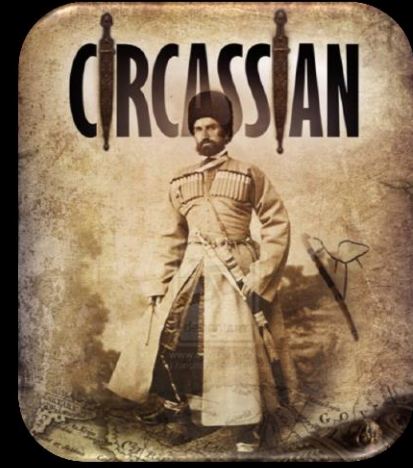
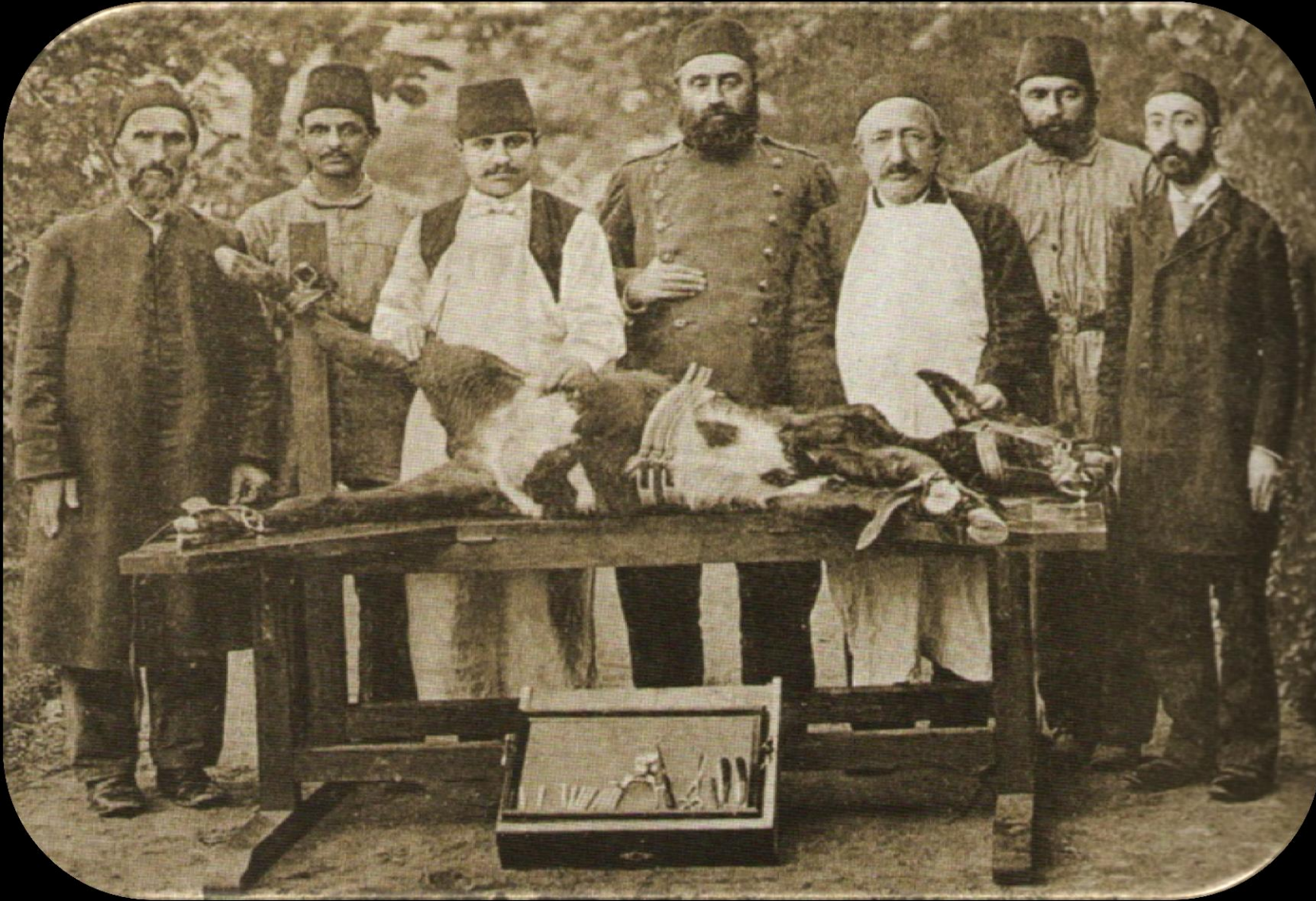




# COVID-19 Aşısı için Antijen keşfi ve DNA aşısı geliştirilmesi



Doç. Dr. Mert DÖŞKAYA  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi



**Atalarımız bu işi başarı ile yaptılar,  
Bizi yüzyıllarca korudular**





# COVID-19 Aşı Araştırma ve Geliştirme Grubu



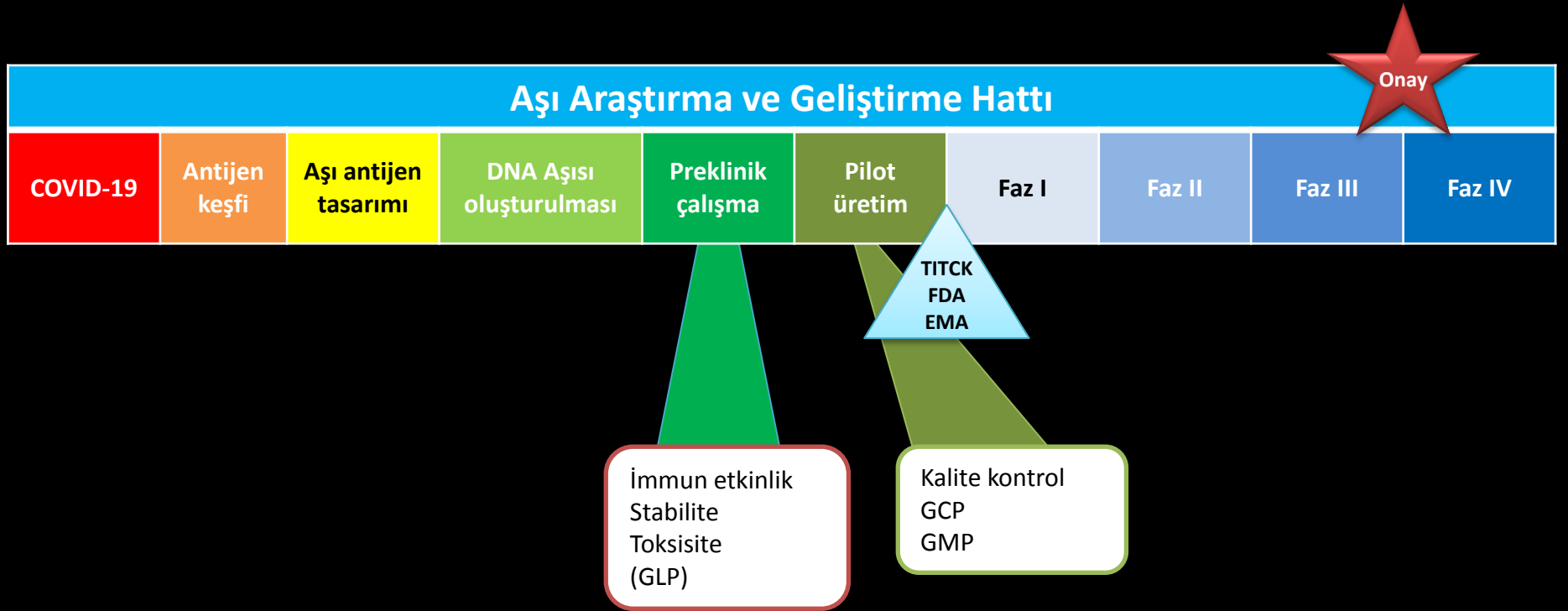
**2 Kamu Üniversitesi (EÜ-ARGEFAR, İKÇÜ), 2 Kamu Kurumu (THSK, BVK),  
1 Araştırma Merkezi (İBG), 2 Şirket (Nobel, Florabio) , 1 Yurtdışı Danışman (UMASS)**

