini üretmek için bir yöntem geliştirilmektedir.

2.6.1. Proteolitik enzimler

Proteolitik enzimler peptid bağlarını hidrolize etme yeteneğine sahiptir ve peptidazlar, proteazlar veya proteinazlar olarak da adlandırılırlar (Barrett ve ark., 1986). Proteazların fizyolojik işlevi virüslerden insanlara kadar tüm canlı organizmalar için gereklidir ve proteolitik enzimler kökenlerine göre mikrobiyal (bakteriyel, fungal ve viral), bitki, hayvan ve insan enzimleri olarak sınıflandırılmaktadır. Proteolitik enzimler, hidrolaz enzim sınıfına (EC 3) aittir ve peptid hidrolazlar veya peptidazlar (EC 3.4) alt sınıfı olarak gruplandırılırlar. Enzim etki bölgesine bağlı olarak proteazlar, ekzopeptidazlar veya endopeptidazlar olarak da alt bölümlere ayrılabilmektedir. Ekzopeptidazlar, substratın N- veya C-terminal uçlarına yakın peptid bağlarının hidrolizini katalizler. Aminopeptidazlar, substratlarının N-terminal ucundan tek amino asitleri (EC 3.4.11), dipeptitleri (dipeptidil

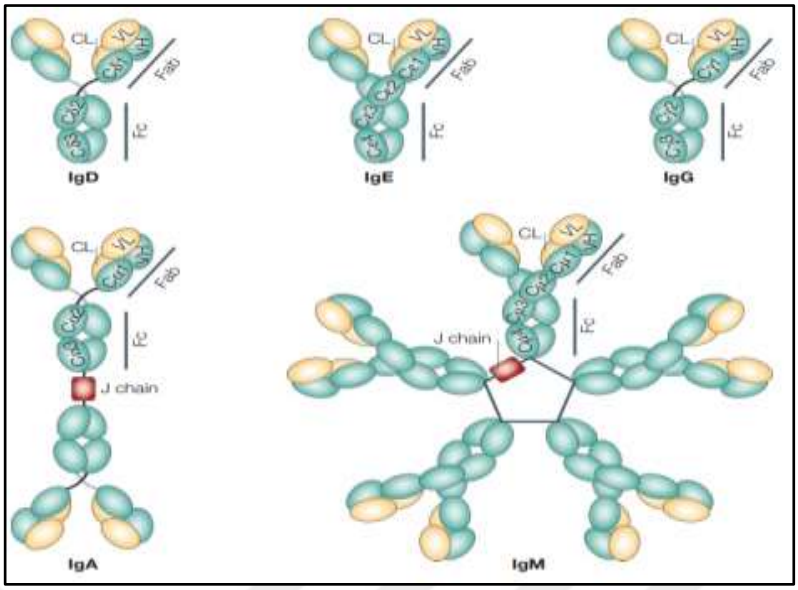
peptidazlar, EC 3.4.14) veya tripeptitleri (tripeptidil peptidazlar, EC 3.4.14) serbest bırakabilir. Dipeptidazlar (EC 3.4.13), dipeptit substratlardan tek amino asitleri serbest bırakırken, karboksipeptidazlar (EC 3.4.16-3.4.18) polipeptitlerden tek amino asitleri serbest bırakır, peptidil dipeptidazlar (EC 3.4.15) ise polipeptit zincirinin C-terminal ucundan dipeptitleri serbest bırakırlar. Endopeptidazlar, polipeptit zinciri içinde ve uçlarından uzakta peptid bağlarını keserler (Rao ve ark., 1988).

Proteazlar, katalitik mekanizmaya ve aktif bölgedeki amino asit kalıntı (lar)ının varlığına dayanarak aspartik proteazlar, sistin proteazlar, glutamik proteazlar, metalloproteazlar, asparajin proteazlar, serin proteazlar, treonin proteazlar ve karışık veya bilinmeyen katalitik mekanizmaya sahip proteazlar olarak gruplandırılabilirler. Mevcut sınıflandırma sistemi proteazları benzerliklerine dayanarak ailelere ayırır, ayrıca yapı tabanlı bir sınıflandırmayı kullanarak homolog aileleri gruplara ayırır (Rawlings, N D. ve Barret, 1993; Rawlings N D. ve ark., 2012).

Proteazlar, endüstri ve biyoteknolojinin birçok sektöründe yaygın olarak kullanılan enzimlerdir; ayrıca, Klenow parçalarının üretimi, peptit sentezi, nükleik asit saflaştırma sırasında istenmeyen proteinlerin sindirimi, hücre kültürü deneylerinde ve doku ayrıştırmasında proteazların kullanımı, araştırma, tanı ve tedavi için rekombinant antikor parçalarının (fragman) hazırlanması, yapı-fonksiyon ilişkilerinin yapısal çalışmalarla keşfi, rekombinant protein tekniklerinde birleşim proteinlerinden bağlayıcı etiketlerin çıkarılması, peptit dizileme ve proteomikte proteinlerin proteolitik sindirimi gibi birçok araştırma uygulaması gerektirir.

2.6.2. Monoklonal antikorların enzimatik sindirimi

Antikor molekülleri, bağışıklık sistemi tarafından yabancı maddelere karşı üretilir ve proteinlerin immünoglobulin süper ailesine göre sınıflandırılır (Şekil 2.14.). Bu moleküller, iki benzer ağır zincir (H) ve iki benzer hafif zincir (L) olmak üzere dört polipeptid zincirinden oluşur ve bu zincirler disülfid köprüleri ile birbirine bağlanır. Hem ağır hem de hafif zincirleri, sırasıyla değişken (VH ve VL) ve sabit (CH1, CH2, CH3 ve CL) bölgeleri içerir. VH ve VL zincirleri idiyotipik bölgelere sahiptir (Devlin ve ark., 2002).

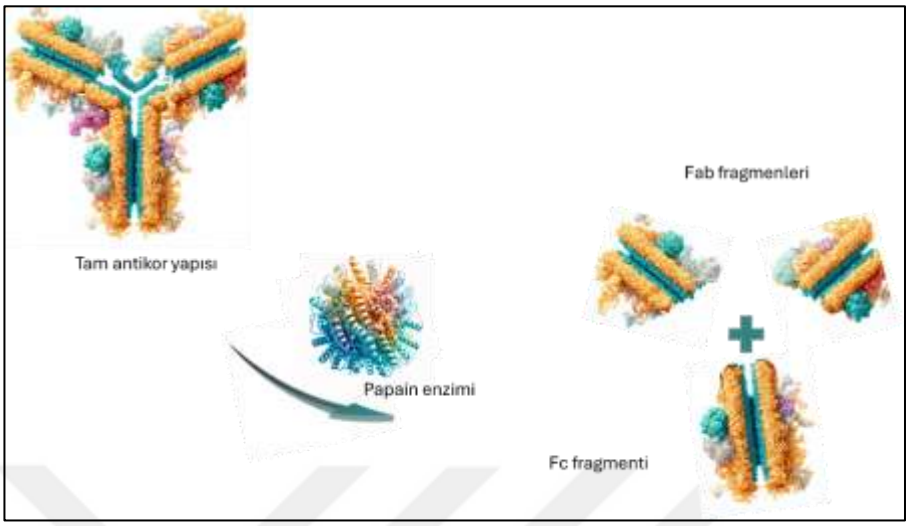


Şekil 2.14. İmmünoglobulin çeşitleri (Rojas ve Apodaca, 2002'den değiştirilerek alınmıştır)

İdiyotipler antikorun spesifik yapısını belirleyen benzersiz yapısal özelliklerdir ve antikorun antijenle etkileşime girebileceği ve tanıyabileceği belirli epitopları içerir. Bu nedenle, idiyotipler antikorun antijen spesifikliğini belirler ve antikorun hangi tür antijenlere bağlanacağını ve onlarla reaksiyona gireceğini belirler. Bu durum antikorların değişken bölgelerindeki amino asit dizilerindeki farklılıklardan kaynaklanır. Bu farklılıklar, germ hattı genlerinin yeniden düzenlenmesi sürecinde ortaya çıkar. Antikorların değişken bölgeleri, bu genlerin tekrar düzenlenmesi sonucunda oluşturulan çeşitli kombinasyonlara sahip olabilir, bu da farklı antikorlar ve idiyotipler üretir. Bu idiyotipler antikorların spesifik yapısını tanımladığı için, antikorlar arasında kavramsal ve yapısal farklılıkların belirlenmesine olanak tanır (Monestier ve ark., 1986; Max ve ark., 1988; Devlin ve ark., 2002).

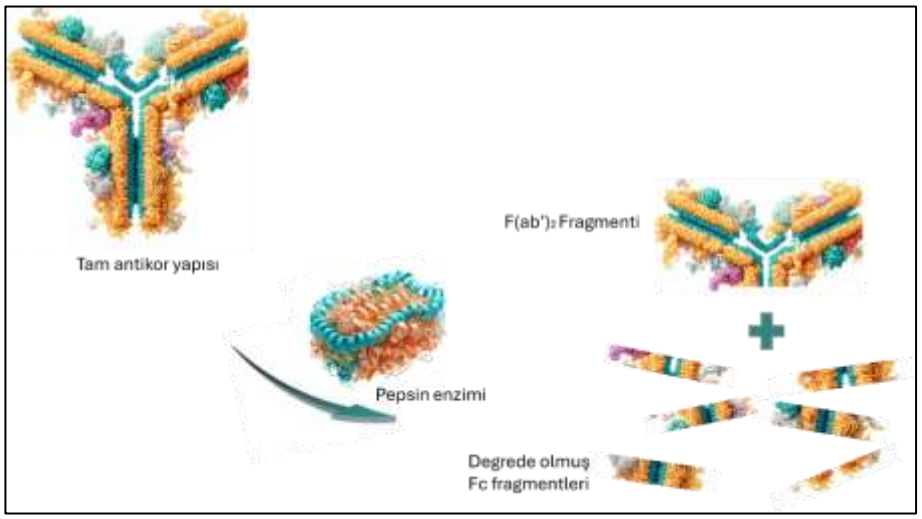
Tüm immünoglobulin moleküllerinin parçaları sindirim yoluyla oluşturulabilir. Genel olarak, papain (Şekil 2.15.), pepsin (Şekil 2.16.) ve fisin (Şekil 2.17.) proteazları, IgG moleküllerinin spesifik sindiriminde kullanılır. Bir antikorun, sistein proteaz papain tarafından sindirilmesi, CH1 ve CH2 alanları arasındaki menteşe bölgesindeki peptid bağlarının kesilmesi nedeniyle üç parçaya ayrılır: bir Fc (kristalize edilebilir) ve iki benzer Fab (antijen bağlayıcı) parçası serbest bırakılır. Serbest bırakılan her iki Fab

parçası da bir antijen bağlama bölgesi taşırken, Fc parçasının antijen bağlama yeteneği yoktur.



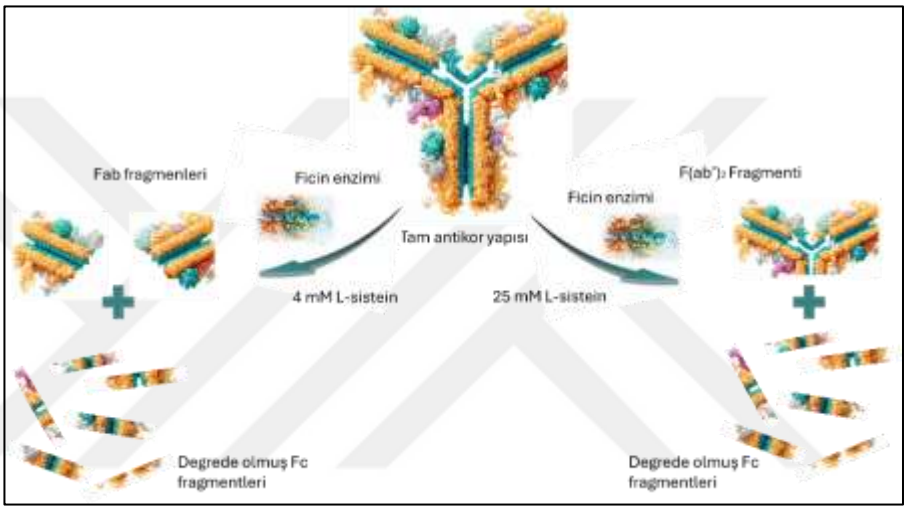
Şekil 2.15. Tam antikor yapısının papain enzimi ile sindirimi sonrası fragmentlerin oluşumu

Aspartik asit proteaz pepsin, ağır zincirleri birleştiren disülfid bağlarının yakınındaki antikorun peptid bağlarını keser. Bu sindirim, Fc bölgesinin ve iki antijen bağlama bölgesini içeren bir F(ab')2 parçasının peptidlerinin salınımıyla sonuçlanır. Sistin proteaz fisin, sistein konsantrasyonuna bağlı olarak hem F(ab')2 hem de Fab parçalarını serbest bırakabilirler (Rader ve ark., 2009).



Şekil 2.16. Tam antikor yapısının pepsin enzimi ile sindirimi sonrası fragmentlerin oluşumu

Fisin, bir proteolitik enzim olup, antikor moleküllerini spesifik olarak hedef alarak onları parçalar. Bu enzim, özellikle antikorların ağır zincirlerinde bulunan peptid bağlarını keser. Bu kesme işlemi, antikorun Fc ve Fab bölümlerinin ayrışmasına olanak tanır, böylece antikorların antijen bağlama bölgeleri ve efektör fonksiyonları arasındaki ilişkiyi ayırt etmeye yardımcı olur. Fisin enzimi ile antikorların sindirimi sürecinde, L-sistein miktarı önemli bir faktördür. L-sistein, Fisin enziminin aktivitesini modüle eden bir redüktan olarak işlev görür. Antikor moleküllerinin sindirimini optimize etmek için, reaksiyon karışımına eklenen L-sistein miktarının dikkatlice ayarlanması gerekmektedir



Şekil 2.17. Tam antikor yapısının fisin enzimi ile sindirimi sonrası fragmentlerin oluşumu

Büyük, pentamerik IgM immünoglobulinlerinin *in vivo* uygulamaları, büyük boyutları nedeniyle enzimatik yolla parçalanabilir. IgM moleküllerinin proteolitik parçalanması, aynı zamanda daha küçük, aktif Fab, Fab', F(ab')2 veya "IgG benzeri" parçaların üretilmesi için kullanışlı bir yöntemdir ve bu parçalar, bütün IgM moleküllerine göre daha faydalı özelliklere sahiptir. IgM parçalanması için kullanışlı enzimler arasında tripsin ve pepsin bulunmaktadır; pepsin, Fab ve F(ab')2 parçalarını üretebilirken, tripsin de "IgG benzeri" parçaları üretebilir. Papain, heterojen parçaların üretimi nedeniyle IgM parçalanması için kullanılamaz (Rader ve ark., 2009).

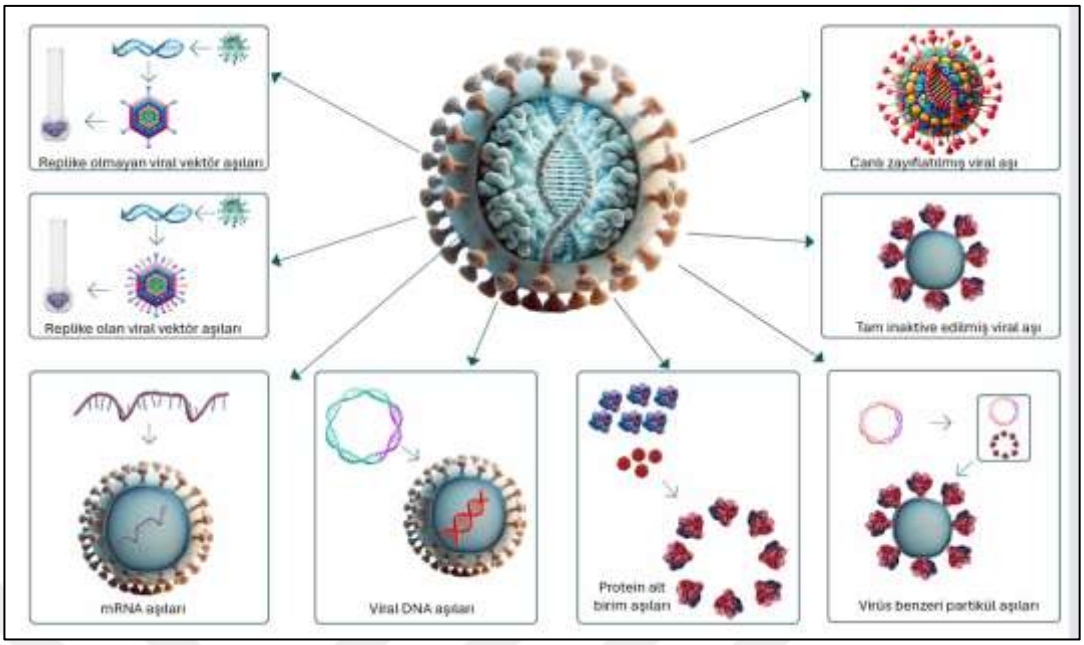
Monoklonal antikorların papain veya pepsin tarafından sindirilmesiyle Fab veya $F(ab')_2$ parçalarını üretmek için kullanılır. Antikor fragmentasyonu ile elde edilen birkaç ürün mevcuttur, ayrıca birçok firma antikor parçalanması için fragmentasyon kitleri sağlamaktadırlar.

Antikor parçalarının, bütün antikor moleküllerine göre *in vivo* uygulamalar için birkaç faydalı özelliği bulunmaktadır. Daha küçük boyutları nedeniyle daha yüksek hareketlilikleri vardır ve dokulara daha kolay nüfuz edebilir veya hücre membranlarından daha kolay geçebilirler. Antijen bağlama parçaları, Fc parçalarını içermediği için daha düşük immünogeniteye sahiptirler, çünkü sadece antijen bağlama alanlarına (Fab, Fab' veya $F(ab')_2$ parçaları) sahiptirler ve antikor etkileyici fonksiyonlar için sorumlu bölgeleri taşımazlar, ayrıca büyük immün kompleksler oluşturmazlar.

Antikorların antijen bağlama parçaları, klinik ve terapötik uygulamalar açısından büyük öneme sahiptir. Antikor parçaları, hastalığın (örneğin, restenoz) gelişimini önlemek için uygulanabilir, tanı sırasında (örneğin, metastatik meme ve kolon kanseri) uygulanabilir veya bazı hastalıkların (örneğin, maküla dejenerasyonu) tedavisi için uygulanabilir, zehirlerin tespiti veya yılan zehirlerinin nötralizasyonu için kullanılabilir (Rader ve ark., 2009). FDA tarafından onaylanmış antikor tabanlı terapötiklerin mevcut sayısı otuz beş iken, ilerleyen süreçler de birçok başka antikorlar da yapılan klinik deneylerde bulunmaktadır (Flanagan ve ark., 2004; De Marco, ve ark., 2011; Mótyán ve ark., 2013).

2.7. COVID-19'un Önlenmesi İçin Aşı Adaylarının Geliştirilmesi

Aşı, enfeksiyöz hastalıkların önlenmesinde etkili bir stratejidir, çünkü vücudun bağışıklık sistemini patojenlere karşı özgül bir savunma üretmeye teşvik eder, böylece enfeksiyon riskini azaltır ve bu enfeksiyonlarla ilişkilendirilen morbidite ve mortaliteyi azaltır. Bu viral enfeksiyonun yönetilmesiyle ilgili ilk adım, SARS-CoV-2'nin diğer koronavirüslere göre daha yüksek yayılım oranlarına sahip olduğu göz önüne alındığında halk sağlığı için bir endişe olarak kabul edilmesi nedeniyle, başka bir kişiye bulaşmayı önlemek için yeterli izolasyonun sağlanmasıdır.Bu nedenle, dünya genelinde çoğu ülke, sosyal etkinlikleri ve temasları azaltarak virüsün yayılım oranını azaltmak amacıyla farklı önleyici önlemler benimsemiştir.Bu da dünya genelinde toplumların ekonomisin de önemli oranda negatif etkiler yarattı, ve bu nedenle, mevcut viral hastalığı hafifletmek için güvenli ve etkili aşılar geliştirme aciliyeti ortaya çıktı. Bu bağlamda, pandemiyle mücadele etmek için SARS-CoV-2'ye karşı etkili aşıların geliştirilmesinde (Şekil 2.18.) önemli ilerlemeler kaydedildi.



Şekil 2.18. SARS-CoV-2 aşı geliştirme çalışmalarında kullanılan teknolojiler

Şu anda, aşı geliştirme için dünya çapında birkaç platform kullanılmakta ve SARS-CoV-2'ye karşı birden fazla aşı ya geliştirilmiş ya da dünya genelinde ABD, Almanya, Avustralya, İngiltere, Çin, Avusturya, Fransa, Hindistan ve Hong Kong gibi farklı ülkelerde geliştirilmekte olan aşılar bulunmaktadır (WHO, 2020).

2.7.1. Tam inaktive edilmiş viral aşı

İnaktive edilmiş viral aşılar, ısıl işlem, radyasyon, kimyasal reaktifler, özellikle formaldehit ve β-propriolakton gibi, öldürülmüş veya inaktive edilmiş tam virüslerden üretilir. İnaktive edilmiş aşılar, diğer viral aşı türlerine göre birçok gerekliliğe ihtiyaç duymadan büyük ölçekte üretilebilirler. Bu aşılar canlı-zayıflatılmış platformdan daha güvenlidir ancak yine de daha az immünojenik profil ve daha zayıf bağışıklık sağlarlar. Bu nedenle, etkili bağışıklık aktivasyonu için ek takviye adjuvanlara ihtiyaç duyulur.

Tam viriyon inaktive edilmiş SARS-CoV-2 aşısı BBV152, COVAXIN, Bharat Biotech International Limited tarafından geliştirilmiş olup, COVID-19'u durdurmak için acil kullanım izni verilmiştir. Aşının, viral stabiliteyi koruyan 2-fenoksietanol içerdiği ve bağışıklık yanıtını artıran bir alüminyum bazlı yardımcı madde içerdiği belirtilmektedir. Aşı, önerilen iki doz olarak intramusküler olarak uygulanmaktadır. Faz-3 denemelerinde, aşının ilk dozunun uygulanmasından sonra %78 etkinliğe sahip olduğu, ikinci dozdan 14

gün veya daha fazla süre sonra %93 etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. 25 Ekim 2023 tarihine kadar, COVAXIN'den 169 000 000 doz insan nüfusuna uygulanmıştır (Sapkal ve ark., 2021; Yadav ve ark., 2021; Deshpande ve ark., 2022).

Sinovac-CoronaVac, Sinovac Life Sciences (Pekin, Çin) tarafından geliştirilen COVID-19'a karşı tam inaktive edilmiş bir virüs aşıdır. Aşı, Şili, Brezilya, Endonezya ve Türkiye'de faz III denemelerine tabi tutulmuştur. Brezilya'da yapılan geniş çaplı bir faz III klinik çalışması, semptomatik SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı %51 etkinlik gösterirken, ciddi ve hastaneye yatırılan bireylerde %100 etkinlik gözlemlenmiştir. WHO ve üye devletlere danışmanlık yapan SAGE (Stratejik Aşı Danışma Grubu), CoronaVac'ı on sekiz yaş ve üstündeki tüm bireyler için güvenli ve etkili olarak önermiştir. Ayrıca, SAGE, CoronaVac'ın ilk dozu olarak kullanıldıktan sonra ikinci doz olarak WHO acil kullanım listesinde (EUL) bulunan COVID-19 mRNA veya vektörlü aşıların karışık ve eşleştirilmiş iki heterojen dozunu kabul etmiştir (Sarıtaş ve ark., 2023; Çakır ve ark., 2023; Fonseca ve ark., 2022; Karabiber ve ark., 2022; Phoksawat ve ark., 2022).

Başka bir COVID-19 aşısı olan BIBP, aynı zamanda BBIBP-CorV, Sinopharm COVID-19 aşısı veya BIBP aşısı olarak da bilinir, Sinopharm'ın Beijing Biological Products Enstitüsü tarafından geliştirilen alüminyum-hidroksit-destekli, tam inaktive edilmiş bir bütün virüs aşısıdır. Sinopharm'ın WIBP COVID-19 aşısı, WIBP-CorV olarak da bilinir, Sinopharm tarafından geliştirilen bir tam inaktive edilmiş viriyon aşıdır. 25 Ekim 2023 tarihi itibariyle, Sinopharm tarafından üretilen aşılarla 2 320 000 kişi aşılanmıştır (Graña ve ark., 2022; Jeewandara ve ark., 2022; Wang, H. ve ark., 2020; Zhang, Y. ve ark., 2022).

2.7.2. Canlı-zayıflatılmış viral aşı

Canlı-zayıflatılmış aşılar, virüsün laboratuvarlarda zayıflatılmış bir versiyonuyla üretilirler. Bu aşılar, doğal enfeksiyonu taklit eden, güçlü bağışıklık tepkilerine ve uzun süreli bağışıklığa izin veren viral doğal antijenleri korur. Canlı-zayıflatılmış aşıdaki patojenler, konak hücrelerinde replike olabilir ve yüksek etkinlikle humoral ve hücresel bağışıklık tepkilerinin uyarılmasını ve indüksiyonunu sağlayabilirler. Ancak, aşılar hala yaşayan mikroorganizmaları içerir ve özellikle orijinal virülent forma dönüşme riski taşıyan diğer aşı türlerine göre daha yüksek risk taşır. Sonuç olarak, canlı aşılar immün yetmezlik hastalarına verilemez. Canlı-zayıflatılmış aşılar, özellikle kızamık, kabakulak,

tüberküloz, kızamıkçık, suçiçeği, influenza ve sarı humma gibi birkaç enfeksiyöz hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Francis ve ark., 2018; Wilder-Smith ve ark., 2020).

SARS-CoV-2 canlı-zayıflatılmış aşıları, Hindistan Immunolojikler şirketi, Griffith Üniversitesi ve Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi gibi birkaç biyoteknoloji şirketi veya üniversitesi tarafından geliştirilmiştir. Tüm canlı-zayıflatılmış aşılar ön klinik çalışmalarda toplanmaktadır. Ayrıca, Codagenix şirketi tarafından geliştirilen COVI-VAC, İngiltere'de klinik Faz I denemesine başvurulabilecek SARS-CoV-2 canlı-zayıflatılmış aşılarından biridir.

2.7.3. mRNA aşıları

Bu aşılar, SARS-CoV-2'nin mRNA'sını kullanır ve hücreleri SARS-CoV-2 spike proteinlerini ifade etmeye ve bu proteinlere karşı bağışıklık yanıtını uyarıcıdır. Aşı Araştırma Merkezi, SARS-CoV-2 spike proteininin prototip yaklaşımının özelleştirilmesi için viral dizi verilerini desteklemek amacıyla Moderna adlı bir şirketle iş birliği yapmıştır. mRNA-1273 adı verilen COVID-19 aşı adayı Şubat ayının başlarında tasarlanmış ve geliştirilmiş ve 16 Mart 2020'de klinik denemelerin ilk aşamasına girmiştir (Shabu ve ark., 2023, Teo ve ark., 2022, Creech ve ark., 2022). 18 Aralık 2020'de, ABD FDA, NIH-Moderna aşısını acil kullanım için %94 etkinlik oranıyla onaylamıştır. Bu arada, Pfizer ve BioNTech SE şirketi tarafından geliştirilen aşı klinik denemeleri geçmiştir. Pfizer/BioNTech aşısı, COVID-19'a karşı Amerika Birleşik Devletleri'nde uygulama için onaylanan ilk aşıdır. Pfizer/BioNTech aşısı, karşılaştırmalı olarak en çok uygulanan aşıdır. Veriler, dünya nüfusunun %68.5'inin COVID-19 aşısının en az bir dozunu aldığını göstermektedir. Buna karşılık, ekonomik olarak zayıf ülkelerden insanların %24,6'sı en az bir doz aşı almıştır. Küresel olarak, 13 510 000 000 aşı dozu uygulanmıştır ve günde 2 200 000 doz aşı uygulanmıştır (Chilamakuri ve ark., 2021; Ramachandran ve ark., 2022; Rudan ve ark., 2022; LactMed®, 2024).

2.7.4. Viral vektör aşıları

Viral RNA platformu, doğal viral enfeksiyonlara benzer şekilde bağışıklık yanıtlarını etkili bir şekilde aktive edebilen yeni nesil bir platformdur. Viral RNA aşıları, hedef antijenik maddeleri kodlayan sentetik viral mRNA'larla yapılır ve bunlar konak hücrenin

sitoplazmasında üretilir. Bu platform, yeni patojenlere uyum sağlayabilen düşük maliyetli, hızlı ve kolay bir üretim sağlar. Bununla birlikte, mRNA aşıları, immünojenik profillerini etkileyen instabiliteden etkilenirler. Ayrıca, depolama ve taşıma için düşük sıcaklık gerektirirler ve RNA kaynaklı interferon yanıtlarına neden olarak hedef dışı etkiler ve istenmeyen yan etkilere yüksek risk sağlarlar.

Bir viral vektör aşısı olan "Covishield," başlangıçta Oxford-Astra Zeneca tarafından üretilen ve Serum Institute of India, Pune, Maharashtra lisansı altında üretilen ilk onaylı aşıdır. Sputnik V (Dr. Reddy's Laboratories), Serum Institute of India'ya 2021 Eylül ayında en fazla aşı dozu üretmek için katıldı. Bu arada, Johnson ve Johnson aşısı, Moderna aşıları ve ZyCoV-D gibi diğer aşıların klinik denemeleri de başlatıldı. 16 Ocak 2021'de Hindistan, COVID-19 aşılama programını aşama aşama başlattı. "The Lancet" dergisinde yayınlanan bir rapora göre, Hindistan'da COVID-19 aşılamanın bir yılda 20 milyon yaşamı kurtardığı belirtilmiştir. Mart 2023 itibarıyla Hindistan'da 2 200 000 000 dozdan fazla COVID-19 aşısı verilmiştir. Aşı kampanyası, ülkedeki tüm yetişkinleri içerecek şekilde genişletilmiş ve belirli gruplara hatırlatma dozları da uygulanmaktadır. Hindistan'daki aşılama hızı yaklaşık olarak günde 1 500 000 dozdur ve hükümet aşı kampanyasını hızlandırmak için çalışmaktadır. Mart 2023'e kadar Hindistan vatandaşlarının %87,80'i en az bir aşı dozu almıştır ve yetişkin nüfusun yaklaşık %94,76'sı tamamen aşılanmıştır. Şu anda, küresel nüfusun yaklaşık %69,3'ü en az bir doz COVID-19 aşısı almıştır. Küresel olarak, 13 230 000 000 doz aşı alınmış olup, günde 1 170 000 doz dağıtılmaktadır. Buna karşılık, ekonomik olarak zayıf ülkelerdeki insanların %6'sı en az bir aşı dozu almıştır.

2.7.5. Viral DNA tabanlı aşılar

DNA tabanlı aşılar, virüs antijenlerini kodlayan belirli viral DNA dizisini içeren plazmidin enjekte edilmesiyle hücrelerde viral antijen ifadesini ve bağışıklık yanıtlarının oluşmasını sağlar. DNA aşılamanın, özellikle immün hücreleri aktive eden antijenik epitopları kodlayan özgüllük, stabilite ve üretim kolaylığı gibi viral vektörlü ve canlı-zayıflatılmış aşılarla karşılaştırıldığında teorik avantajları bulunmaktadır. Bu platform, düşük immünojenite ve insan genomuna genomik entegrasyon riski gibi çeşitli kısıtlamalardan hala muzdariptir.

COVID-19 salgını sırasında, çeşitli viral DNA tabanlı aşı adayları geliştirilmiş ve klinik denemelerde test edilmiştir. INO-4800, klinik denemelerde yer alan SARS-CoV-2 DNA tabanlı aşı adaylarından biridir. Pennsylvania merkezli bir şirket olan Inovio tarafından geliştirilen INO-4800, 'Cellectra 2000' adlı bir taşınabilir cihaz ile SARS-CoV-2 S proteininin DNA dizisidir. Cellectra 2000, elektriksel iletiler yardımıyla çekirdeğe DNA alımını kolaylaştırabilen bir elektroporasyon yöntemi ile çalışır. DNA aşısı, aşılanmış domuz ve farelerin akciğerlerinde tespit edilen nötralize edici antikorları uyardığı tespit edilmiştir. Akciğerde tespit edilen antikorlar, SARS-CoV-2 korunması açısından önemli olabilir. INO-4800'ün Faz I klinik denemeleri, 18-50 yaş aralığında otuz altı gönüllü üzerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, katılımcılarda ciddi yan etkilerin olmadığını göstermiştir. Aşı, *in vitro* nötralizasyon testinde SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 suşuna karşı koruyucu antikorlar üretebilmiş ve güçlü Th1 ve CD8+ T hücresi yanıtları göstermiştir.

GX-19, Genexine konsorsiyumu tarafından geliştirilen klinik denemelerde olan bir diğer DNA tabanlı aşıdır. GX-19, başlangıçta aşının etkinliği fare ve insansı olmayan primat modellerinde test edilmiş ve hayvan modellerinde yeni SARS-CoV-2'ye karşı güçlü nötralize edici antikor üretimi indüklemiştir.

2.7.6. Alt Birim aşıları

Protein bazlı aşılar, rekombinant protein teknikleri ile üretilen viral antijenik maddeleri taşır. Protein alt birimi aşıları, canlı viriyonun bir parçasını içermezler ve bu nedenle tüm virüs ve viral-vektör aşılarına göre güvenlidirler. Ayrıca, alt birim aşıları, özel epitoplar nedeniyle olumsuz reaksiyonların azalmasıyla bağışıklık yanıtlarını hızla uyarır. Bu nedenle, bu aşılar immün yetmezliği olan hastalarda kullanılabilir. Bu aşıların önemli dezavantajları düşük immünojenik profil ve aşı etkinliğini artırmak için adjuvanlar veya immün uyarıcı moleküllerin gerekliliğidir. Ayrıca, aşıların özgüllüğünü artırmak için antijenik epitoplar belirlenmelidir.

SARS-CoV-2'nin S proteininin yüksek antijenitesi nedeniyle güçlü bir bağışıklık yanıtı uyandırmak için ideal bir aşı hedefi olarak kabul edilmiştir. Baculovirus vektörü kullanılarak böcek hücrelerinde geliştirilen bir rekombinant protein alt birimi aşısı olan VAT00002 Sanofi-GSK COVID-19 aşısı, Sanofi Pasteur ve GlaxoSmithKline, Belçika

tarafından geliştirilmiştir. COVAX-19 (veya SpikoGen), Güney Afrika'da Vaxine Pty Ltd. tarafından geliştirilen başka bir rekombinant S protein aşı adayıdır ve enfeksiyonu ve viral bulaşımı azaltma potansiyeline sahiptir.

26 Kasım 2022'de COVID-19'a karşı aşılama dünya çapında iki yüz on sekiz yerde gözlemlenmiştir. 17 Mayıs 2022'ye kadar, EUL kapsamındaki aşılar arasında Pfizer/BioNTech Comirnaty aşısı, SII/COVISHIELD ve AstraZeneca/AZD1222 aşıları, Moderna COVID-19aşısı, Janssen/Ad26.COV 2.S aşısı, Sinovac-CoronaVac aşısı, Sinopharm COVID-19aşısı, Bharat Biotech BBV152 COVAXIN aşısı, Nuvaxovid (NVX-CoV2373) aşısı, Covovax (NVX-CoV2373) aşısı bulunmaktadır.

SAGE tavsiyesi ve WHO Önceliklendirme Yol Haritası'na göre, EUL aşıları güvenli ve etkilidir. Ancak, ağırlıklı olarak aşı türüne, önerilen bireysel yaşa, takviye dozuna ve yeni bir varyanta karşı etkinliğe göre değişirler. 8 Kasım 2022'ye kadar, Ulusal Düzenleyici Otoriteler (NRA), ondan fazla ülkede tam veya acil kullanım için kırk COVID-19 aşısına yetki vermiştir. COVID-19 aşılarını hazırlamak için farklı platformlar kullanılmıştır, bunlar arasında mRNA aşıları, alt birim aşıları, inaktive edilmiş virüs aşıları ve Adenovirüs vektör aşıları bulunmaktadır. 2022'deki Barrett raporuna göre, virüs benzeri partiküller, inaktive edilmiş virüsler, mRNA, replikasyon kusurlu viral vektörler ve protein alt birimleri de dâhil olmak üzere çeşitli teknolojiler kullanılarak atmış dört potansiyel aşı üretilmiştir. Çoğu aday aşı, nötralize edici antikorlar oluşturmak için viral S-proteini hedef almaktadır ve faz III klinik denemelere girmiştir. Toplamda yüz yetmiş beş aşı klinik geliştirme aşamasında ve yüz doksan dokuzu ön klinik geliştirme aşamasındadır.

2.7.7. Anti-idiyotipik aşılar

Anti-idiotipik (anti-Id) antikorlar, Niels Jerne'nin Idiotype kademesi kavramına dayanarak, vekil antijenler olarak kullanılabilir. Bu antikorlar, Ab2a ve Ab2β olarak iki ana tipe ayrılır. Ab2a, antijen bağlanmasını bloke etmezken, Ab2β ise antijenin bağlanmasını inhibe edebilir ve yapısal olarak antijene benzer. Bu, anti-Id antikorlarının, özellikle protein olmayan antijenler gibi zorlu antijenlerin aşılarını üretmede kullanılmasının avantajlarını ortaya koyar (Kieber-Emmonos ve ark., 2012; Ladjemi ve ark., 2012; Lemke ve ark., 2018; Vazquez ve ark., 2012). Anti-Id antikorlar, lipid,

karbonhidrat, nükleik asit epitopları ve hatta ilaçları taklit edebilirler. Bu antikorlar, antijene karşı daha geniş ve kararlı bir bağışıklık tepkisi oluştururken, antijenlere karşı gelişebilecek toleransı aşmaya ve otoimmün tepkileri önlemeye yardımcı olur. Bu özellikler, anti-Id antikorlarının terapötik aşılar olarak etkili bir şekilde kullanılmasını sağlar (Naveed A. ve ark., 2018).

Anti-idiyotipik antikor aşıları, belirli antijenlerin yapısal benzerlerini taklit edebilen monoklonal antikorlardır. Bu tür aşılar, özellikle protein olmayan antijenler için kullanılır çünkü bu tip antijenler genellikle düşük immunojenikliğe sahiptir ve yeterli miktarda veya saflıkta mevcut değildir. Anti-idiyotipik antikorlar, bağışıklık sistemini bu antijenlere karşı tepki vermeye teşvik eder, böylece antijenin kendisine karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi geliştirilmiş olur (Chapman ve ark., 1995).

İdiotipik aşılar, COVID-19'a karşı yeni bir yaklaşım sunar. İdiotip ağının deneysel manipülasyonu sayesinde, anti-idiyotip antikorlar kullanılarak spesifik bağışıklık tepkileri tetiklenebilir. Bu antikorlar, virüsün antijenik yapısını taklit ederek, aşı ve tedavi stratejilerinde alternatif bir yol sunar. Poliklonal idiotip/anti-idiyotip antikorlar, mevcut aşı ve tedavilere alternatif olarak önerilmekte olup, COVID-19'un önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Naveed, A. ve ark., 2021).

Bu çalışmada öncelikle SARS-CoV-2 yüzey proteinlerine karşı hibridoma teknolojisi kullanılarak fare monoklonal antikorları geliştirildi. Anti-SARS-CoV-2 (S protein/RBD) fare antikorları ile SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş bir donör insandan elde edilen Convalescent Plazma'dan enzimatik sindirimi sonrası idiyotip alanların bulunduğu fab fragmentleri saflaştırıldı. Saf Fab fragmentleri kullanılarak anti-idiyotip monoklonal antikorlar hibridoma teknolojisi ile geliştirildi. Bu antikorların anti-RBD yanıtı oluşturma etkinlikleri çeşitli ELISA testleri kullanılarak araştırıldı.

Çalışma sonucunda elde edilen anti-idiyotip fare monoklonal antikorlarının *in vivo* testler de elde edilen sonuçlara göre SARS-CoV-2 için kullanılabilecek aşı adayı moleküller olabilecekleri gösterilmiş oldu.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada monoklonal antikorların geliştirilmesi için Hibridoma Teknolojisi kullanıldı. Geliştirilen monoklonal antikorların saflaştırılmasında kolon kromatografisi, karakterizasyonunda ise direkt ELISA, dolaylı ELISA, yarışımlı ELISA, gümüş boyama, commassie blue boyama, Western Blot tekniklerinden yararlanıldı. Enzim kesimi için fisin, papain ve yerli enzim ile optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Bu çalışma kapsamında kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler Çizelge 3.1.'de kimyasal malzemelerin listesi ise Çizelge 3.2.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve sarf malzeme listesi

Ekipman Adı	**Üretici Firma**
ELISA plak okuyucu	BIOTEK
ELISA yıkayıcı	BIOTEK
Fraksiyon toplayıcı	BIO-RAD
Güç kaynağı	BIO-RAD
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Benchmark
Liyofilizatör	CHRIST
NGC	BIO-RAD
Protein A kolonu	GE
Santrifüj	HITACHI
Spektrofotometre	Biochrom
Manyetik karıştırıcı	BioCote
Vortex	Heidolph
PVDF membran	Thermo
SDS PAGE jel tank sistemi	BIO-RAD
pH metre	METTLER TOLEDO
Çoklu ELISA plak yıkayıcı	BIOTEK
Santrifüj	SIGMA
96 Kuyucuklu steril ELISA plakları	Corning
Hemasitometre	Bright Line
Makas	Sigma
Otomatik pipet	Eppendorf
Pens	Sigma
Su banyosu	OVAN
Vakum filtrasyon	VWR
25, 75, 150, 300 cm^2'lik filtreli hücre flaskı	TPP
25, 30, 40 cm hücre kazıyıcı	Costar
2, 5, 10,25 ml serolojikpPipet	TPP
15, 50 ml steril falkon	Eppendorf

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve sarf malzeme listesi (devam)

Ekipman Adı	**Üretici Firma**
1,8 ml kriyotüp	TPP
Etüv	Nüve
(CO_2) inkübatör	ECOCELL
+4 ˚C buzdolabı	BOSH
0,1-10 µl pipet ucu	Eppendorf
1000-5000 µl pipet ucu	Eppendorf
10-200 µl pipet ucu	Eppendorf
2,5 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl'lik mikropipetler	Thermo
-20 ˚C buzdolabı	BOSH
25, 100, 250, 500, 1000, 2000 cc cam şişe	Schott
300 µl'lik çoklu mikropipet	Thermo
50-1000 µl pipet ucu	Eppendorf
Hassas terazi	Precisa GravimectricsAG
Fare immunoglobulin alt isotip ELISA kiti	BD biosciences
Nitril eldiven	MY GLOVE
Vorteks	Scientefic Indutries
1 ml enjektör	SET
96 Kuyucuklu ELISA plakaları	NUNC
1,5 ml santrifüj tüpü	Eppendorf
0,25 ml santrifüj tüpü	Eppendorf
0,22 µl şırınga filtresi	Millipore
Çalkalamalı inkübatör	N-BIOTEK
1, 2,5, 5, 10, 50 ml'lik enjektör	SET
0,45 µl şırınga filtresi	Millipore
0,75 ml santrifüj tüpü	Eppendorf
Peristaltik pompa	Pharmacia
Antikor izotiplendirme kiti	Roche
2 ml santrifüj tüpü	Eppendorf
Orbital karıştırıcı	Edmund Buhler
Buz makinesi	Scotsman AF100
Inverted mikroskop	Olympus
Karbondioksitli inkübatör	Heraus
LaminAir kabin	Heraeus
Otoklav	Sistek
Sıvı azot tankı ve azot taşıma tankları	Union Carbide Nitrogen
Buz makinesi	Scotsman AF100
Inverted mikroskop	Olympus
Işık mikroskobu	Olympus
LaminAir hava akış kabini	Esco
Isıtıcılı karıştırıcı	Benchmark
Isıtıcı bloğu	Benchmark
Sonikatör	BANDELIN
Deney hayvanları ünitesi	TÜBİTAK/MAM/GMBE

Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzeme listesi

Kimyasal Adı	**Marka**	**Kimyasal Adı**
50X HAT	GIBCO	21060
50X HT	GIBCO	41065
8-azoguanin	SIGMA	A8526
DMEM	SIGMA	D5648
Etanol	ISOLAB	920.026
FBS	CAPRICORN	FBS-IH-11A
Gentamisin	GIBCO	15750
HEPES	SIGMA	H3375
Multicell	VISENT ING	090-110
Poly Etilen Glikol- 4000	MERCK	8.07490
PSA	SIGMA	A5955
RPMI 1640	GIBCO	31800
Hepes, 1 M	GIBCO	15630
L-glutamine, 200 mM (100x)	GIBCO	25030
MEM Amino Acids, 50x,	GIBCO	0977
MEM Non-essential Amino Acids, 100X	GIBCO	0960-8
Sodium Pyruvate, 100 mM (100x)	GIBCO	11360
MEM vitamins, 100x	GIBCO	11120
Sodium bicarbonate, 7.5%	GIBCO	11878
Sodyum Bikarbonat	SIGMA	S5761
Tiripan Blue	SIGMA	T8154
3’3-5’5 Tetrametil Benzidin	SIGMA	T2885
AEC Staining Kit	SIGMA	AEC101-1KIT
Akrilamid	SIGMA	A3553
Anti-mouse IgG AP işaretli	SIGMA	A3688
Anti-mouse IgG HPR işaretli	SIGMA	A9044
Anti-mouse Polyvalent AP işaretli	SIGMA	A0162
Anti-mouse Polyvalent HRP işaretli	SIGMA	A0412
Anti-rabbit IgG AP işaretli	SIGMA	A3687
Anti-rabbit IgG HRP işaretli	SIGMA	A6154
Asetik asit	MERCK	1.00063
BCIP/NBT substrat	MILLIPORE	ES006
Çinko Klorür	SIGMA	Z4875
DMSO	SIGMA	34943
Glisin	MERCK	1.00590
Hamerstan Kazein	SIGMA	E0789
HCL %37	SIGMA	302626
Magnezyum Klorür	SIGMA	M8266
Mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit	BD PHARMA	550487
N'N'-Bisakrilamid	BIORAD	161-0201
Para Nitro Fenil Fosfat	SIGMA	71768
Polivinil Prilidon	SIGMA	PVP10
Potasyum Fosfat Di Bazik	SIGMA	04248

Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzeme listesi (devam)

Kimyasal Adı	**Marka**	**Kimyasal Adı**
Potasyum Fosfat Di Bazik	SIGMA	04243
Potasyum Hidroksit	SIGMA	P5958
Sodyum asetat	VWR	27653292
Sodyum asetat trihidrat	MERCK	106267
Sodyum Hidroksit	MERCK	S8045
Sülfürik Asit %95-97	FLUKA	84721
Süt Tozu	FLUKA	70166
Trisma	SIGMA	T6066
Tween20	SIGMA	P1379
Freund's Complete Adjuvant	SIGMA	F5881
Freund's Incomplete Adjuvant	SIGMA	F5506
Saponin	SIGMA	84510
Tri Sodyum Sitrat Dihidrat	MERCK	1.06448
%37 Formaldehit	MERCK	104.002
4X Laemmli Örnek tamponu	BIORAD	161-0747
Albumin from Chicken Egg White	SIGMA	A5503
Amonyum Persulfat	SIGMA	A3678
Coomasie Brillantblue G-250	APPLICHEM	A3480
Gümüş Nitrat	SIGMA	209139
İzopropanol	VWR	UN1219
Metanol	MERCK	106.007
SDS	SIGMA	L3771
Sodyum Karbonat	SIGMA	13418
Sodyum Tiosulfat Penta Hidrat	SIGMA	S6672
TEMED	SIGMA	T9281
SARS-CoV-2 (COVID-19) S1 Protein His Tag (insect)	SINO BİOLOGICAL	40591-V08B1
SARS-CoV-2 (COVID-19) S1 Protein His Tag (HEK293)	ACRO BİOSYSTEMS	S1N-C52H3
SARS-CoV-2 (COVID-19) S protein RBD, Fc Tag	ACRO BİOSYSTEMS	SPD-C5255
SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein His Tag (HEK293)	SINO BİOLOGICAL	AG0104
TBT-2	ACIBADEM UNİVERSİTESİ	25 AA Peptid

Çizelge 3.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal malzeme listesi (devam)

Kimyasal Adı	Marka	Kimyasal Adı
SARS-CoV-2 (COVID-19) S2 protein, His Tag	ACRO BİOSYSTEMS	S1N-C52H3
SARS – CoV-2 RBD: Spike Protein Receptor Binding Domain	SYNBIOTIK	AG-0103
BSA	SIGMA	A7030
HBS	SIGMA	A5843
ACE2	İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, Mehmet İnan	-

3.1. Kullanılan Hücre Hatları ve Canlı Materyaller

Tez çalışması süresince kullanılan tüm canlı materyaller Çizelge 3.3.'te gösterildi. Monoklonal antikor geliştirme çalışmaları için kullanılan deney hayvanları 12 saat gündüz 12 saat gece döngüsüne uygun olarak 21±2°C sıcaklıkta ve %60 nem oranına sahip ortamda muhafaza edildi. Çalışmada kullanılan tüm deney hayvanları TÜBİTAK MAM Yaşam Bilimleri Başkan Yardımcığı Deney Hayvanları Biriminden temin edildi ve bakımları Deney Hayvanları bakım ünitesi bünyesinde sağlandı. Bu çalışmada deney hayvanları kullanımı konusunda TÜBİTAK Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (TÜBİTAK-HADYEK) onay alınmıştır. (Etik Kurulu no: 16563500-111-64-3028).

Çalışma süresinde kullanılan hücreler ise steril hücre kültürü koşullarında çalışıldı, 37 °C, %5 CO_2 ve %90 nem bulunan ortama sahip inkübatörlerde hücre kültür flaskları içinde inkübe edildi. Hücre hatlarının stokları -196 °C'lik sıvı azot tanklarında muhafaza edildi.

Çizelge 3.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan canlı materyaller

Kullanılan Materyal	Kullanım Amacı	Temin Edildiği Yer
Fare (Balb/C)	İmmünizasyon çalışmaları	TUBITAK/GMBE DEHAM
Tavşan (Yeni Zelanda)		
Fare Dalak Hücreleri	Hibridoma çalışmaları	TUBITAK/GMBE (Proje kapsamında geliştirildi)
Tavşan Dalak Hücreleri		
Fare (Balb/c) Makrofaj Hücreleri		TUBITAK/GMBE DEHAM
F0 fare myeloma hücresi (CRL-1646)		ATCC
240E1:1 tavşan myeloma hücresi		Loyola Üniversitesi

3.2. Ticari SARS-CoV-2 Antijenlerin Temini ve Stok Hazırlanması

SARS-CoV-2 S1 ve SARS-CoV-2 S1 RBD proteinleri "Acro Biosytems" şirketinden SARS-CoV-2 S1 proteini ayrıca "Sino Biological" şirketinden ticari olarak temin edildi. Daha sonra antijenler üretici firma talimatlarına göre sulandırıldı (Çizelge 3.4.) ve 5 µl hacimlere bölünerek -20 °C'de muhafaza edildiler.

Çizelge 3.4. Ticari antijenlerin hazırlanması

Antijen Adı	**Hazırlanışı**
SARS-CoV-2 (COVID-19) S1 Protein His Tag (insect) antijeni (Sino Biological, 40591-V08B1)	Ticari temin edilen antijen liyofilize formda 100 µg geldi. 400 µl steril dH2O içerisinde nazikçe çalkalanarak çözüldü (0,25 mg/ml).
SARS-CoV-2 (COVID-19) S protein RBD, Fc Tag antijeni (Acro Biosystems, SPD-C5255)	Ticari temin edilen antijen liyofilize formda 100 µg geldi. 100 µl steril dH2O içerisinde nazikçe çalkalanarak çözüldü (1 mg/ml).
SARS-CoV-2 S1 Protein His Tag (HEK293) antijeni (Acro Biosystems, S1N-C52H3)	Ticari temin edilen antijen liyofilize halde 100 µg geldi. 167 µl steril dH_2O içerisinde nazikçe çalkalanarak çözüldü ve küçük paylara ayırarak -20 °C'de stoklandı. (0,6 mg/ml)

3.3. Protein Görüntüleme Yöntemleri

Tez çalışmasında hem ticari olarak temin edilen hem de geliştirilen protein yapılarının görüntülenmesi ve karakterizasyon çalışmaları için SDS-PAGE ile yürütüldükten sonra, gümüş boyama, coomassie blue boyama ve Western Blotlama yapıldı.

3.3.1. SDS-PAGE yöntemi

Bir proteinin görünen moleküler ağırlığı (MW), SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemi kullanılarak, güçlü bir katyonik deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile kompleks haline getirilen proteinin göç mesafesi üzerinden belirlenebilir. Bu yöntem, 1969 yılı civarında geliştirilen, basitliği sayesinde günümüzde de yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir (Shapiro ve Maizel, 1969). Bu yöntem, biyokimyasal analizlerde halen vazgeçilmez bir teknik olarak kabul edilmekte olup, proteinlerin yapısal ve işlevsel özelliklerinin belirlenmesinde temel bir araçtır. SDS-PAGE Jel elektroforezi için kullanılacak tamponların hazırlanma yöntemleri Çizelge 3.5.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.5. SDS-PAGE jel elektroforez çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanışı

Tampon Adı	**Hazırlanışı**
%30 Akrilamid-Bis akrilamid Karışımı	29,1 g akrilamid ile 0,9 g Bis-akrilamid 100ml dH_2O içerisinde karanlıkta çözüldü.
%10 Amonyum Per Sülfat Tamponu	0,1 g APS 1ml dH_2O içerisinde çözdürüldü. Kullanılmadan hemen önce taze hazırlandı.
1.5 M Tris-HCl Tamponu pH 8.8	İstenilen hacim kadar 1,5 M Tris-base tartıldı ve distile su içinde çözüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlandı.
1 M Tris-HCl Tamponu pH 6.8	İstenilen hacim kadar 1M Tris-base tartıldı ve distile su içinde çözüldü. HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.
Yürütme Tamponu (10x)	30,3 g Tris-base, 144,1 g Glisin ve 10 gr SDS tartılarak 1 l distile su içinde çözüldü. 1X oranında seyreltilerek kullanıldı.