	Unvanı, Adı, Soyadı	Projedeki Görevi*	Çalışmakta Olduğu Kurum/Kuruluş	Uzmanlık Alanı**
1	Prof. Dr. Ercüment Karasulu	Yürütücü	EÜ ARGEFAR	Eczacılık, Kalite kontrol
2	Doç. Dr. Mert Döşkaya	Araştırmacı	EÜTF Aşı Ar&Ge Lab	DNA aşısı Ar-Ge
3	Prof. Dr. A.Yüksel Gürüz	Araştırmacı	EÜTF Aşı Ar&Ge Lab	DNA aşısı Ar-Ge
4	Doç. Dr. Aysu D.Döşkaya	Araştırmacı	EÜTF Aşı Ar&Ge Lab	DNA aşısı Ar-Ge
5	Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan	Araştırmacı	EÜ Biyomühendislik ARGEFAR	Aşı Ar-Ge, Üretim, Hücre Kültürü
6	Prof. Dr. Elif Esin Hameş	Araştırmacı	EÜ Biyomühendislik	Aşı Ar-Ge, Üretim, Hücre Kültürü
7	Doç. Dr. Sayit Sargin	Araştırmacı	EÜ Biyomühendislik	Aşı Ar-Ge, Üretim, Hücre Kültürü
8	Doç. Dr. Suphi S. Öncel	Araştırmacı	EÜ Biyomühendislik	Aşı Ar-Ge, Üretim, Hücre Kültürü
9	Dr. Öğr. Üy. İsmail H. Akgün	Araştırmacı	EÜ Biyomühendislik	Aşı Ar-Ge, Üretim, Hücre Kültürü
10	Prof. Dr. Gülten Kantarcı	Araştırmacı	EÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji	Eczacılık, Formülasyon, Toksisite, Stabilitate
11	Dr. Öğr. Üy. Yücel Başpınar	Araştırmacı	EÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji	Eczacılık, Formülasyon, Toksisite, Stabilitate
12	Araş. Gör. Dr. Hasan Akbaba	Araştırmacı	EÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji	Eczacılık, Formülasyon, Toksisite, Stabilitate
13	Prof. Dr. Candan Çiçek	Araştırmacı	EÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji	Viroloji, SAR-CoV-2 moleküler tanı
14	Prof. Dr. Rüçhan Sertöz	Araştırmacı	EÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji	Viroloji, SAR-CoV-2 moleküler tanı
15	Doç. Dr. Hüseyin Can	Araştırmacı	EÜ Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji	Moleküler Biyoloji, Biyoinformatik
16	Prof. Dr. Hüsnü Pullukçu	Araştırmacı	EÜTF Enfeksiyon Hastalıkları	Enfeksiyon hastalıkları, COVID-19 uzmanı, Aşı

	Unvanı, Adı, Soyadı	Projedeki Görevi*	Çalışmakta Olduğu Kurum/Kuruluş	Uzmanlık Alanı**
17	Prof. Dr. Meltem Taşbakan	Araştırmacı	EÜTF Enfeksiyon Hastalıkları	Enfeksiyon hastalıkları, COVID-19 uzmanı, Aşı
18	Dr. Öğr. Üy. Didem Ş. Karaman	Araştırmacı	İKÇU Biyomedikal Mühendisliği	Biyomedikal, nanoformülasyon
19	Dr. Öğr. Üy. Gülşah E. Akbaba	Araştırmacı	İKÇU Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji	Eczacılık, Formülasyon, Toksisite, Stabilitate
20	Dr. Öğr. Üy. Zeynep Ahsen Koçer	Araştırmacı	<b>İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi</b>	Viroloji, Hücre kültürü, BSL-3 uzmanlığı
21	Doç. Dr. Gülay Korukluoğlu	Araştırmacı	THSK, Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarı	Viroloji, Hücre kültürü
22	Dr. Ayşe Başak Altaş	Araştırmacı	THSK, Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarı	Viroloji, Hücre kültürü
23	Prof. Dr. Selçuk Kılıç	Araştırmacı	THSK, Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarı	Viroloji, Hücre kültürü
24	Dr. Fethiye Çöven	Araştırmacı	T.C. Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü	Viroloji, BSL-3 uzmanlığı
25	Dr. Öğr. Gör. Muhammet Karakavuk	Araştırmacı	Ege Üniversitesi Ödemiş Meslek Yüksek Okulu	DNA aşısı Ar-Ge
26	Doç. Dr. Emin Karaca	Araştırmacı	EÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Genetik, NGS Sekans, Sanger Sekans
27	Dr. Hasan Ersin Zeytin	Danışman	Nobel İlaç San. Tic. A.Ş.	Fermantasyon, Pilot üretim
28	Dr. Müşra Zeren	Danışman	Nobel İlaç San. Tic. A.Ş.	Fermantasyon, Pilot üretim
29	Dr. Aziz Çaylı	Danışman	Florabio A.Ş.	Hücre kültürü, Besiyeri
30	Cem Erdem	Danışman	Florabio A.Ş.	Hücre kültürü, Besiyeri
31	Prof. Shan Lu	Danışman	Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi	Aşı Araştırma ve Geliştirme
32	Dr. Tolga Ovaryurt	Bursiyer	İKÇU Biyomühendislik	Biyoinformatik



# Antijen keşfi ve DNA aşısı geliştirilmesi



# DNA aşıları

- DNA aşılarının bilimsel ilgiyi uyandırması **1990'lı** yıllara dayanmaktadır.
- Ulmer ve ark., (1993)\* influenza virüs proteinini sentezleyen DNA aşısı ile gerçekleştirdikleri pre-klinik çalışmada koruyucu immun yanıtı uyardıklarını göstermeleri en önemli **başlangıç taşıdır.**
- Daha sonra DNA aşılarının etkinliği ve immünolojik mekanizmaları bulaşıcı hastalıklar yanında kanser gibi **birçok hastalığın preklinik modellerinde** gösterilmiştir.