Ticari olarak temin edilen antijenlerin ve tez çalışması süresince geliştirilen antikorların karakterizasyon çalışmaları için protein yapıların doğruluğunu test etmek için kullanıldı.

Çalışma protokolünde, öncelikle SDS-PAGE için yürütme jelleri hazırlandı (Çizelge 3.6.). Örnekler 4x Laemmli Buffer ile karıştırıldı ve yükleme jelindeki ilgili kuyulara yüklendi. 80 V ile yürütüldü ardından örnekler ayırma jeline geçtiğinde 120 V'da yürütülerek proteinlerin ayrımı gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6. SDS-PAGE yürütme jeli bileşenleri

İçerik	**Yükleme Jeli %10**	**Ayırma Jeli**
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	630 µl	-
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	-	2,5 ml
%30 Akrilamid Karışımı	830 µl	4 ml
dH_2O	3,4 ml	3,3 ml
%20 SDS	50 µl	100 µl
APS (100 mg/ml)	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

3.3.2. Native- PAGE yöntemi

Native jel hazırlığı için kullanılan tamponların hazırlanış şekilleri aynıdır. Ancak SDS-PAGE genellikle proteinlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek, protein saflaştırma süreçlerini kontrol etmek ve denatüre protein örneklerini analiz etmek için kullanılırken; Native PAGE ise protein komplekslerinin incelenmesi, enzim aktivitelerinin değerlendirilmesi ve protein-protein etkileşimlerinin gözlemlenmesi gibi durumlar için tercih edilir.

Çalışma protokolünde, Native Jel, Çizelge 3.7.'de verilen bilgiler doğrultusunda hazırlandı ve dikey elektroforez sistemine alındı. Örnekler, 4x yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra kuyulara yüklendi ve 100 V enerji ile yürütüldü.

Çizelge 3.7. Native jel bileşenleri

İçerik	**Yükleme Jeli**	**Ayırma Jeli**
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	-	5 ml
%30 Akrilamid Karışımı	1,1 ml	6,8 ml
dH_2O	6,1 ml	8 ml
APS (100 mg/ml)	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

3.3.3. Zimogram jel yöntemi

Zimografi, hidrolitik enzimlerin aktivitesini, özellikle substrat spesifikliklerine dayanarak tespit etmek için kullanılan elektroforetik bir tekniktir. Kullanılan bileşenlerin, SDS-PAGE'den farklı olan tamponları Çizelge 3.8.'deki gibi hazırlandı. Bu çalışmada, proteazların aktivitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışma zimogram analizi yöntemine dayanmaktadır (Vijayaraghavan ve ark., 2014). Ancak, orijinal yöntemde kullanılan kazein substratının yerine, bu çalışmada jelatin kullanıldı, bu değişiklik Çizelge 3.9.'da belirtildi.

Çizelge 3.8. Zimogram analizinde kullanılan tamponlar

Tampon Adı	**Hazırlanışı**	**Kullanım Yeri**
Substrat Çözeltisi	5 mg jelatin tartılarak 10 ml distile su içine eklendi ve jelatin eriyene kadar ısıtıldı.	Enzim için uygun substratın hazırlanması.
%1 Triton x Yıkama Tamponu	2 ml Triton X-100, 200 ml 0,05 M sodyum fosfat tamponu içerisinde dilüe edildi.	Jelden SDS'in uzaklaştırılarak enzimin tekrar fonksiyonel hale getirilmesi.

Metodoloji değişikliği olarak, denatürasyon için sıkça kullanılan 2-β-merkaptoetanol ve kaynatma işlemleri bu çalışmada uygulanmadı. Zimografide, elektroforez işleminin tüm aşamaları, SDS-PAGE prosedürlerine uygun şekilde yürütüldü. Bu adaptasyonlar, substrat ve işlem koşullarındaki değişiklikler ile enzim aktivitesinin daha doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlamayı hedeflendi.

Çizelge 3.9. Zimogram jel bileşenleri

İçerik	**Yükleme Jeli**	**Ayırma Jeli**
0,5 M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8.8	-	5 ml
%30 Akrilamid Karışımı	1,1 ml	6,8 ml
dH_2O	6,1 ml	6 ml
Jelatin (5mg/ml)	-	2 ml
%20 SDS	50 µl	100 µl
APS (100 mg/ml)	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Çalışma protokolünde, jel yürütme sonrası SDS'in uzaklaştırılması için 0,5 M sodyum fosfat tamponu içinde 5 dk çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra %1'lik Triton-X bulunan tampon içerinde 90 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra bantların görüntülenmesi için boyama yapıldı.

3.3.4. Gümüş boyama yöntemi

Gümüş boyama, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile ayrılan proteinleri nanogram düzeyinde tespit etme kabiliyeti nedeniyle mükemmel bir teknik olarak kabul edilir. Bu teknik, gümüş iyonlarının protein moleküllerinin bulunduğu yakın çevrede metalik gümüşe seçici olarak indirgenmesi prensibine dayanır. Boyama

işlemi, proteinlerin sabitlenmesi (fiksleme), duyarlılaştırma (ön muamele), yıkama, gümüş emdirme (bant fiksleme) ve sonrasında görüntünün geliştirilmesi (geliştirme) adımlarından oluşur. Tamponların hazırlanma protokolü Çizelge 3.10.'da yer almaktadır. Boyama süreci sırasında, protein bantlarına bağlanan gümüş miktarına bağlı olarak jelin rengi değiştiği için detaylı görsel analizler için ideal kabul edilir (Kumar, G., 2018).

Çizelge 3.10. Gümüş boyama çalışmalarında kullanılan tamponlar

Tampon Adı	**Hazırlanışı**
Fiksleme Tamponu	%50 MetOH, %12 Asetik Asit, 0,5ml %37 Formaldehit olacak şekilde hazırlandı. dH_2O ile 1 litreye tamamlandı.
Yıkama Tamponu	%50 EtOH, %50 dH_2O olacak şekilde hazırlandı.
Ön Muamele Tamponu	0,2g $Na_2S_2O_3$. $5H_2O$ 1 litre çözelti için tartılarak hazırlandı.
Bant Fiksleme Tamponu	$AgNO_3$ (2g/lt) ve 0.75 ml %37 Formaldehit çeker ocak altında hazırlandı.
Gelişme Tamponu	60g/lt Na_2CO_3, 4 mg/lt $Na_2S_2O_3$ ve 0,5ml %37 Formaldehit çeker ocak altında hazırlandı.
Durdurma Tamponu	%50 MetOH, %12 Asetik asit olacak şekilde hazırlandı. dH_2O ile 1 litreye tamamlandı.
Saklama Tamponu	%50 MetOH, %50 dH_2O olacak şekilde hazırlandı.

Çalışma protokolünde, yürütme işlemi biten jellerden gümüş boyama yapılacak olan jel, oda sıcaklığında en az 1 saat fikleme tamponu içerisinde bekletildi. Daha sonra %50 etanol ile üç kere yıkandı. Yıkama sonrası ön muamele tamponu içerisinde 1 dk tutuldu ve distile su ile üç defa yıkandı. Jel bant fix tamponu içerisinde 20 dk bekletildi ve üç defa distile su ile yıkandı ardından geliştirme tamponu içesine alınarak bantların oluşumu takip edildi ve durdurma tamponuna alındı görüntüleme yapıldıktan sonra jel saklama tamponunda, 4 °C'de 3 ay muhafaza edildi.

3.3.5. Commassie blue boyama

Coomassie Brilliant Blue (CBB), elektroforez ile ayrılan proteinlerin görselleştirilmesi için yaygın olarak kullanılan, basit bir boyama prosedürü ve yüksek kantitasyon sunan bir boyadır. Ayrıca kütle spektrometrik protein tanımlaması ile tamamen uyumludur. Ancak avantajlarına rağmen CBB'nin gümüş veya floresans boyamalardan daha az duyarlı olduğu kabul edilir (Dyballa ve Metzger, 2009). Commassie blue boyaması için kullanılan tampon çözeltileri Çizelge 3.11.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.11. Commassie blue boyama için kullanılan tamponlar

Tampon Adı	**Hazırlanışı**
Fiksleme Tamponu	25 ml metanol, 5 ml asetik asit, son hacim dH_2O ile 50 ml'ye tamamlanır.
Commassie Stok Solüsyonu	2 g commassie blue boyası (toz) tartılır 50 ml metanol, 10 ml asetik asit karışımında çözülerek hazırlanır. Karanlıkta saklanır.
Commassie Çalışma Solüsyonu	50 ml metanol, 3 ml commassie stok solüsyonu, 10 ml asetik asit karışımı hazırlanır ve dH_2O ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Karanlıkta saklanır.
Destaining (Arıtma) Solüsyonu	90 ml metanol, 20 ml asetik asit karışımı dH_20 ile 200 ml'ye tamamlanır. Karanlıkta saklanır.

Çalışma protokolünde bu sistemde, Jel önce fiksleme tamponu içerisinde 30 dk. Oda sıcaklığında, karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Ardından 25 ml commassie çalışma solüsyonu içerisine alındıktan sonra bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde tutuldu. Daha sonra jeldeki fazla boyanın uzaklaştırılması için 50 ml arıtma çözeltisine alınıp çalkalayıcı üzerinde bir saat bekletildi. Jeldeki fazla boya yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Boyama sonrası görüntüsü alınan jel, güvenlik kurallarına uygun şekilde bertaraf edildi. Commassie blue proteinlerle kovalent bağlandığı için protein çöken yerler, mavi renkte görünmektedir.

3.3.6. Western Blot yöntemi

Western blotlama, moleküler biyoloji ve proteomik alanlarında dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, hedef proteinleri tespit etmek ve yarı niceliksel olarak değerlendirmek için kullanılır. Proteinleri tanımlamak ve göreceli protein seviyelerini doğru bir şekilde ölçmek için kullanılabilecek etkili ve güçlü bir teknik olmaya devam etmektedir (Sule ve ark., 2023). Çalışmada Western Blot çalışması ile proteinlerin görüntülenmesi için gerekli olan kimyasallar Çizelge 3.12.'de verildi.

Çizelge 3.12. Western blotlama çalışmalarında kullanılan tamponlar.

Tampon Adı	**Hazırlanışı**
Trisma Base Tamponu (TBS)	9,68 g Tris-Base ve 32g NaCl tartılıp 1lt dH_2O içerisine eklendi, ardından pH 7,6'ya ayarlandı.
Trisma Base Tamponu-Tween 20 (TBS-T)	1 litre TBS çözeltisi içerisine 0,5 ml Tween-20 eklendi.
Transfer Tamponu	0,592 g Tris-Base ve 0,293g Glisin tartılarak 1lt distile su içinde çözündü. %10 SDS çözeltisinden 337 µl eklendikten sonra pH 9,2'ye ayarlandı. Mevcut hacmin %20'si kadar methanol eklenerek kullanıldı.
Substrat Tamponu	8 ml dH_2O içerisinde AEC Substrat tamponları çözdürülerek hazırlandı.

Çalışma protokolünde, Western blot çalışması için, PVDF membran metanol ile aktifleştirilip distile su ile durulandı daha sonra whatman kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı. BIORAD Transfer Blot cihazının kasetine sırasıyla dört vatman kâğıdı, aktifleştirilen membran ve ardından yürütme işlemi biten jel ve yine dört vatman kâğıdı dizildi. 1,5 A, 30 V ayarda transfer 30 dk sonunda tamamlandı. Spesifik olmayan bantların ve lekelerin oluşmasının önlenmesi için membran TBS içerisinde hazırlanan %5 süt tozu içerisine alınarak bloklandı. Bloklama sonrası membran 3 kez TBS-T içerisinde 20 dk tutularak yıkandı. Daha sonra uygulama amacına bağlı kalınarak jelde antijen yürütüldüyse; bloklu membran TBS içerisinde hazırlanan işaretli antikor ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi ve ardından üç kez TBS-T ile yıkandı. İşaretli antikora uygun substrat ile muamele edilen membrandaki bantların oluşumu gözlendi. Membrandaki antijene spesifik geliştirilen bir monoklonal antikorun test edilmesi amaçlandıysa; işaretli antikordan önce monoklonal antikorlar membranla etkileşime geçirildi ve daha sonra TBS-T ile yıkanarak uygun işaretli antikor basamağına geçildi.

3.4. ELISA Yöntemleri

Enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA), araştırma ve klinik ortamlarda biyomoleküllerin tespiti için kullanılan en spesifik ve kullanıcı dostu analitik tekniklerden biridir. Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Yenilikçi ilerlemelerle sürekli olarak geliştirilen ELISA, duyarlılığını artırarak çeşitli biyobelirteçlerin belirlenmesine imkân sağlar.

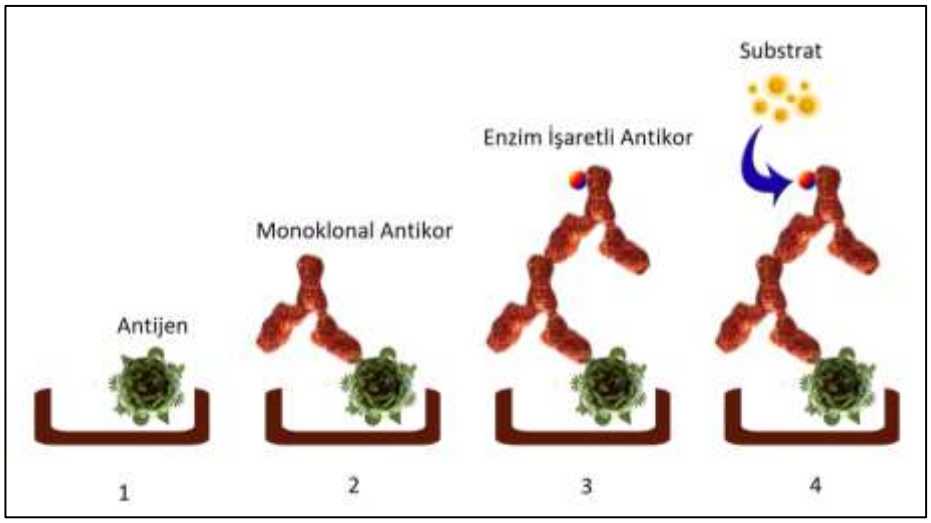
Doğrudan, dolaylı, sandviç, rekabetçi ve nanopartikül bazlı gibi farklı ELISA türleri bulunur. Her bir test türü, belirli biyobelirteçleri tespit etme kapasitesine göre özelleştirilmiştir (Tabatabaei ve Ahmed, 2022).

3.4.1 Dolaylı ELISA yöntemi

Dolaylı ELISA protokolü (Şekil 3.1.) hem immünize deney hayvanlarının kan serumlarındaki antikor yanıtlarının takibi için hem de füzyon çalışmalarında oluşan hibrit hücrelerin ürettikleri antikor yanıtlarını belirlemek için kullanıldı. Gerekli olan tamponlar Çizelge 3.13.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.13. ELISA çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanması

Tampon Adı	**Hazırlanışı**
500 mM Potasyum Fosfat Tamponu (Stok)	400 ml dH_2O içerisinde 34,8 gram dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) çözdürüldü, 200 ml dH_2O içerisinde 13,65 gram potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4) çözdürüldü. Ve pH 7,2 olana kadar potasyum fosfat monobazik, dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisinin üzerine eklenerek çözelti hazırlandı.
10 mM Potasyum Fosfat Tamponu (PBS)	8,75 gr Nacl, 20 ml 500 mM potasyum fosfat tamponu ile karıştırıldı, hacim dH_2O ile 1 litreye tamamlandı.
10 mM Potasyum Fosfat-Tween 20 Tamponu (PBS-T)	1 litre PBS çözeltisinin içerisine 500 µl Tween-20 eklenerek hazırlandı.
%1,5 Süt Tozu Tamponu	1,5 g süt tozu tartılarak 100 ml PBS içerisinde çözüldü.
%2 Süt Tozu Tamponu	2 g süt tozu tartılarak 100 ml PBS içerisinde çözüldü.
%5 Süt Tozu Tamponu	5 g süt tozu tartılarak 100 ml PBS içerisinde çözüldü.
HRP Substrat A tamponu	HRP işaretli antikorlar içinse 0,1 M Sodyum asetat için 1,64 gram tartım yapıldı. 200 ml son hacim dH_2O ile tamamlandı ve 0,1 M sitrik asit ile pH 5,0'a ayarlandı.
HRP Substrat B Tamponu	3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) 20 mg tartılarak 5 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü karanlıkta saklandı.
2 M Sülfürik asit (H_2SO_4)	54 ml H_2SO_4 250 ml dH2O içerisinde çözülerek hazırlanır.
Alkalen Fosfataz Substrat Tamponu	0,027 gram çinko klorür, 0,04 gram magnezyum klorür ve 1,5 gram glisin 200 ml dH_2O içerisinde karıştırıldı. pH 10,4 olana kadar katı potasyum hidroksit eklenerek hazırlandı.



Şekil 3.1. Dolaylı ELISA yöntemi

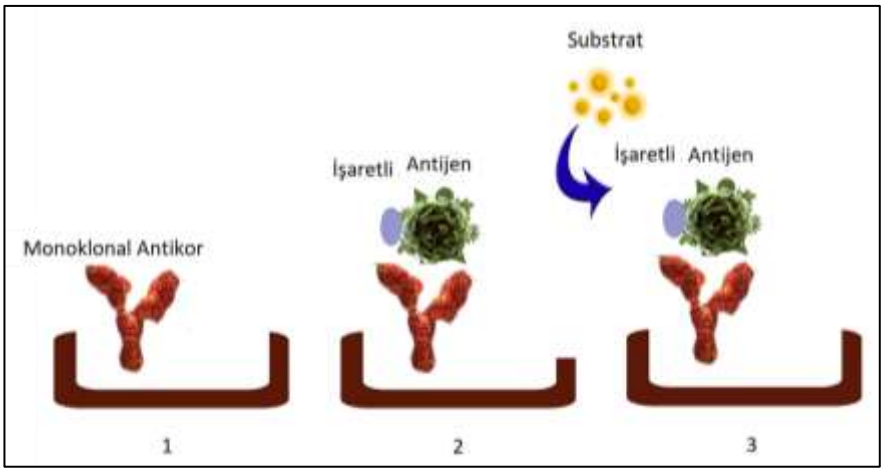
Çalışma protokolünde, çalışmada optimize edilen antijenik protein (SARS Cov-2) 96 gözlü ELISA plak kuyularına PBS içerisinde dilüe edilerek gece boyu 4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün kuyular 300 µl PBS-T ile üç kere yıkandı uygun konsantrasyondaki süt tozu ile 1 saat 37 °C'de bloklandı. İnkübasyon sonrası kuyular PBS-T ile aynı şekilde yıkandı. Test edilecek serum ya da hibridoma üst sıvıları belirlenen dilüsyonlarda kuyulara eklendi ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Enzim işaretli sekonder antikor kullanılmadan önce kuyular PBS-T ile yıkandı ve uygun konsantrasyondaki dilüsyon aralığında (1/2000-1/2500) hazırlanarak ELISA plak kuyularına 100'er µl ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Son kez PBS-T ile beş defa yıkanan kuyulara işaretli enzime uygun substrat tamponu eklenerek spektrofotometrik okuma alındı ve deney sonuçları pozitif ve negatif kontrol kuyuları baz alınarak değerlendirildi. Çizelge 3.14.'te farklı çalışmalar için kullanılan antijen, antikor konsantrasyonları bulunmaktadır.

Çizelge 3.14. Dolaylı ELISA bileşenlerinin kullanım konsantrasyonu ve miktarları

Kullanım amacı	Kullanılan protein	Konsantrasyon /Dilüsyon miktarı	Kullanım miktarı
Fareler ve Tavşanların immün yanıtının kontrolü	Yağı alınmış süt tozu	%1,5	300 µl
Farelerin immün yanıtının kontrolü	Fare serumu	1/100, 1/1000, 1/5000	100 µl
Tavşanların immün yanıtının kontrolü	Tavşan serumu	1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/20000	100 µl
Farelerin immün yanıtının kontrolü	Keçi anti-fare IgG alkalen fosfataz (AP) veya Horseradish peroksidaz (HRP) işaretli	1/2000	100 µl
Tavşanların immün yanıtının kontrolü	Keçi anti-tavşan IgG AP veya HRP işaretli	1/2500	100 µl
Fareler ve Tavşanların immün yanıtının kontrolü	AP enzimi için uygun proteini olmayan substrat	mg/ml	100 µl
Fareler ve Tavşanların immün yanıtının kontrolü	HRP enzimi için uygun substrat	-	100 µl
Hibridoma yanıtının kontrolü	Hibridoma üst sıvısı	-	100 µl
Hibridoma yanıtının kontrolü	Keçi anti-fare Polyvalent (G,A,M) AP veya Horseradish peroksidaz (HRP) işaretli	1/2000	100 µl

3.4.2. Direkt ELISA yöntemi

Direkt ELISA yöntemi (Şekil 3.2.), biyotin ve HRP enzimleri ile işaretlenen antijenlerin çalışma konsantrasyonunun tespit edilmesi için kullanıldı. Gerekli olan tamponlar Çizelge 3.13.'tekiler ile aynıdır.

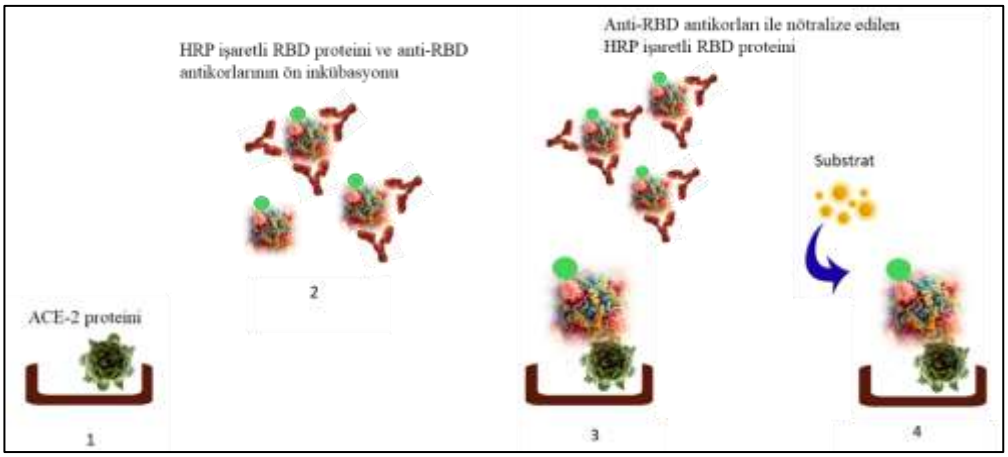


Şekil 3.2. Direkt ELISA yöntemi

Çalışma protokolünde, test edilecek işaretli proteine özgün antikor ya da antijenik proteinin 96 gözlü ELISA plak kuyularına kaplanması için, gece boyu 4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün kuyular 300 µl PBS-T ile üç kere yıkandı uygun konsantrasyondaki süt tozu ile 1 saat 37 °C'de bloklandı. İnkübasyon sonrası kuyular PBS-T ile aynı şekilde yıkandı. Test edilecek işaretli protein artan dilüsyonlarda (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 ve 1/5000) hazırlanarak 100 'er µl ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Son kez PBS-T ile beş defa yıkanan kuyulara işaretli enzime uygun substrat tamponu eklenerek spektrofotometrik okuma alındı ve deney sonuçları pozitif ve negatif kontrol kuyuları baz alınarak değerlendirildi.

3.4.3. Yarışımlı RBD nötralizan ELISA yöntemi

SARS-CoV-2 Spike proteininin reseptör bağlanma alanı (RBD, S-RBD), insan hücrelerinde bulunan ACE-2 reseptörlerine güçlü bir şekilde bağlanma yeteneğine sayesinde virüsün hücrelere girişini ve enfeksiyonun başlamasını sağlar. RBD nötralizasyon ELISA testi (Şekil 3.3.), çalışma kapsamında geliştirilen monoklonal antikorların RBD proteinine bağlanarak onun ACE-2 proteini ile arasındaki etkileşimi bloke edip edemediğini tespit edebilmek için kullanıldı.



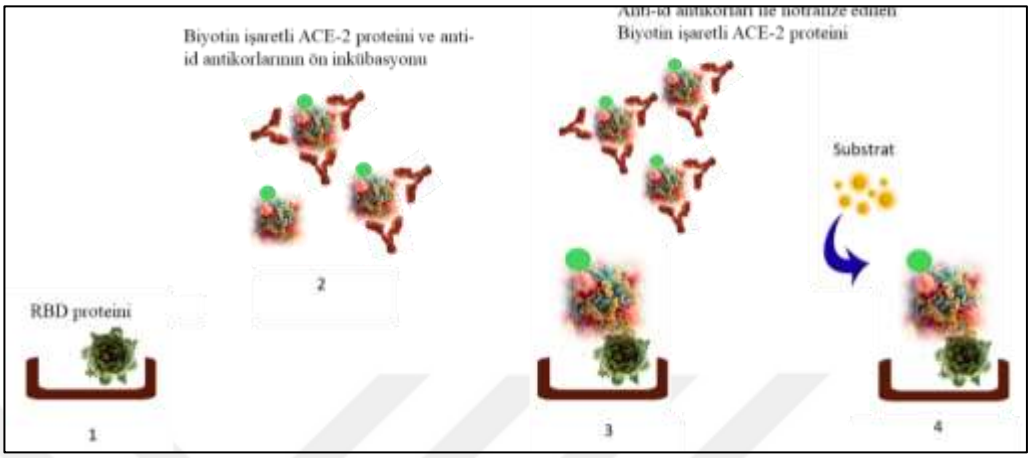
Şekil 3.3. Yarışımlı RBD nötralizan ELISA yöntemi

Çalışma protokolünde, ACE-2 farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak (200, 400, 600, 800 ng), gece boyunca 4°C'de ELISA plakalarının oyuklarına kaplandı. Plaka 3 kez PBS-T ile yıkandı. Kuyucuklar %5 SMP (Yağsız Süt Tozu) ile 37 °C'de 1 saat bloke edildi ve üç kez PBS-T ile yıkandı. 400 ng fare monoklonal antikorları ve iyileşmiş hasta serumundan elde edilen insan poliklonal antikoru üç farklı tüpe alındı (200 µl) ve 1/750 dilüe edilen HRP işaretli RBD (200 µl) ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika ön inkübasyonda tutuldu. Daha sonra karışım ELISA plak kuyularına dağıtıldı ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. PBS-T ile beş kez yıkanan kuyulara TMB substrat tamponu ilave edilerek mavi renk oluşumu gözlendi. 10 dk sonunda reaksiyon 2 M H_2SO_4 ile durdurularak 450 nm de okuma yapıldı. Spesifik olarak RBD'ye bağlanan bir numunedeki nötralize edici antikorlar, HRP etiketli RBD'nin ACE-2 ile etkileşimini bloke etti ve spektrofotometrik okuması yapılan kuyularda sinyal oluşumu gerçekleşmedi. Sinyal, mevcut olan spesifik nötralize edici antikorların miktarı ile orantılı olarak azaldı.

3.4.4. Yarışımlı ACE-2 nötralizan ELISA yöntemi

Tez çalışması kapsamında, SARS-CoV-2 Spike proteininin reseptör bağlanma bölgesi (RBD) molekülünü taklit eden anti-idiyotipik antikorların, insan hücresindeki ACE-2 reseptörlerine olan bağlanma kabiliyetlerinin değerlendirilmesi amacıyla özelleştirilmiş bir ACE-2 Nötralizan ELISA testi geliştirildi (Şekil 3.4.). Bu test, anti-idiyotipik antikorların RBD'nin ACE-2 reseptörüne olan afinitelerini taklit ederek virüsün reseptöre bağlanmasını nasıl engelleyebileceğini analiz etmek için tasarlandı.

Geliştirilen metodoloji, bu antikorların RBD'nin ACE-2 etkileşimini bloke etme yeteneklerini doğrudan ve hassas bir şekilde ölçerek, geliştirilen antikorların RBD'yi taklit edebilme kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı.



Şekil 3.4. Yarışımlı ACE-2 nötralizan ELISA yöntemi

Çalışma protokolünde, öncelikle, 96 oyuklu mikrotiter polistiren ELISA plakaları (Nunc, MA) PBS tamponu içerisinde 100 ng RBD ile kaplandı ve gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. Plaka, üç kez PBS-Tween 20 ile yıkandı. ELISA plakası, 37°C'de 1 saat süreyle %2 BSA ile inkübe edildi. Daha sonra oyuklar, üç kez PBS-Tween ile yıkandı. Farklı konsantrasyonlarda aid-mAb (250, 500,100 ng) ayrı tüplerde sabit miktarda biyotin etiketli ACE-2 (1/250 dilüe) ile inkübe edildi.

Bundan sonra, aid-mAb ve biyotin etiketli ACE-2 karışımları ELISA plaka oyuklarına dağıtıldı. 30 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra plak üç kez PBS-Tween ile yıkandı. Streptavidin-POD konjugat tamponu plaka kuyularına 100 µl dağıtıldı ve karanlıkta, 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildi. ELISA plakları son kez beş defa yıkandı ve TMB-HRP substrat tamponu ile 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyon H_2SO_4 ile durduruldu ve 450 nm'de okundu.

3.5. Protein İşaretleme Yöntemleri

Proteinlerin enzim ile işaretleme yöntemleri, proteinleri tespit etme ve analiz etme süreçlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntemlerde, hedef proteinlere spesifik enzimler bağlanır ve bu enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlar aracılığıyla proteinler görünür hale getirilir. En yaygın kullanılan enzimler arasında horseradish

peroxidase (HRP), biyotin ve alkaline phosphatase (AP) bulunur. Bu enzimler, substratları renkli ürünlere dönüştürerek, Western blot, ELISA gibi analitik tekniklerde proteinlerin varlığını ve miktarını görsel olarak tespit edilmesini sağlar. Bu amaçla tez kapsamında biyotin ve HRP enzimleri kullanılarak proteinlerin işaretleme çalışmaları yapıldı.

3.5.1. Biyotin ile işaretleme yöntemi

Çalışma protokolünde, Biotin etiketleme çalışmalarında bir âmin spesifik biyotinleme maddesi, biotin N-hidroksi-süksinimid ester (NHS-Biotin; Sigma, ABD), DMSO içinde çözdürüldü. Biotin eklenmeden önce, ACE-2 protein solüsyonunun 0,1 M karbonat tamponu ile pH 9'a ayarlandı. ACE-2 proteini ve biotin, 1 mg protein / 125 µg biotin olarak karıştırıldı ve 4 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Reaksiyona girmemiş biyotin, gece boyunca PBS'ye karşı diyaliz edilerek karışımdan çıkarıldı.

3.5.2. HRP ile işaretleme yöntemi

RBD proteini, rekabetçi ELISA testin de sinyal üretmek için HRP enzimleri ile konjüge edildi. HRP, RBD antijenine iki aşamalı bir prosedürle bağlandığı bilinir. İlk adımda, aldehit grupları elde etmek için enzimdeki monosakkarit kalıntıları periyodat kullanılarak oksitlenir. İkinci adımda, aldehit grupları, RBD molekülündeki amino grupları ile reaksiyona girer.

Çalışma protokolünde, 1 mg antijenin işaretlenmesi için; 0,5 mg HRP tartılıp 125 µl dH2O içerisinde çözdürüldü. Üzerine 0,2 M NaIO4 eklendi ve karıştırıcı üzerinde 20 dk oda sıcaklığında çalkalandı. Karışım pH'ı 4,5 olana kadar üzerine 1 mM Na-asetat ilave edildi ardından vivaspin 500 kolonlara yüklenerek 12 000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. İşlem için yaklaşık 300 µl Na-asetat kullanıldı. HRP'li karışıma pH değeri 9,5 olan 0,2 M Karbonat tamponu ilave edilerek nihai pH 9,5'a çıkarıldı. Yaklaşık olarak 50 µl tampon kullanıldı. Temiz bir vivaspin 500 kolanuna alınan karışım konsantre edilerek 75-100 µl hacime indirildi. Konsantre edilen HRP'li antikor üzerine 125 µl 10 mM karbonat tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonu tamamlandıktan sonra 4mg/ml NaBH4 tamponundan 12,5 ml eklenerek 4 saat 4°C'de karıştırıldı ve reaksiyon durduruldu. Reaksiyon karışımı PBS tamponuna karşı diyaliz edikten sonra -20 °C'de küçük parçalara bölünerek saklandı.

3.6. Deney Hayvanlarının Bağışıklanması Yöntemi

Tez çalışmasında tüm deney hayvanları için yapılan bağışıklama çalışmalarında ilk immünizasyonda öldürülmüş *Mycobacterium tuberculosis* içeren tam Freunds' adjuvan (CFA) kullanıldı. Ardından gelen diğer immünizasyonlarda ise sadece mineral yağ içeren tam olmayan Freunds' adjuvanı (IFA) kullanıldı. İmmünojen ve adjuvanlar hacimsel olarak 1:1 oranında karıştırılarak uygulandı. Çalışmada kullanılan tamponun hazırlanışı Çizelge 3.15.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.15. İmmünizasyon çalışmalarında kullanılan tamponlar

Tampon Adı	**Hazırlanışı**	**Kullanım Yeri**
Sodyum Sitrat Tamponu	2,3 gram sodyum sitrat, 0,8 gram sitrik asit ve 2,2 gram glikoz 100 ml distile su içinde çözüldü ve -20 °C'de saklandı.	Deney hayvanlarından kan alımı sırasında kullanıldı.

Deney hayvanlarının bağışıklanması üç ayrı çalışma kapsamında gerçekleştirildi:

1. Anti-SARS-CoV-2 monoklonal antikorlarının geliştirilmesi,
2. Anti-idiyotipik SARS-CoV-2 S1/RBD mAb geliştirilmesi,
3. Anti-idiyotip antikorların anti-RBD etkinliğinin *in vivo* koşullarda araştırılması.

3.6.1. Balb/c cinsi farelerin bağışıklanması

Üç çalışma için hazırlanan gruplar ve immunizasyon bilgileri Çizelge 3.16.'da verildi.

Çizelge 3.16. Fare immünizasyon çalışmalarında kullanılan immünojenler ve uygulama dozları

No	Kullanım Amacı	Kullanılan Antijen	Antijen Miktarı	Deney Hayvanı Sayısı
1	Anti-SARS-CoV-2 mAb geliştirilmesi.	SARS CoV-2 S1 (Sinobiologicals, 40591-V08B1)	4 µg	3
		SARS-CoV-2 S1 Protein His Tag (HEK293) (Acro Biosystems, S1N-C52H3)	5 µg	3
		SARS CoV-2 S1/RBD (Acrobiosytems, SPD-C5255)	5 µg	3
2	Anti-idiyotipik SARS-CoV-2 S1/RBD mAb geliştirilmesi.	Fare anti-SARS-CoV-2 S1 H9 MAM mAb-Fab bölgesi	50 µg	3
		Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM mAb-Fab bölgesi	50 µg	3
		İnsan anti-SARS-CoV-2 S1/RBD FY pAb-Fab bölgesi	50 µg	3
		Fare anti-SARS-CoV-2 S1 H9 MAM mAb	50 µg	3
		Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM mAb	50 µg	3
		İnsan anti-SARS-CoV-2 S1/RBD FY pAb	50 µg	3
3	Anti-idiyotip antikorların anti-RBD etkinliğinin *in vivo* koşullarda araştırılması	Anti-Id SARS-CoV-2 F1B4 mAb	50 µg	3
		Anti-Id SARS-CoV-2 F2A6 mAb	50 µg	3
		Anti-Id SARS-CoV-2 H9F3 mAb	50 µg	3
		Anti-Id SARS-CoV-2 E6G7 mAb	50 µg	3
		Anti-Id SARS-CoV-2 F7E11 mAb	50 µg	3
		Anti-Id SARS-CoV-2 F8H3 mAb	50 µg	3
		SARS CoV-2 S1/RBD (Acrobiosytems, SPD-C5255)	5 µg	3

Çalışma protokolünde, her bir fare için çalışmada belirtilen dozlardaki immünojenler 100 µl PBS içinde dilüe edildi ilk bağışıklamada 100 µl Freund's tam adjuvantı ile karıştırıldı, sonraki immünizasyonlarda 100 µl Freund's tam olmayan adjuvant ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım, Balb/c cinsi altı haftalık dişi farelerin periton içerisine iki haftalık periyotlarla uygulandı.

İmmünizasyonu takip eden 10'uncu günde farelerden alınan az miktar sodyum sitrat içeren kanın serumu ayrılarak -20 °C'de muhafaza edildi. Farelerdeki immün yanıt kontrolü dolaylı ELISA testi ile gerçekleştirildi.

3.6.2. Yeni Zelanda cinsi tavşanların immünizasyonu

SARS Cov-2 RBD molekülünü taklit eden Tavşan Anti-idiyotipik mab geliştirilmesi için hazırlanan immünizasyon gruplarına ait bilgiler Çizlege 3.17.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.17. Tavşan immünizasyon çalışmalarında kullanılan immünojenler ve uygulama dozları

No	Kullanım Amacı	Kullanılan Antijen	Antijen Miktarı	Deney Hayvanı Sayısı
1	Anti-idiyotipik SARS-CoV-2 S1/RBD mAb geliştirilmesi.	Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM Fab	100 µg	1
2		İnsan anti-SARS-CoV-2 S1/RBD FY Fab	100 µg	1

Çalışma protokolünde, immünizasyon için belirlenen antijen dozu 500 µl PBS içinde dilüe edildi ve 500 µl Freund's tam adjuvantı ile karıtırıldı, sonraki immünizasyonlarda 500 µl Freund's tam olmayan adjuvant ile karıştırılarak hazırlandı. Taze hazırlanan immünojenler, üç aylık Yeni Zelanda cinsi tavşanlara subkutan olarak beş farklı bölgeden immünize edildi. İmmünizasyonlar on beş gün arayla uygulandı ve immünizasyonu takip eden 10'uncu günde az miktarda kan alınarak serumu -20 °C'ye kaldırıldı.

3.7. Antikorları Proteolitik Kesim ile Fragmentlere Ayırma Yöntemleri

Anti-Id antikorların geliştirilmesi için öncelikle, tez kapsamında SARS-CoV-2 S ve RBD proteinine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş bir donör insandan elde edilen kovaselent plazmadan saflaştırılmış insan antikoru enzimatik olarak kesilerek fragmentlere ayrıldı.

Tez çalışmasında klasik antikor kesiminde kullanılan ticari papain ve Fisin gibi proteolitik enzimlerin yanı sıra Bursa Uludağ Üniversitesi'nin önceki çalışmalarında, yerli topraklardan izole edilmiş olan *Bacillus subtilis* 168 E6-5 proteaz enzimi antikor kesimi çalışmalarında kullanıldı.

Dolayısı ile bu çalışmada üç farklı enzimin kesim optimizasyonu yapıldı. Çalışma kapsamında kullanılan tamponların hazırlanışı Çizelge 3.18.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.18. Antikor kesim çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanması

Tampon Adı	**Hazırlanışı**	**Kullanım Yeri**
Aktivasyon Tamponu (Papain Enzimi için)	50 mM L-cyctein, 20 mM NaH_2PO_4, 10 mM EDTA, pH. 7	Antikorların Papain ile Proteolitik Kesimi
Sindirim Tamponu (Papain Enzimi için)	20 mM NaH_2PO_4, 10 mM EDTA, pH. 6,3	
Durdurma Solüsyonu (Papain Enzimi için)	100 mM PMSF (İsopropanol içinde)	
Sindirim Tamponu (Fisin Enzimi için)	50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH. 7	Antikorların Fisin ile Proteolitik Kesimi
Durdurma Solüsyonu (Fisin Enzimi için)	100 mM N-etil-maleimid solüsyonu	
Sindirim Tamponu (Yerli Enzim için)	50 mM Sodyum Fosfat Tamponu, 10 mm EDTA (pH 6, pH 7, pH 8, pH 9)	Antikorların *Bacillus subtilis* 168 E6-5 proteaz enzimi Proteolitik Kesimi

3.7.1. Papain enzimi ile antikor fragmentasyonu

Çalışma protokolünde, papain enzimi 5 mg tartılarak 0,5 ml dH_2O içerisinde çözüldü. Çözünen enzimden 50 µl alınarak 450 µl sindirim tamponu eklendi ve enzim aktivasyonu başlatıldı. Enzim tüpü 10 dk 37 °C de karıştırıcılı çalkalayıcı içerisinde inkübe edildi. Daha sonra 10 kDa vivaspin 500 µl konsantratör tüplerine alınan aktive enzim, 10 dk 1200 rpm de santrifüjlendi. 500 µl'lik hacim yaklaşık 50 µl'ye indirildi, üzerine 450 µl sindirim tamponu ilave edilerek enzim konsantratörden alındı. Sindirim (Kesim) tamponu içerisindeki L-sistein arındırıldı ve tampon pH' 6,3'ten 7'ye çıkarıldı.

Diğer taraftan 1-2 mg/ml arasındaki antikorlar, vivaspin kolona alınarak mevcut PBS tamponu, sindirim tamponu ile değiştirildi. Reaksiyon tüpüne 100 µl alınarak enzimatik sindirim pilot ölçek çalışması yapıldı. Farklı yüzdeler ve farklı reaksiyon sürelerinde enzim ve antikor karışımları bir araya getirildi (Çizelge 3.19.).

Çizelge 3.19. Papain enzimi için uygulanan reaksiyon süresi

Enzim/Antikor	İnkübasyon süresi			
	1 saat	4 saat	16 saat	20 saat
1/10				
1//20				
1/50				

İnkübasyon süresinin sonunda 100 mM PMSF stoğundan reaksiyon tüplerine 5 µl eklenerek proteolitik aktivite durduruldu ve kesim sonrası saflaştırma için hazır hale getirildi.

3.7.2. Fisin enzimi ile antikor fragmentasyonu

Çalışma protokolünde, 1 mg Fisin, içerisinde1 ml 2 mM EDTA içeren, pH 7,0 50 mM Tris tamponunda çözüldü ve aynı tampona karşı diyalize edilen antikor çözeltisine 1:30 ve 1:50 Enzim/Sindirim tamponu oranında karıştırıldı. Antikor hacmi 100 µl kullanıldı enzim hacmi belirtilen oranlarda kullanıldı daha sonra enzim hacmi, sindirim tamponu ile 50 µl ye tamamlandı (Çizelge 3.20.). Reaksiyon daha sonra 10 mM'lik son bir konsantrasyonda L-sistein eklenerek aktive edildi ve karışım 37° C'de karıştırıcılı inkübatörde 4, 8, 16 saat boyunca inkübe edildi. Reaksiyon, 100 mM N-etil-maleimid solüsyonundan 15 µl eklenerek durduruldu ve sindirim karışımı PBS'ye karşı diyaliz edildi.

Çizelge 3.20. Fisin enzimi için uygulanan reaksiyon süresi

Enzim/Antikor	İnkübasyon süresi			
	1 saat	4 saat	16 saat	20 saat
1/10				
1//20				
1/50				

3.7.3. Yerli enzim ile antikor fragmentasyonu

Çalışma protokolünde, *Bacillus subtilis* 168 E6-5 'ten saflaştırılan proteaz enzimi; 10 mM EDTA, 50 mM Sodyum Fosfat tamponu içerisinde çözüldü. Enzim dört farklı pH'da test edilmek üzere pH 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanan sindirim tamponu içerisinde mg/ml olacak şekilde çözüldü. Aynı şekilde kesim çalışmasında kullanılacak olan antikorlarda uygun pH değerine sahip tamponlara karşı vivaspin 500 kolonlar kullanılarak tampon değişimi

yapıldı, bu sayede antikorlar hem enzim kesiminde belirlenen farklı pH değerlerine sahip Sodyum fosfat tamponlarına alındı hem de antikorların mevcut konsantrasyonları 2 mg/ml olacak şekilde kullanıldı.

Antikor enzim oranları hacimsel olarak 1:20 olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon tüplerine 2 mg/ml konsantrasyondaki antikorlardan 100 µl ilave edildi, üzerlerine her antikor için aynı olacak şekilde farklı pH değerlerine sahip mg/ml konsantrasyondaki enzimlerden 5 µl eklendi ve hacimsel olarak çalışma ortamının uygun dilüsyonu için 45 µl her tüp için kendi pH değerlerindeki Sodyum Fosfat tamponları ilave edildi (Çizelge 3.21.). Reaksiyon tüpleri 4 saat boyunca 37 °C'de karıştırıcılı ortamda inkübe edildi.

Çizelge 3.21. Enzimatik reaksiyon için kullanılan sindirim tamponu değişkenleri

Sindirim tamponu	Enzim miktarı (mg/ml)	Antikor miktarı (mg/ml)	Eklenen sindirim tamponu miktarı
0.05 M sodyum fosfat, 0,01 m EDTA pH 6	5 µl	100 µl	45 µl
0.05 M sodyum fosfat, 0,01 m EDTA pH 7	5 µl	100 µl	45 µl
0.05 M sodyum fosfat, 0,01 m EDTA pH 8	5 µl	100 µl	45 µl
0.05 M sodyum fosfat, 0,01 m EDTA pH 9	5 µl	100 µl	45 µl

İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyon tüplerine 5 µl 0,1 M PMSF eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Enzimatik aktivitenin kontrolü için reaksiyon tüplerinden alınan örnekler SDS-PAGE ile yürütülerek gümüş boyama yapıldı ve antikor kesiminin kontrolü sağlandı.

3.8. *Bacillus subtilis* 168 E6-5 Proteaz Enzimi Saflaştırma Yöntemi

Bursa Uludağ Üniversitesi'nin önceki çalışmalarında, yerli topraklardan izole edilmiş olan *Bacillus subtilis* 168 E6-5 proteaz enziminin antikor kesimi üzerindeki proteolitik kesim kabiliyeti araştırıldı ve ticari enzimlere alternatif olarak değerlendirildi.

Proteaz Enziminin Saflaştırılması kapsamında, Liyofilize formda temin edilen 5 gr ham enzim, 100 mL 0,05M sodyum-fosfat tampon (pH 7,0) içinde nazikçe çözüldü. Ham enzimin 1 mL'si aktivite tayini, 1 mL'side protein tayini için kullanıldı. Çalışmada kullanılan tamponlar Çizelge 3.22.'de yer almaktadır.

Çizelge 3.22. Antikor kesim çalışmalarında kullanılan tamponların hazırlanması

Tampon Adı	**Hazırlanışı**	**Kullanım Yeri**
Substrat Tamponu	2 g kazein 20 mL 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde sürekli karıştırılarak kaynayana kadar ısıtılmış, ardından karışıma 80 mL 0,05M sodyum-fosfat tampon (pH 7,0) çözeltisi eklenir. Çözeltinin pH değeri 1/3 oranında seyreltilmiş fosforik asit kullanılarak ayarlandı. **Taze hazırlanır.**	Proteaz Aktivite Tayini
0,1 M NaOH çözeltisi	250 ml distile su içerisinde 1 g NaOH çözdürüldü.	Proteaz Aktivite Tayini
0,4 M TCA çözeltisi	6,53 g TCA tartıldı ve 100 mL distile su içerisinde çözüldü. **Taze hazırlanır.**	Proteaz Aktivite Tayini
0,4 M sodyum Karbonat Tamponu	4,23 g Na_2CO_3 tartılarak 100 ml dH2O içinde çözüldü.	Proteaz Aktivite Tayini
0,05 M Sodyum Fosfat Tamponu	A ve B çözeltileri hazırlandı. A) 0,05 M $Na_2HPO_4.7H_2O$ çözeltisi için 2,01 g $Na_2HPO_4.7H_2O$ tartıldı ve 150 mL distile su içerisinde çözüldü. B) 0,05 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ çözeltisi için 0,78 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ tartıldı ve 100 mL distile su içerisinde çözüldü B çözeltisi, A çözeltisi üzerine pH 7 olana kadar yavaş yavaş eklendi. Son hacim 250 ml ye tamamlandı.	Proteaz Aktivite Tayini

3.8.1. Aktivite gösteren proteaz enziminin konsantre edilmesi yöntemi

Yerli enzimin saflaştırma öncesinde aktivitesinin belirlenmesi amonyum sülfat ile çöktürülmesi, diyaliz edilmesi ve konsantrasyonu çalışmaları tamamlandı.

Çalışma protokolünde, aktivite tayini için 2 deney grubu hazırlandı. Örnek tüpüne 1 ml substrat çözeltisi kör tüpüne ise 2 ml 0,4 M TCA koyuldu. Tüpler 37 °C'lik su banyosuna alınarak 10 dk inkübe edildi. Daha sonra örnek tüpüne 1 ml enzim, kör tüpüne ise 50 mM

sodyum fosfat tamponu eklenerek 10 dk su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından örnek tüpüne 2 ml TCA, kör tüpüne 1 ml substrat eklenerek vortesklendi. 37 °C'de 20 dk. bekletildikten sonra 6 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 1 ml süpernatant ile 1ml dilüe edilen folin fenol reaktifi ve 5 ml 0,4 M Na_2CO_3 eklenerek karışım iyice vostekslendi. 20 dk. oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Örneğin, 660 nm'deki absorbans değeri köre karşı okunarak değerlendirildi.

Standart eğri grafiği oluşturmak için 0-60 µg/ml tirozin içeren standartlar hazırlandı. Böylece örnekte proteaz enzimi etkisi ile ortaya çıkan tirozin miktarı hesaplandı. Köre karşı okunan absorbans değeri ile tirozin standartlarının lineer grafik denkleminden yararlanılarak enzim aktivitesi belirlendi. (Keay ve Wildi, 1970) tarafından ortaya konan yönteme göre 1 µg/ml tirozin 2 IU/ml enzime karşılık gelmektedir (1 IU enzim, bir dk 1 µmol substrat dönüşümünü katalizler).

Enzim aktivasyonu belirlendikten sonra ham enzim %80'lik amonyum sülfat ile çöktürüldü. 100 ml ham enzim üzerine 52,3 g amonyum sülfat, 4 °C'de yavaş yavaş ortama eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde 4 saat karıştırıldı. 4 °C'de 1 gece bekletildikten sonra ertesi gün 4 °C'de 10000 rpm'de 30 dk santrifüjlendi ve elde edilen pellet 15 ml 0,5 M sodyum fosfat tamponunda nazikçe dilüe edildi.

Standart diyaliz protokolü uygulandı ancak diyaliz tamponu olarak 0,5 M sodyum fosfat tamponu kullanıldı. Diyaliz edilen enzim, ultrafiltrasyon (Merck™ Centriprep™ Centrifugal Filter Units, MW cut-off 10 kDa) tüpüne aktarıldıktan sonra 4°C'de 5 000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendi. Enzim hacmi 5 ml olacak şekilde konsantre edildi.

3.8.2. Jel filtrasyon kromatografi yöntemi

Bacillus cinsi proteazların moleküler ağırlığı 8-71 kDa arasındadır. Ancak genellikle 30-40 kDa arasında olduğu bilinir. Çalışma protokolünde, Jel filtrasyonu için kullanılan kolon dolgu materyali için Sephadex ® G-75 tercih edildi. Bu dolgu materyali ile 3-80 kDa arasında olan proteinler saflaştırılabildiğinden, enzimin saf olarak elde edilebilmesi için bu materyal çalışma için yeterli oldu. Çapı 2 cm olan 47 cm'lik kolonun hacmi 147 cm^3 olarak hesaplandı. 1 g Sephadex ® G-75 maddesi yaklaşık olarak 12-15 mL su tutabilir. 10 g kolon dolgu materyali tartılarak 250 ml 50 mM sodyum fosfat tamponu

içerisine eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Bir gece boyunca 4 °C'de bekletilerek jelin şişmesi beklendi. Ertesi gün şişen jel kolona dolduruldu ve kolondan çıkan tampon ile kolona giren tamponun pH değeri eşitlenene kadar 50 mM sodyum fosfat tamponu ile kolon dengelendi ve bir gece 4 °C'de bekletildi. Enzim karışımı dikkatlice kolona yüklendi ve tüm örnek kolona girdikten sonra 50 mM sodyum fosfat tamponu ile kolon yıkandı ve fraksiyonlar 1 ml hacimle toplandı. Kolon akış hızı 2 ml/dk olarak ayarlandı. Fraksiyonların absorbans değerleri OD 280 nm'de ölçüldü.

3.9. Fare Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi ve Hibridoma Yöntemi

Çalışma kapsamında immünize edilen farelerin güçlü immün yanıt oluşturanları sırası ile füzyon çalışmasına alındı. Fare (Balb/c) F0 myeloma (kanser) hücresi ve hedef antijen ile bağışıklanmış farenin (Balb/c) dalak hücrelerinin kimyasal bir ajan yardımı ile birleştirilmesi işlemi olan füzyon çalışması için yapılması gereken ön hazırlıklar füzyondan iki hafta öncesinde tamamlandı. Kullanılacak otoklavlanabilir tüm malzemeler steril edildi. Füzyona alınacak fareye füzyondan yaklaşık dört gün öncesinde hedef antijen ile Rapel adı verilen hatırlatma immünizasyonu yapıldı. Çalışmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanması Çizelge 3.23.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.23. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan tamponlar

Tampon Adı	Hazırlanışı	Kullanım Yeri
DMEM Besiyeri	13,36 g DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 2 gram sodyum bikarbonat ve 5,96 g HEPES (Hidroksimetil piperazinehtansulfonik asit) 1 l otoklavlanmış dH_2O içerisinde çözüldü. Çözeltinin pH değeri sodyum hidroksit kullanılarak 7,2'ye ayarlandı. Ardından vakum filtrasyon sistemi ile süzme işlemi gerçekleştirildi.	Serumsuz hücre Besiyeri
Fare Orijinli Hücreler için Büyütme Besiyeri	Farklı hücrelerin büyümesi için gerekli besi yeri, hacmin %20'si kadar FBS (Fetal Bovine Serum), %79 DMEM ve %1 PSA (Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B) ya da FBS oranı %10 a düşürülerek DMEM oranı %89'a çıkartılarak hazırlandı.	Hücrelerin Büyütülmesi
Hibridoma Seçici Besiyeri	Hücre büyütme besiyeri içerisine %2 HAT (Hipoksantin, Aminopterin, Timidin) ilave edildi.	Hibridoma Seleksiyonu
Hibridoma Takviye Besiyeri	Hücre büyütme besiyeri içerisine %2 HT (Hipoksantin, Timidin) ilave edildi.	Hibrit Hücrelerin Desteklenmesi
Hücre Dondurma Besiyeri	%80 FBS, %10 DMEM ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak karanlıkta hazırlandı.	Uzun Süreli Hücre Muhafazası
PEG 4000	2 gram PEG tartılır üzerine 1 ml saf su ve 1 ml PBS koyularak otoklavlandı.	Fare Füzyonu

3.9.1. Fare (Balb/c) orijinli F0 myeloma hücrelerinin hazırlanması

Ölümsüzlük özelliğinden yararlanılacak olan F0 (CRL-1646, ATCC) fare myeloma hücreleri füzyon çalışmasından iki hafta önce hücre kültürün de üretime alındı.

Çalışma protokolünde, hücre dondurma tüplerinde bulunan fare myeloma hücreleri sıvı azot (-196 °C) tankından alınarak hızlıca 37°C sıcaklıkta çözüldü ve 8 ml DMEM içerisinde dilüe edilerek 1250 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. DMSO bulunan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1 ml hücre büyütme besiyeri (%20 FBS, %1 antibiyotikli DMEM) içinde dilüe edilerek 25 cm^2'lik hücre kültür flaskına alındı.

Hücreler 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nem koşullarındaki inkübatörde muhafaza edildi. %70 yoğunluğa ulaşan hücrelere 36-48 saat arayla hücre pasajlama işlemi yapıldı. Bu aşamada hücre kültür şişesindeki hücreler, bir hücre kaldırıcı (Scraper) yardımı ile serumsuz DMEM içeren solüsyon kullanarak nazikçe kaldırıldı ve 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. İki kez yıkama işleminden sonra hücreler taze %10 FBS içeren DMEM medyuma alınarak yeni hücre kültür flaskına (75 -150 cm2'lik) ekim yapıldı.

Füzyon günü myeloma hücrelerinin log fazında olması füzyondan elde edilecek hibrit sayısını olumlu etkileyeceği için füzyondan önceki gün myeloma hücrelerine herhangi bir işlem uygulanmadı.

Füzyon sırasında birçok hücre kültür kabında çoğaltılmış olan tüm myeloma hücreleri bir scrapper yardımıyla kaldırılarak serumsuz DMEM içerisinde dilüe edildi ve tripan blue ile 1:1 oranında karıştırılarak, hücre sayma aparatı olan hemositometre lamında hücreler sayıldı.

3.9.2. Hücrelerin sayım yöntemi

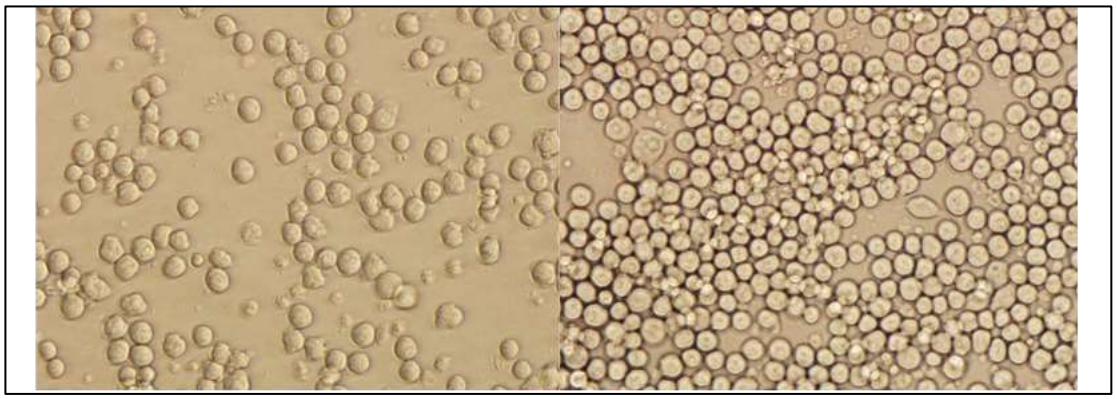
Trypan Blue boyası canlı hücrelerin sayımı için kullanılan geleneksel boyalardandır. Bu boya, ölü hücrelerin zarlarından diffüze olarak bu hücreleri boyar ve diffüze olamadığı sağlıklı hücreler de parlak ve beyaz görünür. Bu sayede hücre süspansiyonundaki yaşam oranı hakkında da fikir sahibi olunabilir.

Çalışma protokolünde, hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 10 µl Trypan Blue hücre boyası ile karıştırıldı. Trypan Blue – hücre karışımı hemositometreye alındı ve 25 kareye düşen hücre miktarı sayıldı. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak hücre sayısı hesaplandı (Şekil 3.5.).

Karelerdeki toplam hücre sayısı x Hücre süspansiyon hacmi x 2 (boya ile yapılan dilüsyon katsayısı) x 10^4 (sabit kat sayı)

Şekil 3.5. Hücre sayım formülü

Şekil 3.6.‘da Fare myeloma hücrelerinin 4X mikroskobik görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 3.6. Fare myeloma hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüleri

2.9.3. Rapel uygulaması

Füzyon işleminden dört gün önce immunize edilen fareler arasında serum ELISA testi sonucunda en yüksek yanıtı veren fare bu işlem için seçildi. Bu fareye rapel yani hatırlatma immünizasyonu yapıldı.

Çalışma protokolünde, rapel immünizasyonunda normal immünizasyonlarda kullanılan antijen, immünizasyon dozunun yarısı kadar miktarda kullanıldı ve herhangi bir tamamlayıcı adjuvant olmadan 100 µl PBS içerisinde hazırlanarak farenin kuyruk veninden enjekte edildi.

3.9.4. Besleyici hücrelerin hazırlanması

Füzyon işleminden bir gün önce, dalak-myeloma hücre füzyonundan elde edilecek olan hibrit hücrelerin yani hibridomaların hayatta kalabilmeleri için gerekli uygun ortam koşullarını sağlamak için herhangi bir immünizasyon işlemi uygulanmamış sağlıklı bir fareden, besleyici hücre (feeder) adı verilen makrofaj hücrelerin alım işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma protokolünde, feeder hücre alımı için, servikal dislokasyonla öldürülen fare %70 ET-OH içine alındı ve daha sonra fare peçeteye emdirilerek, laminer kabin içinde sırt üstü olacak şekilde sabitlendi. Periton zarına zarar verilmeden karın üzerindeki deri sıyrıldı. Steril enjektör yardımıyla 5 ml serumsuz DMEM, herhangi bir organa temas edilmeden periton içine bırakıldı ve geri çekilerek büyütme besiyerine eklendi.

Hücre bulunan besiyeri ortamı en az 10 adet 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına kuyu başına 4 000 ile 6 000 hücre olacak şekilde 100 µl olarak dağıtıldı. Besleyici hücreler CO_2'li inkübatörde muhafaza edildi. Ertesi gün kontaminasyon olup olmadığı mikroskopla kontrol edildi. Gece boyu bu hücrelerin salgıladığı albümin, sitokin bakımından oldukça zengin, uygun büyüme faktörlerini içeren besleyici besiyeri ertesi gün füzyon sonrası elde edilecek hibridoma hücrelerinin büyümesini desteklemek için kullanıldı (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Besleyici hücrelerin mikroskop altındaki görünümü

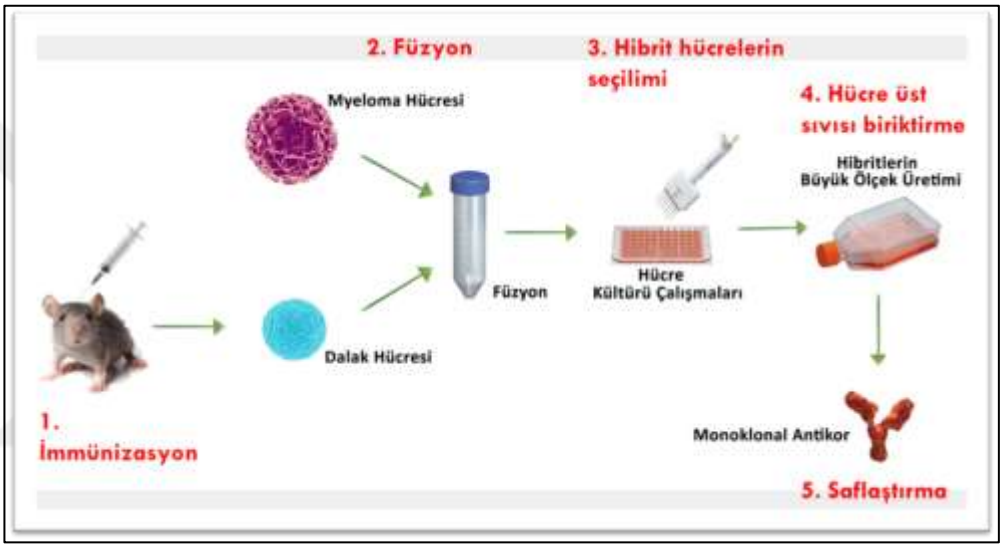
3.9.5. Fare (Balb/c) orijinli dalak hücrelerinin hazırlanması

Hedef antijen ile bağışıklanmış ve antijenik yanıtı yeterli seviyeye ulaşan fare, son Rapel immünizasyon uygulamasından 4 gün sonra servikal dislokasyonla öldürülerek %70 EtOH içerisine alındı.

Çalışma protokolünde, fare laminar akımlı kabin içerisinde sabitlenerek karın bölgesi alt batından kesilerek açıldı ve antikor üreten B hücrelerinin ağırlıklı olarak yer aldığı dalak organı dikkatlice steril pens yardımı ile alınarak steril petri içerisindeki serumsuz DMEM'e alındı. Dalak organı, mevcut hücrelerin sıvı ortama transferi amacı ile steril süzgeç ve baget yardımıyla bir petri kabında süspanse edildi ve mümkün olabildiği kadar yağlarından arındırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu steril falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre sayım işlemi için hemositometre lamında sayıldı. Dalağı alınan bu farenin ELISA testlerinde pozitif kontrol olarak kullanılması amacıyla hayvanın kalp kanı alınarak serumu küçük parçalar halinde ependorf tüplere alınarak -20 °C'de saklandı.

3.9.6. Fare orijinli dalak-myeloma hücrelerinin birleştirilmesi (PEG aracılı füzyon)

Füzyon çalışması iki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması şeklinde gerçekleştirilen bir yöntem olup iki yararlı özelliğe sahip hücrelerin kimyasal bir ajan (polietilen glikol) yardımı ile birleştirilmesi esasına dayanmaktadır. B lenfositlerinin spesifik antikor üretici özellikleri ile myeloma hücrelerinin ölümsüz olma özelliğini kazanan hibrit hücreler özel şartlarda üretildiklerinde tek bir antijenik determinanta karşı çok yüksek özgüllükte ve sonsuz miktarda monoklonal antikor sentezlemektedir (Yücel, 2017) (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor geliştirme basamakları

Çalışma protokolünde, füzyon çalışmasında; F0 myeloma hücreleri ve dalak hücreleri ayrı ayrı sayılarak ve üç kez yıkama işlemi sonrasında 50 ml falcon tüp içerisin de 1:3 ile 1:10 arasında oranlarda birleştirildi. Hücre karışımı serumsuz DMEM içerisinde yıkandı, 1 250 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek, süpernatant dikkatlice hücre karışımının üzerinden çekilerek atıldı. Daha sonra myeloma ve dalak hücre pelletine, 37 °C'de muhafaza edilen Polietilen glikol-4000'den (PEG-4 000) 1 ml alınarak, 1 dk içerisinde, nazikçe yavaş yavaş eklendi, falkon tüp 1 dk boyunca 37 °C'de muhafaza edildi. Daha sonra 4 ml serumsuz DMEM 4 dk içinde yavaş yavaş pellet karışımına ilave edildi. Ardından 10ml serumsuz DMEM yavaşça eklenerek karışım 5 dakika 37°C'deki CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre karışımı 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atırak PEG ortamdan uzaklaştırıldı.

Hücre pelleti %20 FBS, %2 HAT ve %1 Antibiyotik içeren DMEM içinde çözündü ve besleyici besiyeri bulunan 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 150 µl olacak şekilde dağıtıldı. Füzyon işleminden sonra hücreler 10 gün boyunca hiçbir işlem uygulanmadan %5 CO_2, 37 °C'de ve %96 nemli inkübatör ortamın da muhafaza edildi.

Füzyon çalışmalarında kullanılan PEG, memeli hücre sistemlerin de toksik etki gösterdiğinden, yıkama işlemi ile hemen ortamdan uzaklaştırılması önemlidir. Yine reaksiyon ortamının pH'sı (8-8,2), füzyon süresi (1-2 dk), sıcaklık (24-37 °C) füzyon işleminde önemli parametrelerdir (Hui ve Stenger, 1993).

Füzyon çalışması tamamlandıktan sonra füzyon günü kullanılmayan F0 myeloma hücreleri donduruldu.

3.9.7. Hücrelerin dondurulması, muhafaza edilmesi

Hücreleri uzun süre muhafaza etmak için hücre dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çalışma protokolünde gerek myeloma hücreleri gerekse hibridoma hücreleri DMEM medyum ile yıkandıktan sonra 1 250 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Supernatant çekilerek atıldı. Pellet %70 FBS, %20 DMEM, %10 DMSO içeren dondurma besiyeri ile çözüldü ve her bir dondurma tüpünde $1x10^6$-$5x10^6$ hücre olacak şekilde dağıtıldı. DMSO, hücrelerin dondurma sürecinde hücrelerin dondurmaya bağlı oluşan buz kristalinin neden olduğu mekanik hasardan korumak amaçlı kullanılmıştır. Dondurma tüplerin de bulunan hücreler 2 saat -20 °C'de daha sonra bir gece boyunca -80 °C'de bekletilerek, uzun süreli muhafaza için sıvı nitrojen (-195 °C) tankına kaldırıldı.

3.9.8. Hibrit hücrelerin tesbiti, pozitif klon seçilimi ve tek düşürme çalışmaları

Füzyondan sonraki 10'uncu günde tüm kuyular mikroskop altında tek tek tarandı ve hibrit hücre kolonileri bulunan kuyular işaretlendi. İşaretli kuyulara ait hücre kültür üst sıvıları, hedef antijen kaplanmış 96 kuyuluk ELISA plaklarında, dolaylı ELISA testi kullanılarak antijen yanıtları açısından test edildi. ELISA test sonrası, Füzyon plaklarına ait kuyular %2 HT içeren besiyeri ile beslendi. Hücrelerin gelişimine bağlı olarak sonrasında HT içermeyen normal hücre kültür besiyerine geçildi.

Dolaylı ELISA ile antikor yanıtı belirlenen hibrit hücrelerin hedef antijene spesifik olduğunun tespit edilebilmesi için benzer ve farklı antijenler ile çapraz ELISA testi yapılarak pozitif hücre seçilimi gerçekleşti ve üç kez tekrarlanan test sonucunda da spesifik yanıt veren hibrit hücreler belirlendi.

Antijene özgün olduğu belirlenen hibridoma kuyularından tek klon yani monoklon oluşturmak amacı ile tek düşürme çalışması yapıldı. Bu amaçla pozitif hibrit bulunan füzyon plak kuyularından alınan hücreler, taze feeder hücre içeren plaklara seri dilüsyon yöntemi ile dağıtıldı.

Çalışma protokolünde, aktarılacak hibrit hücreler bulunduğu kuyudan nazikçe pipetlenerek kaldırıldı ve 20 µl üst sıvı alınarak 200 µl feeder hücre bulunan kültür plağının A1 kuyusuna bırakıldı. Kuyuda nazikçe pipetleme yapılarak 100 µl olacak şekilde B1 kuyusuna geçildi. Aynı işlem sırasıyla sütunda yapıldı. Seri dilüsyon 1 sütundan 12'nci Sütuna kadar yana kaydırılarak devam ettirildi. Dilüsyon çalışması tamamlanan plaklar CO_2 inkübatöre kaldırıldı ve 10 gün sonra tek koloni düşen kuyular mikroskopta taranarak tek klon olan kuyular belirlendi. Bu kuyuların üst sıvıları dolaylı ELISA ile test edildi ve uygun cevabı veren klonlar yeniden tek düşürme işlemine tabii tutuldu.

3.10. Tavşan Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi ve Hibridoma Yöntemi

İmmünizasyon sonrası yeterli immün yanıt elde edilen tavşanlar ile füzyon çalışması yapıldı. Tavşanlar için immün yanıt kan serumunun 1/5000, 1/10000 dilüsyonlarının ELISA'daki absorbans değerinin >1 ve üzeri olması yeterli görüldü. Tavşanlara yapılan rapel uygulaması için farelerden farklı olarak; füzyona alınacak olan tavşana füzyondan dört gün önce kulaktan intravenöz olarak adjuvant içermeyen antijenler (antikorlar) ile immünizasyon yapıldı. Füzyon çalışmasından önce tavşandan büyük miktar kan alımı yapıldı ve poliklonal antikor elde edilmek üzere saklandı.

Tavşan füzyon çalışmalarında kullanılan myeloma hücre hattı 240 E1:1, Loyola University Chicago Stritch School of Medicine baş araştırmacısı KATHERINE L. KNIGHT'tan temin edilmiştir. Tavşan monoklonal antikorlarının geliştirilmesi için gerekli olan protokol ise Türkiye'de ilk kez TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği'n de tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Füzyon çalışması için kullanılan tamponlar Çizelge 3.24.'te verildi.

Çizelge 3.24. Tavşan monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında kullanılan tamponlar

Tampon Adı	**Hazırlanışı**	**Kullanım Yeri**
RPMI Besiyeri	10 g RPMI (Roswell Park Memorial Institute) tartılarak 1 l otoklavlanmış distile su içerisinde çözüldü. Ardından vakum filtrasyon sistemi ile süzme işlemi gerçekleştirildi.	Serumsuz hücre Besiyeri
Tavşan Orijinli Hücreler için Büyütme Besiyeri	10 gram RPMI toz 1 litreden az distile su içerisinde çözülür. İçerisine 10 ml L-glutamin,10 ml Hepes, 10 ml MEM Amino Asitler, 5 ml MEM Esansiyel Olmayan Amino Asitler, 10 ml Sodyum Piruvat,10 ml MEM vitaminleri, 1 ml 2-ME ve %1 PSA eklenir. Besiyeri pH ı 7.7.2 değerler arasında 25-30 Sodyum bikarbonat eklenerek ayarlanır. Besiyeri 1 litreye tamamlanır.	Hücrelerin Büyütülmesi
Hibridoma Seçici Besiyeri	Hücre büyütme besiyeri içerisine %2 HAT (Hipoksantin, Aminopterin, Timidin) ilave edildi.	Hibridoma Seleksiyonu
Hibridoma Takviye Besiyeri	Hücre büyütme besiyeri içerisine %2 HT (Hipoksantin, Timidin) ilave edildi.	Hibrit Hücrelerin Desteklenmesi
Hücre Dondurma Besiyeri	%80 FBS, %10 RPMI ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak karanlıkta hazırlandı.	Uzun Süreli Hücre Muhafazası
PEG 4000	2 gram PEG tartılır üzerine 1 ml saf su ve 1 ml PBS koyularak otoklavlandı.	Tavşan Füzyonu

3.10.1. 240E1:1 myeloma hücrelerinin hazırlanması

Füzyon partneri olan 240E1:1 hücrelerinin, füzyondan iki hafta öncesinde sıvı azot tankından taze olarak açılması gerekir. Dört haftadan uzun süreyle pasajlanan hücreler füzyon çalışmalarında kullanılmaz.

Çalışma protokolünde, planlanan füzyon tarihinden on beş gün önce sıvı azot tankından bulunan cryo tüplerdeki tavşan myeloma hücresi hızlıca eritilerek RPMI medyum içine alındı ve yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından 1 250 rpm'de 5 dk santrifüjlenen hücrelerin süpernatantı uzaklaştırıldı ve hücre pelleti besleyici RPMI besi yerinde dikkatlice çözülerek 25 cm^2'lik hücre flasklarına ekildi. Hücreler 24-48 saat arasında log fazına geldiği için iki günde bir besiyeri tazelenerek hücreler çoğaltıldı. Füzyon çalışmasından üç gün önce hücreler 8-azaguanin içeren besi yerine alındı ve $HGPRT^-$ olmayan hücrelerin elemine edilmesi sağlandı. Füzyon gününde toplam on adet 75 cm^2'lik flask kullanıldı. Flasklardaki myeloma hücreleri scraper (kazıyıcı) yardımı ile kaldırılarak serumsuz RPMI besiyerine aktarıldı ve 5 dk 1 250 rpm'de santrüfüjlendi. Hücre pelleti serumsuz besiyerinde çözülerek hücre sayımı yapıldı, işlem 3 kez tekrarlandı ve hücre sayımların ortalaması alındı.

Tavşan füzyon çalışmalarında fare füzyon çalışmasından farklı olarak besleyici hücre ortamının hazırlanmasında periton içi sıvı alımı yerine tavşan myeloma hücreleri plaklara ekilerek feeder ortamı hazırlanır. 48 gözlü hücre plaklarına kuyu başına 10^5 hücre gelecek şekilde füzyondan bir gün önce tavşan myeloma hücreleri ekildi.

3.10.2. Tavşan orjinli dalak hücrelerinin hazırlanması

Antijenik yanıtı yüksek olan ve Füzyon çalışmasında kullanılacak olan tavşan, inhalasyon yöntemi ile bayıltıldıktan sonra sol tarafına yatırıldı. Operasyon bölgesi dikkatlice tıraşlandı ve alkolle temizlendikten sonra biyogüvenlik kabin içerisine alındı. Tıraşlı bölge dikkatlice neşter yardımıyla açıldı ve kanlanan alan steril gazlı bez ile temizlendi. Dalak çıkarılarak serumsuz RPMI içerisine alındı. Daha sonra deney hayvanları atık yönetmeliğine uygun olarak kullanılan deney hayvanı bertaraf edildi. Dalak organı hücre kültür ortamında, hücrelerin süspansiyonu için 10 ml RPMI bulunan steril petri kabına aktarıldı. 5 ml lik enjektör yardımı ile RPMI medyum ortamdam şırınga edilerek dikkatlice dalak içerisine zerk edildi.

Bu işlem birkaç kez tekrar edilerek dalak içerisinde bulunan splenositler nazikçe petri içerisinde bulunun RPMI'a aktarıldı. Splenositleri içeren RPMI'ın bulunduğu falkon 1 250 pmp'de 5 dk santrifüjlendikten sonra hücre pelleti serumsuz RPMI'da çözülerek üç kez hücre sayımı yapıldı ve sayımların ortalaması alındı.

3.10.3. Tavşan orjinli dalak-myeloma hücrelerinin birleştirilmesi, füzyon işlemi

Sayımları yapılan dalak hücreleri ve myeloma hücreleri 1:2 Dalak:Myeloma oranında birleştirildi ve 1250 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Supernatant atıldı ve pellet 1 ml PEG-4000 ile çözüldü. İşlem 1 dk içerisinde nazikçe tamamlandı. Hücre pelleti 5 dk 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra birer dk süreyle birer ml sadece RPMI solüsyonu ile dört kez dilüe edildi. Son olarak 10 ml RPMI solüsyonu yavaş yavaş hücre süspansiyonu üzerine eklendi ve çok nazikçe pipetlendi. Hücrelerin birleştirilme işleminin yapıldığı 50 ml. Lik santrifüj tüpü %5 CO_2'lu 37 °C'li inkübatörde 5 dk bekletildi ve inkübasyon sonunda hücreler 5 dk 1 250 rpm'de santrifüjlendi. Hücre supernatantı tamamen pellet üzerinden alındı. Dalak:Myleoma pelleti 1 ml RPMI ile nazikçe çözüldü. Daha sonra füzyon besi yerine alındı. 48 gözlü kuyulara 200 µl olarak dağıtıldı.

Bu çalışmada füzyon besi yeri için HAT içermeyen besi yeri kullanıldı. Füzyonu takip eden 3. günde füzyon kuyularına %1 HAT içerecek şekilde 50 µl taze besi yeri eklendi. Koloniler iki ile beş hafta arasında oluşmaya başladı. Hibrit oluşumuyla beraber hibridoma hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları fare füzyon çalışması ile paralel şekilde devam ettirildi.

3.11. Kolon Kromatografisi ile Protein Saflaştırma Yöntemi

Monoklonal antikorların tek düşürme çalışmaları ve isotiplerinin belirlenmesi çalışmaları tamamlandıktan sonra, hibridoma hücreleri çok miktar da antikor eldesi için geniş ölçek üretime alınmıştır. Antikor içeren hücre kültür üst sıvıları en az 1 Lt. olacak şekilde toplanarak +4 C°'de muhafaza edilmiştir. Saflaştırma aşamasında Antikorun alt isotipine uygun yöntemler seçilerek saflaştırma aşamasına geçilmiştir. Saflaştırma işlemleri sonrasın dayüksek seçicilik ve özgüllük gösteren monoklonal antikorlar elde edilmektedir. Bu da onların tanısal testler, terapötik uygulamalar ve bilimsel araştırmalar açısından değerli biyolojik araçlar haline gelmesine olanak tanımaktadır. Çalışmada kullanılan tamponların hazırlanışı Çizelge 3.25.'te gösterildi.

Çizelge 3.25. Antikorları Saflaştırma çalışmalarında kullanılan tamponlar

Tampon Adı	**Hazırlanışı**	**Kullanım Yeri**
Doyurulmuş Amonyum Sülfat	dH_2O içerisinde çökme gözlenene kadar amonyum sülfat eklenerek hazırlandı.	Antikor Çöktürme
20 mM Sodyum Fosfat Tamponu pH 7.2	A ve B çözeltileri hazırlandı. A) 0,02 M Na_2HPO_4çözeltisi için 14,96 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözüldü. B) 0,05 M NaH_2PO_4 çözeltisi için 11,998 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözülmüştür. B çözeltisi, A çözeltisi üzerine pH 7,2 olana kadar yavaş yavaş eklendi. Son hacim 1 L ye tamamlandı.	Protein G Afinite Kolon Saflaştırma
3 M Sodyum Klorür, 1,5 M Glisin Tamponu pH 8	3 M sodyum klorür ve 1,5 M gilisin tartılarak dH_2O içerisinde çözüldü pH. 8'e ayarlandı. Süzülüp ultrasonik banyoda degaze edildi.	Protein A Afinite Kolon Saflaştırma
0,1 M Glisin Tamponu pH 2.7	0,1 M glisin tartılarak dH_2O içerisinde çözüldü pH 2,7'ye ayarlandı. Süzülüp ultrasonik banyoda degaze edildi.	Protein A/G Afinite Kolon Saflaştırma
1 M Tris Tamponu pH 9	1 M trizma base tartılarak dH_2O içerisinde çözüldü pH 9,0'a ayarlandı. Süzülüp ultrasonik banyoda degaze edildi.	Protein /AG Afinite Kolon Saflaştırma
20mM Sodyum fosfat, 800mM amonyum sülfat pH:7,5	A ve B çözeltileri hazırlandı. A) 0,02 M Na_2HPO_4çözeltisi için 14,96 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözüldü. B) 0,05 M NaH_2PO_4 çözeltisi için 11,998 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözülmüştür. B çözeltisi, A çözeltisi üzerine pH 7,5 olana kadar yavaş yavaş eklendi. İçerisine 800 mM amonyum sülfat katıolarak eklendi ve son hacim 1 L ye tamamlandı.	IgM Antikorlarının Afinite Kolon Saflaştırması
20mM Sodyum fosfat pH:7,5	A ve B çözeltileri hazırlandı. A) 0,02 M Na_2HPO_4çözeltisi için 14,96 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözüldü. B) 0,05 M NaH_2PO_4 çözeltisi için 11,998 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 500 mL distile su içerisinde çözülmüştür. B çözeltisi, A çözeltisi üzerine pH 7,5 olana kadar yavaş yavaş eklendi. Son Hacim 1 L'ye tamamlandı.	IgM Antikorlarının Afinite Kolon Saflaştırması

3.11.1. Hibridoma hücrelerinin geniş ölçek üretilmesi

Antijene spesifik ve monoklonal antikor üreten hibrit hücrelerden, yüksek miktarda antikor elde etmek amacıyla geniş ölçek üretim çalışmaları gerçekleştirildi. Hücre kültür üst sıvıları en az 1 L olacak şekilde toplandı, 1 250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 4 °C'de muhafaza edildi.

Çalışma protokolünde, hibridoma hücresi sırasıyla 96 kuyucuklu plakalardan 24 kuyuluk hücre kültür plaklarına, daha geniş olan 6 kuyuluk plaklara, T25 cm^2, 150 cm^2 ve 175 cm^2'lik hücre kültür (TPP) flasklarına aşama aşama alındı. Her pasaj işleminde üst sıvı kontrolü yapılarak antikor üretiminin devamlılığı dolaylı ELISA ile test edildi.

3.11.2. Antikor isotiplerinin tayini

Tek düşürme çalışmaları sonrasında artık tek klon yani monoklon olduğu belirlenen ve dolayısı ile monoklonal antikor ürettiği değerlendirilen hibritlerin ağır ve hafif zincir izotiplerinin belirlenmesi için BD firmasının ticari Mouse İmmünoglobulin Isotyping ELISA test kiti kullanıldı.

Çalışma protokolünde, kit protokolüne uygun olarak önce kit içeriğindeki antikorlar ELISA plak kuyularına kaplandı. Gece boyu 4 °C'de bekleme sonrasında, plak kit içerisindeki bloklama solüsyonu kullanılarak bloklandı. Tespit edilmek istenen Hibrit hücreye ait antikorun olduğu üst sıvı kuyuya eklendi, inkübasyon sonrası fare sekonder antikoru eklendi. Son olarak subsrat ilave edildi ve 450 nm'de spektrofotometrik okuma alındı. Tek bir alt isotipe sahip olduğu belirlenen monoklonal antikorlar belirlendi ve birden fazla isotipi bulunan kuyulardan gerekli görülmesi halinde yeniden tek düşürme çalışması yapıldı.

3.11.3. Amonyum sülfat ile protein çöktürme yöntemi

Amonyum sülfat ile çöktürmenin çalışma prensibi, hidrofobik protein grupları etrafındaki su moleküllerinin tuz iyonları tarafından uzaklaştırılmasıdır. Böylece hidrofobik grupların birbirleriyle etkileşimi artar ve proteinler çöker.

Antikorun kısmen saflaştırılmasına ve konsantre olmasına izin vermek için hücre kültürü üst sıvısının hacminin 1,1 katı doymuş AS çözeltisi 4 °C'de manyetik bir karıştırıcı yardımıyla karıştırılırken içinde yavaş yavaş ilave edildi. Daha 10 000 rpm'de +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet uygun miktarda PBS ile çözdürüldükten sonra PBS'e karşı diyaliz edildi.

Çalışma protokolünde, immünoglobulin G (IgG) tipi antikorların çöktürülmesi için, saflaştırılacak üst sıvıya üst sıvının 1,1 katı miktarında doyurulmuş amonyum sülfat çözeltisi, 4 °C'de manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dk içerisinde ilave edildi. Çözelti yaklaşık 4 saat süresince 4 °C'de karıştırıcıda inkübe edildi ve karışım uygun şişelere alınarak yüksek hızlı santrifüjde 10.000 rpm'de 4 °C'de 35 dakika boyunca santrifüj edildi. Antikor bulunan pellet saflaştırma çalışması için kullanıldı. Supernatant toplandı ve dolaylı ELISA'da hala antikor bulunup bulunmadığı test edildi. Negatif yanıt alınan süpernatantlar atıldı.

IgM tipi monoklonal antikorların çöktürülmesi için, hücre üst sıvı hacminin ağırlık olarak %20'si kadar katı amonyum sülfat tartılarak, yavaş yavaş 4 °C'de karıştırıcı üzerinde bulunan üst sıvıya eklendi. 4 saat boyunca 4 °C'de karıştırıcı üzerinde monoklonal antikorlar dahil tüm proteinler çöktürüldü ve protokol IgG tipi antikorlarla aynı şekilde tamamlandı.

3.11.4. Diyaliz yöntemi

Çalışma protokolünde, amonyum sülfat ile çöktürülen protein yapıdaki monoklonal antikorların bulunduğu pellet nazikçe PBS tamponu içerisinde çözüldü. Diyaliz tüpüne alınan örnek, hacminin yüz katı büyüklüğündeki PBS tamponu bulunan beher içerisine alınrak 4 °C'de manyetik karıştırıcı üzerinde diyaliz edildi. Diyaliz tamponu en az dört defa değiştirilerek diyaliz tamamlandı.

3.11.5. Protein A kolon kromatografisi ile antikorların saflaştırılması

Ticari olarak temin edilen Protein A ya bağlı afinite kolon kromatografi (HiTrap protein A HP, cytiva) ile IgG tipinde antikorların saflaştırılması aşağıdaki protokole göre tamamlandı.

Çalışma protokolünde protein A kolonu, saflaştırma işlemi yapılacak NGC (New Generation Chromatography) gibi bir saflaştırma sistemine bağlandı. Kolon hacminin 5 katı (5X) kadar bağlama tamponu ile yıkama yapıldı ve ardından protein çöktürme işlemi yapılan diyaliz edilmiş antikorlar 0,45 µm filtreden (Hydrophilic PVDF 0,45 µm, AISIMO) geçirildikten sonra protein A afinite kolonuna verilmek üzere NGC sistemindeki uygun üniteye yüklendi. Sistemden bağlama tamponu geçirildi ve kolon sonrası kesimler birer ml olmak üzere fraksiyon tüplerinde toplandı. Tüplere toplanan ön kesim fraksiyonlarının absorbans değerleri, 280nm'de ölçülerek, sıfırı gösterinceye kadar kolondan bağlama tamponu geçirildi. Daha sonra kolondan elüsyon tamponu geçirildi ve antikorlar 75 µl denge tamponu içeren tüplerde birer ml olmak üzere toplandı. Absorbans 280nm'de sıfırı gösterinceye kadar işlem devam ettirildi. İşlem tamamlandıktan sonra kolonun uzun süreli muhafazası için kolon, hacminin iki katı kadar %20'lik etanol ile yıkanarak 4 °C'ye kaldırıldı. Kolon kromatografisi ile saflaştırılan örneğe ait fraksiyonlar, dolaylı ELISA ile test edildi ve aktivite bulunan antikor kesimleri belirlendi ve birleştirilerek diyaliz edildi ve antikor konsantrasyonu çeşitli yöntemler ile belirlendi.

3.11.6. IgM kolon kromatografisi ile antikorların saflaştırılması

Ticari olarak temin edilmiş olan IgM afinite kromatografi (HiTrap IgM Purification HP, cytiva) ile IgM tipinde antikorların saflaştırılması aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

Çalışma protokolünde, kolon materyali, saflaştırma işlemi yapılacak saflaştırma sistemine bağlandı ve Protein A kolon saflaştırma protokülü ile örnek yükleme kısmına kadar aynı şekilde işlem tamamlandı. Örnek yükleme sonrası sistemden bağlama tamponu geçirildi ve kolon sonrası kesimler birer ml olmak üzere tüplerde toplandı. Tüplere toplanan ön kesim fraksiyonlarının absorbans değerleri, 280 nm'de ölçülerek, sıfırı gösterinceye kadar kolondan bağlama tamponu geçirildi. Sonra kolondan elüsyon tamponu geçirildi ve fraksiyonlar 1'er ml olmak üzere toplandı. Absorbans 280 nm'de sıfırı gösterinceye kadar işlem devam ettirildi. Kolonun yıkanıp kaldırılması ise yine protein A kolonu ile aynı şekilde yapıldı. Saflaştırılan örneğe ait fraksiyonlar, dolaylı ELISA ile test edilerek aktivite alınan antikor kesimleri belirlendi ve birleştirilerek diyaliz edildi.

3.11.7. Protein G kolon kromatografisi ile saflaştırılması

İnsan poliklonal antikorlarının saflaştırılması için, SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte olmuş ve iyileşmiş hastadan alınan kan örneği 4 000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi ve serumu ayrılarak 1 ml hacimli parçalara bölündü. Daha sonra amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmadan direkt olarak serumdan saflaştırma çalışması gerçekleştirildi.

Çalışma protokolünde, ticari olarak temin edilmiş olan Protein G ye bağlı afinite kolon kromatografisi (HiTrap protein G HP, cytiva) ile IgG tipinde antikorların saflaştırılması çalışması Protein a kolon kullanılarak yapılan protokol ile aynı şekilde tamamlandı. Saflaştırma sonrası fraksiyonlar dolaylı ELISA ile test edilerek aktif antikor yanıtı veren elüsyon sonrası fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz edildi.

3.11.8. Antikor konsantrasyonun belirlenmesi

İmmün Afinite Kolon Kromatografisi sonrası ELISA ile test edilerek aktivitesi belirlenen antikor kesimleri konsantre edilerek saklandı. Ancak antikorlar konsantre edilmeden önce sıvı içerisindeki antikor konsantrasyonu 280 nm'deki absorbansı belirlenerek hesaplandı.

Çalışma protokolünde, konsantrasyon tayini için BCA (MERCK) kiti de kullanıldı. Protokol kit talimatına uygun şekilde tamamlandı. Öncelikle A ve B tamponları 50:1 oranında karıştırıldı ve ELISA plak kuyularına 200 µl hacimle dağıtıldı. Daha sonra 2-0,062 aralığında seri dilüsyonla hazırlanan BSA standart örneklerinden 25 µl çift tekrarlı olarak kuyulara eklendi. Test edilecek konsantrasyonu bilinmeyen numunelerde çift tekrarlı olarak kuyulara 25 µl hacimde eklendi. 30 dk, 37 °C'de inkübe edildi. 562 nm de spektrofotometrik okuma alındı. BSA standartlarının ortalamaları alınarak eğim grafiği elde edildi. R^2 değeri %99 ve üzeri olan sonuçlar değerlendirmeye alındı. Grafikten ele edilen denklem üzerinden numunelere ait konsantrasyonlar hesaplandı.

3.11.9. Antikorların konsantre edilmesi

Konsantrasyon yöntemi olarak antikor içeren çözelti diyaliz sonrası liyofilize edildi. Liyofilize edilen monoklonal ve poliklonal antikorlar uzun süreler -20 °C veya -80 °C de saklanabilir.

Bu sistemde (CHRIST Alpha 1-4 Ldplus) liyofilizasyon, çözücünün süblimasyon ile uzaklaştırılmasına dayanır. Antikor içeren çözelti yaklaşık 2 saat -20 °C'de daha sonra gece boyu -80 °C'de bekletilerek dondurulduktan ve çözücü buz kristalleri süblimasyon ile uçurularak toz haline getirildi.

3.11.10. Fab fragmanlarının saflaştırma yöntemi

Antikor-enzim kesimi sonrası Fc ve Fab bölgelerine ayrılan antikorların Fab bölgelerinin saflaştırılması için standart IgG1 saflaştırması ile aynı yöntem kullanıldı.

Çalışma protokolünde, öncelikle kesimin başarılı olduğu protokolün belirlenmesi ile orta ölçekli kesim çalışması yapılarak toplamda 5 mg antikor kesimi ile çalışıldı. Üç farklı enzim kesimi sonrası, Protein A kolonları kullanılarak, bu kolonun antikorların Fc yapısına spesifik olması ve Fc yapıları bağlaması nedeni ile kesilmeden kalan antikorlar ve kesilen Fc bölgeleri, Protein A'ya bağlandığı için, elüsyon tampon kullanım aşamasında elde edildiler, saflaştırılması istenen Fab bölgeleri ise Protein A'ya bağlanmadığı için kolondan inen ön kesim aşamasında toplandılar. Bu amaçla saflaştırma ünitesine bağlanan kolon bağlama tamponu ile şartlandıktan sonra enzimatik kesime tabi tutulan antikorlar kolona yüklendi.

Kolona bağlanmayan Fab bölgeleri ön kesimde toplandı. Elüsyon kesiminde ise Fc bölgeleri ve kesilmeyen tüm antikorlar elde edildi. Ön kesimden elde edilen Fab bölgeleri gümüş boyama ile gösterilerek doğrulandıktan sonra ELISA ile test edilerek karakterizasyon çalışması tamamlandı. Toplanan Fab kesimi deney hayvanlarının bağışıklanması ve bu kesime karşı antikor geliştirilmesi kapsamında kullanılmak üzere küçük parçalara ayrılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

4. BULGULAR

4.1. SARS-CoV-2 Antijenine Karşı Fare Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi

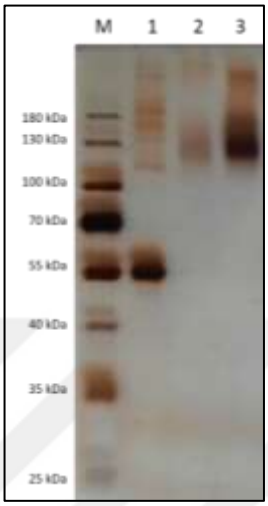
Tez çalışmasının bu bölümünde, SARS-CoV-2 virüsü yüzey proteinlerine (S,RBD) spesifik yüksek derecede duyarlı ve bağlanma kapasitesi olan monoklonal antikorların üretilmesi için, ticari olarak temin edilen ve immünizasyon çalışmalarında kullanılan SARS-CoV-2 antijenlerinin karakterizasyonu, farelerin, tavşanların SARS-CoV-2 antijeni ile immunizasyonu ve immun yanıt kontrolu (dolaylı ELISA), besleyici hücre ve kanser hücrelerinin hazırlanması, bağışık B hücrelerin ve myeloma hücrelerinin PEG mevcudiyetinde birleştirilmesi (Füzyon), hibridoma hücrelerinin ELISA ile seçimi, alt klonlama yani tek klon oluşturma çalışmalarına ait sonuçlar yer almaktadır. Bu süreçte elde edilen SARS-CoV-2'nin S1 ve RBD proteinlerine özgün, yüksek afiniteye sahip monoklonal antikorlarının virüsü nötralize etme kapasitesi, çeşitli laboratuvar testleri kullanılarak değerlendirildi. Bu testler arasında virüs nötralizasyon testleri, ELISA ve Western blot gibi protein analiz yöntemleri yer almaktadır. Yine bu bölüm de geliştirilen monoklonal antikorların SARS-CoV-2'nin S1 ve RBD proteinlerine yüksek derecede bağlanma ve virüsün hücre içi girişini engelleme yeteneğine sahip olduğunu gösteren araştırma sonuçlarına ait veriler gösterilmektedir. Mevcut bulgular, antikorların COVID-19'a karşı potansiyel tedavi ajanları olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.

4.1.1. İmmünizasyonda kullanılan SARS-CoV-2 antijenlerinin temin ve karakterizasyonu

İmmünizasyon çalışmalarında kullanılmış olan SARS CoV-2 S1 proteinleri; ticari olarak Sino Biological ve Acro Biosystems'den temin edilmiştir. (Bkz: Çizelge 3.4.)

Ticari kaynaklardan elde edilen antijen/protein örneklerinin saflık derecelerinin belirlenmesi amacıyla, gümüş boyama metodolojisi kullanılarak bir dizi analiz gerçekleştirildi. İlk adım olarak, SARS-CoV-2 protein örnekleri moleküler ağırlık vb. antijenik özellikleri kritize edebilmek için, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrıştırılmak üzere %10'luk bir SDS-PAGE jeli hazırlanarak işleme alındı. Elektroforez işlemi, örneklerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılabilmesi için 80 V sabit voltaj altında yürütüldü.

Bu sürecin tamamlanmasının ardından, protein bantlarının görselleştirilmesi amacıyla gümüş boyama tekniği uygulandı (Şekil 4.1.). Gümüş boyama sonucunda, jeldeki proteinlerin gümüş iyonları ile kompleks oluşturarak koyu renkli bantlar halinde görünür hale gelmelerini sağlandı, böylelikle proteinlerin varlığı ve saflık dereceleri belirlendi.



Şekil 4.1. S1 proteinlerinin gümüş boyama görüntüsü
M: marker (Thermo Scientific,26616), **1:** 500 ng BSA (Sigma, A2153), **2:** 100 ng S1 (AcroBiosystems, S1N-C52H3), **3:** 500 ng S1 (Sino Biological, 40591-V08B1).

Gümüş boyama işlemi sonucunda elde edilen bantlar, analiz edilen ticari protein örneklerinin saflık derecelerini başarıyla gösterdi. Şekilde görüldüğü üzere iki numaralı kuyuda bulunan S1 proteinin (Acrobiosystems) moleküler ağırlığı 76,9 kDa, üçüncü kuyuda bulunan S1 proteinin (Sino Biological) moleküler ağırlığı 76,45 kDa'dur ve bu proteinler C terminalinde bir polihistidin etiketi taşırlar. Protein, glikosilasyon nedeniyle indirgeyici (R) koşulda (SDS-PAGE) 100-125 kDa olarak görülür. SARS CoV-2 S1 proteinlerinin jel görüntüleri literatüre uygun olarak gözlemlendi.

4.1.2. Deney hayvanlarının immünizasyonu

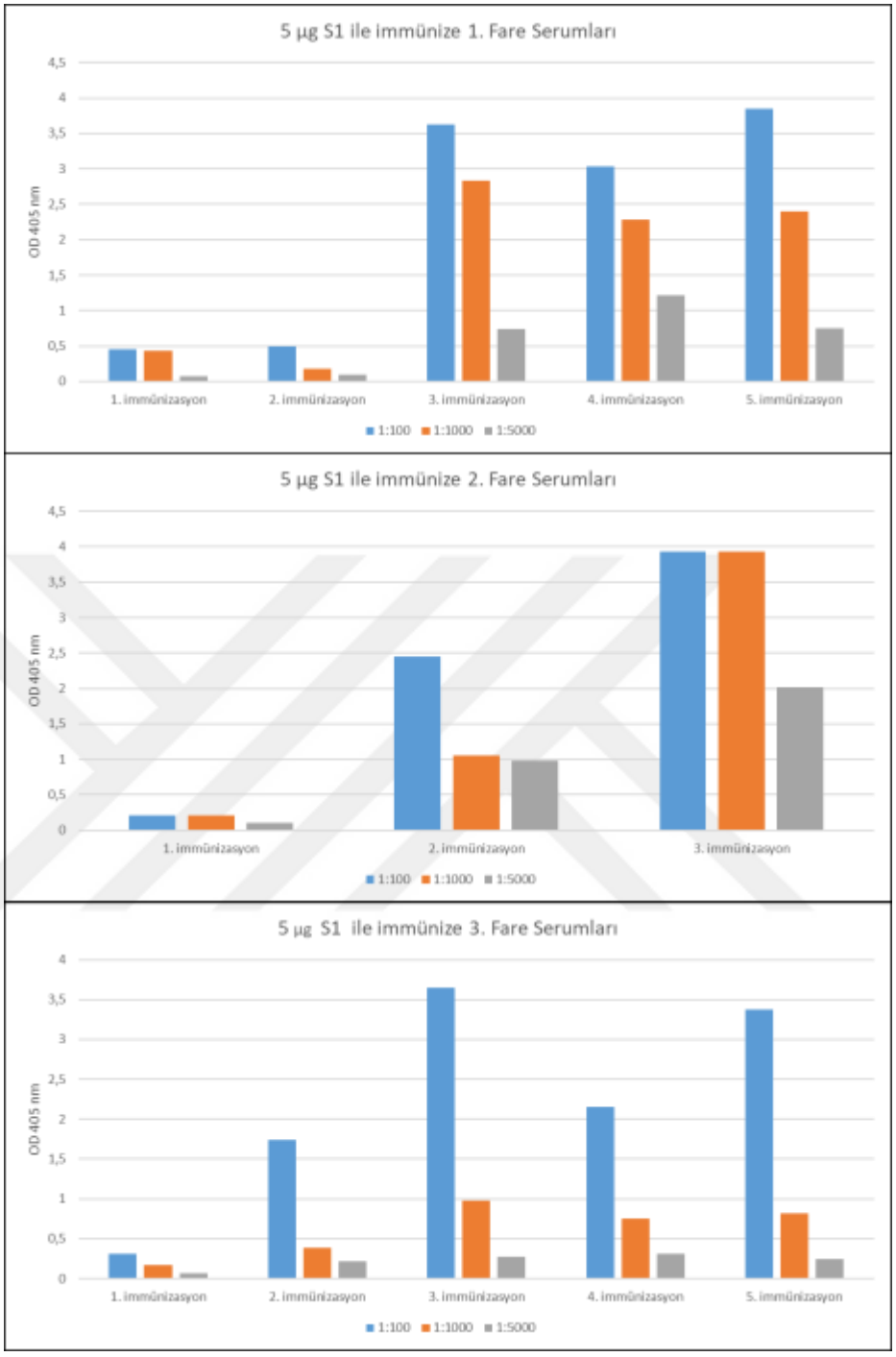
İmmünizasyon çalışmalarında altı haftalık dişi BALB/c cinsi dişi fareler (Şekil 4.2.) kullanıldı. Fareler 14 günde bir periyodik olarak karın içerisinden bağışıklandı ve immunizasyonları takip eden 7'nci günlerde kanları alınarak immün yanıt yani serumlarındaki antikor düzeyleri dolaylı ELISA yöntemi ile belirlendi.



Şekil 4.2. İmmünize edilen Balb/c cinsi dişi fareler

4.1.3. İmmün yanıtın kontrolü

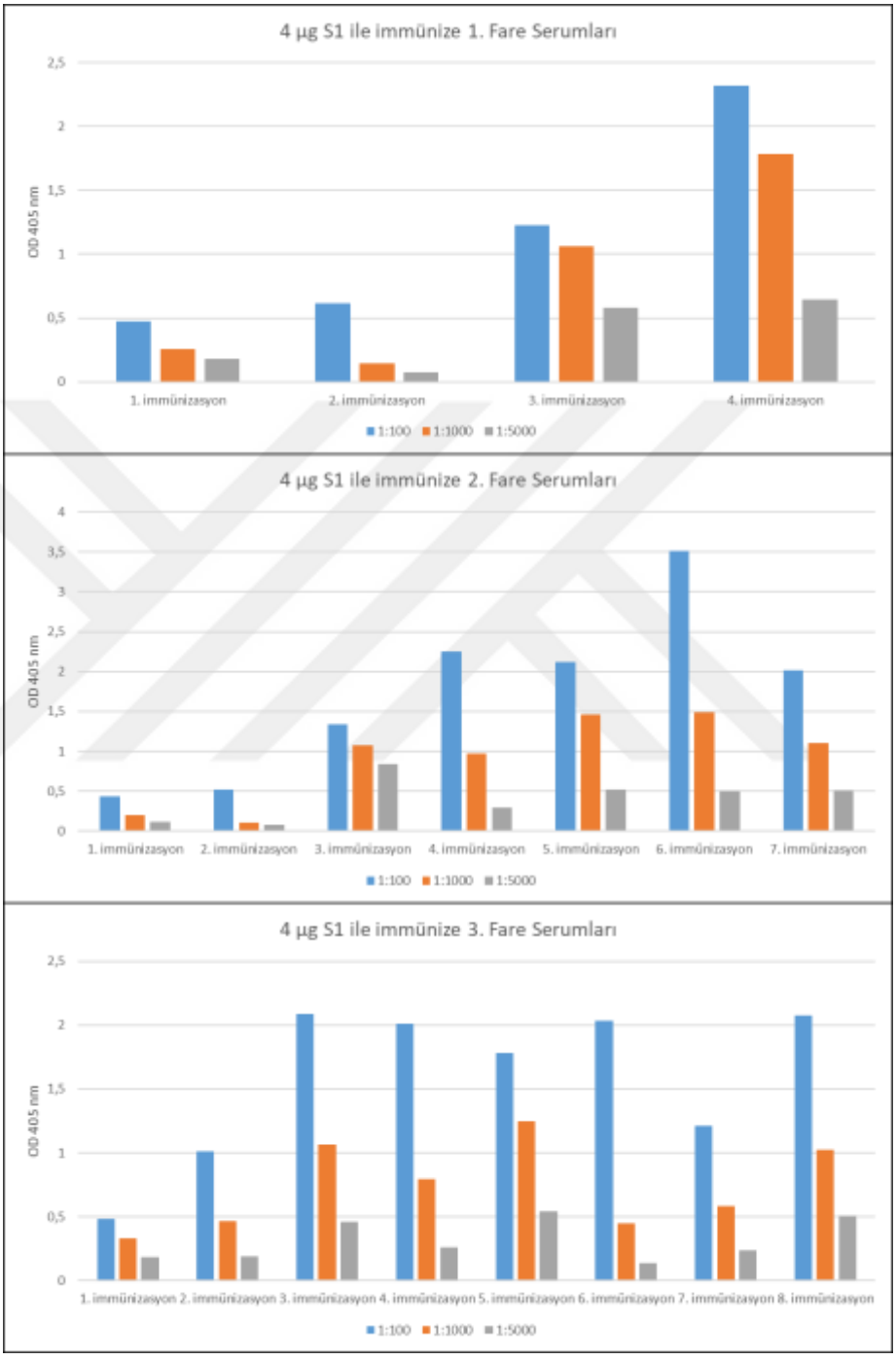
İmmün farelerin antikor aktivitelerini belirlemek amacıyla ELISA plaklarına kuyucuk başına S1 ve RBD antijenleri; 25 µg (S1) /100 µl PBS ve 100 µg (RBD)/100 µl PBS içerisinde kaplanarak +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün yöntemler kısmında anlatıldığı şekilde dolaylı ELISA çalışmaları sürdürüldü. Şekil 4.3.'te SARS-CoV-2 S1 (5 µg, Acro Biosystems) Şekil 4.4.'te SARS-CoV-2 S1 (4 µg, Sino Biological) ile immünize farelerin immün yanıtları Şekil 4.5.'te ise SARS-CoV-2 RBD (5 µg, Acro Biosystems) proteini ile immünize edilen farelerin immün yanıtları yer alır.