\* Ulmer JB, et al., Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science. 1993;259(5102):1745-9.



# DNA aşıları

- DNA aşılarının çıktığı **ilk yıllarda preklinik çalışmalardaki başarısı**, klinik çalışmaların önünü açmıştır.
- Bu süreci takiben 20-25 yıl kadar önce başlatılan **klinik çalışmalar** DNA aşılarının güvenliliği hakkında önemli katkılar yapmıştır;
  - Canlı olmaması, aşılanan bireyde enfeksiyon riskini ortadan kaldırır
  - Klinik çalışmalar için kolaylıkla üretilebilir
  - Oda sıcaklığına dayanıklıdır
  - Son derece güvenilir olup ve iyi tolere edilmektedir



# Clinicaltrials.gov

- Şu anda 718 farklı klinik çalışmada DNA aşıları test edilmiş/mektedir
  - **MERS-CoV için 2 DNA aşısı** (NCT03721718; NCT02670187)
  - **SARS-CoV için 1 DNA aşısı** (NCT00099463)
- WHO ve Clinicaltrials.gov'a göre klinik aşamada olan COVID-19 aşıları
  - NCT04299724: Safety and Immunity of Covid-19 aAPC Vaccine (**hücre bazlı**) (Başladı)
  - NCT04276896: Immunity and Safety of Covid-19 Synthetic Minigene Vaccine (**hücre bazlı**) (Başladı)
  - NCT04283461: **mRNA-1273** aşısı (Başladı)
  - NCT04313127: Recombinant Adenovirus Type 5 Vector (**aktif, henüz başlamadı**)
  - NCT04324606: Non-replike viral vektör ChAdOx1 nCoV-19 (**henüz başlamadı**)

# Aşı Antijen Seçimi



DNA aşısı geliştirilmesinde hedef antijeninin saptanması çalışmaları çok önemlidir

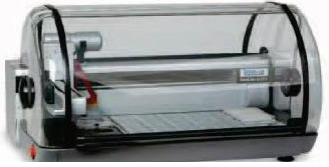
- ✓ Genomik, proteomik veya transkriptomik verilerin *in silico* analizleri
- ✓ *in vitro* ve *in vivo* immüno taramalar

***Bunlara uyulmaması aşı üretiminin geç safhalarında hüsrana oluşturabilir***

(Sıtma hastalığına karşı hazırlanan ve *Plasmodium* MSG yüzey antijeni kullanılarak geliştirilen rekombinant protein aşısı faz III klinik denemeden dönmüştür) (Kayıp ~100 milyon USD)



# Aşı Antijen Seçimi



## Proteomik yaklaşım deneyimi *Toxoplasma gondii* örneği



Döşkaya et al. *Parasites & Vectors* (2018) 11:393  
https://doi.org/10.1186/s13071-018-2934-1

Parasites & Vectors

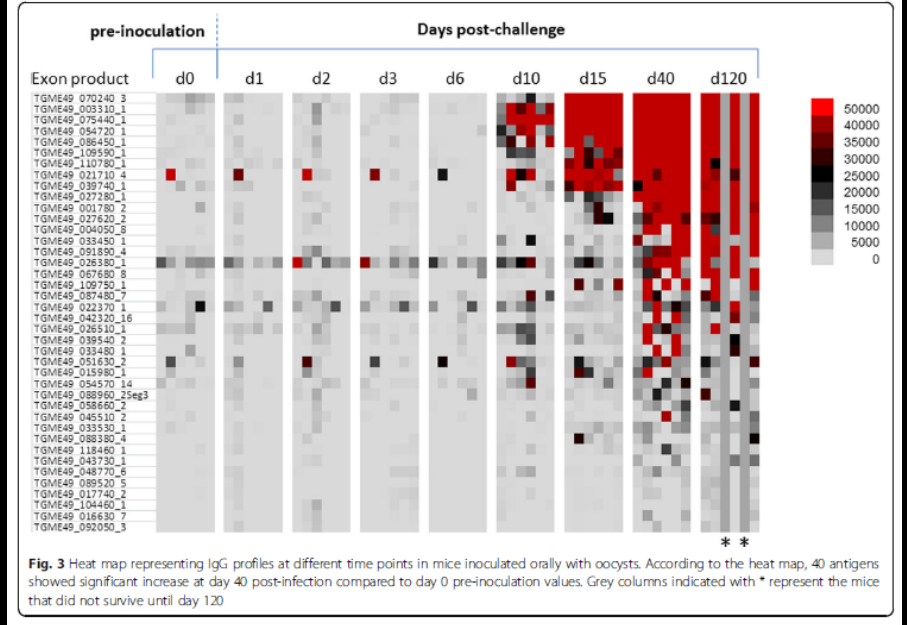
### RESEARCH

### Open Access



Discovery of new *Toxoplasma gondii* antigenic proteins using a high throughput protein microarray approach screening sera of murine model infected orally with oocysts and tissue cysts

Mert Döşkaya<sup>1\*</sup>, Li Liang<sup>2</sup>, Aarti Jain<sup>2</sup>, Hüseyin Can<sup>3</sup>, Sultan Gülçe İz<sup>4</sup>, Philip Louis Felgner<sup>2</sup>, Aysu Değirmenci Döşkaya<sup>1</sup>, David Huw Davies<sup>2</sup> and Adnan Yüksel Gürüz<sup>1</sup>



2870 adet *T. gondii* exon ürünü rekombinant protein olarak üretilip protein mikoarray lamlara yazdırılmıştır. İnsan ve hayvan modellerinden alınan örneklerle karşılaştırılmıştır.

Döşkaya et al., *Parasites&Vectors* 2018; Felgner et al. *Parasitology* 2015; Li et al., *Mol Cell Proteomic* 2011

# Aşı Antijen Seçimi



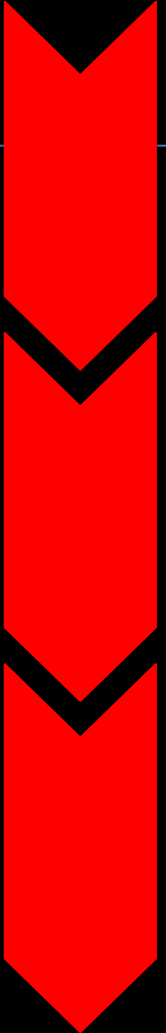
## Bulunan Antijenlerin Biyoinformatik Yöntemlerle Analizi

- ✓ Genin protein dizilimi (ExPASy Proteomics )
- ✓ Proteinin MW ve ORF (Bioinformatic Education)
- ✓ Proteinin sistein içeriği (disülfid bağı oluşturma özelliği)  
protein katlanma (=folding) ve kararlılık (=stability) üzerine net etki
- ✓ Hidrofobik kısımlarının tespiti (ExPASy-ProtScale)
- ✓ Homoloji ve homodimerlik
- ✓ Post-translasyonel modifikasyon
- ✓ Glikozilasyon tespiti (NetNGlyc, NetOGlyc)
- ✓ Epitop analizi (SVMTriP, IEDB)
- ✓ Protein/ligand kenetlenme (AutoDock , Rosetta)