Şekil 4.3. 5 µg S1 proteini (Acro Biosystems, S1N-C52H3) ile immünize farelerin antikor yanıtları

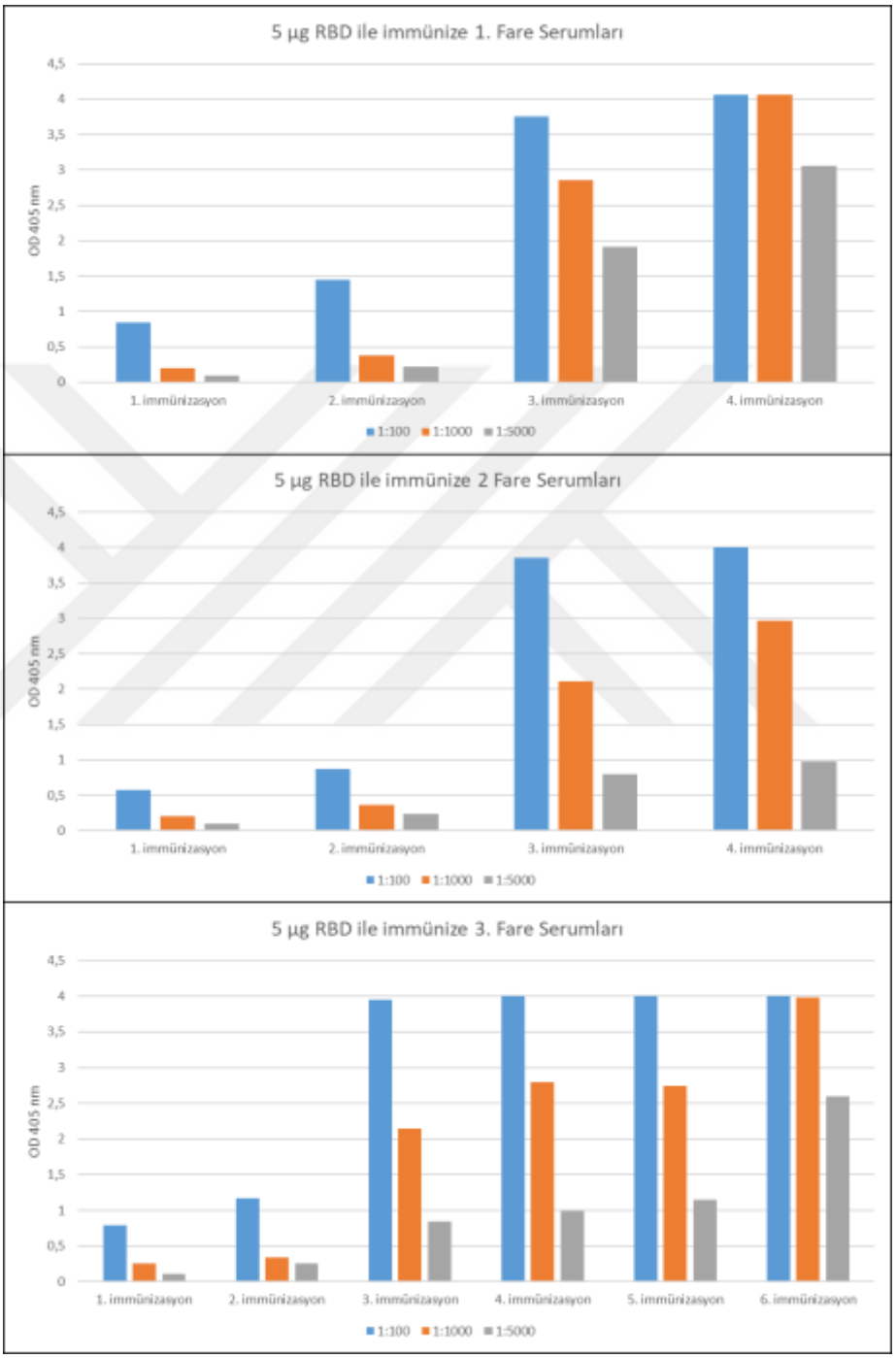
Bu çalışmada, S1 (5 µg, Acro Biosystems) proteini ile immünize edilen farelerden elde edilen antikorların ELISA yanıtları değerlendirildi. Antikorların antijen spesifik yanıtları incelenerek, 1/1000 serum dilüsyonlarındaki ELISA sonuçlarında okunan absorbans değerleri 1,00 ve üzerinde olan fareler füzyon çalışmaları için sırasıyla belirlendi.

İmmünize edilen farelerin füzyon çalışmaları, birinci farede beşinci, ikinci farede üçüncü ve üçüncü farede beşinci immünizasyonun ardından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4. 4 µg S1 proteini (Sino Biological, 40591-V08B1) ile immünize farelerin antikor yanıtları

SARS-CoV-2 S1 (4 µg, Sino Biological) proteini ile immünize edilen farelerin füzyon çalışmaları ise, sırasıyla birinci farede dördüncü, ikinci farede yedinci ve üçüncü farede sekizinci immünizasyonun ardından gerçekleştirildi.



Şekil 4.5. 5 µg RBD proteini (Acro Biosystems, SPD-C5255) ile immünize farelerin antikor yanıtları

SARS-CoV-2- RBD proteini (5 µg, Acro Biosystems) ile immünize edilen farelerin füzyon çalışmaları, birinci ve ikinci farelerde dördüncü, üçüncü farede altıncı immünizasyonun ardından gerçekleştirildi.

4.1.4. Füzyon sonuçları

Fareler üzerindeki immünizasyon protokolünün ardından, en yüksek immün yanıt veren fareler ile sırasıyla füzyon işlemleri metodolojiye uygun olarak gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen füzyon çalışmaları, füzyonda kullanılan hücre sayıları ile bu sürece ait tüm sayısal veriler Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. SARS-CoV-2 immünizasyon sonrası gerçekleştirilen füzyon çalışmalarına ait sayısal veriler ve elde edilen hibridoma sayıları

Füzyon No	Füzyon Faresi	Antijen	Antijen miktarı	Dalak hücresi sayısı	F0 sayısı (ATCC CRL1646)	Dalak/ F0 oranı	Elde edilen hibridoma hücre hatları
1	1.Grup 1.Fare	SARS-CoV-2 S1 Protein (ACRO S1N-C52H3)	5 µg	700 milyon	140 milyon	1:5	0
2	1.Grup 2.Fare		5 µg	420 milyon	140 milyon	1:3	0
3	1.Grup 3.Fare		5 µg	600 milyon	200 milyon	1:3	7D1
4	2.Grup 1.Fare	SARS-CoV-2 S1 Proteini (SİNO 40591-V08B1)	4 µg	500 milyon	166 milyon	1:3	0
5	2.Grup 2.Fare		4 µg	650 milyon	220 milyon	1:3	6E6, 4H9, 6B2
6	2.Grup 3.Fare		4 µg	630 milyon	210 milyon	1:3	0
7	3.Grup 1.Fare	SARS-CoV-2 RBD Proteini (ACRO SPD-C5255)	5 µg	550 milyon	185 milyon	1:3	0
8	3.Grup 2.Fare		5 µg	550 milyon	185 milyon	1:3	0
9	3.Grup 3.Fare		5 µg	430 milyon	143 milyon	1:3	0

1. füzyon çalışmasında; hücre kültüründe yaşanan mikoplazma kontaminasyonu sebebiyle füzyon çalışması sonlandırıldı.

2. füzyon çalışmasında; 286 hibrit klon elde edildi, tekrarlanan ELISA kontrol çalışmalarında bu klonlar arasında antikor aktivitesi gösteren hibrit hücre klonu tespit edilemedi.

3. füzyon çalışmasında; 1 088 hibrit klon elde edildi, tekrarlanan ELISA kontrol çalışmalarında bu klonlar arasından antikor aktivitesi gösteren 9 adet hibrit hücre klonu tespit edildi. Bu hücrelerden bir tanesi (7D1) S1 antijenine karşı spesifik antikor yanıtını sürdürdüğü belirlendi. Bu hücrelerle ileri çalışmalar yapılarak alt klonlama, geniş ölçek üretim ve saflaştırılma çalışmaları yapıldı.

4. füzyon çalışmasında; 396 adet hibrit klon elde edildi, tekrarlanan ELISA kontrol çalışmalarında bu klonlar arasında antikor aktivitesi gösteren hibrit hücre klonu tespit edilemedi.

5. füzyon çalışmasında; Toplam 1 426 adet klon elde edildi. S1 füzyonundan ise 6B2, 6E6 ve 4H9 isimli klonlar elde edildi.
6. füzyon çalışmasında; 582 adet hibrit klon elde edildi. Tekrarlanan ELISA testi kontrol çalışmalarında bu klonlar arasından antikor aktivitesi gösteren hibrit hücre klon tespit edilemedi.

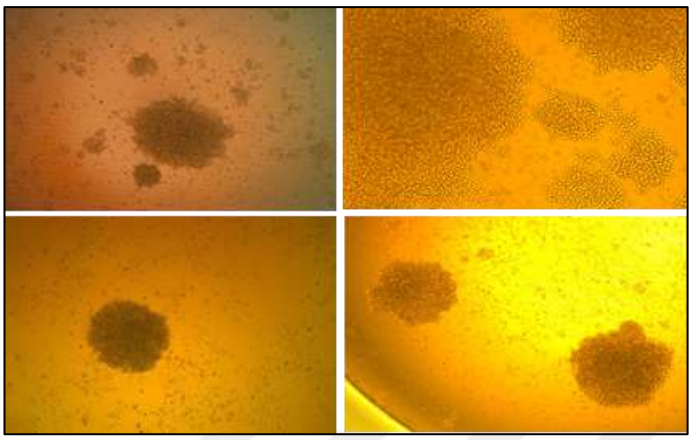
7. füzyon çalışmasında; hücre kültüründe yaşanan mikoplazma kontaminasyonu sebebiyle füzyon çalışması sonlandırıldı.

8. füzyon çalışmasında; Toplam 550 adet klon elde edildi. Tekrarlanan ELISA testi kontrol çalışmalarında bu klonlar arasından antikor aktivitesi gösteren hibrit hücre klonu tespit edilemedi.

9. füzyon çalışmasında; hücre kültüründe yaşanan mikoplazma kontaminasyonu sebebiyle füzyon çalışması sonlandırıldı.

Dolaylı ELISA yöntemi ile yüksek antikor yanıtı verenler tespiti edilerek, tekrarlayan ELISA testleri ile stabil şekilde antikor üretimini sürdüren ve yüksek antikor yanıtı veren hibridoma hücrelerinin belirlenmesi sağlandı. Tekrarlı dolaylı ELISA testleri bu çalışmada çok önemlidir. Hibrit hücreler ortalama 80 kromozom içerdiği için kararsız hücrelerdir ve füzyon sonrası ilk günlerde bu kromozomlarını kaybetme eğilimleri vardır. Kromozom kayıpları hem hücrenin ölümüne hem de üremesinin durmasına ve antikor sentezleme yeteneğinin kaybolmasına sebep olabilir (Stewart, 2001).

Füzyon sonucunda elde edilen hibridoma hücrelerinin 10'uncu gününe ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.6.'da gösterildi.

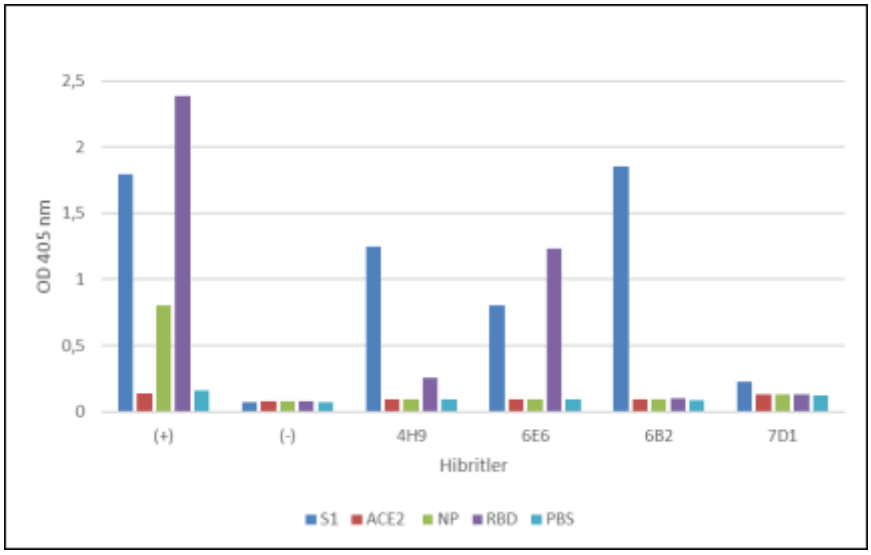


Şekil 4.6. Füzyonun 10'uncu gününde gözlenen farklı büyüklüklerdeki hibrit hücreleri

4.1.5. Monoklonal antikorların çapraz reaksiyon kontrolü

Tüm hibrit hücrelere ait monoklonal antikorların farklı SARS-CoV-2 antijenik yapıları (S2, NP, RBD) ve ACE-2 gibi farklı proteinlere ve PBS'e (negatif kontrol) karşı çapraz etkileşimini görmek için dolaylı ELISA testi kullanıldı.

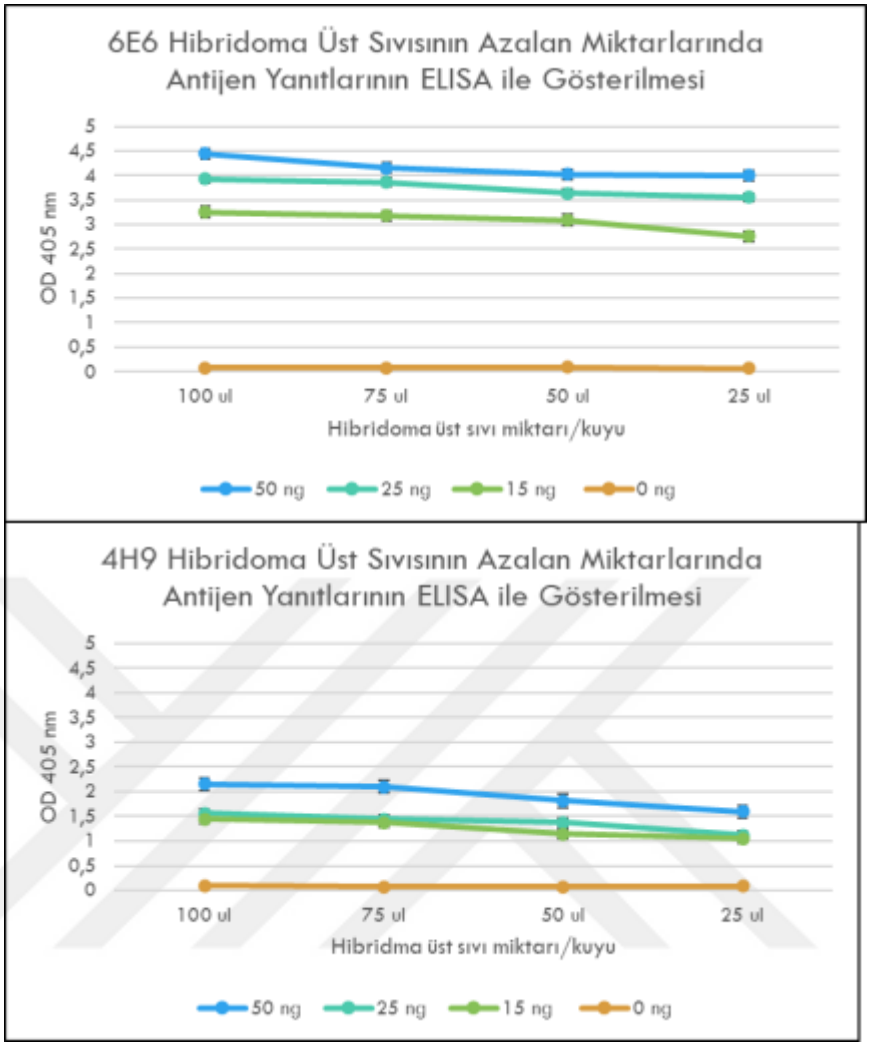
Bu kapsamda, ELISA plağı sırasıyla 25 ng S1, 200 ng ACE-2, 25 ng NP, 100 ng RBD ve negatif kontrol olarak da PBS ile kaplandı. SARS CoV-2 S1 antijenine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar test edildi ve sonuçları Şekil 4.7.'de gösterildi.



Şekil 4.7. SARS CoV-2 S1 antijenine spesifik yanıt veren monoklonal antikorların çapraz reaksiyon ELISA test sonuçları

Bu çalışma sonucunda 6E6 hibritinin hem S1 hem de RBD proteinlerini spesifik olarak tanıdığı gösterildi. Pozitif kontrol olarak füzyon sırasında toplanan S1, NP (projenin diğer çalışması) ve RBD farelerinden elde edilen poliklonal kan serumu karışımı 1/1000 dilüsyonda kullanıldı. 4H9 hibritinin S1 proteinini spesifik olarak tanıdığı gözlendi ancak 7D1 antikorunun bu çalışmada antikor yanıtını kaybettiği tespit edildi. Hücre kültür çalışmaları devam ederken 6B2 hibriti ise kontaminasyon sebebiyle kaybedildi.

Hibrit hücrelerin salgıladığı monoklonal antikorların spesifik antijenlerine olan ilgilerinin gösterilmesi için hibrit üst sıvılarının azalan (100, 75, 50 ve 25 µl) konsantrasyonları ile indirekt ELISA testi yapıldı (Şekil 4.8.). Bu çalışma ile düşük hibrid üst sıvılarında dahi yüksek antijenik yanıtının varlığı ile antikorların antijenlerine olan ilgisinin ne kadar fazla olduğu gösterildi.



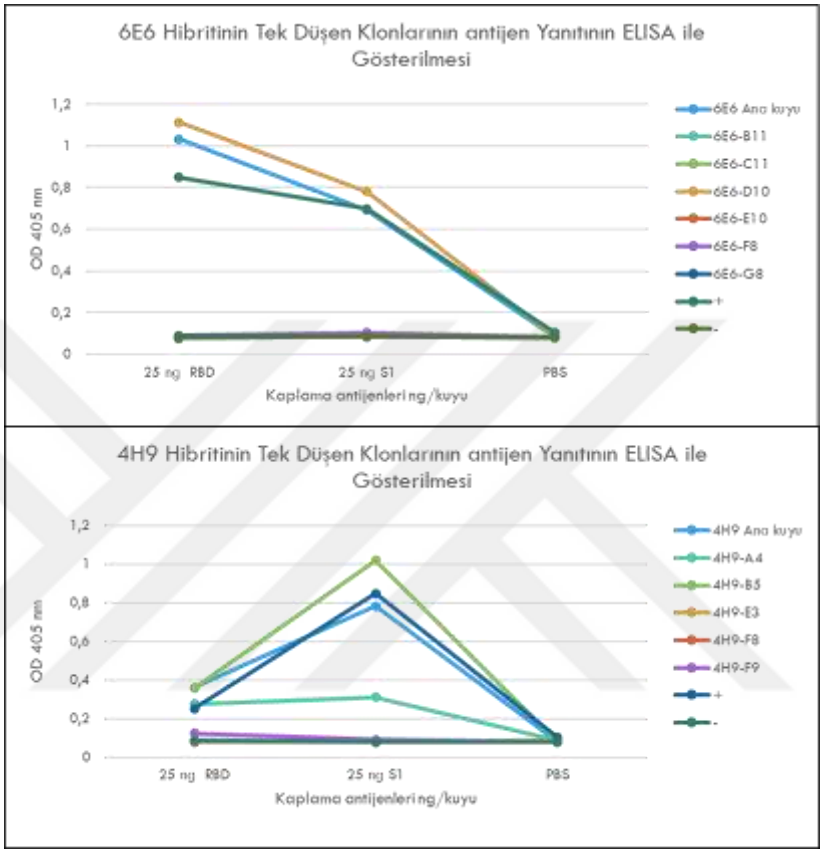
Şekil 4.8. Hibritlerin antijen ilgisinin ELISA ile gösterilmesi

İki hibrit hücreye ait antikorun da azalan antijen ve hibrit üst sıvılarına (antikor bulunan) rağmen yüksek absorbans değerlerine sahip olması sebebiyle yeni immünizasyon çalışmaları yapılmadı, bu hücrelerin tek monoklon/spesifik olabilmesi için tek düşürme çalışmaları ve akabinde bu hücrelere ait antikorların saflaştırma çalışmaları gerçekleştirildi.

4.1.6. Hibrid hücrelerin tek düşürme çalışmaları

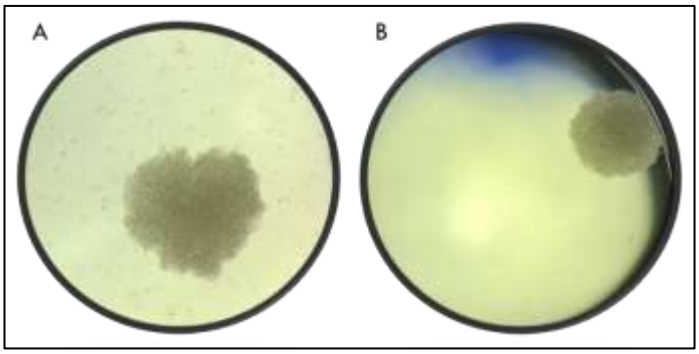
ELISA testlerinde spesifik antikor üreten tüm hibrit hücreler, tek klondan (monoklon) oluşan hibritlere dönüştürülmek amacı ile sınırlı seyreltme işlemi protokole uygun olacak şekilde yapıldı ve tek düşürme gerçekleştirilen plaklar, inkübatörde yaklaşık on gün muhafaza edildi. Daha sonra tek düşen hücreler mikroskop altında tek tek belirlendi ve

ilgili antijenine spesifik olan tek klonlar dolaylı ELISA yöntemi kullanılarak belirlendi. Tek düşen klonlara 2'nci ve 3'üncü tek düşürme işlemleri uygulandı. Bu sürecin sonunda, yüksek antikor yanıtı veren hibrit hücreler izole edilerek monoklonal hücre hatları elde edildi (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. 6E6 ve 4H9 hibritlerinin tek klon düşürme çalışmaları

Bu çalışma sonucunda elde edilen 6E6 ve 4H9 hibritlerinin tek düşen S1 ve RBD protein yanıtları oluşurken PBS bulunan kuyularda yanıt alınmamıştır. Bu da seçili hibritlerin tek düşürme çalışmalarının başarıyla gerçekleştirildiğinin kanıtını oluşturmaktadır (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Tek düşen kolonilerin mikroskop altındaki görünümü
A. 6E6-D10 hibriti, B. 4H9-B5 hibriti

Tek düşen yani monoklon olduğu tespit edilen hibridoma hücreleri daha sonra aşamalı olarak 6 gözlü/ 24 gözlü hücre kültür kaplarına alınarak çoğaltıldı. En son 25 cm^2-75 cm^2'lik hücre kültür şişelerinde çoğaltılarak donduruldu. Hücrelerin bir kısmı da antikor saflaştırma adımına geçmek için geniş ölçek üretime alındı.

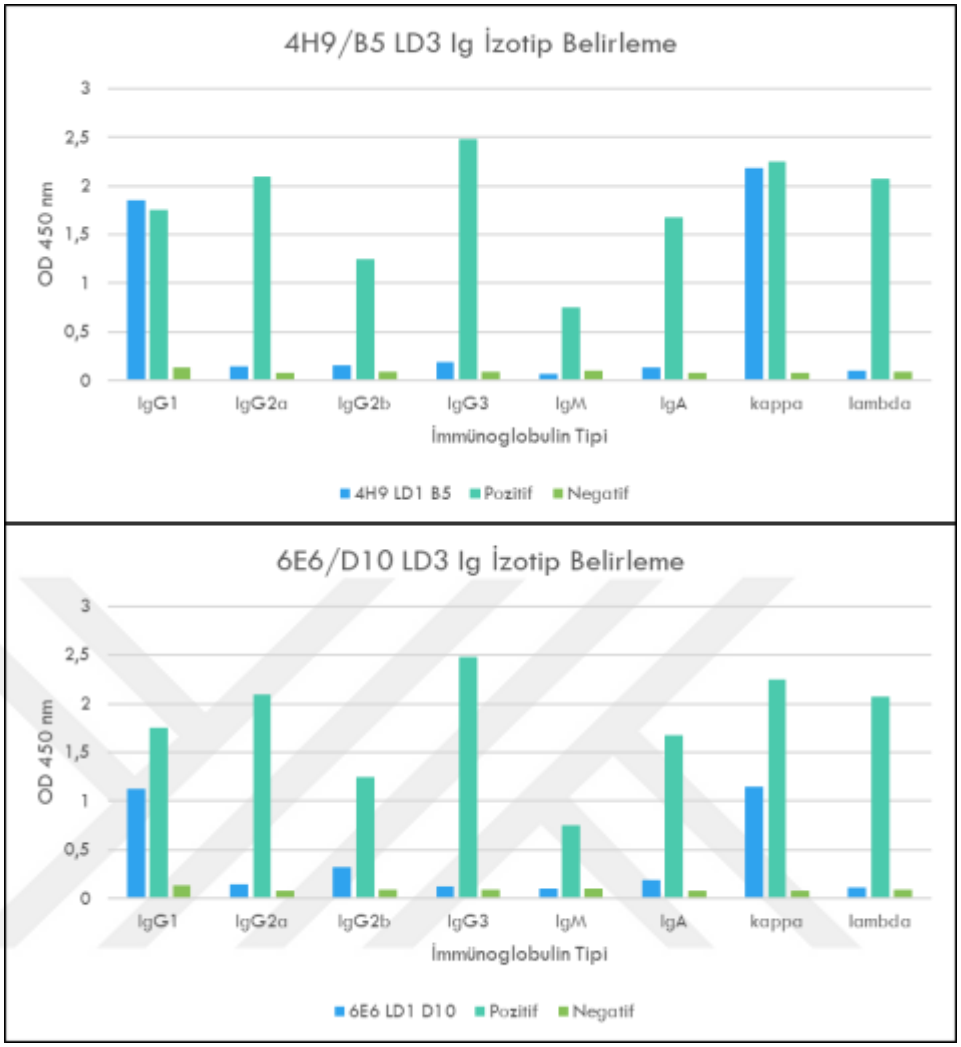
SARS-CoV-2'nin Spike proteinine yönelik geliştirilmiş olan bu monoklonal antikorlar, antijen-antikor ilişkisine dayalı ELISA ve Yanal akış (Lateral flow) gibi test sistemlerinde, teşhis kitlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecektir.

4.2. Fare Anti-SARS-CoV-2 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

SARS-CoV-2 S1 proteinine ve SARS-CoV-2 S1/RBD proteinine karşı monoklonal antikor üreten 4H9 ve 6E6 isimli hibrit hücrelerin tek düşürme çalışmaları tamamlandıktan sonra laboratuvar ölçeğinde üretim çalışmaları başlatıldı. Bu kapsam da hücreler farklı büyüklükte (75 cm^2 ,150 cm^2 ve 175 cm^2) hücre kültür şişelerinde çoğaltılarak geniş ölçekte üretim çalışmaları yapıldı.

4.2.1. İmmünoglobulin alt gruplarının belirlenmesi

Saflaştırma çalışmalarına geçilmeden önce uygun saflaştırma protokolünü seçebilmek için monoklonal antikorların immünoglobulin tipleri BD Mouse Monoclonal Antibody Isotyping antikor alt tipi belirleme kiti ile belirlendi. Şekil 4.11.'de geliştirilen anti-SARS-CoV-2 monoklonal antikorlarına ait immunglobulin tipleri bulunmaktadır.



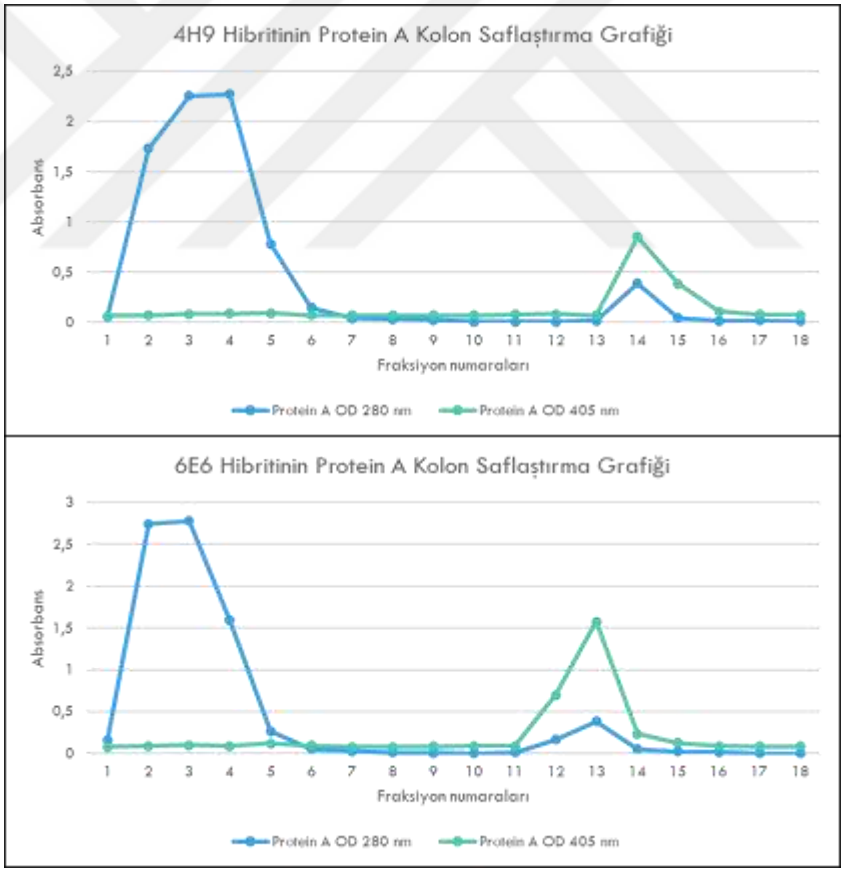
Şekil 4.11. Tek düşürme sonrası hibritlerin alt izotiplerinin gösterilmesi

Bu sonuçlara göre 4H9 ve 6E6 monoklonal antikorlarının IgG1 alt isotipinde olduğu belirlendi.

4.2.2 Kolon kromatografisi

S1 antijenine spesifik (4H9) ve S1/RBD antijenine spesifik (6E6) monoklonal antikorların saflaştırma çalışmaları yapıldı. Her ikisi de IgG1 alt izotipinde olan bu antikorların saflaştırma işlemlerinde aynı prensip uygulandı. Saflaştırma işleminden önce amonyum sülfat (AS) ile hücre kültür üst sıvısında bulunan tüm proteinlerin çöktürülmesi işlemi yapıldı. Supernatant ise herhangi bir protein kaçağı olup olmadığının ELISA ile test edilmesi için kontrol amaçlı saklandı.

Diyaliz edilen antikorlar IgG1 tipinde oldukları için Protein A kolonu kullanılarak saflaştırma işlemine tabi tutuldu. AS çöktürme sonrası antikor/protein kesimi, kolonun tıkanmasını önlemek için kolona yüklenmeden önce 5 dakika süreyle 13 200 rpm'de santrifüjlendi. Fare IgG1 antikorları, protein A için düşük afiniteye sahip olduğundan, antikorların hidrofobik etkileşimini arttırmak için yüksek tuz içeren bağlama tamponu kullanıldı. Bu nedenle santrifüjlenen numune, 1:1 oranında bağlama tamponu ile karıştırıldı ve kolona yüklendi. Saflaştırma işleminde toplanan fraskiyonların antijen spesifik yanıtları indirekt ELISA testi ile kontrol edildi. Şekil 4.12.'de 4H9B5 ve 6E6D10 antikorlarına (tek düşürülmüş olan) ait saflaştırma sonrası yapılan antikor yanıtlarının gözlemlendiği 25 ng S1 proteini kaplı kuyulardan elde edilen ELISA test sonuçları (OD 405 nm) ve protein miktarının belirlendiği 280 nm UV absorbsiyon değerleri yer almaktadır.

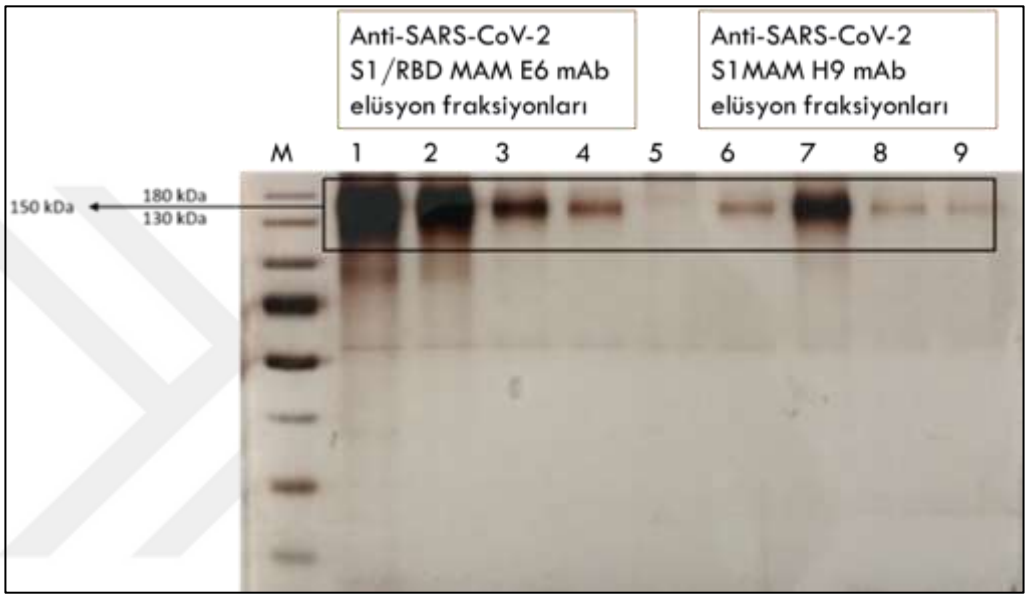


Şekil 4.12. 4H9 ve 6E6 monoklonal antikorlarının saflaştırma grafiği

Saflaştırma sonrası 6E6 hibrit hücresi fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6; 4H9 hibrit hücresi fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 olarak isimlendirildi.

4.2.3. Protein saflığının belirlenmesi (gümüş boyama)

Saflaştırma çalışması sonrası elde edilen elüsyon sonrası kesimlerinden, fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAbına ait 13, 14, 15 ve 16'ıncı fraksiyonlar, fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAbına ait 12, 13, 14 ve 15'inci fraksiyonların saflık derecesi gümüş boyama yöntemi ile gösterildi. Çalışmada fraksiyonlar 100 kat dilüe edilerek jele yüklendi ve gümüş boyama ile saf bantlar jel üzerinde gösterildi (Şekil 4.13.).



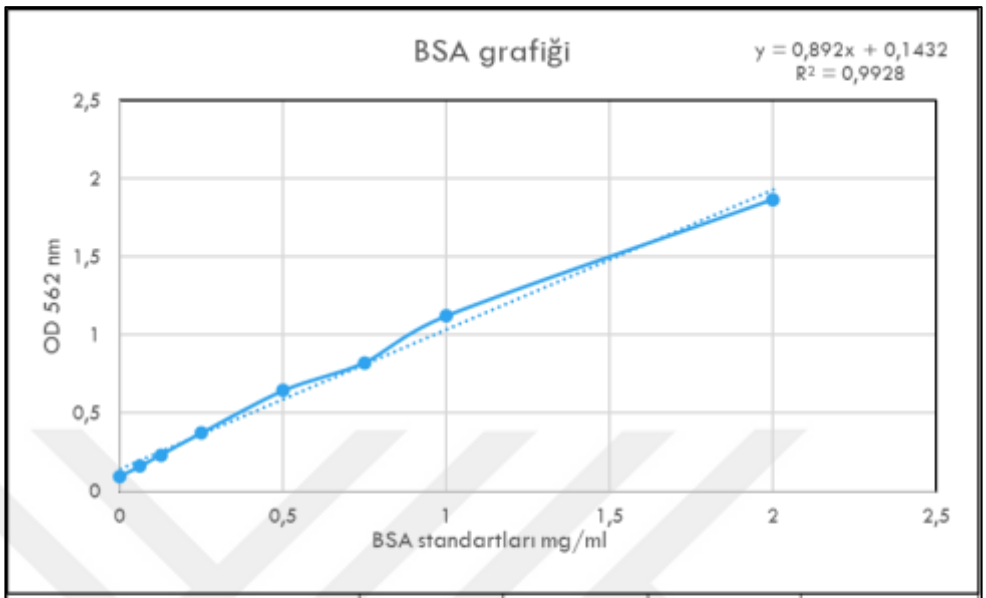
Şekil 4.13. Saflaştırılan fraksiyonların gümüş boyama ile gösterilmesi
Sırasıyla; **M:** Marker (Thermo Scientific, 26616), **1:** Anti-SARS-COV-2 S1/RBD MAM E6 - 12. Fraksiyon, **2:** 13. Fraksiyon, **3:** 14. Fraksiyon, **4:** 15. Fraksiyon, **5:** Boş kuyu, **6:** Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 - 13. Fraksiyon, **7:** 14. Fraksiyon, **8:** 15. Fraksiyon, **9:** 16. Fraksiyon.

Gümüş boyama sonucunda saflığı belirlenen elüsyon fraksiyonları birleştirilerek diyaliz edildi ve karakterizasyon çalışmalarına devam edildi.

4.2.4. Protein konsantrasyon tayini

Saflaştırma işlemi sonrasında, fare kökenli monoklonal antikorlar diyaliz ile arıtıldı ve konsantrasyonlarının tespiti için Bişinoninik Asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu test prosedürü kapsamında, A ve B tamponları 50:1 oranında homojen bir şekilde karıştırıldı ve ardından ELISA kuyucuklarına transfer edildi. Bu işlemden sonra, konsantrasyonları ölçülecek olan monoklonal antikorlar ortama ilave edildi. İnkübasyon sürecinin

tamamlanmasının ardından, absorbans değerleri 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu (Şekil 4.14.).



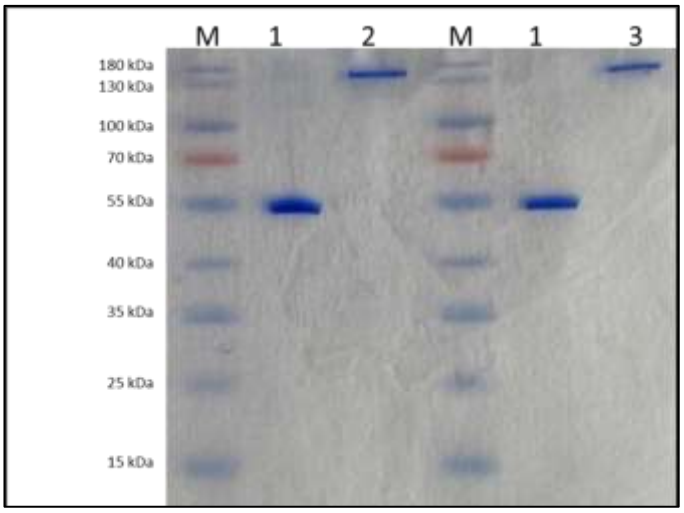
	1. Değer	2. Değer	Ortalama	Konsantrasyon
Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb	1,435	1,438	1,4365	1,449887892
Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb	1,082	1,063	1,0725	1,041816143

Şekil 4.14. BCA testi ile belirlenen Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 ve Anti-SARS-COV-2 S1 MAM H9 monoklonal antikorlarının konsantrasyonları

Konsantrasyonu belirlenen monoklonal antikorlar küçük alikodlara ayrılarak liyofilize edildi ve -20 C de stoklandı. Stoklanan antikorlar enzim kesim çalışmaları için koruyucu ilave edilmeden muhafaza edildi.

4.2.5. Antijen yanıtlarının belirlenmesi (Western Blot ve ELISA)

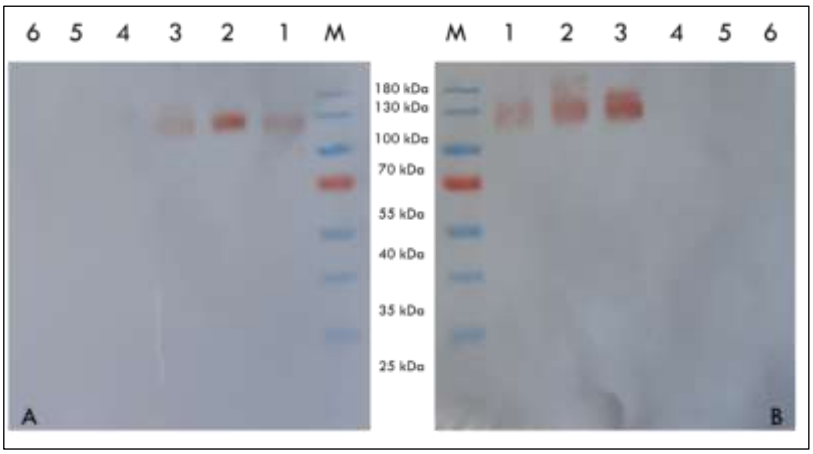
Saflaştırma ve konsantrasyon tayini gerçekleştirilen antikorlar, karakterizasyon testlerinin gerçekleştirilmesi adına öncelikle, SDS-PAGE jel elektroforezi yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra Coomassie Blue ile boyama işlemine tabi tutuldu (Şekil 4.15.). Bu süreç, antikorların saflık derecesinin görsel olarak doğrulanması ve analiz edilmesi için kritik öneme sahiptir.



Şekil 4.15. Anti-SARS-CoV-2 mAblarının commassie blue boyama ile gösterilmesi
M: marker (Thermo Scientific,26616), **1:** 2 µg BSA, **2:** 1,5 µg Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb, **3:** 1,5 µg Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb

Saflaştırılan monoklonal antikorların saflığı, commassie blue boyama sonrası, jel üzerinde iki ve üç nolu kuyularda yaklaşık 150 kDa ağırlığa sahip olan saf monoklonal antikorlar gösterildi.

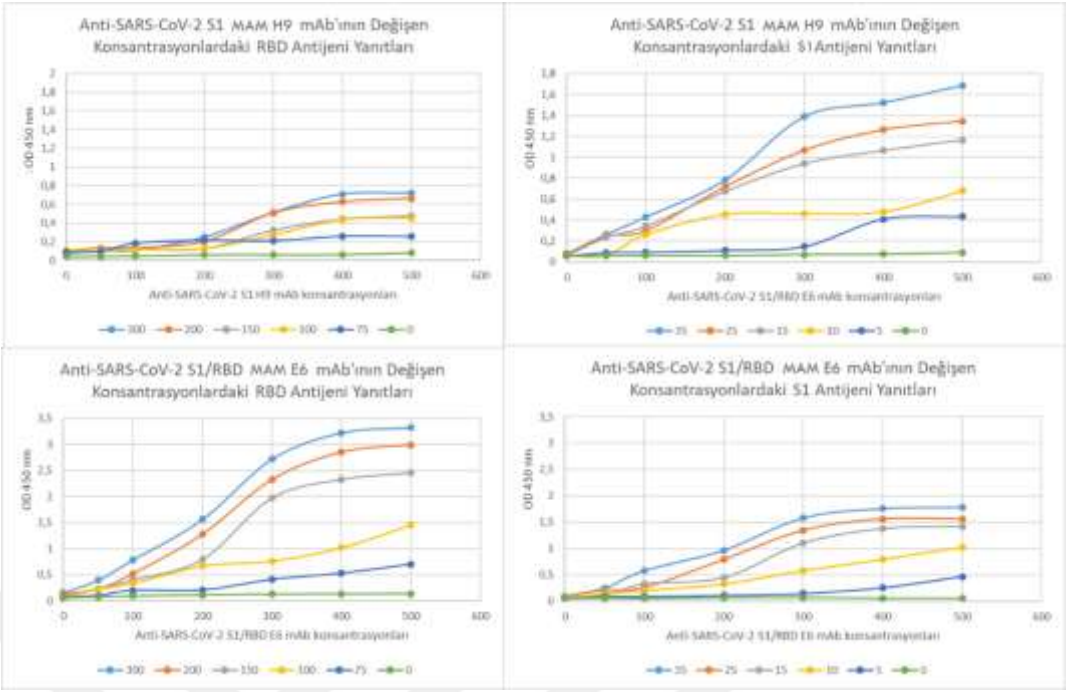
Saflaştırılan proteinlerin antijenik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Western Blot analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.16.). Bu kapsamda, S1, RBD ve NP proteinleri öncelikle SDS-PAGE jel elektroforezi yöntemiyle ayrıştırıldı. Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 ve anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 monoklonal antikorlarının spesifik protein hedeflerine bağlanması sonrasında, işaretlenmiş ikincil antikorlar kullanılarak antikor-protein kompleksleri etkileştirildi. Son aşamada, membran üzerindeki protein bantları görüntülendi.



Şekil 4.16. Anti-SARS-CoV-2 mAblarının Western Blot ile gösterilmesi
M: marker (Thermo Scientific,26616), 1: 100 ng S1 Acro Biosystems, S1N-C52H3, 2: 500 ng S1 Sino Biological,40591-V08B1, 3: 500 ng RBD Acro Biosystems, SPD-C5255, 4: 500 ng NP Synbiotik, AG-0104, 5: 500 ng S2 Sino Biological, 40590-V08B, 6: 500 ng BSA A7030.

A membranı, Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb'ı ile muamele edilirken, B membranı, Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb'ı ile muamele edildi. A membranında monoklonal antikor, S1 proteinine yüksek spesifite ile bağlanırken, RBD proteinine karşı zayıf bir bağlanma profili gösterdi. Buna karşın, B membranındaki mAb hem RBD hem de S1 proteinlerine kuvvetli bir bağlanma gösterdi. Her iki proteinde NP, S2 ve BSA proteinlerine bağlanmadı. Bu analizler, saflaştırılan proteinlerin antijenik özelliklerinin belirlenmesi ve monoklonal antikorların hedef spesifitelerinin doğrulanması açısından kritik öneme sahiptir.

Saflaştırılan monoklonal antikorların antijen yanıtlarının gösterilmesi adına azalan konsantrasyondaki antikorlar azalan konsantrasyonlardaki antijenik proteinlere karşı dolaylı ELISA ile test edildi (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Saflaştırılan monoklonal antikorların ELISA ile antijen yanıtlarının gösterilmesi

ELISA analizi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9mAb'ının S1 proteinine özgü olduğu, Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb'ın ise hem S1 hem de RBD proteinlerine spesifik bir şekilde bağlandığı belirlendi. Çalışma sonucunda ELISA çalışmaları için her iki mab'ın da 400 ng konsantrasyonda kullanılabilir olduğu gösterildi. Antijenlerin kaplama konsantrasyonları ise S1 proteini için 25 ng RBD proteini için 150 ng olarak belirlendi.

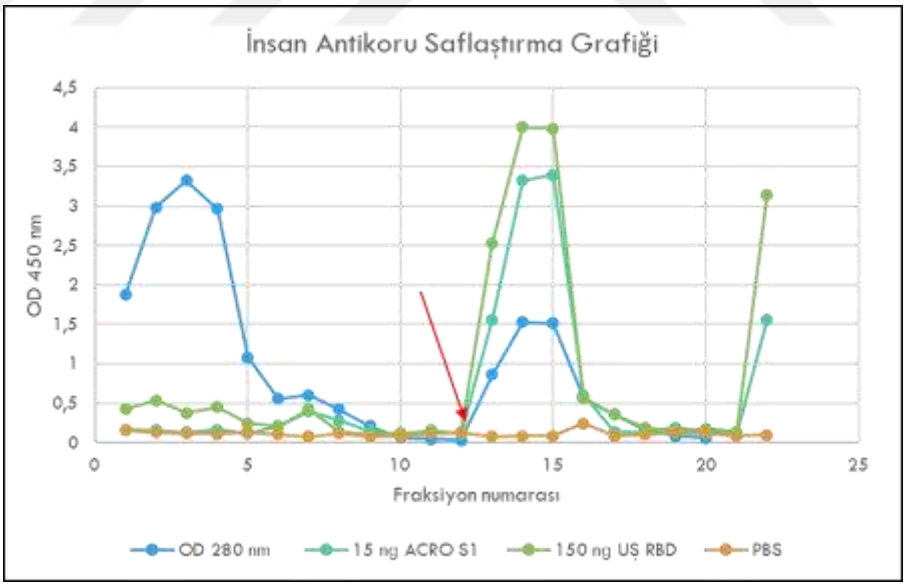
4.3. Konvalesan Serumdan İnsan Antikorlarının Elde Edilmesi

Konvalesan serum, yani COVID-19'u atlattıktan sonra bireylerin kan plazmasında bulunan antikorlar, potansiyel bir tedavi seçeneği olarak ortaya çıkmıştır. İyileşen hastaların plazmasında bulunan antikorlar, virüse özgü bağışıklık tepkileri barındırır ve bu antikorlar, virüsün hücre içi replikasyonunu engelleyecek şekilde nötralizan özellik gösterebilir. Bu çalışma kapsamında, konvalesan serumdan insan antikorlarının izolasyonu ve saflaştırılması, bu antikorların SARS-CoV-2'nin RBD'sine karşı nötralizasyon etkinlikleri incelendi. Elde edilen antikorların karakterizasyonu ve fonksiyonel değerlendirilmesi, COVID-19'a karşı geliştirilebilecek tedavi yöntemlerine

ilişkin değerli bilgiler sunabilir ve bu yöntemlerin etkinliğini artırmak için önemli bir adım olabilir.

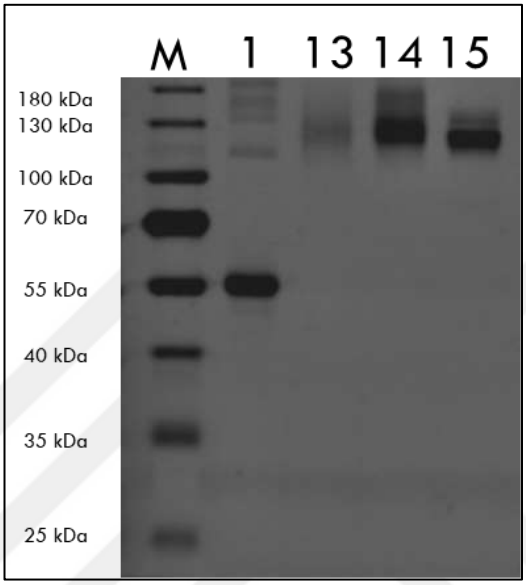
4.3.1. Serumdan poliklonal antikorların saflaştırılması

Etiği onaylanmış protokole uygun olarak, onam formu imzalatılarak COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş ve sonrasında iyileşmiş olan bireyden (FY) kan örneği toplandı. Bu çalışma için Sağlık Bakanlığının Bilimsel Araştırma Platformuna yapmış olduğumuz 2020-11-24T15_38_14 nolu başvuru ile onay alınmıştır. Ayrıca İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik kurulundan (Karar No: 2021-125; 03/06/2021) onay alınmıştır. Bu kan örneği (FY) santrifüj işlemine tabi tutularak plazma fraksiyonu elde edildi. Plazmadaki özgül antikorların saflaştırılması amacıyla, Protein G afinitesi yüksek bir kromatografi kolonu kullanıldı. Bu işlemle, plazmada bulunan antikorlar izole edildi. Elde edilen antikor fraksiyonları, S1 ve RBD proteinleri ile kaplı olan ELISA kuyucuklarında serolojik teste tabi tutuldu ve antikorların bağlanma afiniteleri ile nötralizasyon etkinlikleri incelendi (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. İnsan konvalesan serumundan saflaştırılan fraksiyonların ELISA ile test edilmesi
OD 280: Saflaştırma sonrası elde edilen insan serum protein fraksiyonlarının spektrofotometrik ölçümleri, OD 450: Dolaylı ELISA testinde anti-SARS-CoV-2 antikorlarının antijen yanıtlarına ait absorbans değerleri.

Saflaştırılan insan serumuna ait elüsyon fraksiyonlarının S1 ve RBD proteinlerini tanırken PBS'e karşı yanıt vermediği gösterildi. Saflaştırma işlemi sonrası elde edilen antikor fraksiyonlarının saflık düzeyleri gümüş boyama yöntemi ile görsel olarak değerlendirildi. Antikorlar, proteinlerin çözünürlüklerini ve saflık seviyelerini belirgin bir şekilde gözlemlemek için gümüş boyama ile boyandı (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Saflaştırılan insan serumuna ait elüsyon fraksiyonlarının gümüş boyama ile gösterilmesi

Gümüş boyama sonrası saflığı gösterilen 13, 14 ve 15 nolu fraksiyonlar birleştirilerek diyaliz edildi. Yapılan bu işlemin ardından, BCA proteini tayin testi kullanılarak antikorların konsantrasyonu kantitatif olarak 4,7 mg/ml olarak belirlendi. Bu süreçler, konvalesan plazmadan izole edilen antikorların biyokimyasal karakterizasyonu ve sonraki biyolojik testler için kullanımının ön koşullarını oluşturmaktadır.

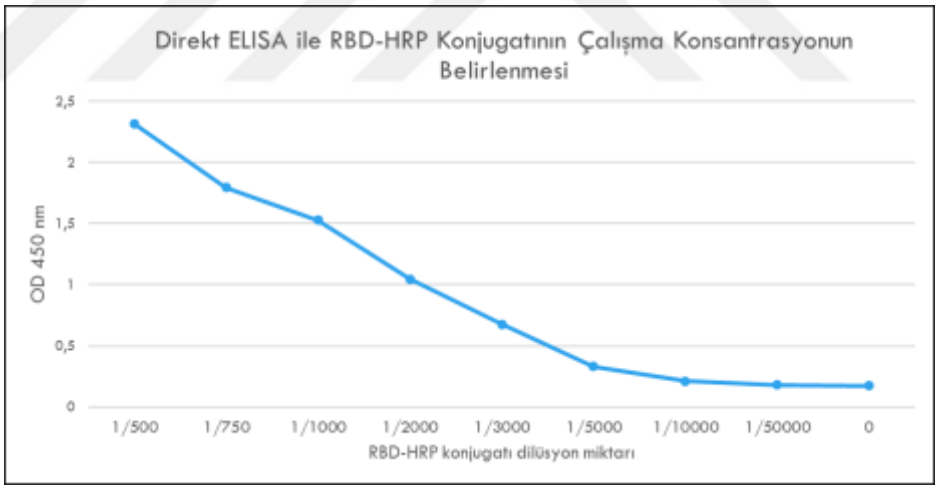
4.4. Antikorların Nötralizasyon Kabiliyetlerinin Gösterilmesi

Monoklonal antikorların SARS-CoV-2 virüsünün RBD proteinine karşı gösterdikleri nötralizasyon kabiliyetleri bu antikorların potansiyel terapötik kullanımlarını belirlemek açısından çok önemlidir. SARS-CoV-2, COVID-19 hastalığının etken maddesi olan bir koronavirüstür ve ACE-2 reseptörlerini hücre girişi için ana bağlanma noktası olarak kullanır. Virüsün bu reseptöre bağlanma yeteneği, enfeksiyonun başlaması ve yayılması için kritik öneme sahiptir. Dolayısıyla, RBD'ye karşı geliştirilen monoklonal antikorlar,

virüsün hücreye girişini engelleyerek enfeksiyonun önlenmesi veya şiddetinin azaltılmasında önemli bir rol oynayacaktır. Bu kapsamda tez sürecin de geliştirilmiş olan Anti-SARS-CoV-2 antikorlarının ve çalışam kapsamında saflaştırılan insan serumunun Nötralizasyon Kabiliyetlerini görmek amacıyla gerçekleştirilen RBD proteinlerinin HRP enzimi ile işaretlenmesi, işaretli konjugatın çalışma koşullarının belirlenmesi ve yarışımlı RBD nötralizan ELISA test sonuçları aşağıda yer almaktadır.

4.4.1. RBD proteinlerinin HRP enzimi ile işaretlenmesi

Yöntemlerde detayları verilmiş olan RBD proteinlerinin, HRP enzimi ile konjügasyonu sonrasında, bu işaretlenmiş proteinlerin aktivitesinin doğrulanması amacıyla, direkt ELISA yöntemi kullanılarak bir dizi test yapıldı. Test prosedürü, her bir kuyunun 200 ng anti-SARS-CoV-2 MAM E6 mAb'ı ile kaplanmasıyla başlandı ve ardından standart dolaylı ELISA protokolü takip edildi. Farklı dilüsyon oranlarında (1/500, 1/750, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/5000, 1/10000, ve 1/50000, ayrıca bir kontrol grubu olarak PBS kullanıldı) RBD-HRP konjügasyonlu proteinler kuyucuklara uygulandı (Şekil 4.20.).



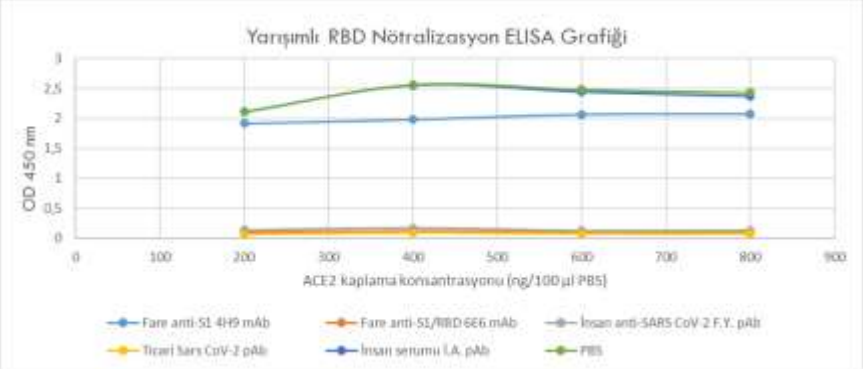
Şekil 4.20. 200 ng kaplı anti-SARS-CoV-2 MAM E6 mAb'ının RBD-HRP etkileşimi

Analiz sonuçları, 1/1000 dilüsyon oranında işaretlenmiş konjuge proteinin kullanımının en uygun çalışma konsantrasyonu olduğunu gösterdi. Konjüge edilen RBD-HRP, bu optimal dilüsyon oranında, nötralizasyon testlerin de kullanılmak üzere alikotlar halinde hazırlanmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Bu süreç, RBD-HRP konjügasyonunun fonksiyonel aktivitesinin ve ELISA yöntemiyle kullanımının etkinliğinin kantitatif olarak

değerlendirilmesini sağlayacak, bu da sonraki nötralizasyon testleri için önemli bir temel oluşturacaktır.

4.4.2. Yarışımlı RBD nötralizasyon ELISA testi

RBD-HRP proteinleri anti-SARS-CoV-2 mAb'larının yanı sıra İnsan anti-SARS-CoV-2 FY poliklonal insan antikoru, Ticari SARS-CoV-2 nötralizan antikoru, hiç hastalanmamış insan serumu (negatif kontrol) ve PBS ile ön inkübasyona alındı. Bu ön inkübasyon işlemi, antikorların RBD proteinleri ile spesifik etkileşimlerini ve bu etkileşimlerin ACE-2'ye bağlanma bölgelerini ne ölçüde bloke edebileceğini değerlendirmek için tasarlandı. Şekil 4.21.'de anti-SARS-CoV-2 antikorlarının nötralizasyon kabiliyetlerinin yarışımlı RBD nötralizan ELISA ile gösterildiği sonuçlar yer almaktadır.



Şekil 4.21. Antikorların RBD Nötralizasyon kabiliyetlerinin ELISA ile gösterilmesi.

200 ng ACE-2 kaplı kuyularda elde edilen yanıtlar temel alınarak antikorların nötralizasyon kabiliyetleri yüzdesel olarak belirlendi (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Antikorların RBD proteinini nötralize edebilme yüzdeleri

Antikor	**Nötralizasyon Yüzdesi**
Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb	9,14
Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb	95,12
İnsan anti-SARS-CoV-2 FY pAb	93,51
Ticari anti-SARS-CoV-2 nötralizan antikor (pozitif kontrol	96,83
Hiç hastalanmamış insan serumu (negatif kontrol)	0
PBS	0

Bu veriler, farklı antikorların SARS-CoV-2 virüsüne karşı potansiyel koruyucu etkilerini ve RBD proteinine karşı bağlanma yeteneklerini gösterir. Özellikle fare anti-SARS-COV-

2 S1/RBD MAM E6mAb ve İnsan anti-SARS-CoV-2 FY pAb'ı yüksek nötralizasyon oranları ile dikkat çekerken, fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb düşük nötralizasyon oranı ile sınırlı bir etkinlik sergiledi.

Bu deneyin tasarımı, antikorların virüsün hücreye girişini bloke edebilme yeteneğinin kantitatif olarak ölçülmesine olanak tanır. Böylece, saflaştırılan antikorların ya da insan serum örneklerinde bulunan antikorların SARS-CoV-2 virüsüne karşı potansiyel nötralizasyon etkileri, spesifik bir bağlanma aktivitesi aracılığıyla değerlendirilebilir. Antikorların RBD proteinine bağlanarak ACE-2 ile olan etkileşimini engellemesi, bu antikorların nötralizasyon kabiliyetinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu yüzdesel değerlendirmeler, daha sonra antikorların profilaktik veya terapötik kullanımlarına dair karar verme sürecinde önemli bir referans noktası oluşturabilir.

4.5. Anti-SARS-COV-2 Antikorlarının Papain Enzimi ile Proteolitik Kesimi

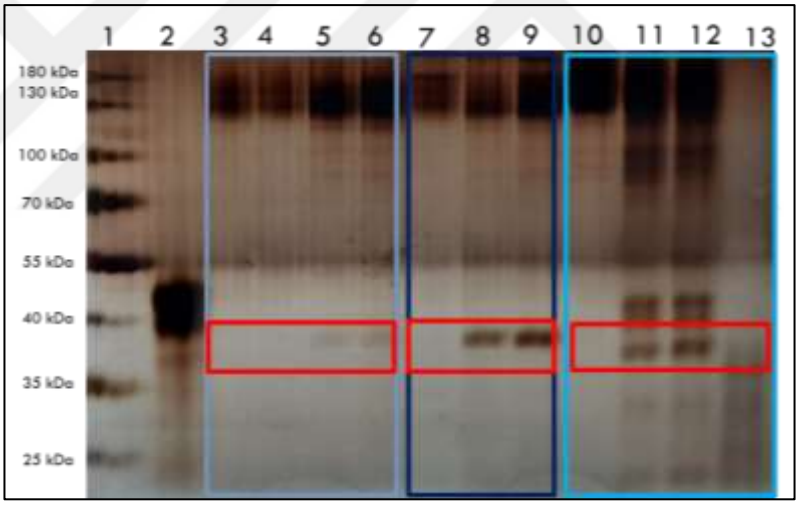
Bu çalışmanın özgül amacı, papain enzimi ile spesifik monoklonal antikorların proteolitik kesimini gerçekleştirerek, özellikle Fonksiyonel Antijen-Bağlayıcı (Fab) fragmentlerinin izolasyonunu sağlamaktır. Papain, bir cysteine protease olarak, antikor molekülünün hinge bölgesinde kesim yaparak, antijenle etkileşimde bulunan Fab fragmentlerini ve immünomodülatör işlevlere katkıda bulunan Fc bölümünü ayırır. Bu sürecin esas hedefi, Fab fragmentlerinin saflaştırılmasını maksimize ederek, bu fragmentlerin antijen tanıma ve bağlama özelliklerinin kapsamlı bir şekilde karakterize edilmesini sağlamaktır. Fab fragmentlerinin elde edilmesinin ardından Balb/c cinsi dişi farelere immünize edilerek anti-idiyotipik antikor geliştirme aşamasında kullanılmıştır.

4.5.1. Papain enzimi ile antikor kesim protokolünün antikor:enzim konsantrasyonunun optimizasyonu

Bu çalışma süresince, fare anti-S1 4H9 ve anti-S1/RBD 6E6 monoklonal antikorları ile aynı dönemde saflaştırılan insan anti-RBD poliklonal antikoru (FY), papain enzimi kullanılarak yöntemlerde anlatıldığı üzere proteolitik fragmentasyona tabi tutuldu. Tüm antikorlar, kondansatör yardımıyla 10 mg/ml konsantrasyona getirildi. Papain enzimi, antikorları kendi Fonksiyonel Fragment antikor bölgesi (Fab) ve Kristalize Fragment (Fc) bölgelerine ayırmak için kullanılan seçici bir proteolitik ajandır. Antikorlar, belirlenen üç farklı oranda (10:1, 20:1 ve 50:1) enzim ile birleştirilerek inkübe edildi. Antikor-enzim

karışımı, 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edilerek antikorların uygun fragmentasyonunun sağlanması hedeflendi. Bu işlem, antikorların antijen bağlama bölgelerinin ayrı olarak elde edilmesi ile anti-idiyotipik antikor geliştirme çalışmasında kullanılacaktır. Bu süreçte kontrol edilen sıcaklık ve süre, antikorların optimal fragmentasyon koşullarını sağlamak için önemli parametrelerdir.

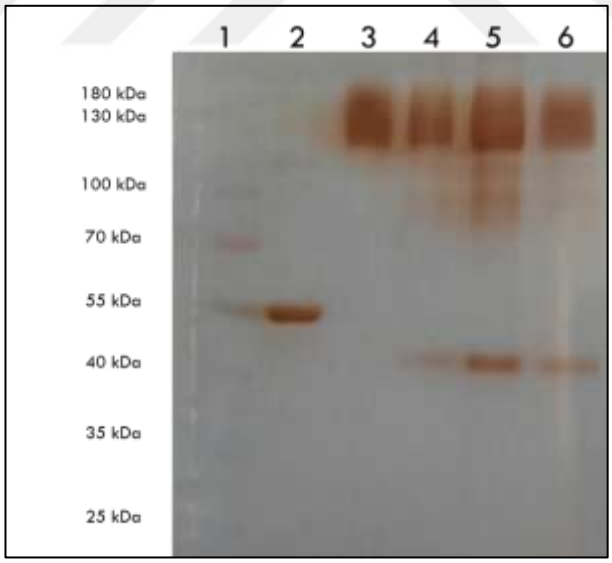
İnkübasyon işleminin tamamlanmasını takiben, antikor ve enzim karışımlarının fragmentasyon profilinin değerlendirilmesi amacıyla gümüş boyama yöntemi kullanıldı (Şekil 4.22.). Bu yöntem, proteolitik işlemden sonra elde edilen Fab ve Fc fragmentlerinin boyut ve bolluğunu görselleştirerek, enzim aktivitesinin etkinliği ve antikor fragmentasyonunun başarısını belirlemek için kullanılmaktadır. Gümüş boyama, nanogram düzeyinde protein tespit edebilen duyarlı bir teknik olup, proteolitik fragmentasyon sürecinin doğrulaması için tercih edilen bir analiz yöntemidir.



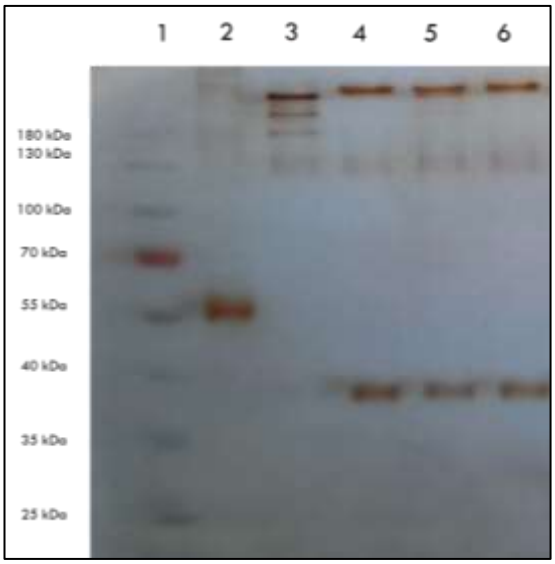
Şekil 4.22. Papain enzimi ile farklı oranlarda sindirilen antikorların gümüş boyama ile gösterilmesi
1: Marker (Thermo Fisher), **2:** 500 ng BSA, **3:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb, **4:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb : Papain ile 10:1 oranında sindirilirdi, **5:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb : Papain ile 20:1 oranında sindirilirdi, **6:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb : Papain ile 50:1 oranında sindirilirdi, **7:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb, **8:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb : Papain ile 10:1 oranında sindirilirdi, **9:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb : Papain ile 20:1 oranında sindirilirdi, **10:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb, **11:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb : Papain ile 10:1 oranında sindirilirdi, **12:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb : Papain ile 20:1 oranında sindirilirdi, **13:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb : Papain ile 50:1 oranında sindirilirdi.

Çalışmada kullanılan antikorlar, -20 °C'de sıvı formda derin dondurucuda depolanan antikor stoklarından alındı. Elde edilen sonuçlara göre, antikor ve enzim arasındaki 20:1 oranının, papain ile proteolitik kesim gerçekleştirme işlemi için optimize edilebilecek bir protokol olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, kesim işleminin verimini artırarak daha net bir proteolitik kesim profilinin elde edilmesini sağlamak amacıyla, ileri deneylerde liyofilize antikorların kullanılması planlandı. Liyofilizasyon işlemi, antikorların uzun süreli stabilitesini artırırken, enzimatik sindirim için kullanıldıklarında daha tutarlı sonuçlar elde edilmesine olanak tanıyabilir. Bu değişiklik, deneylerin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliğini artırma potansiyeline sahiptir ve böylece deneysel prosedürlerin optimizasyonuna katkıda bulunacaktır.

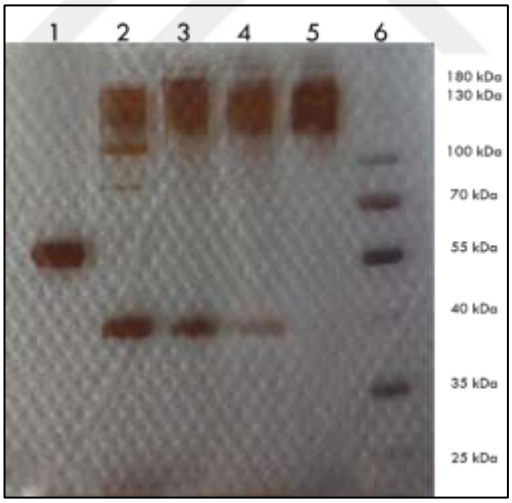
Liyofilize antikorlar aynı koşullarda sindirim işlemine tabi tutulmuştur ve sonuçları gümüş boyama ile gösterilmiştir. Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 antikorunun Şekil 4.23.'te; Fare anti-SARS-COV-2 S1/RBD MAM E6 antikrounun Şekil 4.24.; İnsan anti-SARS-CoV-2 FY antikorunun enzimatik kesim sonrası gümüş boyama görüntüsü ise Şekil 4.25.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.23. Liyofilize Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb'ının papain enzimi ile proteolitik kesimi
1: Marker (Thermo Fisher), **2:** 500 ng BSA, **3:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb, **4:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb: Papain ile 10:1 oranında sindirildi, **5:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb: Papain ile 20:1 oranında sindirildi, **6:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb: Papain ile 50:1 oranında sindirildi.



Şekil 4.24. Liyofilize Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb'ının papain enzimi ile proteolitik kesimi
1: Marker (Thermo Fisher), **2:** 500 ng BSA, **3:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb, **4:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb: Papain ile 50:1 oranında sindirildi, **5:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb: Papain ile 20:1 oranında sindirildi, **6:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb: Papain ile 10:1 oranında sindirildi.



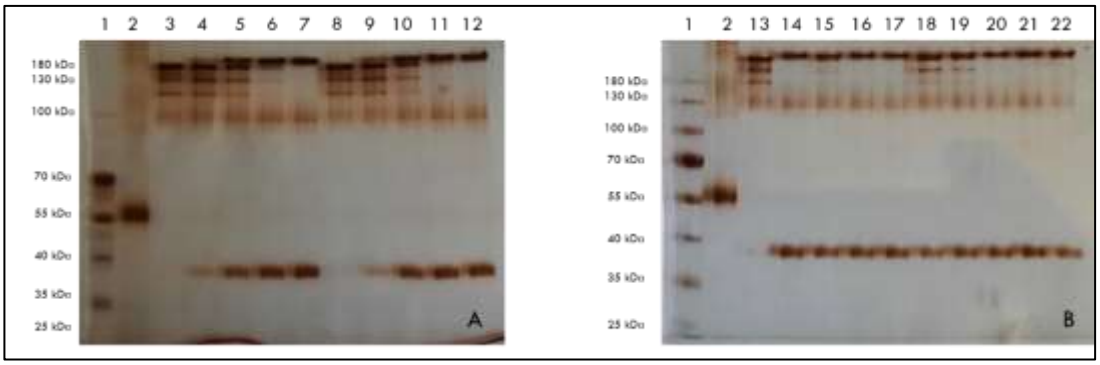
Şekil 4.25. Liyofilize İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb'ının papain enzimi ile proteolitik kesimi
1: Marker (Thermo Fisher), **2:** 500 ng BSA, **3:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb, **4:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb: Papain ile 50:1 oranında sindirildi, **5:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb: Papain ile 20:1 oranında sindirildi, **6:** İnsan Anti-SARS-CoV-2 FY pAb: Papain ile 10:1 oranında sindirildi.

Araştırma sürecinde elde edilen verilerin analizi neticesinde, proteolitik kesim verimliliğini artırmak için liyofilize antikorların kullanımının uygun olacağı sonucuna varıldı. Bu doğrultuda, papain ile yapılan proteolitik kesim işlemleri için antikor: enzim oranının 37 °C'de, 1:20 olarak belirlenmesi, optimal çalışma konsantrasyonu olarak kabul edildi. Liyofilize antikorlar, çözelti içerisindeki stabilite faktörlerini iyileştirebilecek ve enzimatik reaksiyonların tutarlılığını artırabilecek şekilde seçildi. Bu değişiklik, metodolojinin rafine edilmesine ve elde edilecek sonuçların güvenilirliğinin maksimize edilmesine yardımcı olmak için stratejik bir adım olarak belirlendi.

4.5.2. Papain enzimi ile antikor kesim protokolünün zaman optimizasyonu

Antikor sindirim protokollerinde, sindirim süresinin enzim aktivitesi ve antikor fragmentasyon verimliliği üzerinde önemli bir etkisi vardır. Bu çalışma kapsamında, 37 °C'de papain enzimi ile antikor sindirimi gerçekleştirildi ve sindirim süresinin optimizasyonu üzerine odaklanıldı. Belirli bir sıcaklıkta (bu durumda 37 °C), sindirim süresi antikorların Fab ve Fc fragmentlerine ayrıştırılmasında kritik bir faktördür. Çok kısa süreler, tam olmayan sindirime ve dolayısıyla yetersiz fragmentasyona yol açabilirken, çok uzun süreler aşırı sindirime ve potansiyel olarak istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olabilmektedir.

Optimal sindirim süresinin belirlenmesi için, antikor-enzim karışımının farklı zaman aralıklarında 37 °C'de inkübe edildiği bir seri deney düzenlenmişdir. Bu deneyler, sindirim sürecinin başlangıcında ve sonunda ve ayrıca belirlenen ara zaman noktalarında durdurulmuş, sindirim profilinin nasıl değiştiğini gözlemlemek için gümüş boyama analizi yapılmışdır (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. Farklı zaman aralıklarında durdurulan reaksiyonlar sonrası antikor:enzim komplekslerinin gümüş boyama ile gösterilmesi
A: Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb sindirim optimizasyonu, **B:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb sindirim optimizasyonu.
1: Marker (ThermoFisher), **2:** 500 ng BSA (Sigma), **3:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 H9 MAM mAb, **4:** Antikor:Enzim 10:1, 4 saat inkübasyon, **5:** Antikor:Enzim 1:20, 4 saat inkübasyon, **6:** Antikor:Enzim 1:30, 4 saat inkübasyon, **7:** Antikor:Enzim 1:50, 4 saat inkübasyon, **8:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1 H9 MAM mAb, **9:** Antikor:Enzim 10:1, 16 saat inkübasyon, **10:** Antikor:Enzim 1:20, 16 saat inkübasyon, **11:** Antikor:Enzim 1:30, 16 saat inkübasyon, **12:** Antikor:Enzim 1:50, 16 saat inkübasyon, **13:** Fare Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM mAb, **14:** Antikor:Enzim 10:1, 4 saat inkübasyon, 1**5:** Antikor:Enzim 1:20, 4 saat inkübasyon, 1**6:** Antikor:Enzim 1:30, 4 saat inkübasyon, 1**7:** Antikor:Enzim 1:40, 4 saat inkübasyon, 1**8:** Antikor:Enzim 10:1, 16 saat inkübasyon, 1**9:** Antikor:Enzim 20:1, 16 saat inkübasyon, **20:** Antikor:Enzim 1:30, 16 saat inkübasyon, **21:** Antikor:Enzim 1:40, 16 saat inkübasyon, **22:** Antikor:Enzim 1:50, 16 saat inkübasyon.

Jel görüntüsüne göre Fc/Fab fragmentlerinin varlığı yaklaşık 40 kDa olarak gösterildi. Ancak sindirim protokolüne göre deney sonucunda tam yapıda kalan fragmentlere ayrılmayan 150 kDa'luk antikorların varlığı da gözlemlendi. Elde edilen veriler, Fab ve Fc fragmentlerinin saflığı ve bolluğu açısından değerlendirildi ve en verimli antikor kesim süresi olarak 16 saat boyunca 50:1 Antikor: Enzim konsantrasyonunda ve 37 °C bekleme koşullarının olduğuna karar verildi.

Zaman optimizasyonu sürecinde, insan kaynaklı poliklonal serum antikorların kesim süresi doğrudan deneysel bir optimizasyona tabi tutulmadı. Daha önceki deneyimler ve elde edilen ön verilere dayanarak, bu antikorların papain enzimi ile kesimi için dört saatlik bir inkübasyon süresinin optimal koşulları sağladığı belirlendi.

Bu süre zarfında, insan kaynaklı poliklonal antikorlar ile papain enzimi arasındaki reaksiyonun, Fab ve Fc fragmentlerine verimli bir şekilde ayrıştığı ve aşırı proteolize uğramadan istenilen fragmentasyon profiline ulaşıldığı gözlemlendi. Bu yaklaşım, standartlaştırılmış bir protokol oluşturmayı ve laboratuvar içi tekrarlanabilirlik sağlamayı amaçlamaktadır.

Optimal süre, sindirim reaksiyonunun yeterli seviyede tamamlanmasını ve aynı zamanda enzimin aşırı aktivitesinden kaynaklanabilecek proteoliz ürünlerinin minimize edilmesini sağlamaktadır. Bu süreç, antikor sindirim protokolünün standardizasyonuna önemli katkı sağlayarak ileriye dönük uygulamalarda antikor fragmentasyonunun tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini garanti altına alır.

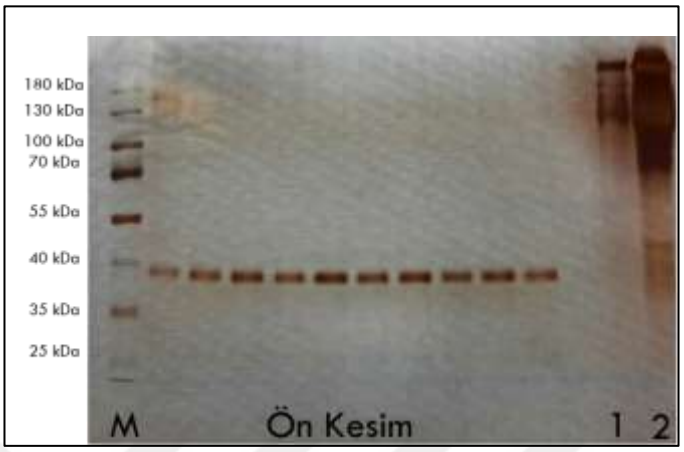
4.5.3. Antikor fab fragmanlarının saflaştırılması

Fab fragmanları, antikorun antijenle etkileşimde bulunan bölgesini oluşturur ve bu özellikleri, hastalık tanımlama, immünoterapi ve antikor mühendisliği gibi alanlarda uygulamalar için önem arz eder. Bu nedenle, spesifik antijenlere karşı yüksek seçicilik ve afinite gösteren Fab fragmanlarının saflaştırılması, fonksiyonel ve yapısal çalışmalar için temel bir adımdır.

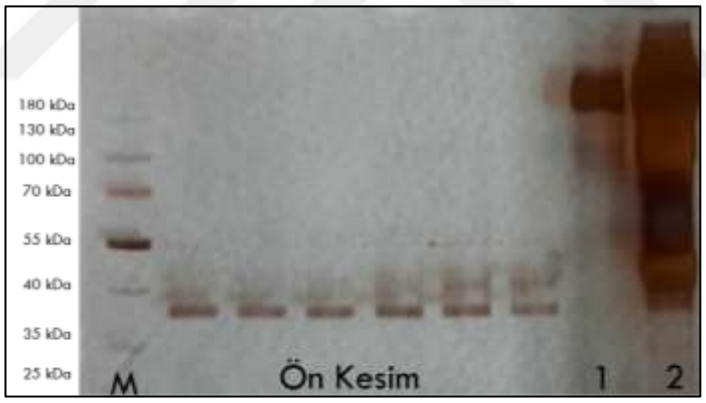
Antikor molekülünün Fab ve Fc bölümlerine ayrılmasının ardından elde edilen fragmanların saflaştırılması için çeşitli kromatografik teknikler uygulanabilir. Bu teknikler arasında jelfiltrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve affinite kromatografisi bulunur. Bu metodlar, boyut, yük ve spesifik ligand-antikor etkileşimleri temelinde fragmentlerin ayrılmasını sağlayarak, yüksek saflıkta Fab fragmanlarının elde edilmesine olanak tanır.

Saflaştırma protokolünde, ilk adımda, kolona uygulanan örnekten kolona bağlanmayan Fab fragmentleri elde edildi. Bu Fab fragmentleri, Protein A'nin Fc bölgesine olan spesifik bağlanma özelliği sayesinde kolondan geçerken tutulmamış ve böylece ön kesim fraksiyonunda toplanmıştır. Bu süreç, Fab fragmentlerinin, Fc bölgeleri ve kesilmemiş tam boyutlu antikorlardan ayrılmasını sağlamaktadır. Elüsyon fraksiyonlarında ise, kesilememiş tam yapılı antikorlar ve kesilmiş Fc fragmentleri elde edilmektedir. Saflaştırma sonrası saflığın kontrolü için yapılan gümüş boyama sonuçları fare anti-

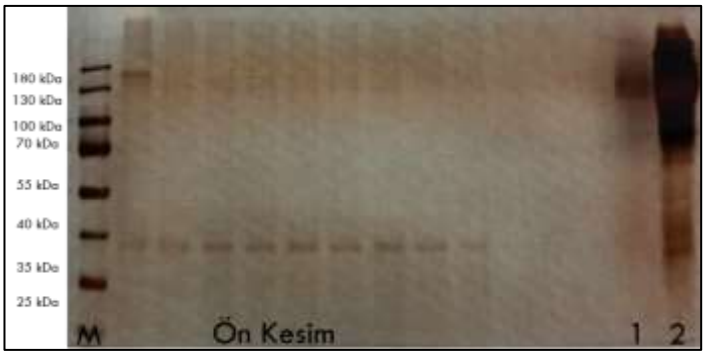
SARS-CoV-2 S1 MAM H9 antikoru için Şekil 4.27.'de; fare anti-SARS-COV-2 S1/RBD MAM E6 antikrou için Şekil 4.28.'de; insan anti-SARS-CoV-2 FY antikoru için ise Şekil 4.29'da gösterilmektedir.



Şekil 4.27. Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb'ının enzimatik sindirim sonrası saflaştırılan Fab fragmanlarının gümüş boyama ile gösterilmesi
M: marker, **1:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb, **2:** BSA (500 ng), **Ön kesim:** Saflaştırılan Fab fragmanları.



Şekil 4.28. Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb'ının enzimatik sindirim sonrası saflaştırılan Fab fragmanlarının gümüş boyama ile gösterilmesi
M: marker, **1:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb, **2:** BSA (500 ng), **Ön kesim:** Saflaştırılan Fab fragmanları.



Şekil 4.29. İnsan anti-SARS-CoV-2 Fy pAb'ının enzimatik sindirim sonrası saflaştırılan Fab fragmanlarının gümüş boyama ile gösterilmesi
M: marker, **1:** İnsan anti-SARS-CoV-2 Fy pAb, **2:** BSA (500 ng), **Ön kesim:** Saflaştırılan Fab fragmanları

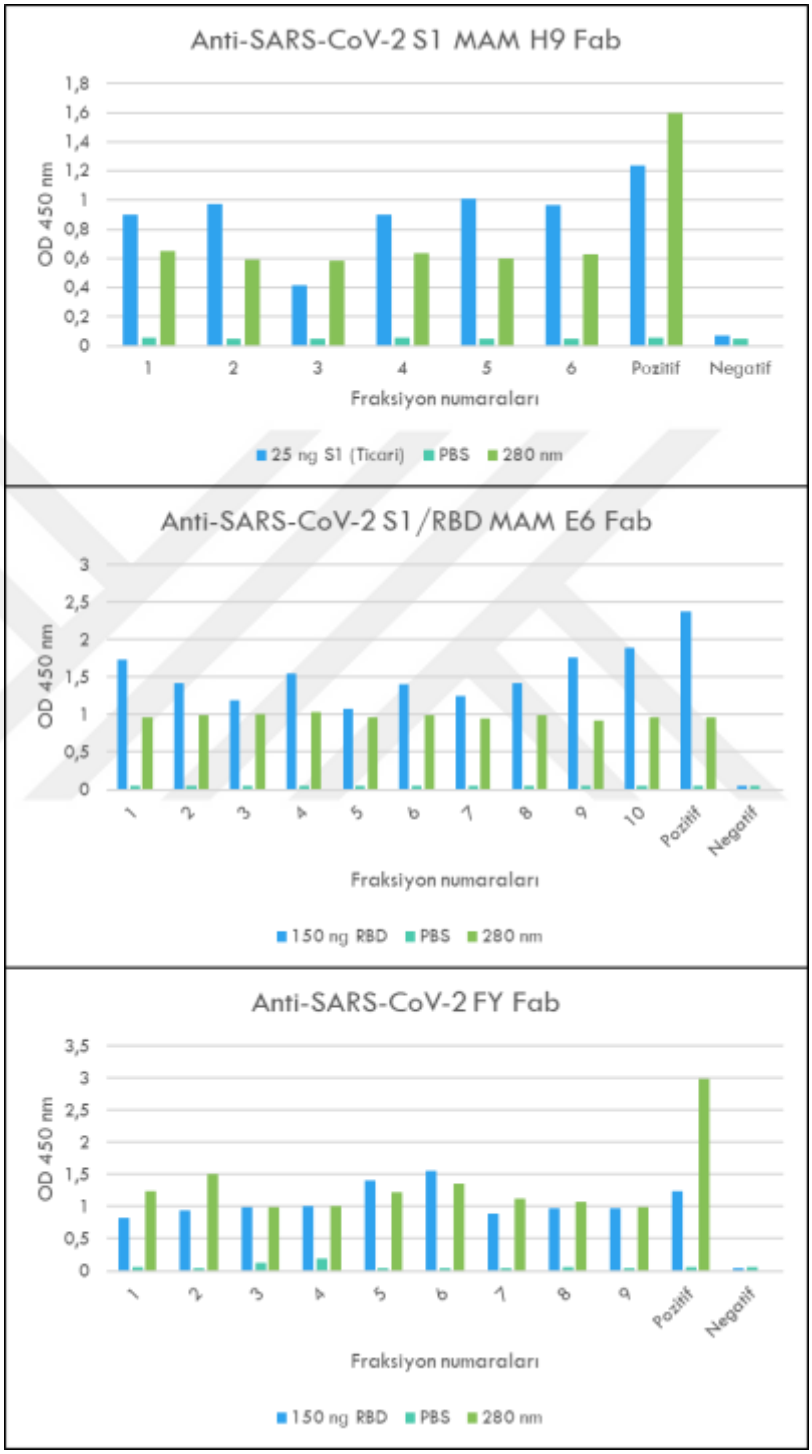
Antikorların sindirim sonrası protein A kolon kullanılarak saflaştırılmasının ardından bağlanmayan ön kesimde bulunan yaklaşık 40 kDa ağırlığındaki Fab fragmentleri birleştirilerek diyaliz edildi ve ELISA, gümüş boyama ve Western Blot ile görüntülendi.

4.5.4. Fab fragmanlarının idiyotip bölgelerinin etkinliğinin gösterilmesi

Protein A affinite kromatografisi sonrası saflaştırılan antikor Fab fragmentleri, dolaylı ELISA yöntemiyle test edildi. Dolaylı ELISA, spesifik antijen-antikor etkileşimlerinin karakterizasyonu ve antikorların fonksiyonel validasyonu için geniş çapta kabul gören bir yöntemdir. Bu test, Fab fragmentlerinin antijen bağlama kapasitelerini ve spesifitelerini değerlendirmek için kullanıldı.

Dolaylı ELISA prosedüründe, PBS yerine pH 9,5 değerinde sodyum karbonat tamponu kullanılarak antijen kaplama işlemi gerçekleştirildi. SARS-CoV-2 S1 ve RBD proteinlerinin kaplaması, 4 °C'de gece boyunca inkübasyon yoluyla yapıldı. Geleneksel yöntemden farklı olarak, bloklama ve Fab fragmentlarının (saflaştırma ön kesim fraksiyonları) kuyucuklara ilavesi adımları, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilerek tamamlandı. Bu süreçte, Fare anti- SARS-CoV-2 S1 MAM H9 Fab antikoru S1 antijenine karşı, Fare anti- SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab ve İnsan anti- SARS-CoV-2 FY Fab antikorları ise RBD proteine karşı test edildi. ELISA okumaları 405 nm'de yapıldı ve elde edilen sonuçlar grafik üzerinde 280 nm'deki değerlerle beraber gösterildi, pozitif kontrol olarak tam yapıdaki antikor yapıları, negatif kontrol olarak PBS kullanıldı (Şekil 4.30.).

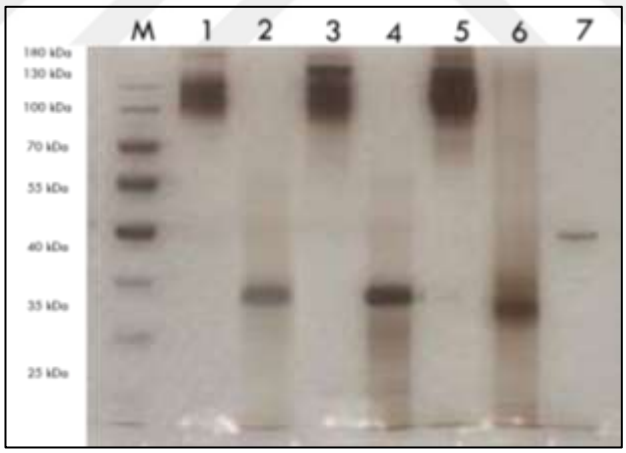
Bu metodoloji, Fab fragmentlerinin antijen spesifitelerinin kantitatif analizini sağlayarak, antikorların fonksiyonel özelliklerinin değerlendirilmesinde araç olarak kullanıldı.



Şekil 4.30. Fab fragmentlerinin antijen yanıtlarının dolaylı ELISA ile gösterilmesi

Dolaylı ELISA analizinde, Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9 Fab fragmentlerinin S1 proteini ile etkileşimine yönelik absorbans değerleri yaklaşık bir olarak ölçüldü. Bunun yanı sıra, Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab fragmentlerinin RBD proteini ile olan etkileşimine dair absorbans değerleri ise yaklaşık iki olarak tespit edildi. İnsan anti-SARS-CoV-2 FY Fab fragmentlerinin RBD proteini ile etkileşim gösterdiği durumda ölçülen absorbans değerleri ise yaklaşık birin üzerinde kaydedildi. Bu sonuçlar, antikor fragmentlerinin hedef proteinlere karşı afinite ve bağlanma gücünün değerlendirilmesinde önemli bir kantitatif ölçüt sağlamaktadır.

Saflaştırma işleminden sonra antijen bağlanma ve yüksek saflık dereceleri onaylanan ön kesim fraksiyonları, birleştirilerek diyaliz işlemine tabi tutuldu. Diyaliz sonrası, Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9, Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 ve İnsan anti-SARS-CoV-2 FY antikorlarının ve ilgili Fab fragmentlerinin karşılaştırmalı protein profilleri incelendi. Bunun için, bu antikorlar ve fragmentler, SDS-PAGE üzerinde aynı jelde yürütüldü. Protein bantlarının görselleştirilmesi, gümüş boyama tekniği kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 4.31.).

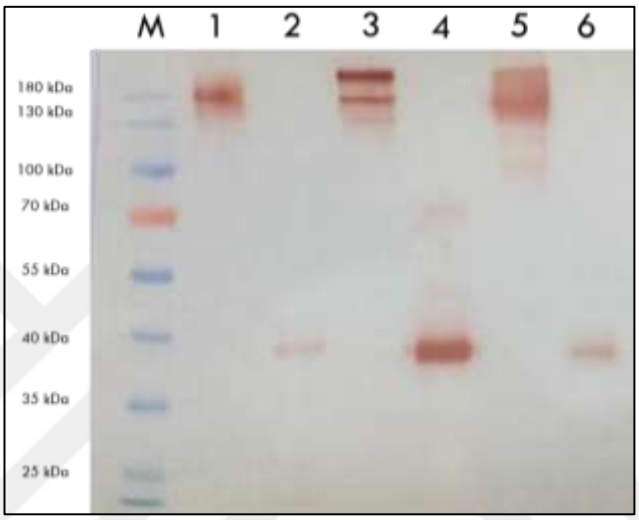


Şekil 4.31. Anti-SARS-CoV-2 Antikorlarının ilgili Fab fragmentleri ile karşılaştırmalı gümüş boyama görüntüsü
M: Marker, **1:** Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9 Mab, **2:** Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9 Fab, **3:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Mab, **4:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab, **5:** İnsan anti-SARS-CoV-2 FY PaB, **6:** İnsan anti-SARS-CoV-2 FY Fab, **7:** 500 ng BSA

Daha sonra, proteinlerin antijenik özelliklerinin belirlenmesi için Western Blot analizi uygulandı. Western Blot, antikor ve Fab fragmentlerinin antijen bağlayıcı aktivitelerinin yanı sıra saflıklarının da teyit edilmesi için kullanıldı. Bu analizler, saflaştırılan antikor

ve fragmentlerinin biyolojik aktivitelerinin ve uygulama potansiyellerinin detaylı bir şekilde değerlendirilmesine imkân tanımaktadır.

Yürütülen jelde, ayrılmış antikor ve Fab fragmentleri, HRP ile işaretli S1 ve RBD antijenleri içeren protein karışımı ile inkübe edilerek membran ile muamele edilmesi sağlandı. Substrat uygulaması sonrasında, antikor ve fragmentlerin antijen bağlayıcı aktivitelerini ve saflıklarını teyit eden bantlar görüntülendi (Şekil 4.32.).



Şekil 4.32. Antikorların ilgili Fab fragmentleri ile karşılaştırmalı Western Blot görüntüsü **M:** Marker, **1:** Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9 Mab, **2:** Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9 Fab, **3:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Mab, **4:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab, **5:** İnsan anti-SARS-CoV-2 FY PaB, **6:** İnsan anti-SARS-CoV-2 FY Fab

Çalışma sonucunda gösterilen bu bantlar, antikorların ilgili antijenleri tanıma ve bağlama yeteneklerinin korunduğunu ve istenen spesifiteye sahip olduklarını gösterdi.

4.6. Anti-SARS-CoV-2 Antikorlarının Diğer Proteolitik Enzimlerle Kesim Çalışmaları; Fisin Enzimi ile Antikor Kesimi

Tez çalışmasında farklı proteolitik enzimlerle kesim çalışmaları yapıldı. Fisin ile gerçekleştirilen bu çalışmanında spesifik amacı, fisin enzimi kullanarak monoklonal antikorların hedeflenmiş proteolitik sindirimini gerçekleştirmek, yerli ve yeni izole edilen bir *Bacillus* suşundan elde edilen proteolitik enzimin antikor sindirim etkinliği ile karşılaştırmasında kullanabilmektir. Fisin, bir cysteine proteazdır ve benzersiz substrat

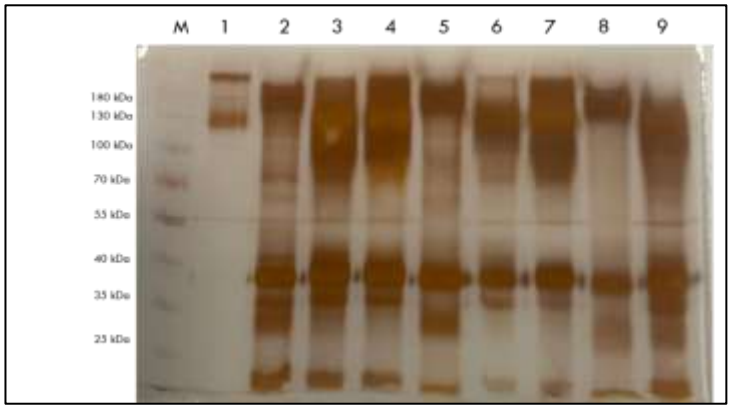
spesifitesi sayesinde antikorların belirli bölgelerinde kesim yaparak Fab ve Fc fragmentlerinin ayrışmasını sağlar.

Bu işlemin temel hedefi, antikorların enzimatik reaksiyonla sindirilerek antijenle etkileşimde bulunan Fab fragmentlerinin elde edilmesini sağlamak ve bu fragmentlerin antijen tanıma, bağlama özellikleri ile affinitelerinin detaylı bir biçimde karakterize edilmesini sağlamaktır.

4.6.1. Fisin enzimi ile antikor kesim protokolünün Antikor:Enzim konsantrasyonunun optimizasyonu

Bu çalışma için, Fare anti-S1/RBD MAM E6 monoklonal antikoru, fisin enzimi kullanılarak proteolitik fragmentasyona tabi tutuldu. Antikor, kondansasyon işlemi ile 2 mg/ml konsantrasyona ulaştırıldıktan sonra, fisin enzimi ile üç farklı oranda (10:1, 30:1 ve 50:1) birleştirilerek inkübe edildi. Bu spesifik proteoliz sürecinde, antikorun Fab bölgesini ve Fc bölgesinin ayrılması hedeflendi. Karışım, 37 °C'de dört saat boyunca inkübe edilerek fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 antikorunun etkin bir şekilde fragmentasyona uğraması sağlandı. Bu süreç, özellikle Fab fragmentlerinin elde edilmesine odaklanmış olup, bu çalışmanın yerli enzim ile karşılaştırılmasında kullanıldı.

İnkübasyon işleminin tamamlanmasının ardından 100 mM N-Ethil Maleimid ile reaksiyon durduruldu. Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 antikorunun fisin ile sindirim sonrası elde edilen fragmentasyon profili, gümüş boyama (Şekil 4.33.) ve Western Blot (Şekil 4.34.) yöntemleri ile değerlendirildi.

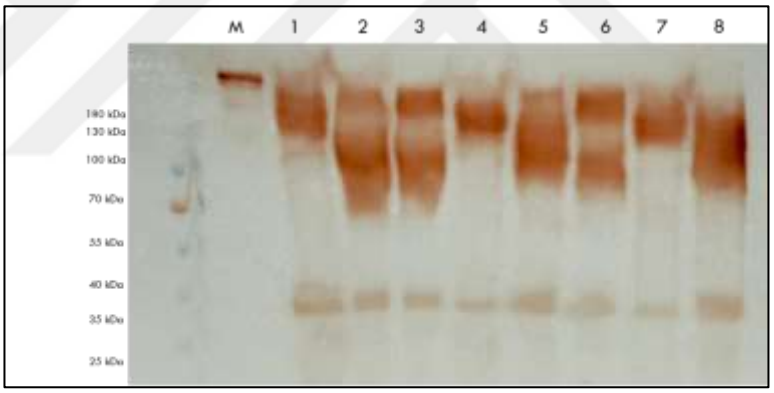


Şekil 4.33. Fisin ile kesilen monoklonal antikorların gümüş boyama ile gösterilmesi

M: marker, **1:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb, **2:** Antikor 50:1 Enzim + 25 mM L-sistein, **3:** Antikor 50:1 Enzim + 10 mM L-sistein, **4:** Antikor 50:1 Enzim + 1 mM L-sistein, **5:** Antikor 30:1 Enzim + 25 mM L-sistein, **6:** Antikor 30:1 Enzim + 10 mM L-sistein, **7:** Antikor 30:1 Enzim + 1 mM L-sistein, **8:** Antikor 10:1 Enzim+ 25 mM L-sistein, **9:** Antikor 10:1 Enzim + 1 mM L-sistein

Fisin enzimi ile proteolitik olarak sindirime uğratılan antikorların 25 mM L-sistein varlığında yaklaşık 40 kDa'luk Fab/Fc fragmentleri elde edilirken 10 mM ve 1 mM L-cyctein varlığında hem 40 kDa'luk fragmentler hem de 110 kDa'luk $F(ab')_2$ fragmentleri elde edildiği gümüş boyama ile gösterildi. Bu deney ile elde edilen Fragmentlerin literatüre uygun ağırlıklda olduğu tespit edildi.

Ek olarak sindirim sonrası antikor fragmentlerinin antijen yanıtlarının devam ettiğin gösteirlmesi için Western Blot çalışması yapıldı. Sindirim sonrası fragmentler SDS-PAGE ile jelde yürütüldükten sonra PVDF membrana transferi geçekleştirildi ve HRP işsretli RBD proteini ile muamele edildi (Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. Fisin ile kesilen monoklonal antikorların Western Blot ile gösterilmesi
M: marker, **1:** Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb, **2:** Antikor 50:1 Enzim + 25 mM L-sistein, **3:** Antikor 50:1 Enzim + 10 mM L-sistein, **4:** Antikor 50:1 Enzim + 1 mM L-sistein, **5:** Antikor 30:1 Enzim + 25 mM L-sistein, **6:** Antikor 30:1 Enzim + 10 mM L-sistein, **7:** Antikor 30:1 Enzim + 1 mM L-sistein, **8:** Antikor 10:1 Enzim+ 25 mM L-sistein, **9:** Antikor 10:1 Enzim + 1 mM L-sistein

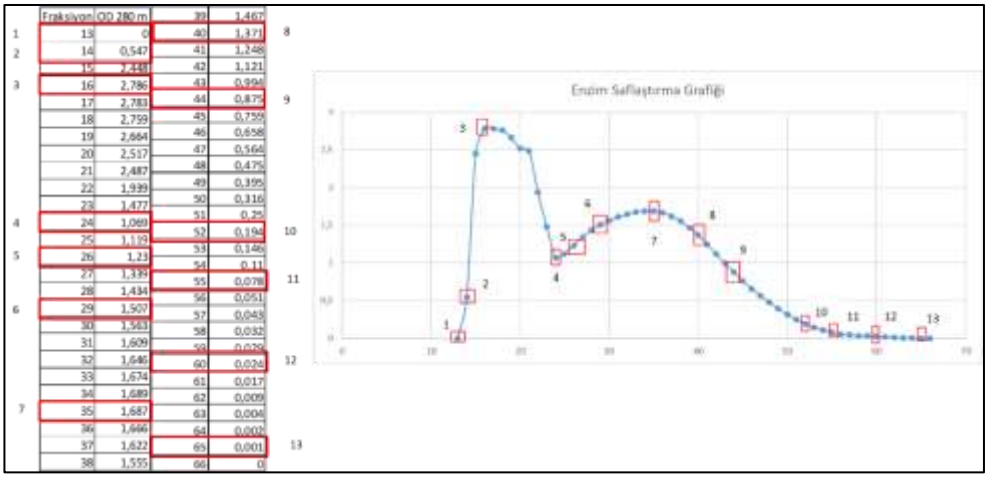
Enzimatik sindirim sonucunda elde edilen fragmentler işaretli RBD ile muamele edildiğinde antikorların antijenik yanıtların devam ettirdikleri gösterildi. Bu da kesim protokolünün uygun koşullar altında gerçekleştirildiğinin kanıtı oldu. Buradan elde edilen bilgiler ışığında yerli topraklarda izole edilen bir proteolitik enzimin antikor sindirim aktivitesinin gösterilebilmesi için farklı kesim prtokolleri denemesi başarı ile tamamlanmış oldu.

4.7. Anti-SARS-CoV-2 Antikorlarının Yerli ve Yeni *Bacillus* suşundan İzole Edilen Enzim ile Antikorların Proteolitik Olarak Kesilmesi

Bu çalışmanın temel amacı, yerli toprak (Kütahya)'tan izole edilen ve 16S rRNA gen dizi analizi ile isimlendirilen *Bacillus subtilis* 168 E6-5 (GenBank erişim numarası OM004560)'den (Demirkan ve ark., 2020) üretilen proteaz enzimin alternatif çalışma alanı olup olmadığı belirlenerek antikor kesim çalışmalarında etkinliği test edilmesi ve rutin de antikor kesiminde kullanılan papain ve fisin enzimleri ile gerçekleştirilen kesim sonuçlarıyla karşılaştırmaktır. Bu karşılaştırmalı analiz, yeni izole edilen *Bacillus* suşuna ait proteolitik enzimin, antikor moleküllerini sindirme kapasitesi ve etkinliğinin araştırılması üzerine gerçekleştirildi. Daha etkin bir proteolitik enzimin keşfi, Fab fragmentlerinin ve Fc bölümlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antikorların antijen tanıma özelliklerinin, bağlanma affinitelerinin ve immünomodülatör fonksiyonlarının derinlemesine incelenmesine olanak tanıyacaktır.

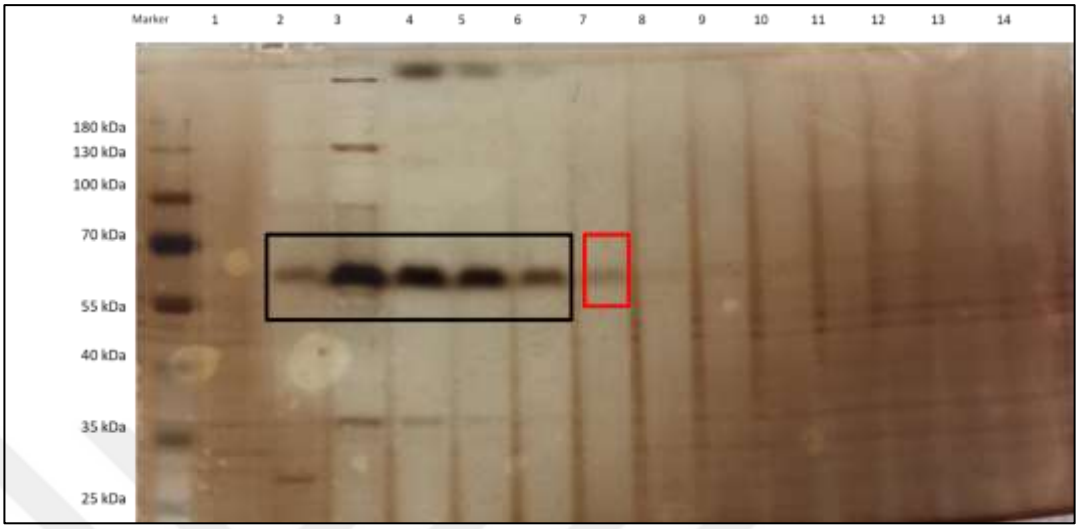
4.7.1. Yerli ve yeni *Bacillus* suşundan enzimin saflaştırılması

Çalışma kapsamında öncelikle Bursa Uludağ Üniversitesinden liyofilize halde temin edilen enzimin saflaştırma çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, yöntemde detayları anlatıldığı üzere, AS ile çöktürülüp diyaliz edilen yerli enzim G-50 jel kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. 100 fraksiyon örnek toplandı. İşlem 4 ºC'de gerçekleştirildi. Fraksiyonların OD'leri 280 nm de okundu (Şekil 4.35.). Daha sonra SDS PAGE ile seçili fraksiyonlar gümüş boyama ile görüntülenerek saflıkları gösterildi (Şekil 4.36.).