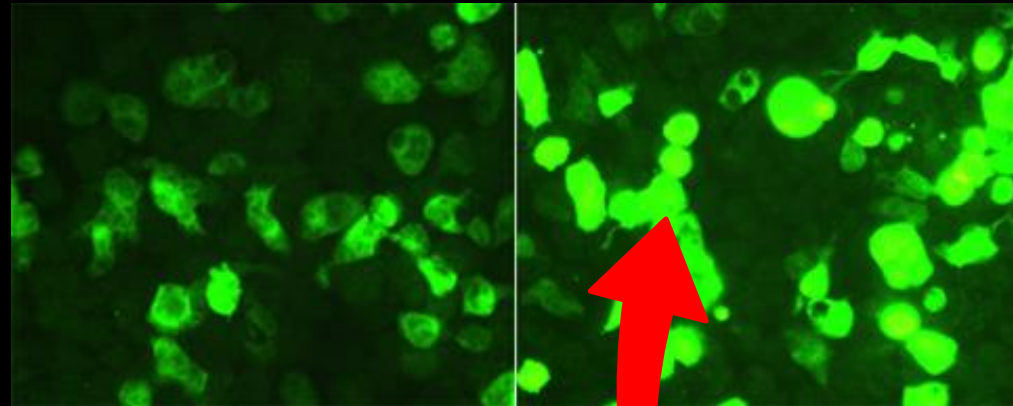
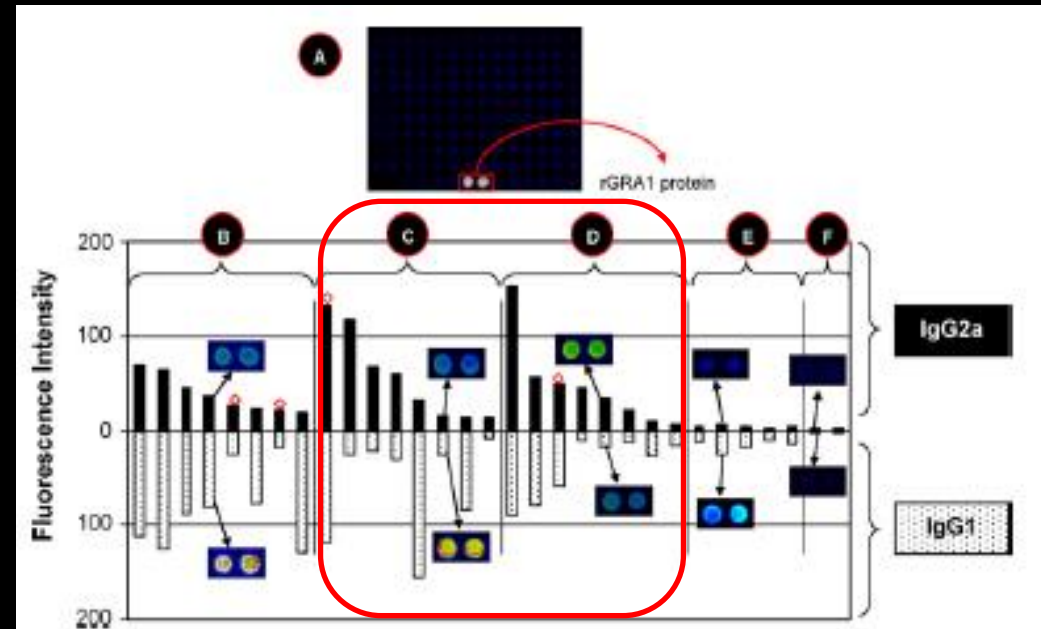
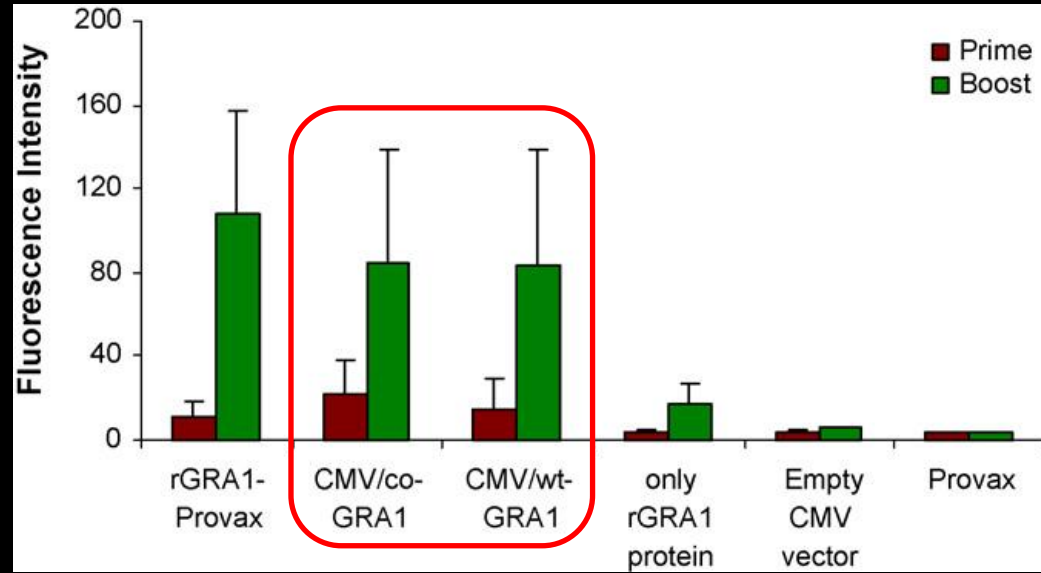
# DNA Aşısı geliştirme

- ✓ PCR, CMV plasmid klonlama, jel görüntüleme, sekans, *in vitro* transfeksiyon, IFA, SDS-PAGE, Western blot
- ✓ Tek Klon (derin dondurucuda 😊)
- ✓ Fermentörde büyük ölçekli üretim
- ✓ Soğutmalı santrifüj ile DNA aşısı içeren hücrelerin toplanması
- ✓ Endofree plasmid saflaştırma
- ✓ Jel görüntüleme, miktar ölçümü (UV260/280)



## GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine

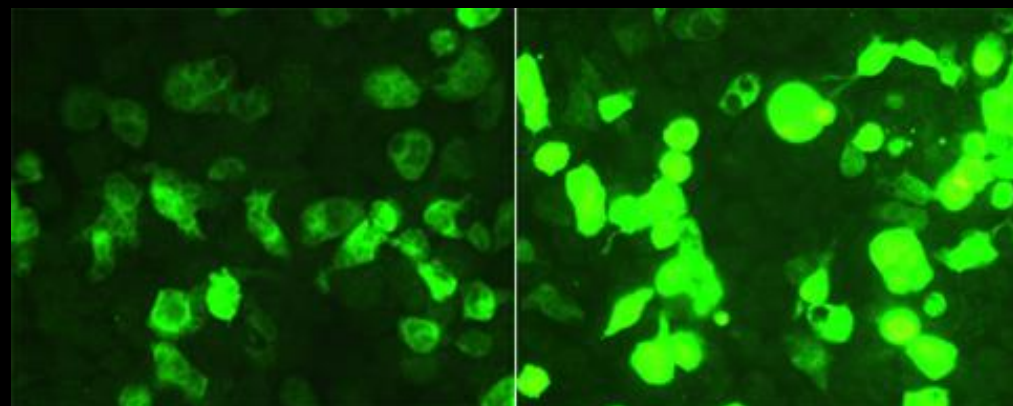
Mert Döşkaya<sup>a,h</sup>, Mina Kalantari-Dehaghi<sup>b</sup>, Craig M. Walsh<sup>b</sup>, Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka<sup>c</sup>, D. Huw Davies<sup>d</sup>, Philip L. Felgner<sup>d</sup>, Liza S.Z. Larsen<sup>e</sup>, Richard H. Lathrop<sup>f,g</sup>, G. Wesley Hatfield<sup>e,g</sup>, Jessica R. Schulz<sup>b</sup>, Yüksel Gürtüz<sup>h</sup>, Frances Jurnak<sup>a,\*</sup>





## GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine

Mert Döşkaya<sup>a,h</sup>, Mina Kalantari-Dehaghi<sup>b</sup>, Craig M. Walsh<sup>b</sup>, Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka<sup>c</sup>, D. Huw Davies<sup>d</sup>, Philip L. Felgner<sup>d</sup>, Liza S.Z. Larsen<sup>e</sup>, Richard H. Lathrop<sup>f,g</sup>, G. Wesley Hatfield<sup>e,g</sup>, Jessica R. Schulz<sup>b</sup>, Yüksel Gürtüz<sup>h</sup>, Frances Jurnak<sup>a,\*</sup>



**Table 2**

Lymphoproliferation and cytokine production of BALB/c mice vaccinated with rGRA1-Provax, CMV/co-GRA1 and CMV/wt-GRA1

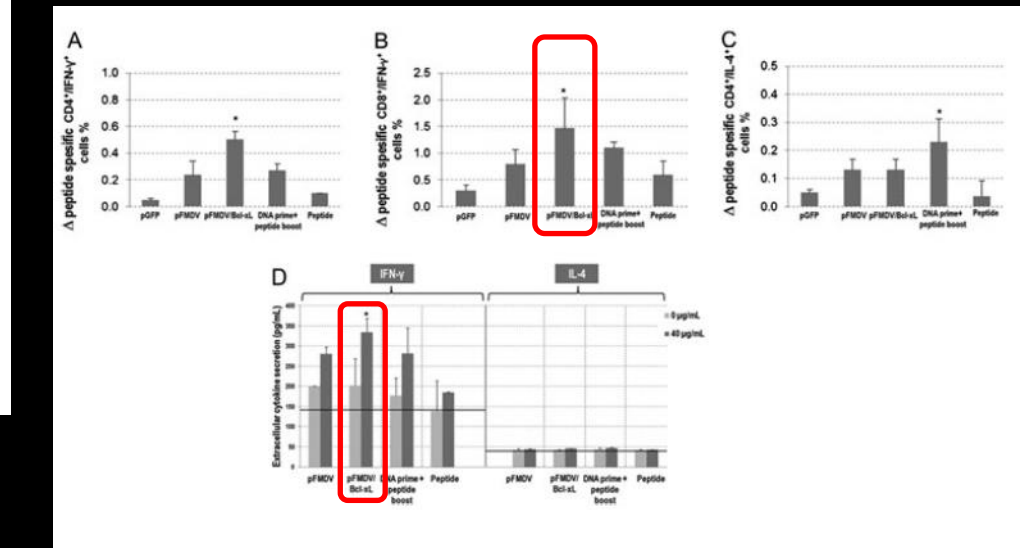
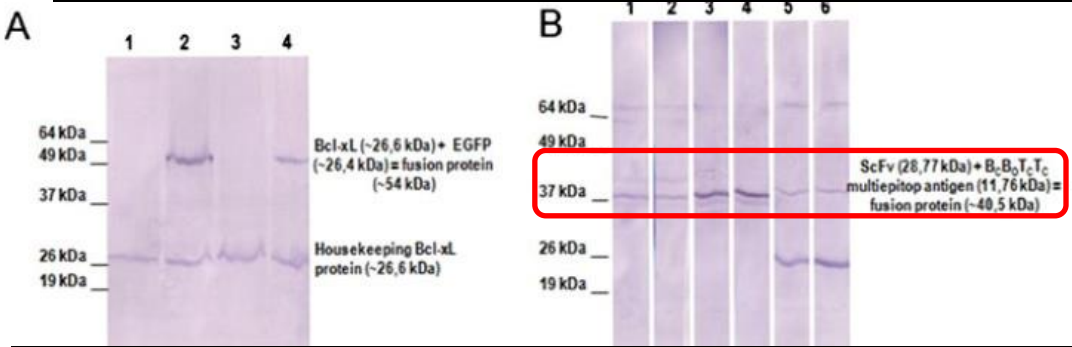
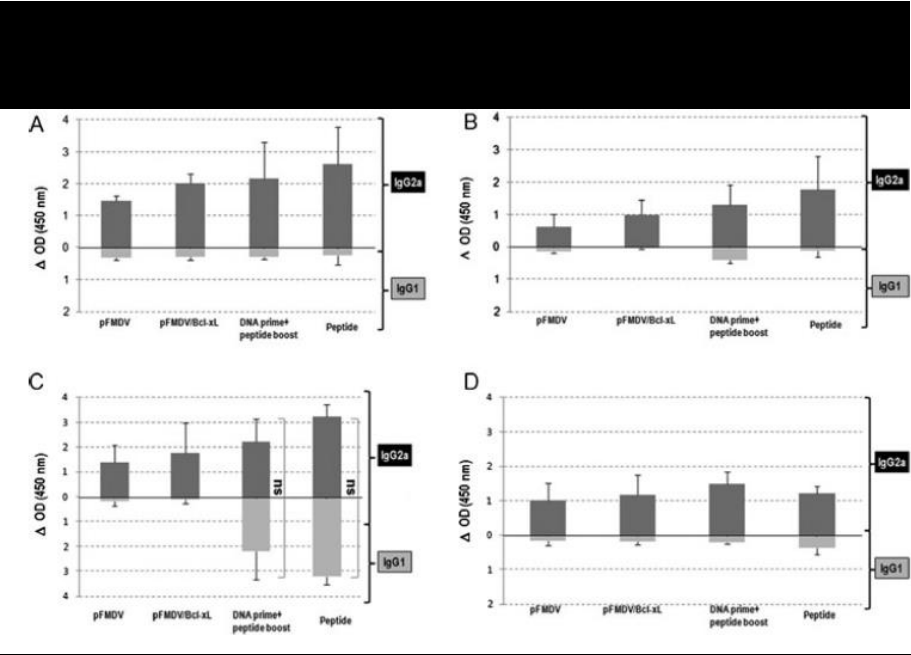
Vaccine candidates	Stimulation index <sup>a</sup>	Cytokine production (pg/ml) <sup>b</sup>	
		IFN- $\gamma$	IL-4
rGRA1-Provax	4.7 $\pm$ 0.2	1502 $\pm$ 301	28 $\pm$ 0
CMV/co-GRA1	3.4 $\pm$ 0.6	565 $\pm$ 22	16 $\pm$ 4
CMV/wt-GRA1	2.8 $\pm$ 0.4	481 $\pm$ 25	15 $\pm$ 2

<sup>a</sup> As described in methods, the stimulation index is the ratio of the mean counts per minute (cpm) of spleen cells stimulated with varying concentrations of rGRA1 to the mean cpm of controls.