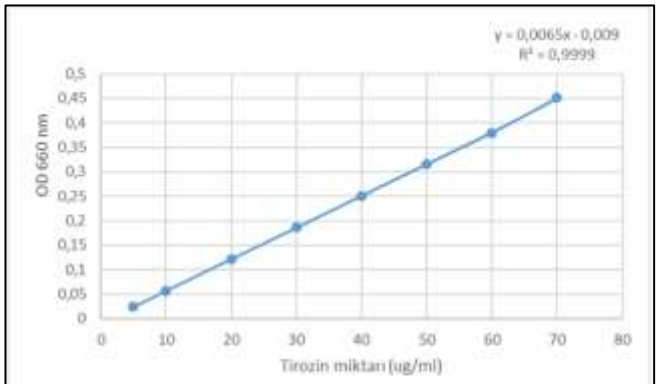
Şekil 4.35. Saflaştırılan enzim fraksiyonlarının 280 nm'de spektrofotometrik okuması

Saflaştırma çalışmasında proteinler büyüklüklerine göre ayrıldığı için farklı kesimlerde gelen prtoinlerin bulunduğu fraksiyonlar gümüş boyamada tespit edilmek üzere seçildi.



Şekil 4.36. Enzim fraksiyonlarının gümüş boyama ile gösterilmesi

Saflaştırılan fraksiyonlardan 2, 3 ve 4 numaraları tüpler pool 1; 5, 6 ve 7 numaralı tüpler pool 2 şeklinde adlandırılarak birleştirildi. Saflaştırılan enzimin ve ham enzimin aktivasyon tayini için trozin standartları hazırlandı. 660 nm'de spektrofotometrik okuma sonrası enzim aktivitesi belirlendi (Şekil 4.37.).

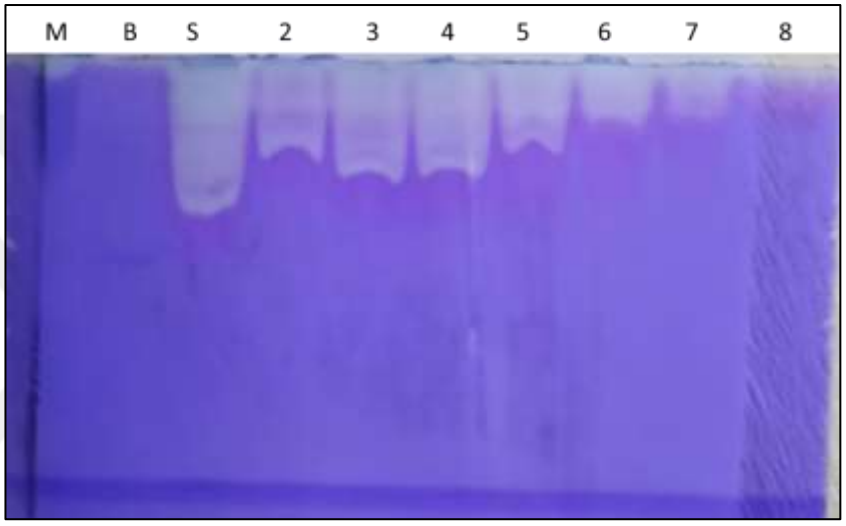


	OD 660 nm	Enzim IU	Toplam Hacim
Ham enzim	0,188	1212,308	50 ml
AS çöktürülen enzim	0,43	2701,538	4 ml
Pool 1	0,073	504,6154	6 ml
Pool 2	0,056	400	6 ml

Şekil 4.37. Tirozin standartlarının hazırlanması ve enzim aktivasyon değerinin belirlenmesi (µg/ml)

İlk tüp yani pool 1 için belirlenen aktivite 504,615 U iken pool 2 için belirlenen aktivite değeri 400 U olarak belirlendi.

Yerli enzimin zimogram analizi substrat (jelatin) içeren SDS-PAGE çalışması ile gerçekleştirildi. Proteotilik hidrolizin olduğu bantlar, zimogram jellerinde boyanmamış bölgeler olarak görüntülendi. Zimogram, Jel elektroforezi tamamlandıktan sonra commassie blue ile boyama yapıldı ve enzimin substrat ile olan etkileşimi boyanmayan şeffaf kısımlar üzerinden belirlendi (Şekil 4.38.).



Şekil 4.38. Saflaştırılan fraksiyonların zimogram jel görüntüsü
M: Marker (Thermo Scientific), **B:** 500 ng BSA (Sigma), **S:** Saflaştırılan Pool 1, **2-8:** Gümüş boyamada yürütülen saflaştırılan fraksiyonlar.

Çalışma sonucuna göre, saflaştırılan enzimin substratını parçaladığı ve aktif olarak işlevselliğinin görüldüğü alan jel üzerinde şeffaf bantlar olarak gözlendi. Enzimatik sindirim çalışması için pool 1 enzim stoğunun kullanılmasına karar verildi.

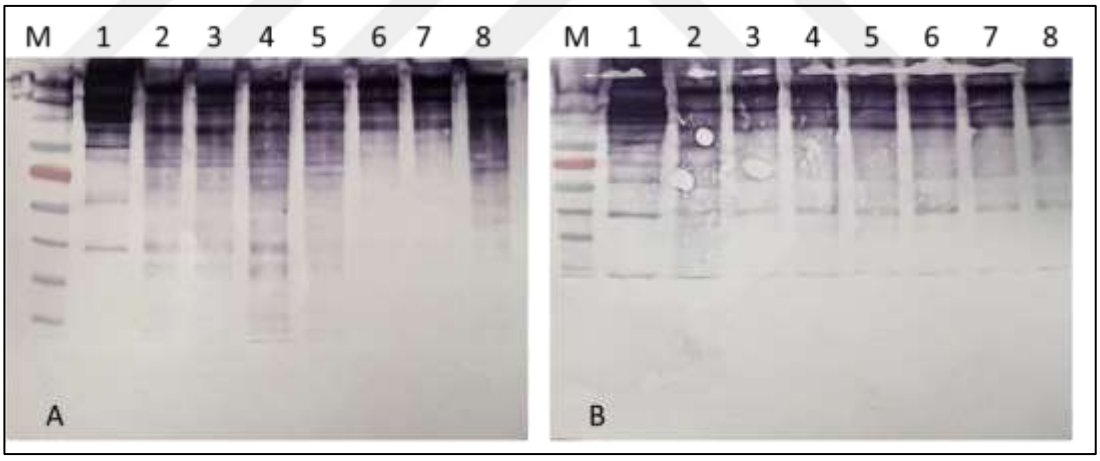
4.7.2. Yerli ve Yeni *Bacillus* suşundan izole edilen enzimi ile antikor sindirim protokolünün Antikor:Enzim konsantrasyonunun optimizasyonu

Bu çalışma için, Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mab'ının, yerli enzim kullanılarak proteolitik fragmentasyona tabi tutuldu. Antikor, kondansasyon işlemi ile 2 mg/ml konsantrasyona ulaştırıldıktan sonra, yerli enzim için (mg/ml) farklı sindirim tamponları hazırlandı. Sindirim tamponları 5 mM L-sistein içerecek ve L-sistein içermeyecek şekilde kullanılmıştır. (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Yerli ve yeni enzimin antikor sindirimi çalışılmalarında kullanılan tampon içerikleri

No	Tampon içeriği	pH değeri	L-sistein varlığı
1	Sodyum Fosfat Tamponu	9,0	-
2		8,5	-
3		8,0	-
4		7,5	-
5		7,0	+
6		9,0	+
7		8,5	+
8		8,0	+

Enzimin kesim aktivitesi belirli olmadığı için önce yüksek Enzim:Antikor konsantrasyonu kullanıldı. 1 hacim enzim: 5 hacim antikor olacak şekildeki ortam hazırlandı. Enzim: Antikor karışımları, 37 ºC'de 16 saat (Şekil 4.39-A) ve 4 saat (Şekil 4.39-B) süre ile inkübe edildi ve Western Blot ile görüntülendi. Bu spesifik proteoliz sürecinde, antikorun Fab bölgesi ve Fc bölgesinin ayrılması için gerekli sürenin belirlenmesi hedeflendi.



Şekil 4.39. Yerli enzim kullanılarak antikorun enzimatik sindirim süresinin Western Blot ile belirlenmesi
A: Enzim: Antikor karışımları, 37 ºC'de 16 saat. B: Enzim: Antikor karışımları, 37 ºC'de 4 saat inkübe edildi.

Enzimatik sindirim süresi 4 saatten 16 saate uzadıkça. Kesim alanlarının arttığı ve farklı boyutlarda fragmentlerin oluşumunun arttığı gözlendi. Bu amaçla sindirim reaksiyonun süresi 4 saat olarak belirlendi.

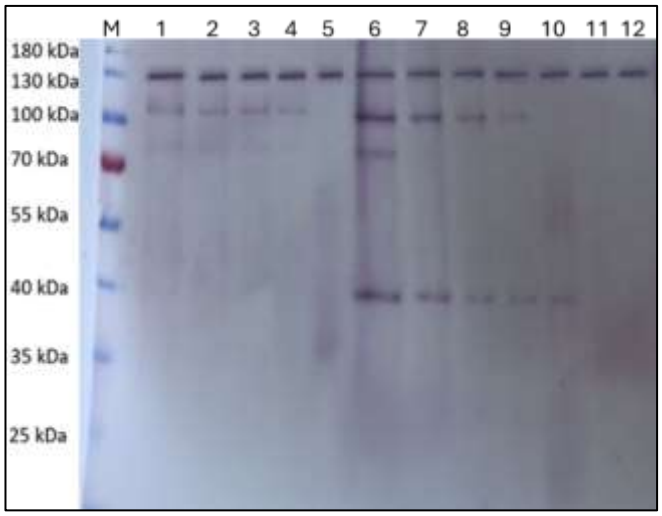
Çalışmanın ikinci aşamasında, 2mg/ml antikor konsantrasyonu sabit tutuldu, Antikor: Enzim karışımı içindeki enzim miktarı daha dilüe oranlarda kullanıldı. Sindirim tamponları 5 mM L-sistein içerecek ve L-sistein içermeyecek şekilde kullanıldı (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Yerli ve yeni enzimin antikor sindirimi çalışılmalarında kullanılan tampon içerikleri 2

No	Tampon içeriği	pH değeri	L-sistein varlığı
1	Sodyum Fosfat Tamponu	9,0	-
2		8,5	-
3		8,0	-
4		7,5	-
5		6,5	-
6		9,0	+
7		8,5	+
8		8,0	+
9		7,5	+
10		7,0	+
11		6,5	+

Enzimatik sindirim için ayarlanan Enzim:Antikor konsantrasyonu 1:30'dur. Yerli enzim ve Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 antikoru sindirim tamponu içerisinde hazırlandı. Enzim:Antikor karışımı, 37 ºC'de 4 saat inkübe edildi. Bu spesifik proteoliz sürecinde, antikorun Fab bölgesi ve Fc bölgesinin ayrılması hedeflendi.

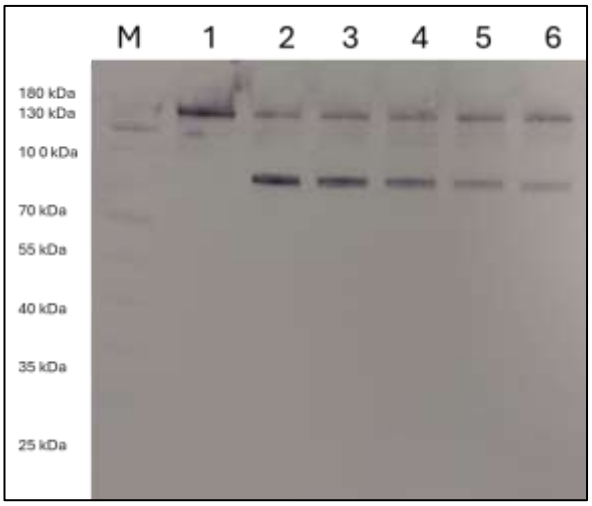
Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 antikorunun yerli enzim ile sindirim sonrası elde edilen fragmentasyon profili, Western Blot (Şekil 4.40.) yöntemi ile değerlendirildi.



Şekil 4.40. Yerli enzim kullanılarak antikorların enzimatik olarak sindiriminin Western Blot görüntüsü
M: Marker, **1-11** numaraları, Çizelge 4.4'teki 1'den 11'e kadar olan farklı tampon içerikleridir. **12.** Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb.

Kesim sonrası L-cystein içermeyen sindirim tamponları ile yaklaşık 110 kDa'luk antikor fragmentleri elde edilirken, L-sistein içeren sindirim tamponlarının kullanımı ile yaklaşık 110 kDaluk fragmentlere ek olarak yine yaklaşık 40 kDa'luk fragmentler elde edildi. Ayrıca bu çalışma sonucunda elde edilen bilgilere göre pH değeri 6,5 olan tampon içerisinde enzimatik sindirim gözlenmedi.

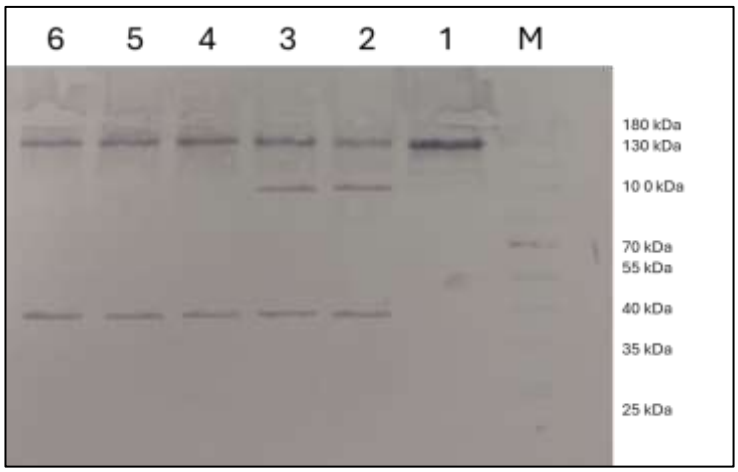
Daha sonra L-sisten içermeyen Sodyum Fosfat Tamponu pH 8,0 içerisinde hazırlanan farklı karışım oranlarında enzim: antikor karışımları farklı oranlarda (1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ve 1:50) denendi (Şekil 4.41.).



Şekil 4.41. Farklı Enzim:Antikor sindirim oranlarının Western Blot görüntüsü.
M: marker, **1:** Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM mAb, **2**. 1:10 Enzim:Antikor oranı, **3.** 1:20 Enzim:Antikor oranı, **4.** 1:30 Enzim:Antikor oranı, **5.** 1:40 Enzim:Antikor oranı, **6.** 1:50 Enzim:Antikor oranı.

Enzim:Antikor oranlarının belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda, yaklaşık 110 kDa'luk Fragmentin elde edilmesi için 1:20 çalışma oranının uygulanabilir olduğu gösterildi.

Aynı çalışma L-sisten içeren Sodyum Fosfat Tamponu pH 7,0 içerisinde hazırlanan farklı karışım oranlarında Enzim: Antikor karışımları farklı oranlarda (1:10, 1:20, 1:30, 1:40 ve 1:50) denendi (Şekil 4.42.).



Şekil 4.42. Farklı Enzim:Antikor sindirim oranlarının Western Blot görüntüsü
M: Marker, **1:** Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb, **2:** 1:10 Enzim:A ntikor oranı, **3:** 1:20 Enzim:Antikor oranı, **4:** 1:30 Enzim:Antikor oranı, **5:** 1:40 Enzim:Antikor oranı, **6:** 1:50 Enzim:Antikor oranı.

Bu çalışmanın sonucuna göre; L-sistein içeren pH 7,0 tamponunda 1:10 ve 1:20 Enzim:Antikor oranlarında çalışıldığında , yaklaşık 110 kDa ve 40 kDa luk fragmentler aynı anda gözlendi ancak artan oranlarda enzim varlığında çalışıldığında, sadece 40 kDa'luk fragmentlerin elde edildiği gözlendi. Bu sonuçlara göre yerli ve yeni bir *Bacillus* suşundan izole edilen proteolitik enzim ile antikor kesim çalışmalarının mümkün ve kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur.

4.8. SARS-CoV-2 Fare Anti-İdiyotipik Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi

Hibridoma teknolojisinin kullanılması, anti-idiyotipik monoklonal antikorların geliştirilmesi sürecinde kullanılan bir metodolojidir. Bu yöntem, Anti-SARS-CoV-2 monoklonal antikorlarının geliştirildiği yöntem ile aynı yöntem olup özgül bir antijenik determinanta (idiyotop) karşı immün yanıtı uyarılmış tek bir B lenfositin, ölümsüz bir myeloma hücre hattı ile somatik hücre füzyonu aracılığıyla entegrasyonunu içerir. Aid Mab üreten hibridoma hücreleri de laboratuvar koşullarında sürekli ve homojen bir şekilde hedef moleküle özgü monoklonal antikor üretme kapasitesine sahip hücrelerdir.

Bu bölüm de, Anti-idiyotipik monoklonal antikor üretim çalışmaları kapsamında, SARS CoV-2 yüzey antijenine (S1,RBD) karşı nötralizan etki gösteren monoklonal antikorların (6E6, 4H9) ve enfekte olup iyileşme gösteren insandan elde edilen nötralizan antikorların (FY) ayrı ayrı papain enzimi ile kesilmesi sonrasında elde edilen saflaştırılmış Fab fragmanları ile gerçekleştirilen immünizasyon ve en yüksek bağışık cevabı gösteren fareler ile gerçekleştirilen füzyon çalışmalarına ait sonuçlar yer almaktadır.

4.8.1. Deney hayvanlarının immünizasyonu

İmmünizasyon prosedürleri, 6-8 haftalık BALB/c dişi fareler üzerinde gerçekleştirildi. Farelerin sayıları ve maruz kaldıkları antijen dozları Çizelge 3.16.'da sıralanmıştır. İlk aşılamada Freund's complete adjuvan kullanılırken, devamındaki aşılamalar 2 haftalık aralıklarla Freund's incomplete adjuvan kullanılarak yapıldı. Her 10 günde bir intraperitoneal yolla aşılanan farelerden, immünizasyonların 7'nci gününde serum örnekleri alınarak dolaylı ELISA ile antikor seviyeleri ölçüldü.

4.8.2. İmmünizasyon gruplarının oluşturulması

Antijen hazırlıkları, immünizasyon dozlarının hazırlanmasıyla başladı ve her bir antijen, adjuvant ile eşit hacimlerde (1:1 oranında) karıştırılarak farelerin periton boşluğuna enjekte edildi. İmmünizasyon için her kafese üçer fare yerleştirildi ve takip kolaylığı için bireysel olarak işaretlendi. Altı farklı antijen kullanılarak toplamda altı grup oluşturuldu ve her bir grup spesifik bir antijene ayrıldı. İmmünizasyon süreci, on günlük aralıklarla düzenli olarak tekrarlandı, bu periyodik uygulama ile optimal antikor yanıtının elde edilmesi ve immünolojik hafıza hücrelerinin geliştirilmesi amaçlandı. Bu yaklaşım, uzun vadeli immün yanıtın teşvik edilmesini ve potansiyel aşı adaylarının etkinliğinin maksimize edilmesini hedeflemektedir.

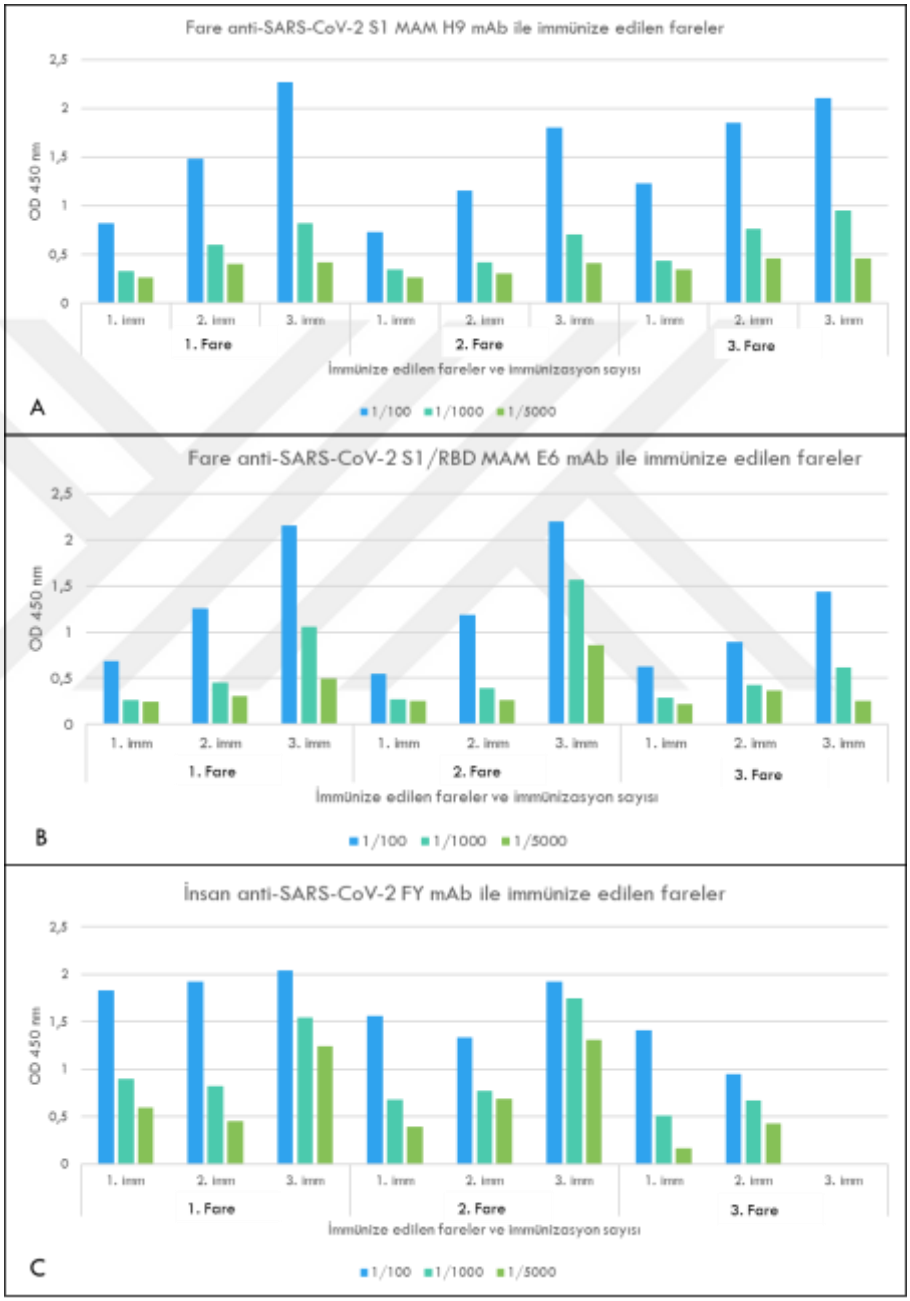
4.8.3. İmmün yanıtın kontrolü

İmmünize edilen farelerin serumlarındaki antikor aktiviteleri, dolaylı ELISA yöntemi kullanılarak değerlendirildi. İlk aşamada geliştirilen antikorlar anti-S1/RBD antikorları olduğu için bu antikorların antijen olarak kullanılması anti-anti-RBD antikor yanıtının oluşmasını sağlayacaktır. Bu sebeple dolaylı ELISA plaklarının RBD reseptörü olan ACE-2 proteini ile kaplanmasına karar verildi. Bu strateji, SARS-CoV-2 Spike proteininin RBD karşı geliştirilen antikorların işlevselliğini değerlendirmeye yöneliktir.

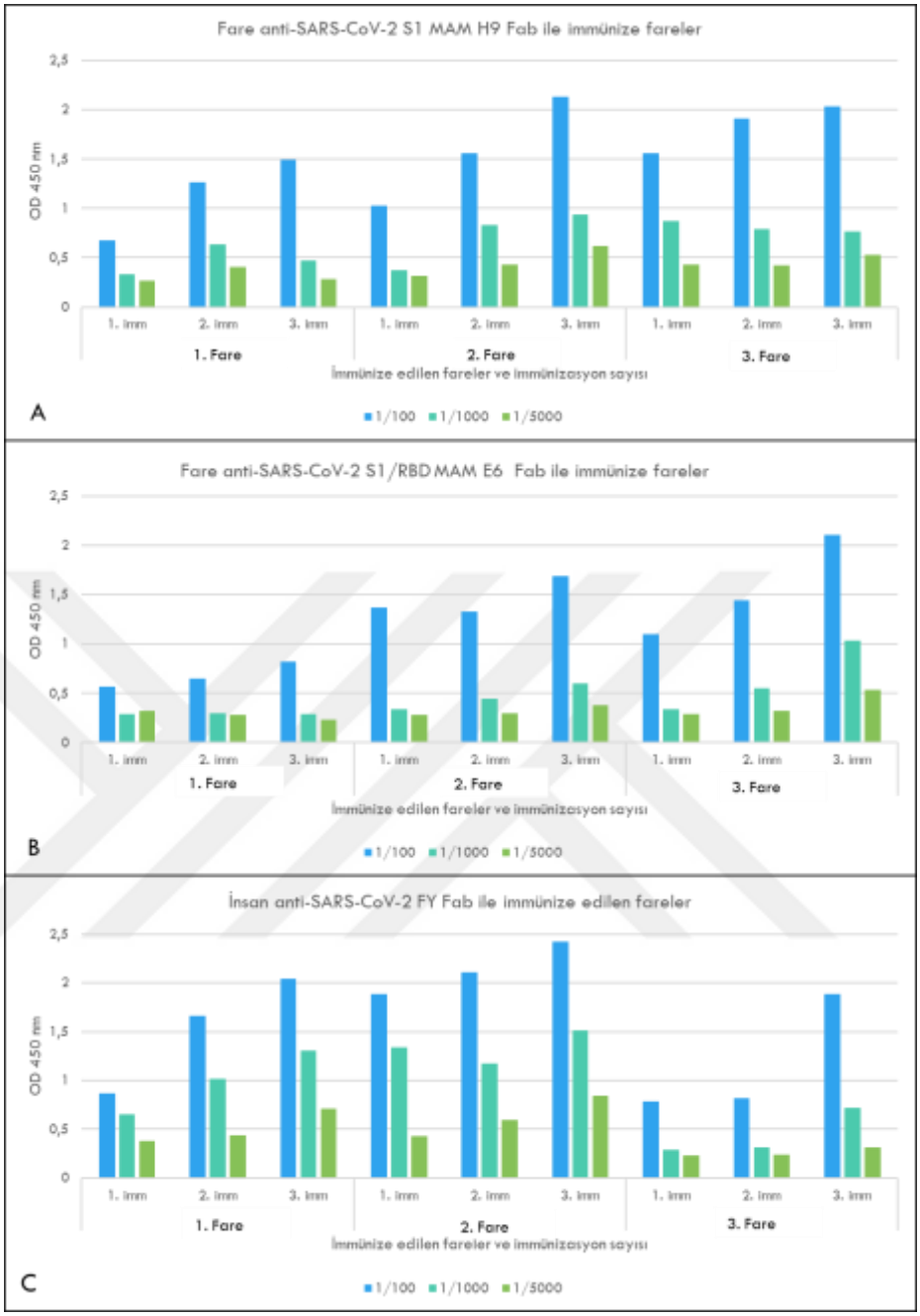
ACE-2, insan hücrelerinde SARS-CoV-2'nin giriş noktası olarak hizmet eden ve virüsün RBD'si ile yüksek afiniteli etkileşim gösteren bir reseptördür. Dolayısıyla, ELISA plaklarının ACE-2 ile kaplanması, anti-idiyotipik antikorların RBD proteinini taklit etme yeteneklerinin değerlendirilmesinde önem taşır. Bu yaklaşım, anti-idiyotipik antikorların, RBD-ACE-2 etkileşimini bloke etme veya taklit etme potansiyellerini ortaya koyarak, bu antikorların terapötik veya profilaktik ajanlar olarak kullanımı açısından potansiyelini belirlemeyi amaçlar. Bu metodoloji, aynı zamanda RBD'ye özgü antikorların antijenik spesifitelerinin ve bağlanma özelliklerinin incelenmesi için de kritik bir öneme sahiptir.

Her kuyu 200 ng ACE-2 ile kaplandı ve metod kısmında anlatıldığı gibi standart dolaylı ELISA protoklü uygulandı. Çalışmada, anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb, anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mab ve anti-SARS-CoV-2 FY pAb tüm yapıdaki antikorlar ile immünize edilen farelerin serum yanıtları incelendi (Şekil 4.43.) Ayrıca anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 Fab, anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab ve anti-

SARS-CoV-2 FY, fragmentleri ile immünize edilen farelerin serum yanıtları da dolaylı ELISA ile incelendi (Şekil 4.44). Bu yöntem, söz konusu antikorların RBD'ye karşı geliştirdikleri spesifik immün yanıtın yanı sıra, anti-idiyotipik antikorların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi için temel bir araçtır.



Şekil 4.43. Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9, Fare anti-SARS-CoV-2 MAM E6 ve İnsan anti-SARS-CoV-2 FY tam yapıdaki antikorlar ile immünize edilen farelerin ACE-2 yanıtlarına ait dolaylı ELISA test sonuçları



Şekil 4.44. Fare anti-SARS-CoV-2 MAM H9, Fare anti-SARS-CoV-2 MAM E6 ve İnsan SARS-CoV-2 FY Fab fragmentleri ile immünize edilen farelerin ACE-2 yanıtlarına ait dolaylı ELISA test sonuçları

İmmünizasyon setlerinde bulunan deney hayvanlarının serumlarının dolaylı ELISA ile ile test edilmesi sonrası, yeterli antikor yanıtları oluşturduğu gözlenen fareler ile füzyon çalışması başlatıldı.

4.8.4 Füzyon çalışmaları

İmmünizasyonu takiben, hedef antijene duyarlı hale gelen fare B hücreleri dalaktan izole edildi ve in vitro koşullarda myeloma hücreleri ile PEG aracılığıyla somatik hücre füzyonuna tabi tutuldular. Toplam yedi füzyon çalışması yapılmıştır. Gerçekleştirilen Füzyon çalışmalarına ait bilgiler Çizelge 4.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Füzyon çalışmalarına ait bilgiler

Füzyon No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Füzyon Faresi	1.grup 2. fare	2.grup 3. fare	3.grup 1. fare	4.grup 2. fare	5.grup 2. fare	6.grup 2. fare	6.grup 1. fare
Antijen	Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6mAb	Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab	Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 mAb	Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 Fab	İnsan anti-SARS-CoV-2 Fy pAb	İnsan anti-SARS-CoV-2 Fy Fab	İnsan anti-SARS-CoV-2 Fy Fab
Antijen miktarı	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg
Dalak hücresi sayısı	675 000 000	807 000 000	789 000 000	948 000 000	965 000 000	1 225 000 000	1 011 000 000
F0 sayısı (ATCC CRL1646)	225 000 000	269 000 000	263 000 000	316 000 000	321 000 000	408 000 000	337 000 000
Dalak/ F0 oranı	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
Elde edilen hibrit hücre hatları	0	1 (11G7)	0	2 (2F3, 6F10)	1 (1D4)	0	17

İki numaralı füzyonda; Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab fragmenti ile immünize edilen farelerden elde edilen 11G7 ve 2D8 monoklonal antikorlarının SARS-CoV-2 antijenleri ile çapraz reaksiyona girmediği gösterildi. Ancak çalışma sonrası 2D8 mAb'ı antikor yanıtını kaybetmiştir.

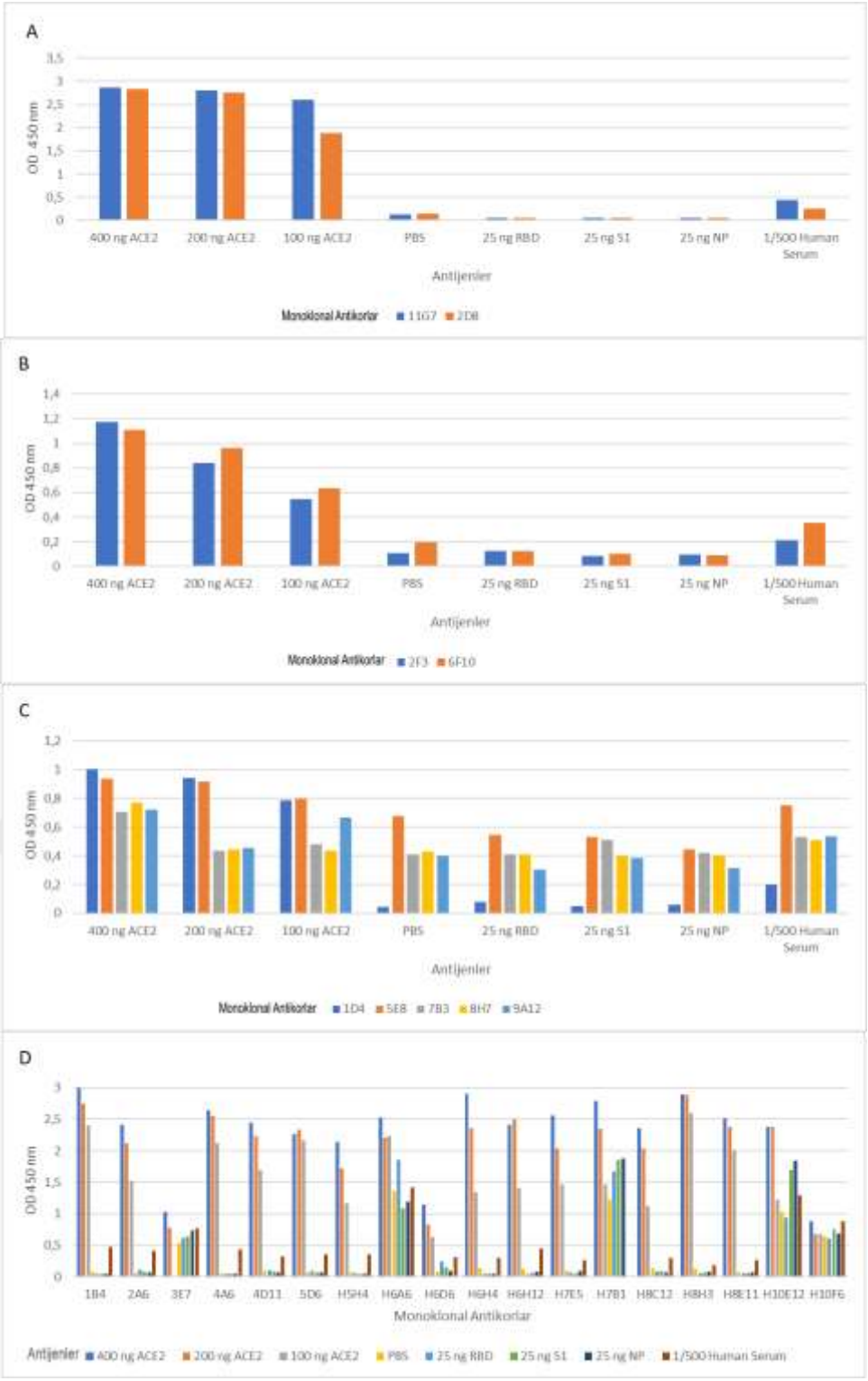
Dört numaralı füzyonda; Fare anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 Fab fragmenti ile immünize edilen farelerden elde edilen 2F3 ve 6F10 monoklonal antikorlarının SARS-CoV-2 antijenleri ile çapraz reaksiyona girmediği gösterildi.

Beş numaralı füzyonda; İnsan anti-SARS-CoV-2 FY pAb ile immünize edilen farelerden elde edilen 1D4 monoklonal antikorunun SARS-CoV-2 antijenleri ile çapraz reaksiyona

girmediği ancak, 5E8, 7B3, 8H7 ve 9A12 monoklonal antikorlarının çapraz reaksiyon sebebiyle çalışmaya uygun olmadıkları gösterildi.

Yedi numaralı füzyonda; İnsan anti-SARS-CoV-2 FY Fab fragmenti ile immünize edilen farelerden elde edilen 1B4, 2A6, 4A6, 4D11, 5D6, 5H4, 6H4, 6H12, 7E5, 8C12, 8H3 ve 8E11 monoklonal antikorlarının SARS-CoV-2 antijenleri ile çapraz reaksiyona girmediği ancak, 3E7, 6A6, 6D6, 7B1, 10E12 ve 10F6 monoklonal antikorlarının çapraz reaksiyon sebebiyle çalışmaya uygun olmadıkları gösterildi. Ancak 8H3 monoklonal antikoru tek düşürme çalışmaları sırasında kontaminasyon sebebiyle kaybedildi.

Gerçekleştirilen yedi füzyon çalışması neticesinde, toplamda on dört adet ACE-2 proteinine bağlanan monoklonal antikor üreten hibridoma hücresi elde edildi. Şekil 4.45.'te tüm hibrit hücrelere ait monoklonal antikorların ACE-2 proteini ile farklı SARS-CoV-2 antijenik yapıları (S2, NP, RBD) ile çapraz etkileşimleri yer almaktadır.



Şekil 4.45. Füzyon çalışmaları sonrası elde edilen hibrit hücrelere ait monoklonal antikorların antijenik yanıtlarının dolaylı ELISA ile gösterilmesi
A. 2 numaralı füzyon çalışmasına ait hibritler, **B.** 4 numaralı füzyon çalışmasına ait hibritler, **C.** 5 numaralı füzyon çalışmasına ait hibritler, **D.** 7 numaralı füzyon çalışmasına ait hibritlerin antikor yanıtları

Bu sonuçlara göre; üç adet fare anti-SARS-CoV-2 Fab fragmanına karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar (2F3, 6F10 ve11G7) ile 11 adet de SARS-CoV-2 geçirerek iyileşmiş insan antikoruna ait Pab (tüm antikor yapısı) ve Fab fragmanlarına karşı geliştirilmiş monoklonal antikor (1B4, 2A6, 4D11, 5D6, 5H4, 6H4, 6H12, 7E5, 8C12, 8H3 ve 8E11) üreten hibridoma hücreleri elde edilmiştir.

Bu hücrelerin tek düşürme çalışmaları tamamlandıktan sonra antikor alt isotipleri BD Mouse Isotyping ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Monoklonal antikorların immünoglobulin alt izotipleri

Füzyon Faresi	**Hibrit Adı**	**Alt-izotip**	**Zincir**
Anti-SARS-CoV-2 S1 MAM H9 Fab 2. Fare	H9F3	IgG3	Kappa
	H9F10	IgG1	Kappa
Anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 Fab 3. Fare	E6G7	IgG1	Kappa
Anti-SARS-CoV-2 FY pAb 2. Fare	F1D8	IgG1	Kappa
Anti-SARS-CoV-2 FY Fab 1. Fare	F1B4	IgG1	Kappa
	F2A6	Ig2b	Kappa
	F4A6	IgG1	Kappa
	F5D6	IgG1	Kappa
	F5H4	Ig2b	Kappa
	F6H4	IgG3	Kappa
	F6H12	IgM	Kappa
	F7E5	IgG2a	Kappa
	F8H3	IgG2a	Kappa
	F8E11	IgG1	Kappa

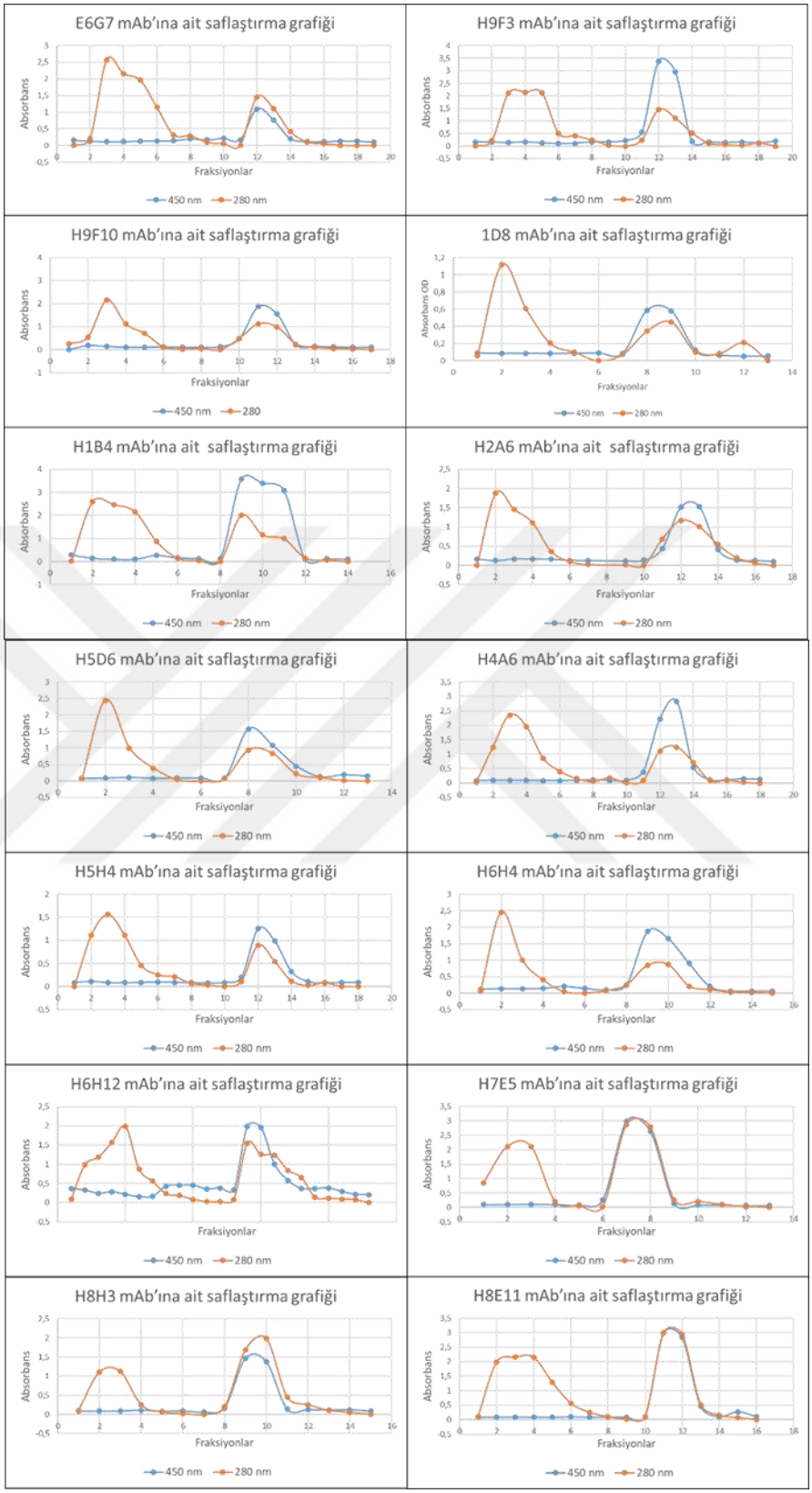
İmmünoglobulin alt izotipleri belirlenen monoklonal antikorların saflaştırma çalışmaları yapıldı.

4.9. SARS-CoV-2 Fare Anti-id Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

İmmünoglobulin alt izotipleri tanımlanmış olan monoklonal antikorların saflaştırılması süreci, her bir alt izotipe özgü affinite ve kimyasal özelliklere dayalı olarak özelleştirilmiş saflaştırma tekniklerinin ve kolon kromatografisi yöntemlerinin seçilmesiyle başlandı. Bu aşamada, IgG, IgM, IgA gibi farklı immünoglobulin sınıflarının ve alt izotiplerinin fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri dikkate alınarak, en etkili saflaştırma stratejisi belirlendi. Çalışmada geliştirilen, IgG alt izotipleri için Protein A veya Protein G gibi affinite kromatografisi kolonları tercih edildi. Bu yöntemler, antikorların Fc bölgesindeki spesifik proteinlere yüksek affinite gösteren ve böylece IgG moleküllerini seçici bir şekilde yakalayan ve saflaştıran yöntemlerdir. Diğer taraftan, IgM gibi immünoglobulin sınıfları

için, moleküler boyut veya yük farklılıklarını temel alan gel filtrasyon kromatografisi veya iyon değişim kromatografisi gibi alternatif yöntemler uygulandı.

Bu işlemler sırasında, antikorların antijen bağlama kapasitelerini ve fonksiyonel bütünlüklerini korumak esas alındı. Antikorların saflaştırılması sonrası, elde edilen preparatların saflık dereceleri ve antijen bağlama özellikleri değerlendirildi (Şekil 4.46.)



Şekil 4.46. Geliştirilen aid-monoklonal antikorlara ait kolon kromatografisi sonrası saflaştırma fraksiyonlarının absorbans 280 nm okumaları ve dolaylı ELISA yanıtlarının birlikte gösterimi

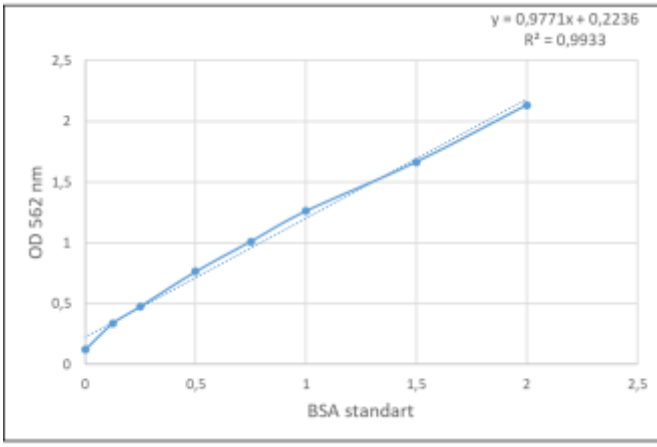
Çalışmada, S1 proteininin antijenik özelliklerinin incelenmesi amacıyla, saflaştırma fraksiyonları 25 ng S1 proteini ile kaplanmış ELISA kuyularında test edilmiştir. Kolorimetrik okumalar, 450 nm dalga boyunda yapılarak, antijen-antikor etkileşimlerinin varlığını ve yoğunluğunu ölçmüştür. Bu okumalar, özellikle elüsyon fraksiyonlarında belirgin antijen yanıtlarının alındığını göstermiştir. Diğer yandan, ön kesim fraksiyonlarında herhangi bir antijen yanıtının tespit edilmemesi, bu fraksiyonların istenmeyen bileşenlerden arındırıldığını ve saflaştırmanın başarılı olduğunu göstermektedir.

Ek olarak, 280 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik okumalar, protein konsantrasyonları hakkında bilgi sağlamıştır. Bu okumalar, saflaştırılan fraksiyonların protein içeriğini ve dolayısıyla saflaştırma işleminin verimliliğini değerlendirmek için önemli bir araçtır.

Elde edilen sonuçlar, saflaştırma sürecinin, hedef protein olan S1 proteini açısından zenginleştirilmiş fraksiyonlar üretmede başarılı olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, elde edilen her iki okuma tipinin sonuçlarının grafikler üzerinde gösterilmesiyle sunulmuştur. Bu grafikler, saflaştırma işleminin etkinliğini ve spesifik fraksiyonlarda antijen varlığını açıkça göstermektedir.

Saflaştırma sonrası protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için BCA tayini yapıldı. Her bir monoklonal antikora ait antikor konsantrasyonu belirlendi (Şekil 4.47.).



mAb Adı	mg/ml
H9F3	0,99
H9F10	0,49
E6G7	0,54
F1D8	0,24
F1B4	0,73
F2A6	0,77
F4A6	0,37
F5D6	0,35
F5H4	0,41
F6H4	0,26
F6H12	0,55
F7E5	0,94
F8H3	0,93
F8E11	1,07

Şekil 4.47. Anti-idiyotip monoklonal antikorların konsantrasyon tayini

Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ışığında uygun kromatografik yöntemin belirlenmesi ile anti-id monoklonal antikorların saflaştırma çalışmaları yapıldı.

4.10. Anti-İdiyotip Antikorların Nötralizasyon Kabiliyetlerinin Gösterilmesi

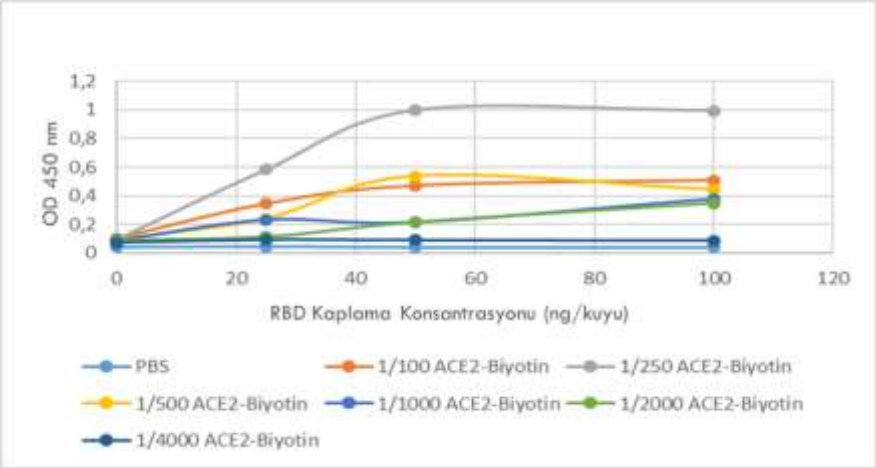
Bu çalışmanın odak noktası, SARS-CoV-2 virüsüne ait RBD proteininin, insan hücrelerindeki ACE-2 reseptörüne bağlanma bölgesindeki epitopları taklit edebilme kapasitesine sahip anti-idiyotipik monoklonal antikorların geliştirilmesi ve bu antikorların aşı adayı olarak potansiyellerinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada, RBD proteinine karşı üretilen monoklonal antikorların idiyotip bölgelerine yönelik anti-idiyotipik antikorlar, RBD'nin ACE-2 ile olan etkileşimini taklit edebilir şekilde tasarlanmıştır.

Geliştirilen aid-mAb'lerin (RBD yi taklit eden Mab) RBD ile rekabet ettiğini göstermek için kompetitif (Rekabetçi) ELISA tekniği kullanılmıştır. Dolayısıyla bu ELISA sisteminde gerekli olan ACE-2 proteinlerinin biotin enzimi ile işaretlenmesi çalışmaları yapılmıştır.

4.10.1. ACE-2 proteinlerinin biotin enzimi ile işaretlenmesi

Çalışmanın başlangıcında, ACE-2 proteinlerinin Biotin enzimi ile konjügasyonu yöntemlerde anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. İşaretlenmiş konjuge protein aktivitesinin doğrulanması amacıyla, direkt ELISA yöntemi ile test edildi. Test prosedürü, her bir kuyunun 25 ng RBD proteini ile kaplanmasıyla başlandı ve ardından standart ELISA protokolü takip edildi. Farklı dilüsyon oranlarında (1/500, 1/750, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/5000, 1/10000, ve 1/50000, ayrıca bir kontrol grubu olarak PBS kullanıldı) ACE2-Biotin konjügasyonlu proteinler kuyucuklara uygulandı (Şekil 4.48.).



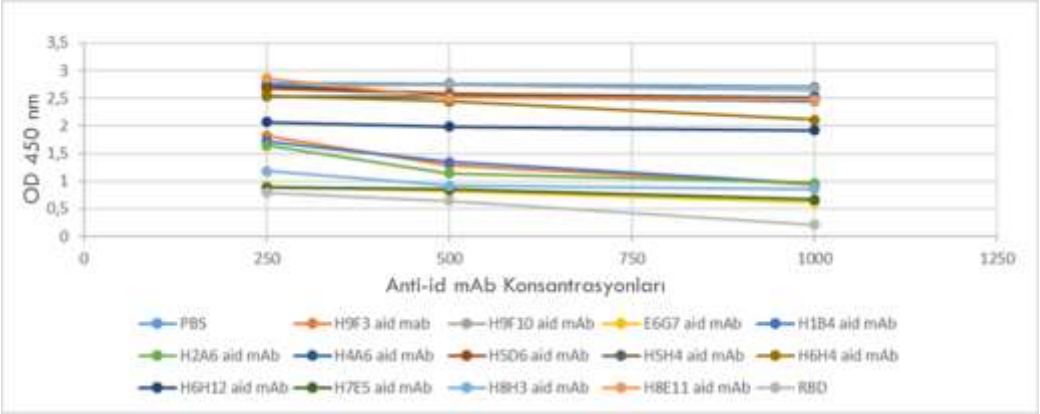
Şekil 4.48. ACE-2-Biyotin konjugat proteininin çalışma konsantrasyonunun direkt ELISA ile belirlenmesi

Analiz sonuçları, 1/250 dilüsyon oranında işaretlenmiş proteinin kullanımının en uygun çalışma koşulu olduğunu gösterdi. Bu optimal dilüsyon oranında konjüge edilen ACE-2-Biyotin, nötralizasyon testleri için alikotlar halinde hazırlanmış ve -20 °C'de saklandı. Bu süreç, ACE-2-Biyotin konjügasyonunun fonksiyonel aktivitesinin ve ELISA yöntemiyle kullanımının etkinliğinin kantitatif olarak değerlendirilmesini sağladı, bu da sonraki nötralizasyon testleri için önemli bir temel oluşturdu.