<sup>b</sup> The culture supernatants were assayed for cytokine production. Values for IFN- $\gamma$  and IL-4 were obtained from 72 h culture.

# Co-expression of the Bcl-xL antiapoptotic protein enhances the induction of Th1-like immune responses in mice immunized with DNA vaccines encoding FMDV B and T cell epitopes

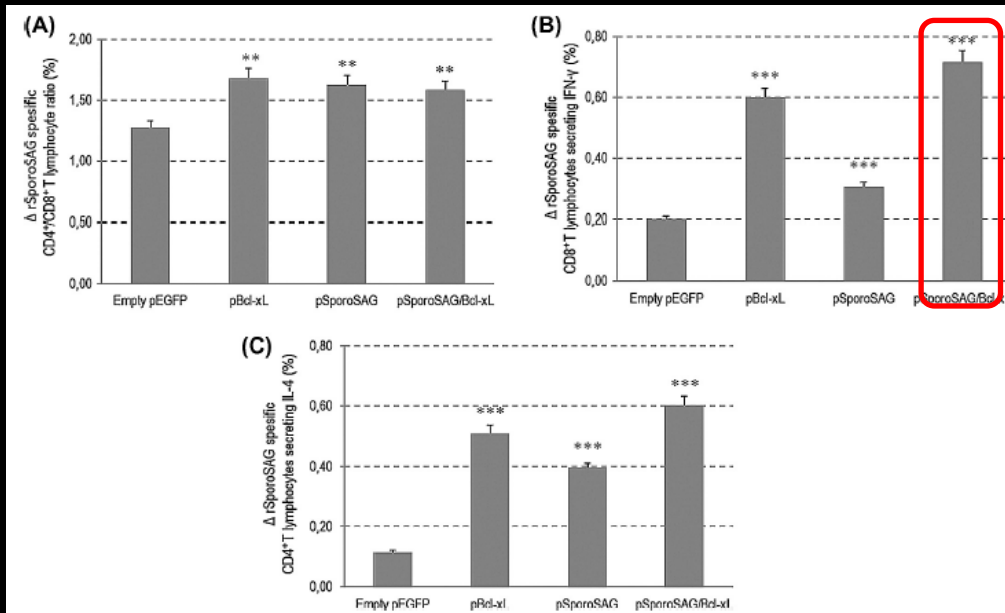
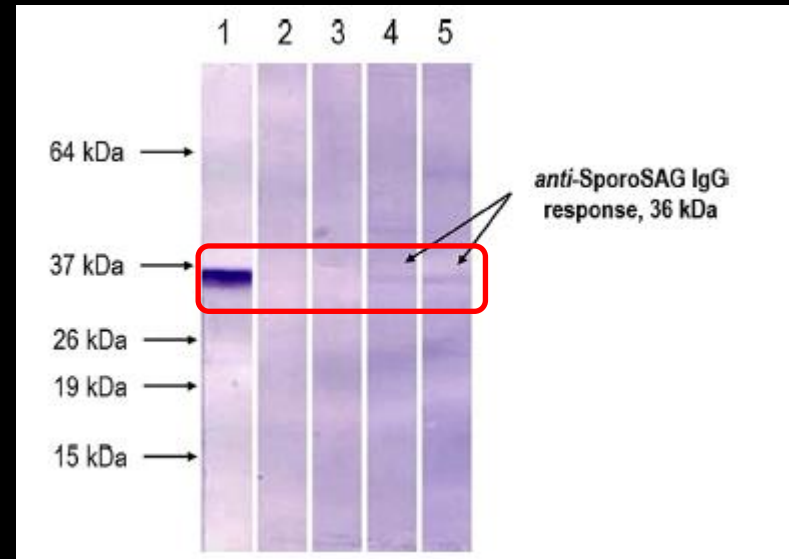
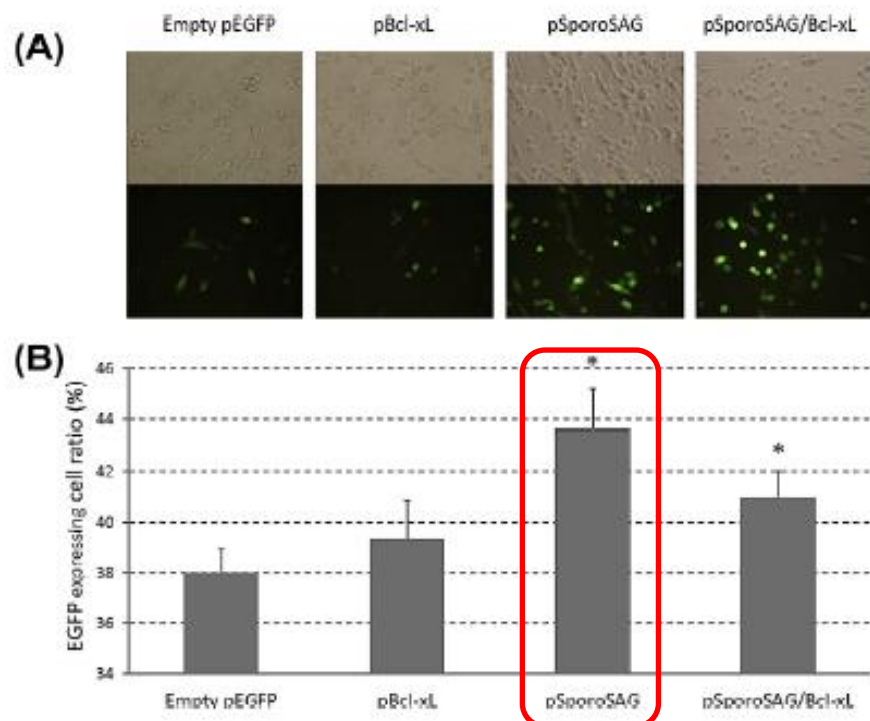
Sultan Gülçe İz • Mert Döşkaya • Belen Borrego •  
Fernando Rodriguez • Yüksel Gürüz •  
İsmet Deliloğlu Gürhan