4.10.2. Yarışımlı ACE-2 nötralizasyon ELISA testi

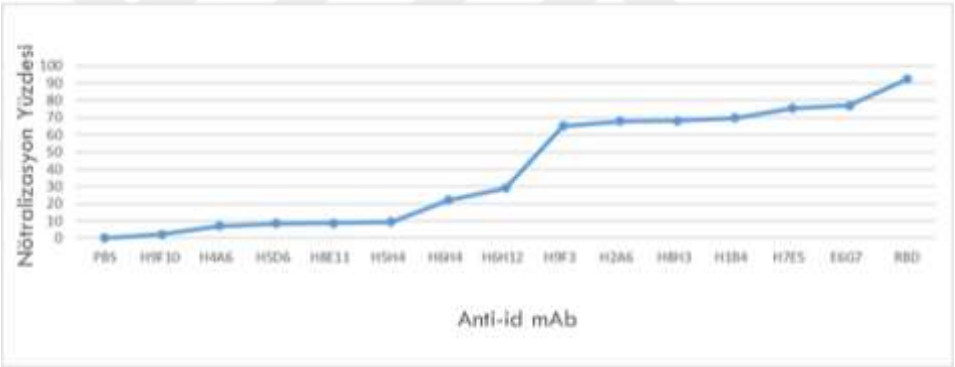
Aid mAblarının hem ELISA yöntemi ile hem de BALB/c fareler üzerinde anti-RBD antikorlarına tepki oluşturma ve antijeni taklit etme yeteneği araştırıldı. Rekabetçi ELISA ile, geliştirilen on üç aid mAbının (1D8 hücre hattı kaybedildi) serbest ortamda biyotin işaretli ACE-2 ile etkileşime girdikten sonra, ELISA plak kuyusunda kaplı olan RBD proteinine bağlanmayı inhibe etme yetenekleri test edildi.

Saf fare monoklonal antikorları (250-1000 ng), Biotin etiketli ACE-2 ile ayrı ayrı ön inkübasyonda tutuldu ve RBD kaplı ELISA plaka kuyularına eklenerek test edildi. 100 ng RBD kaplı kuyularda gerçekleştirilen rekabetçi ELISA test sonuçları aşağıda yer almaktadır (Şekil 4.49.).



Şekil 4.49. Anti-id monoklonal antikorların RBD nötralizasyon kabiliyetlerinin yarışımlı ACE-2 nötralizasyon ELISA ile gösterilmesi

Çalışmada negatif kontrol olarak PBS; pozitif kontrol olarak ise ticari RBD molekülü kullanıldı. Deneysel sonuçlara göre antikorların RBD proteinini 200 ng ACE-2 kaplı ELISA kuyucuğunda nötralize etme yetenekleri belirlendi (Şekil 4.50.).



Şekil 4.50. Antikorların RBD proteinini nötralize edebilme yüzdeleri

Test edilen 13 aid antikorundan 6 tanesinin diğerlerinden daha yüksek yüzdelerde ACE-2 yüzeyindeki RBD bağlanma alanını blokladığı gösterildi (E6G7, H7E5, H1B4, H8H3, H2A6, H9F3 aid mAbları).

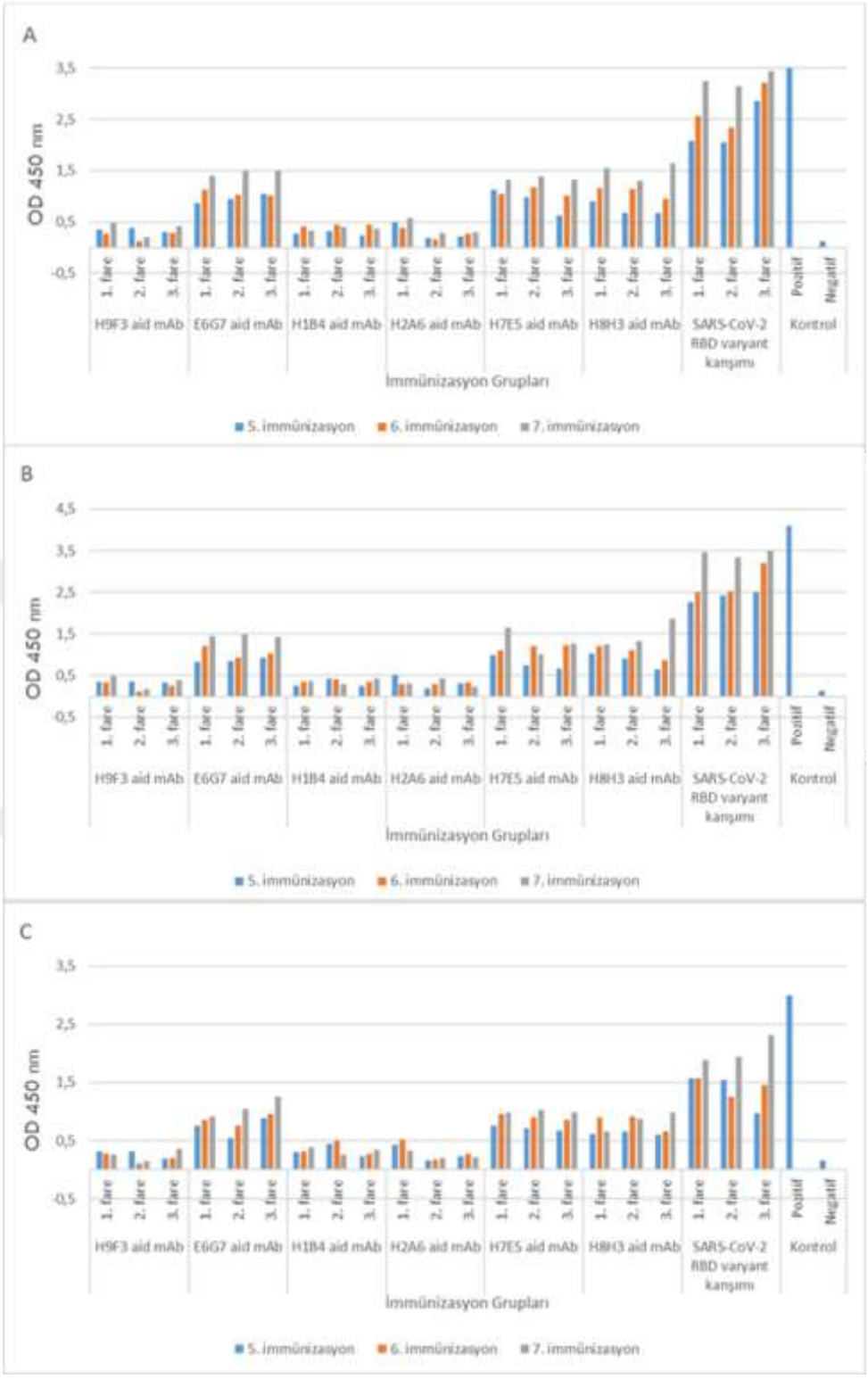
4.11. Anti-İdiyotip Antikorların *İn Vivo* Etkinliklerinin Gösterilmesi

RBD yi taklit eden anti-idiyotipik monoklonal antikorlar ile immünize edilen farelerden alınması beklenen immün yanıtın RBD proteinine karşı oluşması beklenmektedir. Böylece anti-idiyotip mAbların aşı adayı moleküller olarak kullanılabilir olduğu gösterilmiş olacaktır.

Belirlenen altı adet Aid- monoklonal antikor ile fare immünizasyonları başlatılarak aid mAb larının in vivo etkileri araştırıldı. Çalışmada pozitif kontrol olarak ticari RBD proteini ile immünizasyon grubu oluşturuldu. Altı farklı antikor ile altı farklı aşılama grubu oluşturuldu. Her grupta üçer fare bağışıklandı. Bağışıklama dozu olarak 50 µg Fab fragmanı kullanıldı. Deneyin kontrol grubu olması için 4 µg RBD proteini ile aşılanmış 7. grup oluşturuldu (bkz. Çizelge 3.16.).

Farelerin RBD antijene karşı geliştirdikleri immün yanıtlar, dördüncü, beşinci ve altıncı immünizasyon işlemlerinin ardından, elde edilen kan serumları kullanılarak dolaylı ELISA yöntemi ile değerlendirildi. İmmünize edilen farelerden alınan serum örnekleri, 250 kat oranında sulandırılarak analizde kullanıldı. ELISA plakları, SARS-CoV-2 virüsünün İngiltere, Wuhan ve Delta varyantlarına özgü antijenler ile ayrı ayrı kaplandı, böylece farklı virüs suşlarına karşı geliştirilen spesifik immün yanıtların karşılaştırılması sağlandı (Şekil 4.51).

Analizde pozitif kontrol olarak, bilinen nötralizasyon kapasitesine sahip Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM monoklonal antikoru, 1/1000 dilüsyon oranında kullanıldı. Bu, elde edilen immün yanıtların güvenilirliğini ve spesifisitesini doğrulamak için referans bir değer sunar. Negatif kontrol olarak ise, herhangi bir antikor içermeyen PBS kullanıldı, bu da arka plan sinyalinin belirlenmesi ve ölçümlerin spesifisitesinin artırılması açısından önemlidir.



Şekil 4.51. Anti-idiyotipik monoklonal antikorlarının *in vivo*da anti-RBD yanıtı oluşturma etkinliklerinin gösterilmesi
A-İngiltere, B- Wuhan ve C- Delta varyantları ile kaplama yapılmış sonuçlarıdır.

In vivo çalışmalardan elde edilen verilerin grafiksel analizi, aid-E6G7, aid-H7E5 ve aid-H8H3 olarak tanımlanan anti-idiyotipik monoklonal antikorların, RBD molekülü ile immünize edilmiş farelerde elde edilen antikorlarla karşılaştırıldığında, RBD molekülünün antijenik özelliklerini taklit ettiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, hibridoma teknolojisi kullanılarak geliştirilen anti-idiyotipik monoklonal antikorların, SARS-CoV-2 virüsünün ACE-2 reseptörüne bağlanan RBD bölgesine özgü antijenik determinatları taklit edebilecek biyomimetik moleküller olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, hibridoma teknolojisi aracılığıyla, RBD antijenini taklit edebilme kapasitesine sahip anti-idiyotipik monoklonal antikorlar başarıyla geliştirilmiştir. Bu antikorlar, in vivo deneylerde, ticari olarak temin edilen RBD antijenlerine benzer antijenik özellikler sergileyerek, potansiyel bir aşı adayı veya terapötik ajan olarak kullanılabilirliğini kanıtlamıştır. Bu çalışma, anti-idiyotipik antikorların, viral proteinlerin antijenik epitoplarını taklit ederek, SARS-CoV-2'ye karşı spesifik ve etkili bir immün yanıt geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu yaklaşım, COVID-19'a karşı yeni ve yenilikçi immunoprofilaktik ve immünoterapötik stratejilerin geliştirilmesi için temel bir platform sunar.

4.12. SARS-CoV-2 Tavşan Anti-İdiyotipik Monoklonal Antikorlarının Geliştirilmesi

Bu çalışmanın odak noktası, SARS-CoV-2'nin RBD'sine özgü monoklonal antikorlara karşı üretilen anti-idiyotipik antikorlardır. Bu çalışma kapsamında, özellikle Türkiye'de ilk kez gerçekleştirilecek, yenilikçi bir yöntem olan tavşan monoklonal antikorlarının hibridoma teknolojisi ile geliştirilmesi üzerine odaklanıldı. Tavşan antikorları, yüksek affinite ve özgüllükleri nedeniyle özellikle antikor araştırmalarında değerli birer araçtır. Bu tez çalışmasıyla, tavşan monoklonal antikorlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonu sürecindeki teknik zorlukların üstesinden gelinmesi ve bu antikorların SARS-CoV-2'nin RBD'sini taklit edebilen anti-idiyotipik antikor üretiminde kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflendi. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için Loyala Üniversitesi öğretim üyesi Katherine Knigt tarafından gönderilen 240E1:1 tavşan myeloma hücre hattı hibridoma partneri olarak kullanıldı.

4.12.1. Deney hayvanlarının immünizasyonu

İmmünizasyon prosedürleri, 2-4 aylık Yeni Zelanda cinsi dişi tavşanlar üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada 2 adet tavşan kullanıldı ve ilk aşılamada Freund's complete adjuvan kullanılırken, devamındaki aşılamalar 2 haftalık aralıklarla Freund's incomplete adjuvan kullanılarak yapıldı. Her 15 günde bir subkutan yolla aşılanan tavşanlardan, immünizasyonların 10'uncu gününde kulak veninden kan örnekleri alınarak serumlarındaki antikor seviyeleri dolaylı ELISA ile ölçüldü.

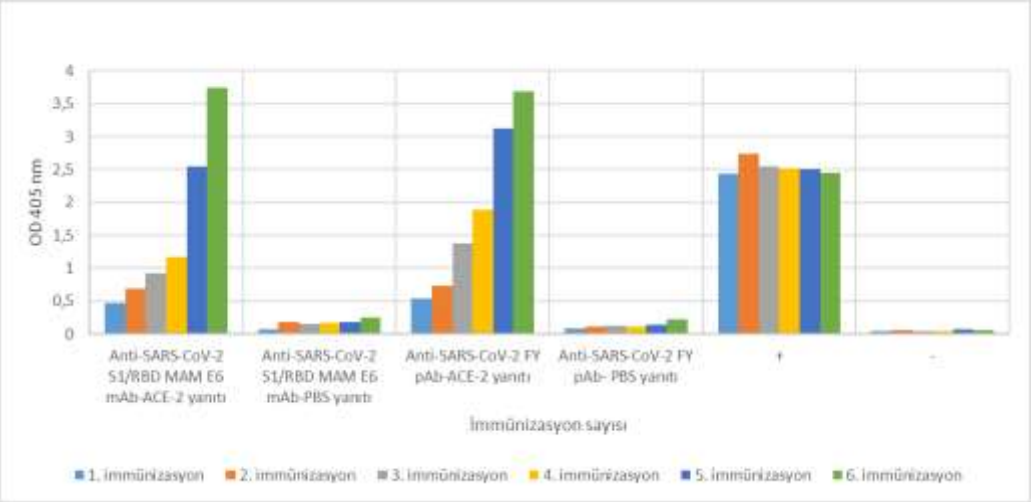
4.12.2. İmmünizasyon gruplarının oluşturulması

Antijen hazırlıkları, immünizasyon dozlarının hazırlanmasıyla başladı ve her bir antijen, adjuvant ile eşit hacimlerde (1:1 oranında) karıştırılarak tavşana subkutan olarak enjekte edildi. İmmünizasyon için her kafese bir tavşan yerleştirildi. İmmünizasyon süreci, 15 gün aralıklarla düzenli olarak tekrarlandı, bu periyodik uygulama ile optimal antikor yanıtının elde edilmesi ve immünolojik hafıza hücrelerinin geliştirilmesi amaçlandı.

4.12.3. İmmün yanıtın kontol edilmesi

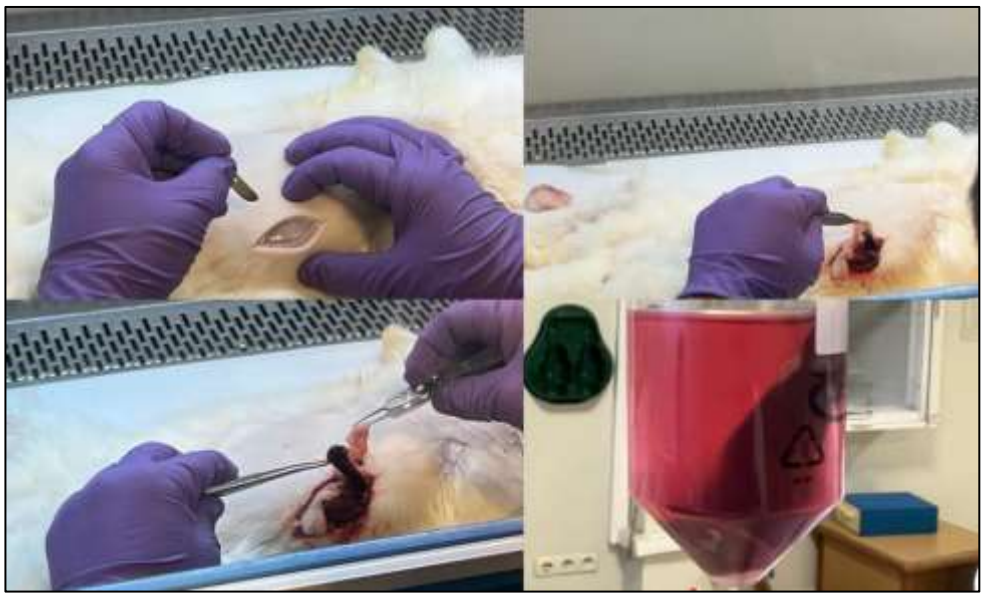
İmmünize edilen tavşanların serumlarındaki antikor aktiviteleri, dolaylı ELISA yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

Bu kapsamda ELISA plaklarına 200 ng ACE-2 ile kaplandı ve anti-S1/RBD MAM E6 mab ve anti-S1/RBD FY pAb immünize tavşan serumundan elde edilen antikorlar, 1:100, 1:1000 ve 1:5000 dilüsyonlarında inkübe edildi. İkincil antikor olarak, 1:2000 oranında seyreltilmiş alkalen fosfataz ile işaretlenmiş anti-rabbit IgG antikoru kullanıldı. İmmünize tavşan serumlarına ait sonuçlar Şekil 4.52.'de yer almaktadır. Bu yöntem, söz konusu antikorların RBD'ye karşı geliştirdikleri spesifik immün yanıtın yanı sıra, anti-idiyotipik antikorların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi için temel bir araçtır.



Şekil 4.52. Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD MAM E6 mAb ve insan anti-SARS-CoV-2 FY pAb ile immünize edilen tavşan immün yanıtlarının dolaylı ELISA ile gösterilmesi.

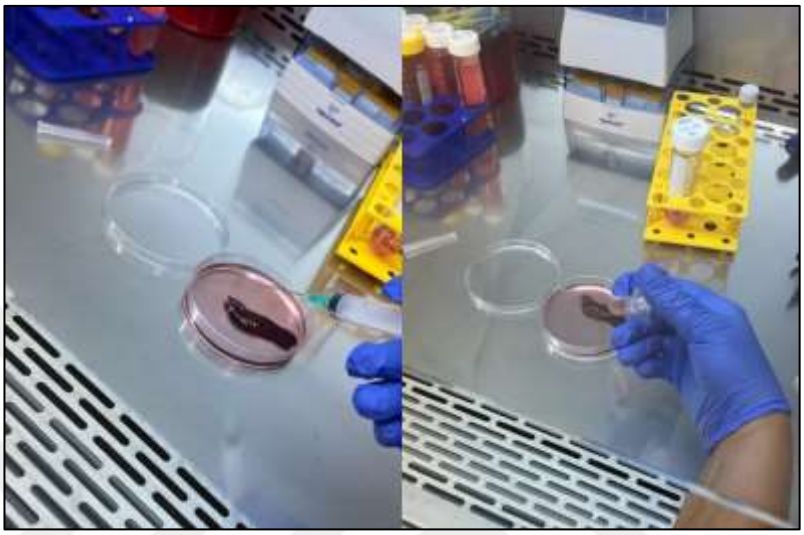
İmmünize edilen tavşanlardan fare anti-S1/RBD mAb ile immünize edilen tavşan 6'ncı İmmünizasyon sonrası füzyon çalışmasına tabi tutulurken insan anti-SARS-CoV-2 pab ile immünize edilen tavşan füzyona alınamadan kaybedilmiştir. Füzyona alınacak tavşan uygun ve etik koşullarda anestezik ve aneljezik maddeler ile uyutulduktan sonra dalak çıkarıldı (Şekil 4.53.) ve deney hayvanı uygun şekilde ex edilerek imha edildi.



Şekil 4.53. Tavşan dalağının çıkarılması

4.12.4. Hibridoma teknolojisi ile tavşan monoklonal antikorların geliştirilmesi

İmmünizasyonu takiben, hedef antijene duyarlı hale gelen B hücreleri dalaktan izole edildi (Şekil 4.54.) ve *in vitro* koşullarda myeloma hücreleri ile somatik hücre füzyonuna tabi tutuldular. Füzyon bilgisi Çizelge 4.7.'de gösterildi.

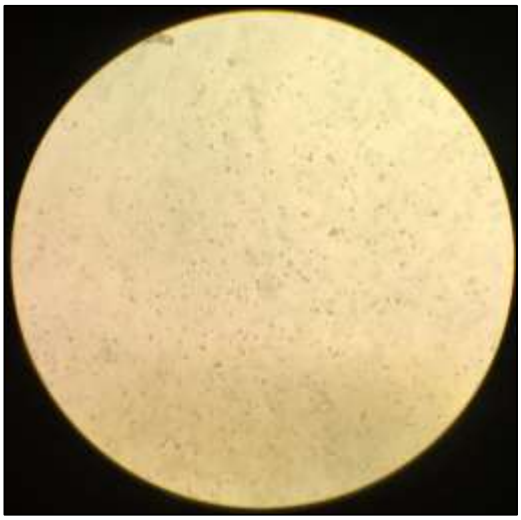


Şekil 4.54. Tavşan dalağından splenositlerin izolasyonu

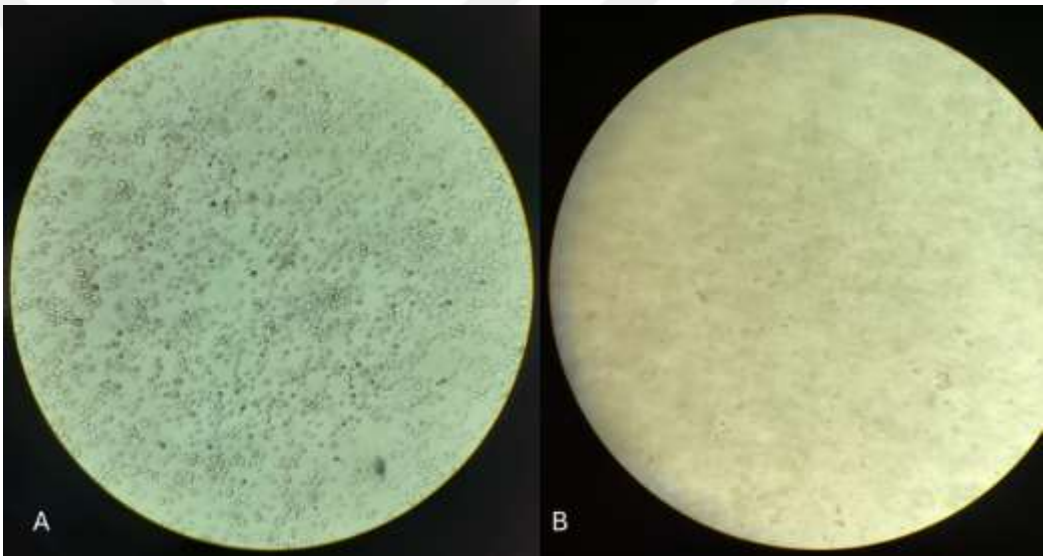
Çizelge 4.7. Tavşan füzyon çalışmalarının bilgisi

Füzyon No	1	2
Antijen	Fare anti-SARS-CoV-2 S1/RBD E6 MAM mAb	
Antijen miktarı	150 µg	
Dalak hücresi sayısı	625 000 000	625 000 000
Myeloma hücre sayısı	208 000 000 (Fare F0 hücre hattı)	125 000 000 (Tavşan 240E1:1 hücre hattı)
Dalak/ F0 oranı	1:3	1:5
Elde edilen hibrit hücre hatları	0	11

Füzyon çalışması sırasında tavşan myeloma hücre hattı 240E1:1 ile fare myeloma hücre hattı olan F0 hücrelerinin füzyon sonrası stabilitelerinin kıyaslanması amacı ile hem tavşan myeloma hattı hem de fare myeloma hattı ile ayrı ayrı füzyon çalışması gerçekleştirildi. Ayrıca bu çalışma içerisinde hem tavşan myeloma 240E1:1 hücre hattının feeder (Şekil 4.55.) olarak kullanıldığı (Şekil 4.56.) hem de fareye ait feeder hücrelerin kullanıldığı bir karşılaştırma çalışması da yapıldı.



Şekil 4.55. Tavşan 240E1:1 myeloma hücre hattının mikroskop altında görünümü.



Şekil 4.56. Tavşan hibridoma hücrelerinin mikroskop altında görünümü
A: Tavşan dalağı:Tavşan myeloma 240E1:1, B: Tavşan dalağı: Fare myeloma F0

Füzyon çalışması sonucunda fare F0 myeloma hücresi ile yapılan füzyondan elde edilen hibrit hücrelerin sayısı tavşan myeloma hücreleri ile yapılan çalışmaya göre 6 kat daha azdı ve oluşan kolonilerin hiçbirinden ACE-2 yanıtı alınamadı. Ancak tavşan myeloma hattı kullanılarak elde edilen hibrit hücrelerin ACE-2 yanıtlarının kararlı olduğu gözlendi.

Bu füzyon çalışmasının neticesinde, toplamda on bir adet tavşan kökenli hibrit hücre elde edildi. İmmün yanıtlar üç defa ACE-2 kaplı plaklarda dolaylı ELISA ile test edildi ancak hücre kültüründe yaşanan kontaminasyon sonucu tüm hibritler imha edildi.

Bu çalışma ile tavşan hibridoma yöntemi adına yapılan protokol çalışmaları neticesinde tavşan mabı üreten hibrit hücrelerin elde edilmesi sağlandı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Coronaviridae ailesine ait yeni bir betakoronavirüs türü olarak sınıflandırılan Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), ilk defa Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaleti Wuhan'da insanlara bulaştığı tespit edilmiştir (Dong ve ark. 2020). SARS-CoV-2'nin yol açtığı hastalık, Dünya Sağlık Örgütü tarafından COVID-19 olarak adlandırılmıştır. Koronavirüsler, yüksek prevalansa ve geniş coğrafi dağılıma sahip olan, tek iplikli RNA virüsleridir. Bu virüslerin genomlarındaki sık mutasyonlar, yeni koronavirüs türlerinin ortaya çıkmasına ve insan-hayvan etkileşimlerinin artmasıyla yeni enfeksiyon vakalarının meydana gelmesine sebep olmaktadır (Cui ve ark. 2019, Wong ve ark. 2015). T.C. Sağlık Bakanlığının güncel verilerine göre, Mart 2023 itibariyle COVID-19 vaka sayısı 17 232 06'dır. Bu sayı dünya çapında toplam 656 398 043 olarak kaydedilmiştir.

Özetle, koronavirüslerin yapısal proteinleri ve bunların genetik kodlanması, virüsün konakçı hücrelere bağlanması, hücre içine girmesi ve enfeksiyonun başlatılması süreçlerinde merkezi bir öneme sahiptir.

Koronavirusların hücreye giriş mekanizması, yüzeyinde bulunan S (spike) proteininin S1 bölgesinde yer alan RBD, SARS-CoV-2'nin insan hücrelerinde bulunan ACE-2 reseptörü ile etkileşimiyle başlar (Fehr ve Perlman. 2015, Walls ve ark. 2020). SARS-CoV ve diğer bazı koronavirüslerde RBD, S1'in N-terminalinde bulunurken, SARS-CoV-2'de bu bölge S1'in C-terminalinde konumlanmıştır (Kubo ve ark. 1994, Cheng ve ark. 2004). Bu süreçte S proteininin S1 alt birimi, reseptörle bağlanma işlevini üstlenirken, S2 alt birimi ise virüs ve hücresel zarın etkileşimi ve füzyonunu yönetir (Belouzard ve ark. 2009, Burkard ve ark. 2014).

Koronavirüslerin S proteini, virüsün konak hücre ile etkileşimini sağlayan ana yapısal bileşen olduğundan, nötralize edici antikorların hedefi haline gelir. Bu bilgiler, virüsün hücreye bağlanmasını ve dolayısıyla enfeksiyonun başlamasını engelleyebilir, bu da S proteinini potansiyel bir aşı hedefi ve antiviral tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bir odak noktası olmasını sağlar (Rossen ve ark. 1998).

Nötralize edici antikorlar, virüs kaynaklı hastalıklara karşı bağışıklık sisteminin evrimsel açıdan kritik öneme sahip unsurlarındandır. Bu antikorların etkinliği, virüs serotiplerini ayırt edebilme yetenekleriyle doğrudan ilişkilidir. Antikorların toleransı, konsantrasyonu ve sekonder lenfoid organlardaki varlığı gibi faktörler, nötralizan etkinin derecesini belirler. B hücre hafızası, antijenik stimülasyona bağlı olarak gelişir ve antikor titrasyonları ile ölçülebilir (Zinkernagel ve ark. 2001). Monoklonal nötralize edici antikorların in vitro olarak geliştirilmesi, bu antikorların terapötik amaçlarla kullanılmasına yönelik çalışmaların yaygınlaşmasına yol açmıştır. Hâlihazırda COVID-19 tedavisi için onaylanmış bir terapötik ajan bulunmamakla birlikte, çeşitli ilaç adayları geliştirilmekte ve araştırılmaktadır. 12 Mart 2020'de, SARS-CoV-2'ye özgü bir monoklonal antikor (mAb) için patent başvurusu yapılmıştır.

Koronavirüslerin yüzeyinde yer alan S (spike) proteinini hedefleyen monoklonal antikorlar hem tanı sistemlerin de kullanımı hem de hastalığın tedavisinde umut verici ilaçların geliştirilmesin de giderek artan bir öneme sahiptir. SARS-CoV-2 ve SARS-CoV virüslerinin S glikoproteinlerinin yapısal benzerliği (%77,5), bu antikorların terapötik potansiyelini artırmaktadır (Wrapp, D. ve ark. 2020; Gui ve ark. 2017).

Nötralize edici etkiye sahip monoklonal antikorlar kullanılarak geliştirilen anti-idiyotip antikorların, aktif ve pasif koruma sağladığı deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Maglioni ve ark. 2003). Bu bulgular, nötralize edici antikorların ve bunlara yönelik geliştirilen anti-idiyotip antikorların, viral hastalıkların tedavisinde önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

Antikorların birincil yapısının ve işlevlerinin detaylı incelenmesi ile idiyotiplerin, antikorların farklı değişken bölge döngüleri (CDR) ile ilişkili oldukları keşfedilmiştir. Bu bulgu, CDR çeşitliliğinin yanı sıra idiyotip çeşitliliğinin de olduğunu göstermiştir (Bentley ve ark. 1990; Poljak, 1994). Anti-idiyotipik antikorlar, hedefledikleri idiyotipik bölgenin konumuna göre sınıflandırılır ve ab2α, ab2β, ab2γ, ve ab2ε olmak üzere dört alt tipe ayrılırlar (Huang, J. ve ark. 1988). Özellikle, ab2β alt tipine sahip anti-idiyotipik antikorlar, bakteri, virüs ve parazit kaynaklı enfeksiyonlara karşı geliştirilen hayvan aşı çalışmalarında spesifik ve koruyucu bağışıklığı tetikleme potansiyelleri açısından değerlendirilmiş ve etkinlikleri gösterilmiştir (Pan ve ark. 1995).

Bu bağlamda, anti-idiyotipik antikorların kullanımı, enfeksiyon hastalıklarına karşı koruyucu bağışıklık yanıtının elde edilmesinde ve aşı geliştirme süreçlerinde önemli bir araç olarak öne çıkmaktadır. Bu antikorlar, antijenik mimikri yoluyla immün yanıtı modüle edebilir ve bu özellikleri sayesinde, geleneksel aşı yaklaşımlarına alternatif veya tamamlayıcı stratejiler sunabilirler. Anti-idiyotipik antikorların bu benzersiz özellikleri, enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde yeni ve yenilikçi terapötik yaklaşımların geliştirilmesine olanak tanımaktadır.

Anti-idiyotipik (Anti-Id) antikorlar, antijenleri taklit edebilme yetenekleri sayesinde, immünojen olarak antijenlere bağlanma kapasitesindeki antikorları aktive edebilir ve epitop spesifik aşılar olarak kullanılabilirler. Bu antikorlar, aşılamada kullanıldığında, antijenin epitoplarını yapısal olarak taklit ederek, taklit ettikleri epitoplara karşı koruyucu nitelikte antikor gelişimini tetiklerler. Bu durum, aşı olarak kullanılan anti-Id antikorların taklit ettikleri epitopa karşı yüksek derecede koruyuculuk sağlayan antikorların geliştirilmesine olanak tanır (Delves ve ark. 1997, Thanavala, 1996, Benjamini ve ark. 2000; Maruyama ve ark. 2002). Etkili bir anti-Id aşı geliştirebilmek için, hedef enfeksiyöz ajanın epitoplarının detaylı bir şekilde bilinmesi gerekmektedir (Lesinski ve Westrink, 2001).

Anti-Id aşıların, Rabies, Coronavirus, Cytomegalovirus (Herpesvirus) ve Hepatit B gibi çeşitli virüslere karşı koruyucu bağışıklığı artırma kapasitesi olduğu literatürde belgelenmiştir (Lamarre ve ark. 1991, Yu ve ark. 1996). Aralık 2019'da ortaya çıkan ve küresel bir pandemiye yol açan SARS-CoV-2, ciddi ölüm oranlarıyla dikkat çeken koronavirüs ailesinin üçüncü üyesidir. COVID-19 üzerine dünya genelinde yürütülen yoğun araştırma ve klinik çalışmalara rağmen, hastaların iyileştiğini doğrulayan randomize kontrollü çalışmalar bulunmamaktadır (Sanders ve ark. 2019).

Salgının yayılma hızı ve kapsamı göz önüne alındığında, COVID-19'a özgü etkili terapötiklerin bulunması kritik bir önem taşımaktadır. Bu çerçevede, tez çalışmasında SARS-CoV-2 proteinlerini hedef alan ve aşı çalışmalarına odaklanılan bir araştırma başlatılmıştır. Bu çalışmanın amacı, hibridoma teknolojisi kullanılarak SARS-CoV-2'nin S1 yüzey proteinini spesifik bu bölgeyi hedef alan nötralizan bir monoklonal antikor geliştirmek ve bu antikorun anti-Id aşı geliştirme çalışmalarında kullanılabilirliğini

araştırmaktır. SARS-CoV-2'nin yüzeyinde yer alan ve viral hücre girişine aracılık eden glikosile edilmiş S proteinlerinin, hücre reseptörü ACE2'ye bağlanması bu süreçte merkezi bir rol oynamaktadır (Letko ve ark. 2020). Çalışmamızda, ACE2 ile rekabet ederek SARS-CoV-2'nin S1 yüzey proteinlerine bağlanan ve S proteininin reseptör bağlanma bölgelerini bloke eden nötralizan bir monoklonal antikorun geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, SARS-CoV-2 virüs yüzey proteininin epitop dizisini taklit eden anti-id antikorların geliştirilmesi ve bu antikorların *in vivo s*istemde etkinliğinin araştırılması yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanlarında antijen bazlı tedavileri ile hastalık durumundaki hayvanların iyileşme göstermesinden sonra, antijene özgü yaklaşımların immünoterapide kullanımı dikkat çekmiştir (Sabatos-Peyton ve ark. 2010). Antijenik yapılara özgün olarak gelişen immünoglobulinler, iki özdeş ağır ve hafif zincire sahip glikoprotein yapıya sahiptirler. Bu ağır-hafif zincirler, antijen bağlanması için iki değişken (V) immünoglobülin (Ig) alanından (VL ve VH) oluşmaktadır. Bu V alanları, idiotipin (Id) oluşumunu tamamlar (López-Requena ve ark. 2012). Bu bölgelere karşı gelişen antikorlara ise anti-idiyotip antikorlar adı verilir.

Anti-idiotip (Anti-Ids) antikorları, bir antikorun idiyotipik değişken alanlarına bağlanma kabiliyetine sahiptir (Naveed, A. ve ark., 2018) bu sayede anti-idiyotip antikorlar antijenlerin bağlanma dizilerini taklit ederek antikor oluşumunu tetikleyebilirler (Mitra-Kaushik ve ark. 2001, Lesinski ve Westrink 2001). Anti idiyotip antikorların antijen olarak kullanılması için ilk çalışmalar Niels Jerne tarafından önerilen bağışıklık sisteminin antikor ve lenfosit hücreleri arasındaki bir “İdiotipik Ağ " hipotezine dayanmaktadır (Jerne, 1974). Bağışıklık sistemi bir antijene karşı antikor üretir ve ilk üretilen antikorun idiyotipine karşı antikorlar üretimine devam eder. Bu teoriye göre bir antijen kullanılarak yapılan aşılama sonrası bu antijene karşı Ab1 olarak adlandırılan antikorların gelişmesini sağlar. Ab1 antikorları da Ab2 olarak adlandırılan bir dize anti-idiyotipik antikor üretir. İdiyotipleri Ab1'in antijen bağlama bölgesine uyan Ab2 antikorları ile aşılama yapılması ile, Ab1 tarafından tanımlanan orijinal antijeni tanıyacak olan Ab3 (anti-anti-id antikorları) oluşumunu sağlanır.

Bu nedenle, İdiyotipik Ağ teorisinde anti-idiotipik antikorlar mevcut antijenlerden herhangi birini taklit edebilir veya taklit edilen antijenler olarak kullanılabilir (Vázquez ve ark. 2012). Kısaca bağışıklık sistemi idiyotipler ve anti-idiyotipler ağı tarafından kontrol edilir.

Anti-idiyotipik antikorların, immün sistemde özgül bir düzenleyici rolü vardır ve bu antikorların etkileşimi, antijen tanıma ve bağışıklık yanıtının modülasyonunda kritik öneme sahiptir. Anti-idiyotipik antikorlar, orijinal antikorların (Ab1) idiyotip bölgesine karşı geliştirilen antikorlardır ve bu etkileşim, antijen-antikor ilişkisinin bir yansıması olarak düşünülebilir. Bu antikorlar, kendi içlerinde üç farklı sınıfa ayrılır ve her bir sınıf, immün sistemin farklı yönlerini etkiler. Birinci sınıf, Ab2B olarak adlandırılan anti-idiyotipik antikorlardır. Bu antikorlar, idiyotip bölgesinin antijen ya da haptenle doğrudan etkileşimini engelleyerek, antijenin antikorla bağlanmasını bloke eder. Bu etkileşim, Ab2B antikorlarının antijenin yapısal bir taklidi olarak işlev görmesini ve bu şekilde spesifik bağışıklık yanıtını modüle etmesini sağlar. İkinci sınıf olan Ab2α, idiyotip bölgesine antijen ya da haptenin bağlanmasını engellemez; bu nedenle, bu antikorlar, idiyotipin çerçeve bölgesinde bulunan, antijenle doğrudan ilişkili olmayan idiyotoplara karşı gelişmiştir. Ab2α antikorlarının varlığı, antijen tanıma ve bağlanma sürecini doğrudan etkilemese de antikorların çeşitliliği ve immün yanıtın genişletilmesi açısından önemlidir. Üçüncü sınıf, Ab2β olarak adlandırılan anti-idiyotipik antikorlar ise, hem idiyotip bölgesine antijen ya da haptenin bağlanmasını engelleyen hem de idiyotipin çerçeve bölgesindeki idiyotoplara karşı gelişmiş özelliklere sahiptir. Bu çift fonksiyonlu anti-idiyotipik antikorlar, hem antijen tanıma sürecini doğrudan etkileyebilir hem de immün sistemin antijenlere karşı geliştirdiği yanıtı derinlemesine modüle edebilir. Ab2β antikorlarının bu özellikleri, onları immünoterapi ve aşı geliştirme çalışmalarında özellikle değerli kılmaktadır. (Rajewsky, 1996, Jerne ,1974, Greenspan ve ark. 1993, Behar, 2007).

İmmün sistemde, antijen sunan hücreler (APC) tarafından tanınan idiyotipler, MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla T hücrelerine sunulur. Ardından, B lenfositler, idiyotipik peptitleri MHC sınıf II molekülleri üzerinde sürekli olarak sunmaya devam eder (King ve ark. 1993, Weiss ve Bogen, 1989). Bu süreç, tanımlanabilir peptitlerin eklenmesi ile anti-idiyotipik antikorların oluşumuna katkıda bulunur. İleri aşamada, antikor üreten plazma

hücreleri ile anti-idiyotipik antikorlar arasındaki ayrımı sağlayan sinyalizasyon süreci başlar (Janeway, 1975, Reitan ve Hannestad, 2001). Sonuçta, T hücreleri ve B hücreleri arasında antijensiz bir iş birliği, yani idiyotip tarafından yönlendirilen T-B hücre iş birliği gerçekleşir (Munthe ve ark. 2005). Bu antijensiz mekanizma, antijenin var olmadığı durumlarda immünolojik hafızanın sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir (Nayak ve ark. 2001, Vani ve ark. 2007).

Poliklonal idiyotipik determinantların, B ve T hücreleri arasında aynı antijene karşı paylaşıldığı hipotezi, monoklonal antikorlarda, B hücre reseptörlerinin doğal epitoplara bağlanması ile T hücre reseptörlerinin, antijen sunan hücreler tarafından MHC molekülleri ile etkileşime girdikten sonra antijen bağlama kapasitesi kazanması arasında bir farklılık ortaya koymaktadır. Bu durum, poliklonal idiyotiplerin sunduğu avantajdan monoklonal idiyotiplerin mahrum kalmasına neden olur (Uner ve Gavalchin, 2006). Bu çalışmada, poliklonal ve monoklonal idiyotiplerin kullanımına dayalı bir karşılaştırma yapılmıştır. Bu amaçla oluşturulan fare grupları içinde, poliklonal idiyotiplerle immünize edilen farelerin daha hızlı antijenik yanıt gösterdiği belirlenmiştir. İdiyotiplerle immünize edilerek gerçekleştirilen füzyon çalışmaları sonucunda elde edilen hibridomaların sayısı, poliklonal idiyotip kullanılan füzyon çalışmalarında, monoklonallere kıyasla sayısal olarak üstünlük göstermiştir.

Anti-idiyotip antikorların geliştirilmesine yönelik literatür incelemeleri, antijen bağlayıcı bölge (Fab) içeren antikor moleküllerinin saf formda elde edilmesinin önemini vurgulamaktadır (Bhattacharya-Chatterjee M. ve Fon, 1998). Bu Fab bölgeleri, spesifik antijen yapılarını tanıyan idiyotipik bölgeleri içerir ve anti-idiyotip antikorların üretimi için hedef olarak kullanılır. Bu antikorlar, bakteri, virüs, küf gibi çeşitli mikroorganizmalarla ilişkili aşı geliştirme çalışmalarında kullanılarak, hayvan modelinde koruyucu etkinlikleri gösterilmiştir (Moe ve ark. 1999). Bu çalışmada, SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen antikorların, papain enzimi yardımıyla kesilerek idiyotipik bölgeyi içeren Fab fragmentlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bu fragmentler, Balb/c türü dişi farelere immünize edilmiş ve enzimatik olarak kesilmemiş tam antikor yapısı ile immünize edilen farelere kıyasla, hibridoma verimliliğinin belirgin derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Veri gösterilmemiştir).

Bu bulgular, anti-idiyotip antikorların geliştirilmesi ve aşı çalışmalarında kullanılmasının, özellikle spesifik antijenik hedeflere karşı etkili immün yanıtların elde edilmesinde önemli bir strateji olduğunu ortaya koymaktadır. Antijen bağlayıcı bölgelerin (Fab) saf formda elde edilmesi ve bu bölgelere yönelik anti-idiyotip antikorların üretilmesi, immünolojik araştırmalar ve aşı geliştirme süreçleri için kritik öneme sahiptir. Bu yaklaşım, özellikle yeni patojenlere karşı hızlı ve etkili aşıların geliştirilmesi açısından değerli bir yöntem sunmaktadır.

Anti-id antikorları antijeni taklit edebilirler ve bu sayede hücresel bağışıklığı yani antijene bağlanma kapasitesine sahip antikorları aktive edebilirler ve epitop spesifik aşı olarak kullanılabilirler (Delves ve ark. 1997). Aid antikorlarının aşı olarak kullanılması taklit ettiği epitopa karşı yüksek koruyuculukta antikor geliştirilmesini sağlar (Maruyama ve ark. 2000). Yıllar içinde Aid antikorları çeşitli kanser türleri için tedavi amaçlı olarak geniş ölçüde denenmiştir. Tümörle ilişkili antijenlerin (TAA) keşfedilmesi ile bağışıklık temelli anti-kanser tedavileri araştırılmaya başlanmıştır. Bu kapsamda Monoklonal antikorlar spesifik olmaları sebebiyle onkolojide pasif immünoterapi de çok çalışılmış ve etkinliği kanıtlanmıştır. Tümörle ilişkili genlerin çoğu canlının kendi antijenleri ile ilişkilidir ve bunlara karşı bağışıklık toleransı oluşur ve sonuçta onkoproteinlere karşı etkili aşılamaya karşı bir engel oluşur. Oluşan bu bağışıklık toleransı engelinin yıkılması için antijeni taklit eden anti-idiyotipik antikorların gerçekten humoral ve/veya hücresel bağışıklık tepiklerini indüklediği gösterilmiştir (Bhattacharya-Chatterjee M. ve ark. 1993, Foon ve ark. 1995, Ladjemi, 2012).

Literatür, çeşitli patojenlere karşı anti-idiyotipik antikorların geliştirilmesi ve bu antikorların aşı olarak kullanılma potansiyelinin araştırıldığı geniş çapta çalışmalara ev sahipliği yapmaktadır. Bu çalışmalar, anti-idiyotipik antikorların, özellikle virüs, bakteri ve kanser hücrelerine karşı immünolojik yanıtı tetikleyerek, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Örneğin, Naveed ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, buzağılarda Şap Hastalığı Virüsü'ne (FMDV) karşı geliştirilen anti-idiyotipik antikorların, ticari öldürülmüş virüs aşısıyla karşılaştırıldığında, kalıcı ve güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, anti-idiyotipik antikorların geleneksel aşılarla benzer ya da daha üstün bağışıklık yanıtları sağlayabileceğini göstermektedir.

Benzer şekilde, Hiernaux (1988) tarafından gerçekleştirilen çalışmalar, Streptococcus pneumonia, Brucella abortus ve Escherichia coli gibi çeşitli patojenlere karşı kemirgenlerde bağışıklama amacıyla anti-idiyotipik aşıların üretildiğini ve başarılı sonuçlar elde edildiğini bildirmiştir.

Ayrıca, anti-idiyotip aşıların, Kuduz virüsü, Hepatit B virüsü (HBV) ve İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV) dâhil olmak üzere bir dizi virüse karşı etkililik potansiyeline sahip olduğu araştırılmıştır. Özellikle, Pride (1992) ve Muller S. (2016) tarafından yapılan çalışmalar, Hepatit B yüzey antijenini taklit eden Ab2β antikorlarının güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Kanser tedavisine yönelik çalışmalarda ise, gastrointestinal adenokarsinomalarda kullanılan karsinoembriyonik antijenleri (CEA) taklit eden anti-idiyotipik antikorlar (Ab2) ile yapılan deneyler, bu antikorların tümör aşısı olarak tedavi edici özelliğe sahip olabileceğini göstermiştir (Bhattacharya-Chatterjee M. ve Foon, 1998). Bu bağlamda, Racotumomab (Vaxira) aşısı, Küba ve Arjantin'de onaylanmış ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilk anti-idiyotipik aşı olmuştur. Racotumomab, hastalarda tümör hücrelerinde bulunan spesifik glikolize gangliyositlere (NeuGcGM3) karşı güçlü bir bağışıklık yanıtı indükleyen bir anti-idiyotipik monoklonal antikordur (Gaidosik, 2014).

Bu çalışmaların geneli, anti-idiyotipik antikorların, çeşitli hastalıklara karşı etkili aşı ve tedavi yöntemleri geliştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu yöntemler, özellikle immünolojik mekanizmaları detaylı bir şekilde anlama ve immün sistemi hastalıklara karşı daha etkin bir şekilde harekete geçirebilme açısından önem taşımaktadır.

Anti-idiyotipik (Anti-Id) aşıların tümörlere karşı etkisiz kalabilmesinin altında yatan nedenler, diğer kanser aşılarına yönelik genel başarısızlıklarla paralellik gösterir. Bu durumun temelinde, kanserli hastaların tümörlerinde gözlenen antijen ekspresyonunun karmaşıklığı ve heterojenliği yatar. T ve B hücrelerinin hedef aldığı antijenlerin çeşitliliği oldukça fazladır ve bu antijenler adaptasyon yeteneği yüksek bir yapıya sahiptirler. Bu çeşitlilik, bağışıklık sistem hücrelerinin tanıma, bağlanma ve yok etme işlevlerini tutarlı bir şekilde gerçekleştirme kapasitesini önemli ölçüde azaltabilir. Bu nedenle, idiyotipik ifadeleri olan B hücresi reseptörlerine yönelik Anti-Id aşılarının etkililiğinin artırılabilmesi için, tüm Anti-Id sınıfları (Ab2α, Ab2β, Ab2γ ve Ab2δ) dâhil edilerek hedefleme stratejilerinin optimize edilmesi gerekmektedir.

Monoklonal tabanlı Anti-Id aşı geliştirme ve uygulama stratejisinin, poliklonal tabanlı anti-id yaklaşımlarına doğru evrilmesi, hedeflenmiş ve hedeflenmemiş antijenlere karşı antikor üreten B ve T hücrelerini aktive ederek, hastalarda daha geniş bir hümoral antijen yayılımını teşvik edebilir. Poliklonal anti-Id'lerle gerçekleştirilen çoklu antijen hedeflemeli bağışıklamalar, mevcut B hücre yanıtlarını ve potansiyel olarak mevcut T hücre yanıtlarını genişletme açısından etkili bir strateji sunabilir. Çoklu epitop bağlama ile hedeflenen genel aviditenin artırılması, antijen tanıma ve bağlanma süreçlerinin güçlendirilmesine katkıda bulunabilir (Kohler, H. ve ark. 2019).

Bu çalışmanın ilerleyen aşamalarında, fare kökenli anti-idiyotip monoklonal antikorlarımızın, gelecekte geliştirilecek olan tavşan kökenli poliklonal anti-idiyotip antikorlarla karşılaştırmalı olarak aşı adayı molekül olarak test edilmesi planlanmaktadır. Bu yaklaşım, anti-Id aşı stratejilerinin optimizasyonuna yönelik önemli bilgiler sunarak, kanserle mücadelede yeni yolların keşfedilmesine olanak sağlayabilir. Bu çalışmaların sonuçları, kanser aşıları alanında önemli ilerlemeler kaydedilmesine katkıda bulunabilir ve tümörlere karşı daha etkili immünoterapötik stratejilerin geliştirilmesine zemin hazırlayabilir.

Aşı teknolojisi için kullanılan yöntemler, karmaşık ve zahmetlidir. Aşı geliştirmek için yapılan çalışmalar, uzun ve maliyetli süreçlerdir ve yine lisanslı bir aşının geliştirilmesi uzun yıllar alır (Gouglas ve ark. 2018). Hastalıkları önlemek için koruyucu etkisi olan geleneksel ve modern aşılar olmak üzere çok sayıda farklı teknikle geliştirilen aşılar

kullanılmaktadır. Bunların arasında DNA ve RNA bazlı aşılar, kültüre önceden ihtiyaç olmadığı için daha hızlı geliştirilebilir (Lurie ve ark. 2020). 2020 yılında yaşanan SARS-CoV 2 aşısının geliştirilmesi, daha önce yapılan tüm aşı geliştirme çalışmalarının önüne geçerek birkaç ay içinde 300'den fazla aşı geliştirme projesiyle sonuçlandı (Forni ve ark. 2021). Bu süreçte SARS-CoV-2 için onaylanmış aşılar arasında inaktive aşılar (Sinopharm ve SinoVac), vektör bazlı aşılar (CanSinoBio, Sputnik V ve AstraZeneca) ve mRNA bazlı aşılar (Pfizer BioNTech ve Moderna) bulunmaktadır (Wu, Z. ve ark. 2021).

Yapılan aşı çalışmalarının yanı sıra, COVID-19hastalarını iyileştirmek için Hidroksiklorokin, Azitromisin ve Remdesivir gibi çeşitli terapötik müdahaleler de test edilmiştir. Hidroksiklorokin'in ACE-2'nin glikozilasyonuna müdahale ettiği ve bunun sonucunda virüs bağlanmasının önlenmesine yol açtığı gösterilmiştir (Wang, C. ve ark., 2020, Gautret ve ark. 2020) ancak bu veriler, herhangi bir güvenilir sonuca varmak için yeterli görülmemektedir. Ciddi şekilde hasta olan COVID-19 hastalarında yüksek dozlarda Hidroksiklorokin de önerilmemektedir (Gordon ve ark. 2020).

COVID-19insanlık tarihinde ikinci en büyük salgın olarak kaydedilmiştir. İnfluenza virüsü için, yapılan tüm aşı geliştirme çalışmalarına rağmen etkili bir korunma yöntemi geliştirilememiştir. Hala küresel sağlık için büyük bir tehtitdir (Nickol ve Kindrachuk, 2019).

Bakteriyel ve viral patojenlere karşı daha önce etkinliği kanıtlanmış olan anti-idiyotipik aşılar, SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilecek alternatif aşılama stratejileri arasında potansiyel bir yaklaşım sunmaktadır. Bu aşılar, özellikle antijenlerin yeterli miktarda elde edilemediği veya saflıkla ilgili sorunlar yaşandığında ve antijenin protein yapısına sahip olmadığı durumlar gibi belirli senaryolarda, diğer aşı geliştirme yöntemlerine göre avantaj sağlamaktadır (Chapman, 1995).

Anti-idiyotipik aşılar, rekombinant veya sentetik yöntemlerle üretilen antijenlerin protein katlanması veya glikozilasyon gibi zorluklarla karşılaştığı durumlarda büyük ölçekli üretim ve saflaştırma avantajı sunar. Protein yapısında olmaları sayesinde, bu aşılar daha büyük moleküler immünojenik taşıyıcılara kolaylıkla bağlanabilir ve böylece timusa bağımlı antijenler haline gelerek immün sistemde güçlü bir antikor yanıtının gelişimini teşvik edebilir. Ayrıca, idiyotip hibridomalarından elde edilen antijen dizi bilgisine

dayanarak tamamen sentetik aşılar üretmek mümkündür. Anti-idiyotip aşıların üretimi, yüksek miktarda saf antijen gerektirmemesi nedeniyle maliyet açısından da ekonomiktir. Bu aşılar, antijenin tamamını veya antijenik parçaları içermediğinden, geleneksel antijenik aşılardan kaynaklanabilecek istenmeyen yan etki risklerini minimize edebilir (Ma ve ark. 2002). İdiyotip aşıları, protein yapısında oldukları için işlenmeleri kolaydır ve T hücresine bağımlı antijenler olarak etkili immünojenik taşıyıcılar ve eşleşme ajanları olarak kullanılabilirler (Fredriksen ve ark. 2012). Hibridoma teknolojisi aracılığıyla anti-idiyotip aşılarının geniş ölçekte ve güvenli bir şekilde üretimi mümkündür. Yapılan önceki çalışmalar, BALB/c farelerine saf tavuk anti-H9 IgG'si ile aşılama sonrasında, anti-idiyotipik antikorların ve spesifik B hücresi hibridomlarının gelişimini desteklediğini ortaya koymuştur. Hibridomaların detaylı incelenmesi sonucunda, hemaglutinini bağlayabilen ve antikor üretebilen monoklonal bir antikorun geliştirildiği gösterilmiştir (Li, W. ve ark. 2005). Bu bulgular, anti-idiyotipik aşıların, özellikle zorlu patojenler karşısında yeni ve etkili immünolojik stratejiler sunabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, Hibridoma teknolojisi kullanarak, anti-idiyotipik SARS CoV-2 yüzey antijenini (S/RBD) taklit eden nötralizan monoklonal antikorlar geliştirildi. Bu kapsamda Anti- SARS CoV-2 yüzey proteinini (S1/RBD) hedef alan nötralizan özellik gösteren fare monoklonal antikorları (MAM-H9, MAM-E6) ile SARS CoV-2 ile enfekte olup iyileşme gösteren donör insandan elde edilen serumdan saflaştırılan ve nötralizan özelliği gösterilen insan antikorları kullanıldı. Her iki antikor ayrı ayrı papain enzimi ile kesilerek, antikorlara ait Fab fragmanları saflaştırıldı ve BALB/c farelerin immünizasyonunda kullanıldı. Bağışıklama sonucu en yüksek anti-idiyotipik anti- SARS-CoV-2 (S/RBD) cevabı gösteren fareler sırasıyla füzyona alındı. Bu farelerin B-lenfositleri izole edilerek myeloma hücreleri ile birleştirildi. Seçici HAT kültür ortamında üreyen hibridoma hücrelerinden ACE-2 ye spesifik bağlanan klonlar dolaylı ELISA testiyle belirlendi. RBD'yi taklit eden yani Aid antikor üreten hibridoma hücreleri (E6G7, H7E5 ve H8H3) geliştirildi. Anti idiyotipik monoklonal antikorların SARS-CoV-2 RBD yi taklit ederek anti-RBD yanıtı oluşturulup oluşturamadığı *in-vivo* sistemde de gösterildi.

Çalışmadan elde edilen anti-idiotip antikorların, orijinal SARS-CoV-2 Yüzey antijenin kopyası olarak kullanılabileceği ve ticari aşılara alternatif olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir. Anti-id antikorları sentezleyen hibridomaların hücre kültür sistemlerinde geniş ölçekte üretilmesi ile güvenli ve ekonomik bir şekilde bol miktarda SARS-CoV-2 yüzey antijen elde edilmesi mümkün olacaktır. Ayrıca elde edilecek anti-idiotip antikorlar, tanı sistemlerinde kullanılan anti-SARS-CoV-2 monoklonal antikorlarının immünaffinite yöntemleri ile saflaştırılmasında kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

Absolom, D. R., & van Oss, C. J. (1986). The nature of the antigen-antibody bond and the factors affecting its association and dissociation. *CRC Critical reviews in immunology*, *6*(1), 1–46.

Actor, JK. (2012.) Immunology and Microbiology (2nd ed), *Elsevier Saunders*, Philadelphia, 33-38.

Barnes, C. O., Jette, C. A., Abernathy, M. E., Dam, K. A., Esswein, S. R., Gristick, H. B., Malyutin, A. G., Sharaf, N. G., Huey-Tubman, K. E., Lee, Y. E., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., West, A. P., Jr, & Bjorkman, P. J. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*, *588*(7839), 682–687. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2852-1

Barnes, K. (2018). Milestone 2: the first monoclonal antibody therapy. *Nature Protocols*. December.

Barrett, A. J., & McDonald, J. K. (1986). Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *The Biochemical journal*, *237*(3), 935. https://doi.org/10.1042/bj2370935

Behar, S. M., & Porcelli, S. A. (1995). Mechanisms of autoimmune disease induction. The role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis and rheumatism*, *38*(4), 458–476. https://doi.org/10.1002/art.1780380403

Belouzard, S., Chu, V. C., & Whittaker, G. R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(14), 5871–5876. https://doi.org/10.1073/pnas.0809524106

Benjamini, E., Coico, R., Sunshine, G., (2000). Resistance and immunization to infectious diseases in: Immunology a Short Course. (4th ed.) *A John Wiley&Sons, Inc*. USA, pp. 421-453.

Bentley, G. A., Boulot, G., Riottot, M. M., & Poljak, R. J. (1990). Three-dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex. *Nature*, *348*(6298), 254–257. https://doi.org/10.1038/348254a0

Bestle, D., Heindl, M. R., Limburg, H., Van Lam van, T., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D. A., Hardes, K., Eickmann, M., Dolnik, O., Rohde, C., Klenk, H. D., Garten, W., Steinmetzer, T., & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life science alliance*, *3*(9), e202000786. https://doi.org/10.26508/lsa.202000786

Bhattacharya-Chatterjee, M., & Foon, K. A. (1998). Anti-idiotype antibody vaccine therapies of cancer. *Cancer treatment and research*, *94*, 51–68. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6189-7_4

Bhattacharya-Chatterjee, M., Mrozek, E., Vaickus, L., Oseroff, A., Stoll, H., Russell, D., Kohler, H., & Foon, K. A. (1993). Antiidiotype (Ab2) vaccine therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *690*, 376–377. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb44036.x

Brouwer, P. J. M., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., Bangaru, S., Torres, J. L., Okba, N. M. A., Claireaux, M., Kerster, G., Bentlage, A. E. H., van Haaren, M. M., Guerra, D., Burger, J. A., Schermer, E. E., Verheul, K. D., van der Velde, N., van der Kooi, A., van Schooten, J., van Breemen, M. J., … van Gils, M. J. (2020). Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science (New York, N.Y.)*, *369*(6504), 643–650. https://doi.org/10.1126/science.abc5902

Burkard, C., Verheije, M. H., Wicht, O., van Kasteren, S. I., van Kuppeveld, F. J., Haagmans, B. L., Pelkmans, L., Rottier, P. J., Bosch, B. J., & de Haan, C. A. (2014). Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS pathogens*, *10*(11), e1004502. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502

Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Jr, Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science (New York, N.Y.)*, *369*(6511), 1586–1592. https://doi.org/10.1126/science.abd4251

Cerutti, G., Guo, Y., Zhou, T., Gorman, J., Lee, M., Rapp, M., Reddem, E. R., Yu, J., Bahna, F., Bimela, J., Huang, Y., Katsamba, P. S., Liu, L., Nair, M. S., Rawi, R., Olia, A. S., Wang, P., Zhang, B., Chuang, G. Y., Ho, D. D., … Shapiro, L. (2021). Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies directed against spike N-terminal domain target a single supersite. *Cell host & microbe*, *29*(5), 819–833.e7. https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.005

Chang, C. K., Chen, C. M., Chiang, M. H., Hsu, Y. L., & Huang, T. H. (2013). Transient oligomerization of the SARS-CoV N protein--implication for virus ribonucleoprotein packaging. *PloS one*, *8*(5), e65045. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065045

Chapman P. B. (1995). Anti-idiotypic monoclonal antibody cancer vaccines. *Seminars in cancer biology*, *6*(6), 367–374. https://doi.org/10.1016/1044-579x(95)90006-3

Chen, C. Y., Chang, C. K., Chang, Y. W., Sue, S. C., Bai, H. I., Riang, L., Hsiao, C. D., & Huang, T. H. (2007). Structure of the SARS coronavirus nucleocapsid protein RNA-binding dimerization domain suggests a mechanism for helical packaging of viral RNA. *Journal of molecular biology*, *368*(4), 1075–1086. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.069

Cheng, P. K., Wong, D. A., Tong, L. K., Ip, S. M., Lo, A. C., Lau, C. S., Yeung, E. Y., & Lim, W. W. (2004). Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet (London, England)*, *363*(9422), 1699–1700. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16255-7

Chi, X., Yan, R., Zhang. J., Zhang, G. (2020). A potent neutralizing human antibody reveals the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2 as a site of vulnerability. *Science* 369:650–55. https://doi.org/ 10.1101/2020.05.08.083964.

Chilamakuri, R., & Agarwal, S. (2021). COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells*, *10*(2), 206. https://doi.org/10.3390/cells10020206

Chong, S. L., Mou, D. G., Ali, A. M., Lim, S. H., & Tey, B. T. (2008). Cell growth, cell-cycle progress, and antibody production in hybridoma cells cultivated under mild hypothermic conditions. *Hybridoma (2005)*, *27*(2), 107–111. https://doi.org/10.1089/hyb.2007.0548

Cleveland, W. L., Wassermann, N. H., Sarangarajan, R., Penn, A. S., & Erlanger, B. F. (1983). Monoclonal antibodies to the acetylcholine receptor by a normally functioning auto-anti-idiotypic mechanism. *Nature*, *305*(5929), 56–57. https://doi.org/10.1038/305056a0

Creech, C. B., Anderson, E., Berthaud, V., Yildirim, I., Atz, A. M., Melendez Baez, I., Finkelstein, D., Pickrell, P., Kirstein, J., Yut, C., Blair, R., Clifford, R. A., Dunn, M., Campbell, J. D., Montefiori, D. C., Tomassini, J. E., Zhao, X., Deng, W., Zhou, H., Ramirez Schrempp, D., … KidCOVE Study Group (2022). Evaluation of mRNA-1273 Covid-19 Vaccine in Children 6 to 11 Years of Age. *The New England journal of medicine*, *386*(21), 2011–2023. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2203315

Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, *17*(3), 181–192. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9

Çakır, E., Saydan, D., Gülbagcı, B., Özen, M., Uğurlu, I., Demirci, A., Bilir, F., Hacıbekiroglu, I., Yıldız, N., Akcali, S., Altindis, M., Varım, C., Yaylaci, S., & Bilir, C. (2023). Comparison of immunogenicity for Sinovac-CoronaVac vaccine vs. natural infection during cancer treatment. *European review for medical and pharmacological sciences*, *27*(9), 4309–4315. https://doi.org/10.26355/eurrev_202305_32341

de Marco A. (2011). Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microbial cell factories*, *10*, 44. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-44

de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., & Munster, V. J. (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature reviews. Microbiology*, *14*(8), 523–534. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81

Delves, P. J., Lund, T., & Roitt, I. M. (1997). Can epitope-focused vaccines select advantageous immune responses?. *Molecular medicine today*, *3*(2), 55–60. https://doi.org/10.1016/s1357-4310(96)20036-x

Demirkan, E., Kut, D., Sevgi, T., Dogan, M., & Baygin, E. (2019). Investigation of effects of protease enzyme produced by *Bacillus subtilis* 168 E6-5 and commercial enzyme on physical properties of woolen fabric. *The Journal of The Textile Institute*, *111*(1), 26–35. https://doi.org/10.1080/00405000.2019.1624069

Deshpande, G. R., Yadav, P. D., Abraham, P., Nyayanit, D. A., Sapkal, G. N., Shete, A. M., Gupta, N., Vadrevu, K. M., Ella, R., Panda, S., & Bhargava, B. (2022). Booster dose of the inactivated COVID-19 vaccine BBV152 (Covaxin) enhances the neutralizing antibody response against Alpha, Beta, Delta and Omicron variants of concern. *Journal of travel medicine*, *29*(3), taac039. https://doi.org/10.1093/jtm/taac039

Devlin, T.M. 2020. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, (5th ed.); *Wiley & Sons: New York*, NY, USA.

Dinesh, D. C., Chalupska, D., Silhan, J., Koutna, E., Nencka, R., Veverka, V., & Boura, E. (2020). Structural basis of RNA recognition by the SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein. *PLoS pathogens*, *16*(12), e1009100. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009100

Dong, E., Du, H., & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet. Infectious diseases*, *20*(5), 533–534. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1

Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., & Jiang, S. (2009). The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nature reviews. Microbiology*, *7*(3), 226–236. https://doi.org/10.1038/nrmicro2090

Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (30), 1431. https://doi.org/10.3791/1431

El Abd, Y., Tabll, A., Smolic, R., & Smolic, M. (2022). Mini-review: The market growth of diagnostic and therapeutic monoclonal antibodies- SARS CoV-2 as an example. *Human antibodies*, *30*(1), 15–24. https://doi.org/10.3233/HAB-211513

Fan, H., Ooi, A., Tan, Y. W., Wang, S., Fang, S., Liu, D. X., & Lescar, J. (2005). The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure (London, England : 1993)*, *13*(12), 1859–1868. https://doi.org/10.1016/j.str.2005.08.021

Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Candido, D. D. S., Mishra, S., Crispim, M. A. E., Sales, F. C. S., Hawryluk, I., McCrone, J. T., Hulswit, R. J. G., Franco, L. A. M., Ramundo, M. S., de Jesus, J. G., Andrade, P. S., Coletti, T. M., Ferreira, G. M., Silva, C. A. M., Manuli, E. R., Pereira, R. H. M., … Sabino, E. C. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science (New York, N.Y.)*, *372*(6544), 815–821. https://doi.org/10.1126/science.abh2644

Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1282*, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

Finberg, R. W., & Ertl, H. C. (1986). Use of T cell-specific anti-idiotypes to immunize against viral infections. *Immunological reviews*, *90*, 129–155. https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1986.tb01481.x

Flanagan, R. J., & Jones, A. L. (2004). Fab antibody fragments: some applications in clinical toxicology. *Drug safety*, *27*(14), 1115–1133. https://doi.org/10.2165/00002018-200427140-00004

Flores-Vega, V. R., Monroy-Molina, J. V., Jiménez-Hernández, L. E., Torres, A. G., Santos-Preciado, J. I., & Rosales-Reyes, R. (2022). SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. *Viruses*, *14*(4), 653. https://doi.org/10.3390/v14040653

Fonseca, D. C. S. C., Rocha, M. C. B., Pereira, L. A., Botega, L. P., Cutrim, S. C. P. F., Silva, F. V., Batista, F. D., Rêgo, A. S., Falcai, Â., Lima-Neto, L. G., Santos, A. P. S. A., Carvalho, R. C., & Sousa, E. M. (2022). Decrease in $CD8^{+}CD45^{+}CCR7^{+}CD62L^{+}$ T cells in individuals vaccinated with Sinovac-CoronaVac following COVID-19 infection. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, *242*, 109092. https://doi.org/10.1016/j.clim.2022.109092

Foon, K. A., Chakraborty, M., John, W. J., Sherratt, A., Köhler, H., & Bhattacharya-Chatterjee, M. (1995). Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotype antibody vaccine. *The Journal of clinical investigation*, *96*(1), 334–342. https://doi.org/10.1172/JCI118039

Forni, G., Mantovani, A., & COVID-19 Commission of Accademia Nazionale dei Lincei, Rome (2021). COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell death and differentiation*, *28*(2), 626–639. https://doi.org/10.1038/s41418-020-00720-9

Francis M. J. (2018). Recent Advances in Vaccine Technologies. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, *48*(2), 231–241. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.002

Fredriksen, A. B., Sandlie, I., & Bogen, B. (2012). Targeted DNA vaccines for enhanced induction of idiotype-specific B and T cells. *Frontiers in oncology*, *2*, 154. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00154

Gajdosik Z. (2014). Racotumomab- a novel anti-idiotype monoclonal antibody vaccine for the treatment of cancer. *Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)*, *50*(4), 301–307. https://doi.org/10.1358/dot.2014.50.4.2116670

Galfrè, G., & Milstein, C. (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in enzymology*, *73*(Pt B), 3–46. https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)73054-4

Galloway, S. E., Paul, P., MacCannell, D. R., Johansson, M. A., Brooks, J. T., MacNeil, A., Slayton, R. B., Tong, S., Silk, B. J., Armstrong, G. L., Biggerstaff, M., & Dugan, V. G. (2021). Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, *70*(3), 95–99. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2

Gautret, P., Million, M., Jarrot, P. A., Camoin-Jau, L., Colson, P., Fenollar, F., Leone, M., La Scola, B., Devaux, C., Gaubert, J. Y., Mege, J. L., Vitte, J., Melenotte, C., Rolain, J. M., Parola, P., Lagier, J. C., Brouqui, P., & Raoult, D. (2020). Natural history of COVID-19 and therapeutic options. *Expert review of clinical immunology*, *16*(12), 1159–1184. https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1847640

Gordon, M., Patricio, M., Horne, L., Muston, A., Alston, S. R., Pammi, M., Thammasitboon, S., Park, S., Pawlikowska, T., Rees, E. L., Doyle, A. J., & Daniel, M. (2020). Developments in medical education in response to the COVID-19 pandemic: A rapid BEME systematic review: BEME Guide No. 63. *Medical teacher*, *42*(11), 1202–1215. https://doi.org/10.1080/0142159X.2020.1807484

Gouglas, D., Thanh Le, T., Henderson, K., Kaloudis, A., Danielsen, T., Hammersland, N. C., Robinson, J. M., Heaton, P. M., & Røttingen, J. A. (2018). Estimating the cost of vaccine development against epidemic infectious diseases: a cost minimisation study. *The Lancet. Global health*, *6*(12), e1386–e1396. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30346-2

Graña, C., Ghosn, L., Evrenoglou, T., Jarde, A., Minozzi, S., Bergman, H., Buckley, B. S., Probyn, K., Villanueva, G., Henschke, N., Bonnet, H., Assi, R., Menon, S., Marti, M., Devane, D., Mallon, P., Lelievre, J. D., Askie, L. M., Kredo, T., Ferrand, G., … Boutron, I. (2022). Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *The Cochrane database of systematic reviews*, *12*(12), CD015477. https://doi.org/10.1002/14651858.CD015477

Greenspan, N.S., & Bona, C.A. (1993). "Idiotypes: structure and immunogenicity". FASEB Journal, 7 (14), 437–444.

Gui, M., Song, W., Zhou, H., Xu, J., Chen, S., Xiang, Y., & Wang, X. (2017). Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell research*, *27*(1), 119–129. https://doi.org/10.1038/cr.2016.152

Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & George, A. J. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature reviews. Drug discovery*, *9*(4), 325–338. https://doi.org/10.1038/nrd3003

He, R., Leeson, A., Ballantine, M., Andonov, A., Baker, L., Dobie, F., Li, Y., Bastien, N., Feldmann, H., Strocher, U., Theriault, S., Cutts, T., Cao, J., Booth, T. F., Plummer, F. A., Tyler, S., & Li, X. (2004). Characterization of protein-protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus. *Virus research*, *105*(2), 121–125. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.05.002

Heffron, A. S., McIlwain, S. J., Amjadi, M. F., Baker, D. A., Khullar, S., Armbrust, T., Halfmann, P. J., Kawaoka, Y., Sethi, A. K., Palmenberg, A. C., Shelef, M. A., O'Connor, D. H., & Ong, I. M. (2021). The landscape of antibody binding in SARS-CoV-2 infection. *PLOS Biology*, *19*(6). https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001265

Henderson, R., Edwards, R. J., Mansouri, K., Janowska, K., Stalls, V., Gobeil, S. M. C., Kopp, M., Li, D., Parks, R., Hsu, A. L., Borgnia, M. J., Haynes, B. F., & Acharya, P. (2020). Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation. *Nature structural & molecular biology*, *27*(10), 925–933. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0479-4

Hiernaux J. R. (1988). Idiotypic vaccines and infectious diseases. *Infection and immunity*, *56*(6), 1407–1413. https://doi.org/10.1128/iai.56.6.1407-1413.1988

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271–280.e8. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052

Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., … Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, *395*(10223), 497–506. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5

Huang, J. Y., Ward, R. E., & Kohler, H. (1988). Biological mimicry of antigenic stimulation: analysis of the in vivo antibody responses induced by monoclonal anti-idiotypic antibodies. *Immunology*, *63*(1), 1–8.

Huang, Q., Yu, L., Petros, A. M., Gunasekera, A., Liu, Z., Xu, N., Hajduk, P., Mack, J., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2004). Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry*, *43*(20), 6059–6063. https://doi.org/10.1021/bi036155b

Huang, Y., Nguyen, A. W., Hsieh, C-L., Silva, R. P., Olaluwoye, O., Wilen, R., … (2021). Identification of a conserved neutralizing epitope present on spike proteins from all highly pathogenic coronaviruses. bioRxiv 428824. https://doi.org/10.1101/2021.01.31.428824

Hui SW, Stenger DA (1993). Electrofusion of cells: Hybridoma production by electrofusion and Polyethylen glycol. Methods in Enzymology, (220), 212-227.

ICTV 9th Report (2011). ICTV. (n.d.). Retrieved September 16, 2021, from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/

ICTV. (n.d.). Retrieved September 16, 2021, from https://talk.ictvonline.org/

Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *23*(1), 3–20. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x

Janeway, C. A., Jr, Sakato, N., & Eisen, H. N. (1975). Recognition of immunoglobulin idiotypes by thymus-derived lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(6), 2357–2360. https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2357

Jayaram, H., Fan, H., Bowman, B. R., Ooi, A., Jayaram, J., Collisson, E. W., Lescar, J., & Prasad, B. V. (2006). X-ray structures of the N- and C-terminal domains of a coronavirus nucleocapsid protein: implications for nucleocapsid formation. *Journal of virology*, *80*(13), 6612–6620. https://doi.org/10.1128/JVI.00157-06

Jeewandara, C., Aberathna, I. S., Pushpakumara, P. D., Kamaladasa, A., Guruge, D., Wijesinghe, A., Gunasekera, B., Tanussiya, S., Kuruppu, H., Ranasinghe, T., Dayarathne, S., Dissanayake, O., Gamalath, N., Ekanayake, D., Jayamali, J., Jayathilaka, D., Dissanayake, M., Madusanka, D., Jayadas, T. T., Mudunkotuwa, A., … Malavige, G. N. (2022). Immune responses to Sinopharm/BBIBP-CorV in individuals in Sri Lanka. *Immunology*, *167*(2), 275–285. https://doi.org/10.1111/imm.13536

Jennewein, M. F., MacCamy, A. J., Akins, N. R., Feng, J., Homad, L. J., Hurlburt, N. K., Seydoux, E., Wan, Y. H., Stuart, A. B., Edara, V. V., Floyd, K., Vanderheiden, A., Mascola, J. R., Doria-Rose, N., Wang, L., Yang, E. S., Chu, H. Y., Torres, J. L., Ozorowski, G., Ward, A. B., … Stamatatos, L. (2021). Isolation and characterization of cross-neutralizing coronavirus antibodies from COVID-19+ subjects. *Cell reports*, *36*(2), 109353. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109353

Jerne N. K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Annales d'immunologie*, *125C*(1-2), 373–389.

Kang, S., Yang, M., Hong, Z., Zhang, L., Huang, Z., Chen, X., He, S., Zhou, Z., Zhou, Z., Chen, Q., Yan, Y., Zhang, C., Shan, H., & Chen, S. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, *10*(7), 1228–1238. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.009

Karabiber, E., Atik, Ö., Tepetam, F. M., Ergan, B., İlki, A., Karakoç Aydıner, E., Özen, A., Özyer, F., & Barış, S. (2023). Clinical and immunological outcomes of SARS-CoV-2 infection in patients with inborn errors of immunity receiving different brands and doses of COVID-19 vaccines. İmmün sistemin doğuştan gelen kusurları olan hastalarda farklı marka ve dozlarda uygulanan SARS-CoV-2 aşısı sonrası SARSCoV-2 enfeksiyonunun klinik ve immünolojik sonuçları. *Tuberkuloz ve toraks*, *71*(3), 236–249. https://doi.org/10.5578/tt.20239705

Ke, Z., Oton, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., McKeane, L., Nakane, T., Zivanov, J., Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Lu, J. M., Peukes, J., Xiong, X., Kräusslich, H. G., Scheres, S. H. W., Bartenschlager, R., & Briggs, J. A. G. (2020). Structures and distributions of

SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, *588*(7838), 498–502. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2

Keay, L., & Wildi, B. S. (1970). Proteases of the genus Bacillus. I. Neutral proteases. *Biotechnology and bioengineering*, *12*(2), 179–212. https://doi.org/10.1002/bit.260120205

Kelley, B. (2009). Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*, *1*(5), 443–452. https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9448

Kieber-Emmons, T., Monzavi-Karbassi, B., Pashov, A., Saha, S., Murali, R., & Kohler, H. (2012). The promise of the anti-idiotype concept. *Frontiers in oncology*, *2*, 196. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00196

King, C. A., Wills, M. R., Hamblin, T. J., & Stevenson, F. K. (1993). Idiotypic IgM on a B-cell surface requires processing for recognition by anti-idiotypic T cells. *Cellular immunology*, *147*(2), 411–424. https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1080

Klasse, P. J., & Moore, J. P. (2020). Antibodies to SARS-CoV-2 and their potential for therapeutic passive immunization. *eLife*, *9*, e57877. https://doi.org/10.7554/eLife.57877

Kohler, H., Pashov, A., & Kieber-Emmons, T. (2019). The Promise of Anti-idiotype Revisited. *Frontiers in immunology*, *10*, 808. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00808

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*(5517), 495–497. https://doi.org/10.1038/256495a0

Kubo, H., Yamada, Y. K., & Taguchi, F. (1994). Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. *Journal of virology*, *68*(9), 5403–5410. https://doi.org/10.1128/JVI.68.9.5403-5410.1994

Kumar G. (2018). Principle and Method of Silver Staining of Proteins Separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1853*, 231–236. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8745-0_26

LactMed, COVID-19 Vaccines. (2024). In *Drugs and Lactation Database (LactMed®)*. National Institute of Child Health and Human Development.

Ladjemi, M. Z. (2012). Anti-idiotypic antibodies as cancer vaccines: achievements and future improvements. *Frontiers in oncology*, *2*, 158. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00158

Lamarre, A., Lecomte, J., & Talbot, P. J. (1991). Antiidiotypic vaccination against murine coronavirus infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *147*(12), 4256–4262.

Lee, C. Y., Lin, R. T. P., Renia, L., & Ng, L. F. P. (2020). Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Frontiers in immunology*, *11*, 879. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00879

Lee, L., Samardzic, K., Wallach, M., Frumkin, L. R., & Mochly-Rosen, D. (2021). Immunoglobulin Y for Potential Diagnostic and Therapeutic Applications in Infectious Diseases. *Frontiers in immunology*, *12*, 696003. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.696003

LELE, Uma; GOSWAMI, Sambuddha. Lessons from COVID-19. Medical Research Archives, [S.l.], v. 12, n. 2, mar. 2024. ISSN 2375-1924. Available at: <https://esmed.org/MRA/mra/article/view/5039>. Date accessed: 24 may 2024. doi: https://doi.org/10.18103/mra.v12i2.5039

Lemke H. (2018). Immune Response Regulation by Antigen Receptors' Clone-Specific Nonself Parts. *Frontiers in immunology*, *9*, 1471. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01471

Lesinski, G. B., & Westerink, M. A. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *Journal of microbiological methods*, *47*(2), 135–149. https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00290-1

Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature microbiology*, *5*(4), 562–569. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y

Li F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology*, *3*(1), 237–261. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301

Li, D., Edwards, R. J., Manne, K., Martinez, D. R., Schäfer, A., Alam, S. M., Wiehe, K., Lu, X., Parks, R., Sutherland, L. L., Oguin, T. H., 3rd, McDanal, C., Perez, L. G., Mansouri, K., Gobeil, S. M. C., Janowska, K., Stalls, V., Kopp, M., Cai, F., Lee, E., … Saunders, K. O. (2021). In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies. *Cell*, *184*(16), 4203–4219.e32.

Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J. H., Moore, M. J., Luo, S., Wong, S. K., Huang, I. C., Xu, K., Vasilieva, N., Murakami, A., He, Y., Marasco, W. A., Guan, Y., Choe, H., & Farzan, M. (2005). Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *The EMBO journal*, *24*(8), 1634–1643. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600640

Liu, H., & Wilson, I. A. (2022). Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunological reviews*, *310*(1), 76–92. https://doi.org/10.1111/imr.13084

López-Requena, A., Burrone, O. R., & Cesco-Gaspere, M. (2012). Idiotypes as immunogens: facing the challenge of inducing strong therapeutic immune responses against the variable region of immunoglobulins. *Frontiers in oncology*, *2*, 159. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00159

Lurie, N., Saville, M., Hatchett, R., & Halton, J. (2020). Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. *The New England journal of medicine*, *382*(21), 1969–1973. https://doi.org/10.1056/NEJMp2005630

Ma, J., Zhou, L., & Wang, D. (2002). Functional mimicry of an anti-idiotypic antibody to nominal antigen on cellular response. *Japanese journal of cancer research : Gann*, *93*(1), 78–84. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2002.tb01203.x

Magliani, W., Conti, S., Salati, A., Arseni, S., Ravanetti, L., Frazzi, R., & Polonelli, L. (2003). Biotechnological approaches to the production of idiotypic vaccines and antiidiotypic antibiotics. *Current pharmaceutical biotechnology*, *4*(2), 91–97. https://doi.org/10.2174/1389201033489874

Martinez, D. R., Schaefer, A., Gobeil, S., Li, D., De la Cruz, G., Parks, R., Lu, X., Barr, M., Manne, K., Mansouri, K., Edwards, R. J., Yount, B., Anasti, K., Montgomery, S. A., Shen, S., Zhou, T., Kwong, P. D., Graham, B. S., Mascola, J. R., Montefiori, D. C., … Baric, R. S. (2021). A broadly neutralizing antibody protects against SARS-CoV, pre-emergent bat CoVs, and SARS-CoV-2 variants in mice. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2021.04.27.441655. https://doi.org/10.1101/2021.04.27.441655

Maruyama, H., Zaloudik, J., Li, W., Sperlagh, M., Koido, T., Somasundaram, R., Scheck, S., Prewett, M., & Herlyn, D. (2000). Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotype vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, *49*(3), 123–132. https://doi.org/10.1007/s002620050611

Max EE. (1984). Immunoglobulins: molecular genetics. In: Paul WE, ed. Fundamental immunology. New York: Raven Press.

Mitra-Kaushik, S., Shaila, M. S., Karande, A. K., & Nayak, R. (2001). Idiotype and antigen-specific T cell responses in mice on immunization with antigen, antibody, and anti-idiotypic antibody. *Cellular immunology*, *209*(2), 109–119. https://doi.org/10.1006/cimm.2001.1794

Moe, G. R., Tan, S., & Granoff, D. M. (1999). Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of Neisseria meningitidis serogroup B disease. *FEMS immunology and medical microbiology*, *26*(3-4), 209–226. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01392.x

Monestier, M., Manheimer-Lory, A., Bellon, B., Painter, C., Dang, H., Talal, N., Zanetti, M., Schwartz, R., Pisetsky, D., & Kuppers, R. (1986). Shared idiotypes and restricted immunoglobulin variable region heavy chain genes characterize murine autoantibodies of various specificities. *The Journal of clinical investigation*, *78*(3), 753–759. https://doi.org/10.1172/JCI112637

Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tőzsér, J. (2013). Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, *3*(4), 923–942. https://doi.org/10.3390/biom3040923

Mukerjee, S., McKnight, M. E., & Glassy, M. C. (1998). Immunoscreening protocols for the identification of clinically useful antibodies and antigens. *Expert opinion on investigational drugs*, *7*(3), 373–389. https://doi.org/10.1517/13543784.7.3.373

Muller, S., Parsons, M. S., Kohler, H., & Grant, M. (2016). The Significance of a Common Idiotype (1F7) on Antibodies against Human Immune Deficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus. *Frontiers in oncology*, *6*, 11. https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00011

Naveed, A., Naz, D., & Rahman, S. U. (2021). Idiotype/anti-idiotype antibodies: as a glorious savior in COVID-19 pandemics. *Translational medicine communications*, *6*(1), 18. https://doi.org/10.1186/s41231-021-00097-y

Naveed, A., Rahman, S. U., Arshad, M. I., & Aslam, B. (2018). Immune Modulatory Potential of Anti-idiotype Antibodies as a Surrogate of Foot-and-Mouth Disease Virus Antigen. *mSphere*, *3*(5), e00522-18. https://doi.org/10.1128/mSphere.00522-18

Naveed, A., Rahman, S. U., Arshad, M. I., (2018). Recapitulation of the anti-idiotype antibodies as vaccine candidate. Translational Medicine Communications, 3, 1–7. https://doi.org/10.1186/s41231-018-0021-4

Nayak, R., Mitra-Kaushik, S., & Shaila, M. S. (2001). Perpetuation of immunological memory: a relay hypothesis. *Immunology*, *102*(4), 387–395. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01205.x

Nemazee, D. A., & Sato, V. L. (1982). Enhancing antibody: a novel component of the immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(12), 3828–3832. https://doi.org/10.1073/pnas.79.12.3828

Nickol, M. E., & Kindrachuk, J. (2019). A year of terror and a century of reflection: perspectives on the great influenza pandemic of 1918-1919. *BMC infectious diseases*, *19*(1), 117. https://doi.org/10.1186/s12879-019-3750-8

Padron-Regalado E. (2020). Vaccines for SARS-CoV-2: Lessons from Other Coronavirus Strains. *Infectious diseases and therapy*, *9*(2), 255–274. https://doi.org/10.1007/s40121-020-00300-x

Pan, Y., Yuhasz, S. C., & Amzel, L. M. (1995). Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *9*(1), 43–49. https://doi.org/10.1096/fasebj.9.1.7821758

Paque, R. E., & Miller, R. (1991). Autoanti-idiotypes exhibit mimicry of myocyte antigens in virus-induced myocarditis. *Journal of virology*, *65*(1), 16–22. https://doi.org/10.1128/JVI.65.1.16-22.1991

Phoksawat, W., Nithichanon, A., Lerdsamran, H., Wongratanacheewin, S., Meesing, A., Pipattanaboon, C., Kanthawong, S., Aromseree, S., Yordpratum, U., Laohaviroj, M., Lulitanond, V., Chareonsudjai, S., Puthavathana, P., Kamuthachad, L., Kamsom, C., Thapphan, C., Salao, K., Chonlapan, A., Nawawishkarun, P., Prasertsopon, J., … Phanthanawiboon, S. (2022). Phenotypic and functional changes of T cell subsets after CoronaVac vaccination. Vaccine, 40(48), 6963–6970. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.10.017

Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Walls, A. C., Beltramello, M., Silacci-Fregni, C., Pinto, D., Rosen, L. E., Bowen, J. E., Acton, O. J., Jaconi, S., Guarino, B., Minola, A., Zatta, F., Sprugasci, N., Bassi, J., Peter, A., De Marco, A., Nix, J. C., … Veesler, D. (2020). Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, *183*(4), 1024–1042.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037

Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., Bianchi, S., Jaconi, S., Culap, K., Zatta, F., De Marco, A., Peter, A., Guarino, B., Spreafico, R., Cameroni, E., Case, J. B., Chen, R. E., Havenar-Daughton, C., Snell, G., Telenti, A., Virgin, H. W., … Corti, D. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, *583*(7815), 290–295. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y

Plotz P. H. (1983). Autoantibodies are anti-idiotype antibodies to antiviral antibodies. *Lancet (London, England)*, *2*(8354), 824–826. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(83)90740-7

Poljak R. J. (1994). An idiotope--anti-idiotope complex and the structural basis of molecular mimicking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(5), 1599–1600. https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1599

Pride, M. W., Shi, H., Anchin, J. M., Linthicum, D. S., LoVerde, P. T., Thakur, A., & Thanavala, Y. (1992). Molecular mimicry of hepatitis B surface antigen by an anti-idiotype-derived synthetic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(24), 11900–11904. https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11900

Rader C. (2009). Overview on concepts and applications of Fab antibody fragments. *Current protocols in protein science*, *Chapter 6*. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0609s55

Rajewsky K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, *381*(6585), 751–758. https://doi.org/10.1038/381751a0

Ramachandran, S., Satapathy, S. R., & Dutta, T. (2022). Delivery Strategies for mRNA Vaccines. *Pharmaceutical medicine*, *36*(1), 11–20. https://doi.org/10.1007/s40290-021-00417-5

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *62*(3), 597–635. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998

Rappazzo, C. G., Tse, L. V., Kaku, C. I., Wrapp, D., Sakharkar, M., Huang, D., Deveau, L. M., Yockachonis, T. J., Herbert, A. S., Battles, M. B., O'Brien, C. M., Brown, M. E., Geoghegan, J. C., Belk, J., Peng, L., Yang, L., Hou, Y., Scobey, T. D., Burton, D. R., Nemazee, D., … Walker, L. M. (2021). Broad and potent activity against SARS-like viruses by an engineered human monoclonal antibody. *Science (New York, N.Y.)*, *371*(6531), 823–829. https://doi.org/10.1126/science.abf4830

Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal*, *290 (Pt 1)*(Pt 1), 205–218. https://doi.org/10.1042/bj2900205

Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, *42*(Database issue), D503–D509. https://doi.org/10.1093/nar/gkt953

Rehman, S. U., Shafique, L., Ihsan, A., & Liu, Q. (2020). Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *9*(3), 240. https://doi.org/10.3390/pathogens9030240

Reitan, S. K., & Hannestad, K. (2001). The primary IgM antibody repertoire: a source of potent idiotype immunogens. *European journal of immunology*, *31*(7), 2143–2153. https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<2143::aid-immu2143>3.0.co;2-1

Reverberi, R., & Reverberi, L. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, *5*(4), 227–240. https://doi.org/10.2450/2007.0047-07

Rojas, R., & Apodaca, G. (2002). Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *3*(12), 944–955. https://doi.org/10.1038/nrm972

Rossen, J. W., de Beer, R., Godeke, G. J., Raamsman, M. J., Horzinek, M. C., Vennema, H., & Rottier, P. J. (1998). The viral spike protein is not involved in the polarized sorting of coronaviruses in epithelial cells. *Journal of virology*, *72*(1), 497–503. https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.497-503.1998

Rudan, I., Adeloye, D., & Sheikh, A. (2022). COVID-19: vaccines, efficacy and effects on variants. *Current opinion in pulmonary medicine*, *28*(3), 180–191. https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000868

Ruoslahtı, E. (1976), Antigen-Antibody Interaction, Antibody Affinity, and Dissociation of Immune Complexes. *Scandinavian Journal of Immunology*. 5: 3-7. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1976.tb03831.x

Sabatos-Peyton, C. A., Verhagen, J., & Wraith, D. C. (2010). Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Current opinion in immunology*, *22*(5), 609–615. https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.006

Sanders, J. M., Monogue, M. L., Jodlowski, T. Z., & Cutrell, J. B. (2020). Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, *323*(18), 1824–1836. https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019

Sankaran, D., Nakra, N., Cheema, R., Blumberg, D., & Lakshminrusimha, S. (2021). Perinatal SARS-CoV-2 Infection and Neonatal COVID-19: A 2021 Update. *NeoReviews*, *22*(5), e284–e295. https://doi.org/10.1542/neo.22-5-e1001

Sapkal, G. N., Yadav, P. D., Ella, R., Deshpande, G. R., Sahay, R. R., Gupta, N., Vadrevu, K. M., Abraham, P., Panda, S., & Bhargava, B. (2021). Inactivated COVID-19 vaccine BBV152/COVAXIN effectively neutralizes recently emerged B.1.1.7 variant of SARS-CoV-2. Journal of travel medicine, 28(4), taab051. https://doi.org/10.1093/jtm/taab051

Sarıtaş, Ö., Yorgun, M. A., & Gökpınar, E. (2023). Effects of Sinovac-Coronavac and Pfizer-BioNTech mRNA vaccines on choroidal and retinal vascular system. Photodiagnosis and photodynamic therapy, 43, 103702. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103702

Satarker, S., & Nampoothiri, M. (2020). Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. *Archives of medical research*, *51*(6), 482–491. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.05.012

Shabu, A., & Nishtala, P. S. (2023). Safety outcomes associated with the moderna COVID-19 vaccine (mRNA-1273): a literature review. Expert review of vaccines, 22(1), 393–409. https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2209177

Shang, B., Wang, X. Y., Yuan, J. W., Vabret, A., Wu, X. D., Yang, R. F., Tian, L., Ji, Y. Y., Deubel, V., & Sun, B. (2005). Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus. *Biochemical and biophysical research communications*, *336*(1), 110–117. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.032

Shapiro, A. L., & Maizel, J. V., Jr (1969). Molecular weight estimation of polypeptides by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: further data concerning resolving power and general considerations. *Analytical biochemistry*, *29*(3), 505–514. https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90335-2

Slabakova Y, Gerenska D, Ivanov N, Velikova T. (2022). Immune titers of protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: are we there yet? Explor Immunol.;2:9–24.

Stewart S.J (2001). Monoclonal antibody production, In: Basic methods in antibody production and characterization, Howard G.C., Bethell D.R. (Eds.), CRC Press, LLC. USA, 2001: 51-67.

Strohl, W. R., Ku, Z., An, Z., Carroll, S. F., Keyt, B. A., & Strohl, L. M. (2022). Passive Immunotherapy Against SARS-CoV-2: From Plasma-Based Therapy to Single Potent Antibodies in the Race to Stay Ahead of the Variants. BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy, 36(3), 231–323. https://doi.org/10.1007/s40259-022-00529-7.

Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. BioTechniques, 75(3), 99–114. https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034

Tabatabaei, M. S., & Ahmed, M. (2022). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2508, 115–134. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10

Tan, Y. W., Fang, S., Fan, H., Lescar, J., & Liu, D. X. (2006). Amino acid residues critical for RNA-binding in the N-terminal domain of the nucleocapsid protein are essential determinants for the infectivity of coronavirus in cultured cells. *Nucleic acids research*, *34*(17), 4816–4825. https://doi.org/10.1093/nar/gkl650

Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., … de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, *592*(7854), 438–443. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9

Teo S. P. (2022). Review of COVID-19 mRNA Vaccines: BNT162b2 and mRNA-1273. *Journal of pharmacy practice*, *35*(6), 947–951. https://doi.org/10.1177/08971900211009650

ter Meulen, J., van den Brink, E. N., Poon, L. L., Marissen, W. E., Leung, C. S., Cox, F., Cheung, C. Y., Bakker, A. Q., Bogaards, J. A., van Deventer, E., Preiser, W., Doerr, H. W., Chow, V. T., de Kruif, J., Peiris, J. S., & Goudsmit, J. (2006). Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: synergy and coverage of escape mutants. *PLoS medicine*, *3*(7), e237. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030237

Thanavala Y. (1996). Novel approaches to vaccine development against HBV. *Journal of biotechnology*, *44*(1-3), 67–73. https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00117-4

To, K. K., Tsang, O. T., Leung, W. S., Tam, A. R., Wu, T. C., Lung, D. C., Yip, C. C., Cai, J. P., Chan, J. M., Chik, T. S., Lau, D. P., Choi, C. Y., Chen, L. L., Chan, W. M., Chan, K. H., Ip, J. D., Ng, A. C., Poon, R. W., Luo, C. T., Cheng, V. C., … Yuen, K. Y. (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet. Infectious diseases*, *20*(5), 565–574. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1

Tomita, M., & Tsumoto, K. (2011). Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, *3*(3), 371–380. https://doi.org/10.2217/imt.11.4

Tuccori, M., Ferraro, S., Convertino, I., Cappello, E., Valdiserra, G., Blandizzi, C., Maggi, F., & Focosi, D. (2020). Anti-SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies: clinical pipeline. *mAbs*, *12*(1), 1854149. https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1854149

Turoňová, B., Sikora, M., Schürmann, C., Hagen, W. J. H., Welsch, S., Blanc, F. E. C., von Bülow, S., Gecht, M., Bagola, K., Hörner, C., van Zandbergen, G., Landry, J., de Azevedo, N. T. D., Mosalaganti, S., Schwarz, A., Covino, R., Mühlebach, M. D., Hummer, G., Krijnse Locker, J., & Beck, M. (2020). In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science (New York, N.Y.)*, *370*(6513), 203–208. https://doi.org/10.1126/science.abd5223

Ujike, M., & Taguchi, F. (2015). Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, *7*(4), 1700–1725. https://doi.org/10.3390/v7041700

Uner, A., Gavalchin J., 2006 “Idiotypes”, eLS,.

Vani, J., Nayak, R., & Shaila, M. S. (2007). Maintenance of antigen-specific immunological memory through variable regions of heavy and light chains of anti-idiotypic antibody. *Immunology*, *120*(4), 486–496. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02519.x

Vázquez, A. M., Rodrèguez-Zhurbenko, N., & López, A. M. (2012). Anti-ganglioside anti-idiotypic vaccination: more than molecular mimicry. *Frontiers in oncology*, *2*, 170. https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00170

Venturini, A., Bresjanac, M., Vranac, T., Koren, S., Narat, M., Popović, M., & Curin Serbec, V. (2009). Anti-idiotypic antibodies: a new approach in prion research. *BMC immunology*, *10*, 16. https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-16

Vijayaraghavan, P., Lazarus, S., & Vincent, S. G. (2014). De-hairing protease production by an isolated Bacillus cereus strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. *Saudi journal of biological sciences*, *21*(1), 27–34. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.010

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature reviews. Microbiology*, *19*(3), 155–170. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6

Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., Geidelberg, L., Hinsley, W. R., Laydon, D. J., Dabrera, G., O'Toole, Á., Amato, R., Ragonnet-Cronin, M., Harrison, I., Jackson, B., Ariani, C. V., Boyd, O., Loman, N. J., McCrone, J. T., Gonçalves, S., Jorgensen, D., … Ferguson, N. M. (2021). Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*, *593*(7858), 266–269. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03470-x

Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281–292.e6. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058

Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet (London, England)*, *395*(10223), 470–473. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9

Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., Osterhaus, A. D. M. E., van Kuppeveld, F. J. M., Haagmans, B. L., Grosveld, F., & Bosch, B. J. (2020). A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nature communications*, *11*(1), 2251. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16256-y

Wang, H., Zhang, Y., Huang, B., Deng, W., Quan, Y., Wang, W., Xu, W., Zhao, Y., Li, N., Zhang, J., Liang, H., Bao, L., Xu, Y., Ding, L., Zhou, W., Gao, H., Liu, J., Niu, P., Zhao, L., Zhen, W., … Yang, X. (2020). Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell*, *182*(3), 713–721.e9. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008

Wang, L., Zhou, L., Ma, N., Wan, Y., Zhang, Y., Xu, B., & Qian, W. (2023). Real-time monitoring of papain digestion of antibodies immobilized with various strategies by optical interferometry. *International journal of biological macromolecules*, *235*, 123872. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123872

Wang, Q., Wu, J., Wang, H., Gao, Y., Liu, Q., Mu, A., Ji, W., Yan, L., Zhu, Y., Zhu, C., Fang, X., Yang, X., Huang, Y., Gao, H., Liu, F., Ge, J., Sun, Q., Yang, X., Xu, W., Liu, Z., … Rao, Z. (2020). Structural Basis for RNA Replication by the SARS-CoV-2 Polymerase. *Cell*, *182*(2), 417–428.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.034

Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, *181*(4), 894–904.e9. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045

Watts, R. A., & Isenberg, D. A. (1988). Idiotypes and anti-idiotypes: what are they trying to tell us?. *Annals of the rheumatic diseases*, *47*(9), 705–707. https://doi.org/10.1136/ard.47.9.705

Wec, A. Z., Wrapp, D., Herbert, A. S., Maurer, D. P., Haslwanter, D., Sakharkar, M., Jangra, R. K., Dieterle, M. E., Lilov, A., Huang, D., Tse, L. V., Johnson, N. V., Hsieh, C. L., Wang, N., Nett, J. H., Champney, E., Burnina, I., Brown, M., Lin, S., Sinclair, M., … Walker, L. M. (2020). Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies. *Science (New York, N.Y.)*, *369*(6504), 731–736. https://doi.org/10.1126/science.abc7424

Weiss, S., & Bogen, B. (1989). B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(1), 282–286. https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.282

Wilder-Smith A. (2020). Dengue vaccine development: status and future. Entwicklung von Impfstoffen gegen Dengue: aktueller Stand und Zukunft. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, *63*(1), 40–44. https://doi.org/10.1007/s00103-019-03060-3

Wong, G., Liu, W., Liu, Y., Zhou, B., Bi, Y., & Gao, G. F. (2015). MERS, SARS, and Ebola: The Role of Super-Spreaders in Infectious Disease. *Cell host & microbe*, *18*(4), 398–401. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.013

World Health Organisation (WHO) 2021. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern.https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern

Wrapp, D., De Vlieger, D., Corbett, K. S., Torres, G. M., Wang, N., Van Breedam, W., Roose, K., van Schie, L., VIB-CMB COVID-19 Response Team, Hoffmann, M., Pöhlmann, S., Graham, B. S., Callewaert, N., Schepens, B., Saelens, X., & McLellan, J. S. (2020). Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell*, *181*(5), 1004–1015.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.031

Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2020.02.11.944462. https://doi.org/10.1101/2020.02.11.944462

Wu, Q., Zhang, Y., Lü, H., Wang, J., He, X., Liu, Y., Ye, C., Lin, W., Hu, J., Ji, J., Xu, J., Ye, J., Hu, Y., Chen, W., Li, S., Wang, J., Wang, J., Bi, S., & Yang, H. (2003). The E protein is a multifunctional membrane protein of SARS-CoV. Genomics, proteomics & bioinformatics, 1(2), 131–144. https://doi.org/10.1016/s1672-0229(03)01017-9

Wu, Z., Hu, Y., Xu, M., Chen, Z., Yang, W., Jiang, Z., Li, M., Jin, H., Cui, G., Chen, P., Wang, L., Zhao, G., Ding, Y., Zhao, Y., & Yin, W. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet. Infectious diseases*, *21*(6), 803–812. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30987-7

Xu, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., Zhong, W., & Hao, P. (2020). Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China. Life sciences*, *63*(3), 457–460. https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5

Xue, W., Orten, D. J., Abdelmagid, O. Y., Rider, M., Blecha, F., & Minocha, H. C. (1991). Anti-idiotypic antibodies mimic bovine viral diarrhea virus antigen. *Veterinary microbiology*, *29*(3-4), 201–212. https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90128-3

Yadav, P. D., Sapkal, G. N., Ella, R., Sahay, R. R., Nyayanit, D. A., Patil, D. Y., Deshpande, G., Shete, A. M., Gupta, N., Mohan, V. K., Abraham, P., Panda, S., & Bhargava, B. (2021). Neutralization of Beta and Delta variant with sera of COVID-19 recovered cases and vaccinees of inactivated COVID-19 vaccine BBV152/Covaxin. *Journal of travel medicine*, *28*(7), taab104. https://doi.org/10.1093/jtm/taab104

Ye, Q., West, A. M. V., Silletti, S., & Corbett, K. D. (2020). Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein science : a publication of the Protein Society*, *29*(9), 1890–1901. https://doi.org/10.1002/pro.3909

Yu, I. M., Oldham, M. L., Zhang, J., & Chen, J. (2006). Crystal structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein dimerization domain reveals evolutionary linkage between corona- and arteriviridae. *The Journal of biological chemistry*, *281*(25), 17134–17139. https://doi.org/10.1074/jbc.M602107200

Yuan, M., Wu, N. C., Zhu, X., Lee, C. D., So, R. T. Y., Lv, H., Mok, C. K. P., & Wilson, I. A. (2020). A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science (New York, N.Y.)*, *368*(6491), 630–633. https://doi.org/10.1126/science.abb7269

Yücel, F., Ertekin, Ö. (2017). Güncel Biyoteknoloji ve Uygulamaları" Kitap Bölümü: Bölüm 9, "Hibridoma Teknolojiler, (1. St ed.); sayfa 189-210, Ekim 2017, Erciyes Üniversitesi Kayseri, ISBN 978-605-67442-0-4.

Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., Mohammed, A., Zhao, C., Yang, Y., Xie, J., Ding, C., Ma, X., Weng, J., Gao, Y., He, H., & Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, *527*(3), 618–623. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.136

Zhang, P. C., Bai, C., Ho, P. K., Dai, Y., & Wu, Y. S. (1997). Observing interactions between the IgG antigen and anti-IgG antibody with AFM. *IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society*, *16*(2), 42–46. https://doi.org/10.1109/51.582175

Zhang, Y., Belayachi, J., Yang, Y., Fu, Q., Rodewald, L., Li, H., Yan, B., Wang, Y., Shen, Y., Yang, Q., Mu, W., Tang, R., Su, C., Xu, T., Obtel, M., Mhayi, A., Razine, R., Abouqal, R., Zhang, Y., & Yang, X. (2022). Real-world study of the effectiveness of BBIBP-CorV (Sinopharm) COVID-19 vaccine in the Kingdom of Morocco. *BMC public health*, *22*(1), 1584. https://doi.org/10.1186/s12889-022-14016-9

Zhao, X., Nicholls, J. M., & Chen, Y. G. (2008). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus nucleocapsid protein interacts with Smad3 and modulates transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*, *283*(6), 3272–3280. https://doi.org/10.1074/jbc.M708033200

Zhou, M., & Collisson, E. W. (2000). The amino and carboxyl domains of the infectious bronchitis virus nucleocapsid protein interact with 3' genomic RNA. *Virus research*, *67*(1), 31–39. https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00126-x

Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., … Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, *579*(7798), 270–273. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, *382*(8), 727–733. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017.

Zinkernagel, R. M., LaMarre, A., Ciurea, A., Hunziker, L., Ochsenbein, A. F., McCoy, K. D., Fehr, T., Bachmann, M. F., Kalinke, U., & Hengartner, H. (2001). Neutralizing antiviral antibody responses. *Advances in immunology*, *79*, 1–53. https://doi.org/10.1016/s0065-2776(01)79001-3