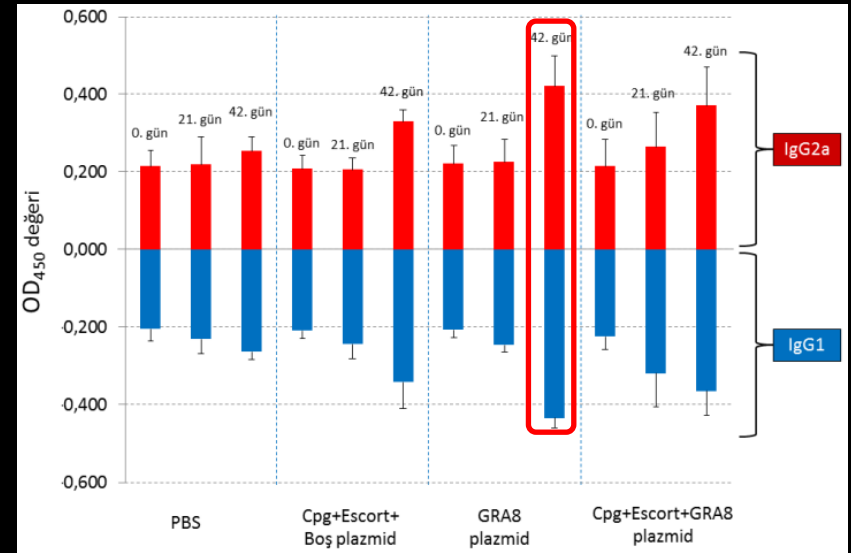
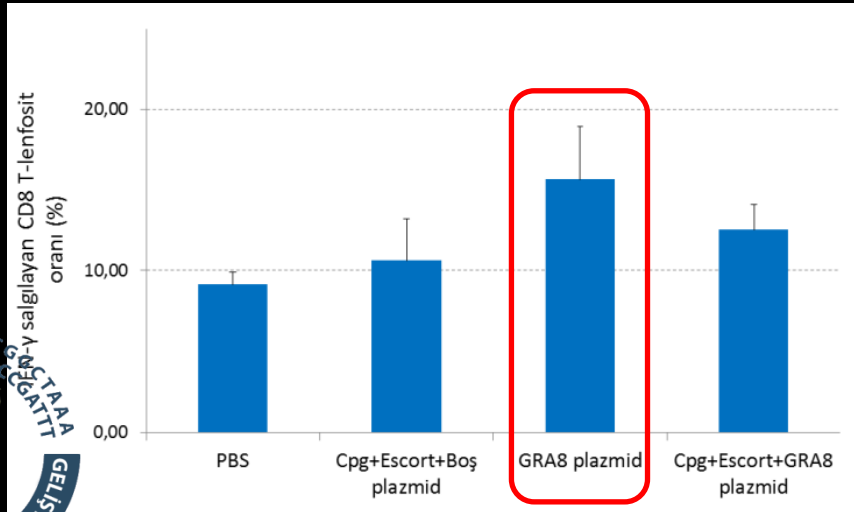
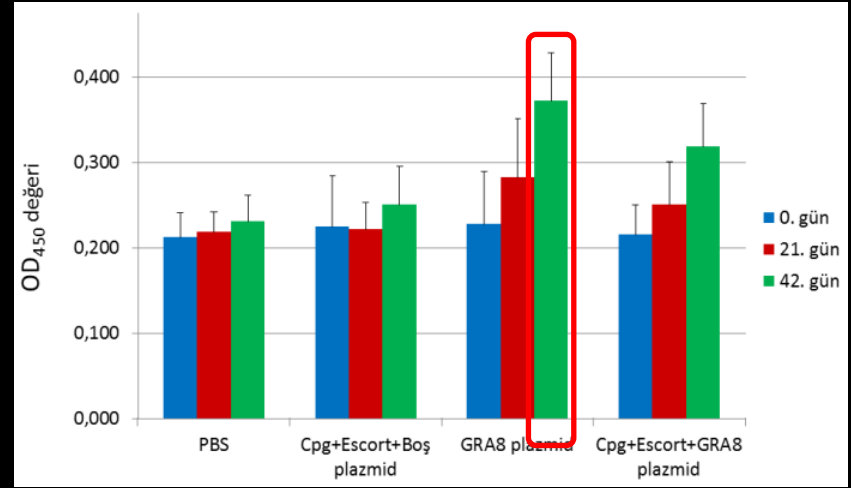
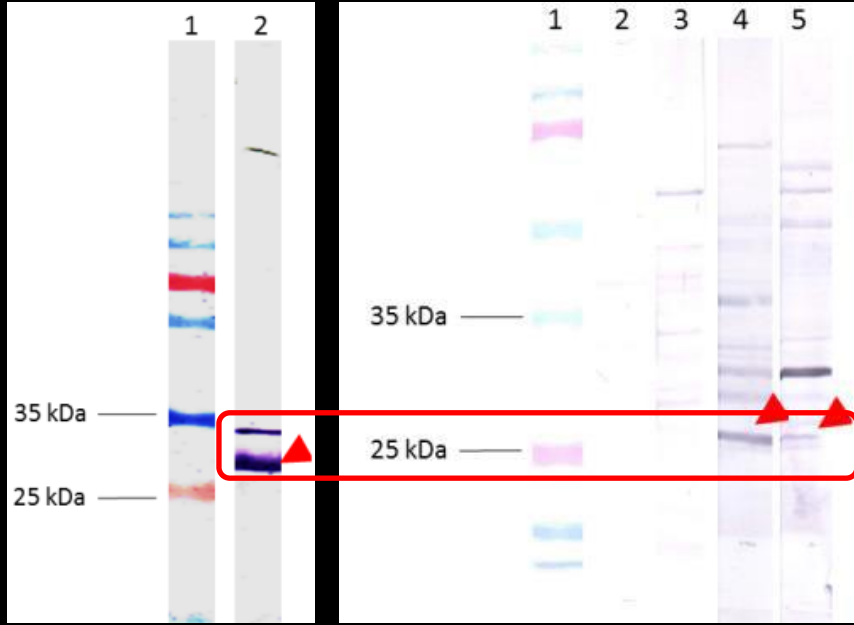
A novel dual promoter DNA vaccine induces CD8<sup>+</sup> response against *Toxoplasma gondii* sporozoite specific surface protein "SporoSAG" through non-apoptotic cells



Sultan Gülçe İz<sup>a,b,1</sup>, Mert Döşkaya<sup>b,\*,1</sup>, Ayşe Caner<sup>b</sup>, Aysu Değirmenci Döşkaya<sup>b</sup>, Fernando Rodriguez<sup>c</sup>, Yüksel Gürüz<sup>b</sup>, S. İsmet Deliloğlu Gürhan<sup>a</sup>



**Karakavuk et al., 2019. Aşı Adayı *Toxoplasma gondii* GRA8 Proteininin Oluşturduğu İmmün Yanıt ve Korunmanın Araştırılması» T.C. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi**







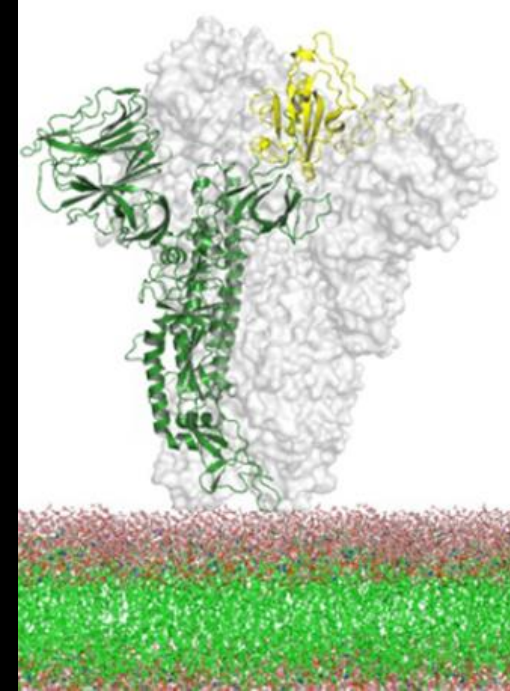
# COVID-19 için DNA Aşısı

- ❑ GENBANK: SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) Sequences

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/sars-cov-2-seqs/>

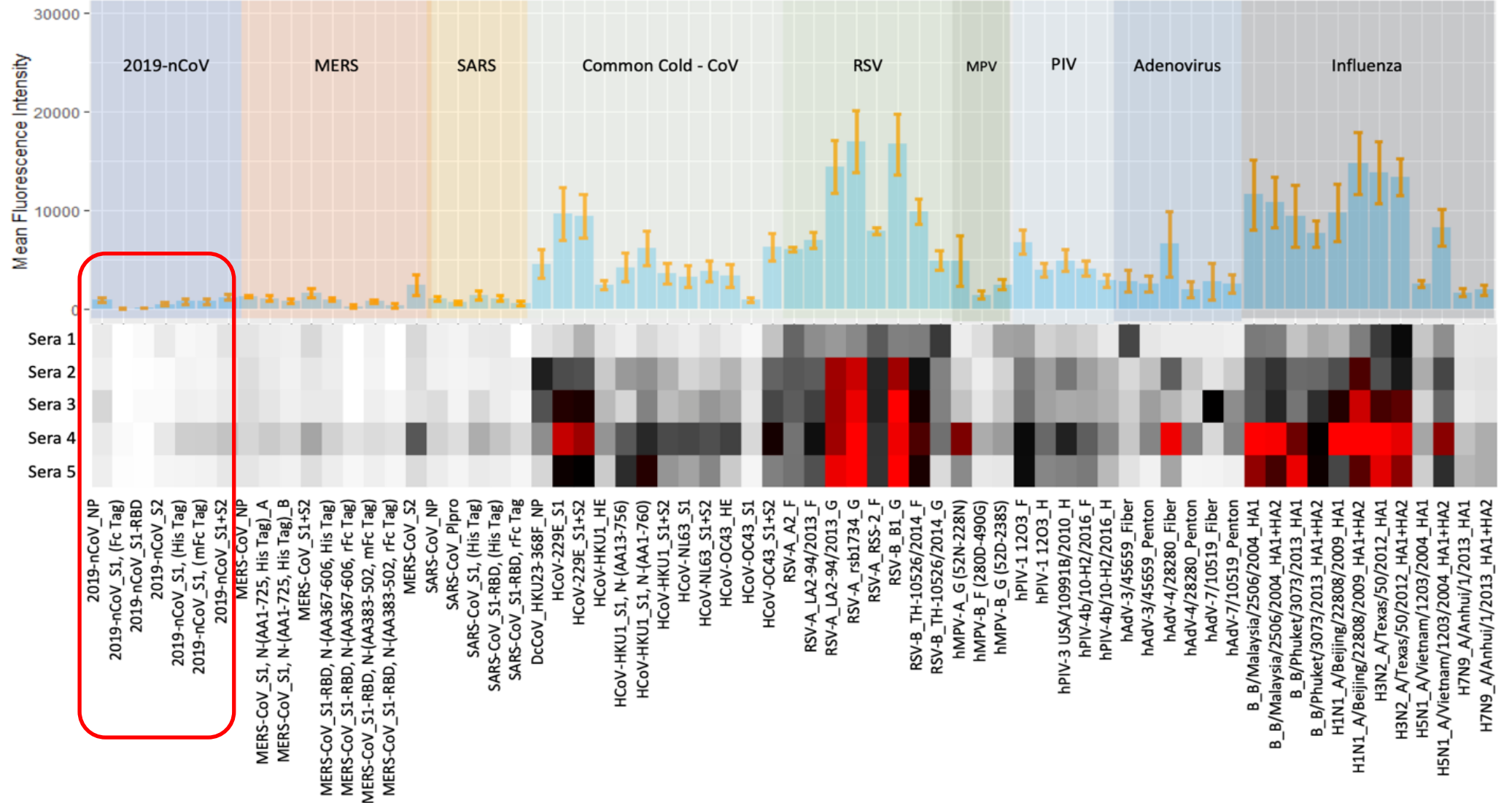
- ❑ WHO COVID-19 aşı adayları

- ✓ **Spike glikoprotein** (S1 ve S2 protein); hücreye bağlanıp enfekte etmek için.
  - ✓ Receptor binding domain (ACE2; Angiotensin converting enzim)
  - ✓ Polybasic cleavage site (furin aktivasyon bölgesi; insan dokuları özellikle Akc, KC ve ince bağırsaklarda bol)
- ✓ li-Key peptit
- ✓ gp-96
- ✓ M protein
- ✓ **NK protein**





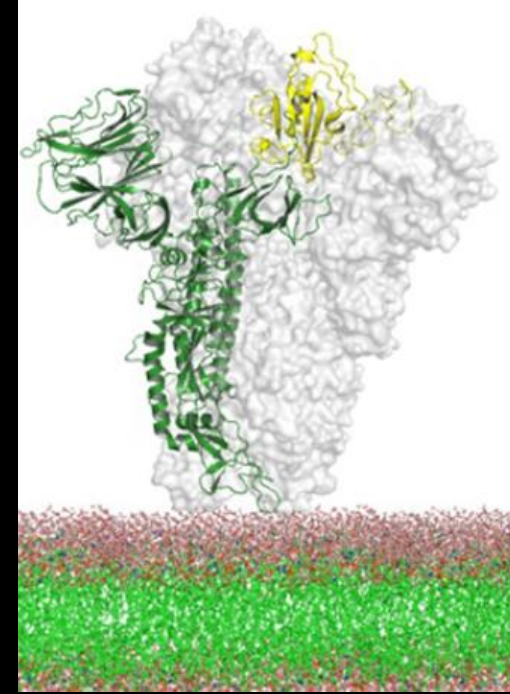
# COVID-19 için DNA Aşısı





# COVID-19 için DNA Aşısı

- ✓ Ülkemize dolaşan virüs izolatları tüm genom dizi verisi
- ✓ Antijen belirleme: *In siliko* analiz ve literatür analizi
- ✓ DNA aşısı oluşturulması
- ✓ *In vitro* transfeksiyon
  - ✓ WB, IFA
- ✓ Pre-klinik çalışma
  - ✓ Uygulama (i.m., tibialis posterior, gen tabancası)
    - ✓ Lipid formülasyon
  - ✓ Salgısal ve hücrel immun yanıt analizi (ELISA, WB, akış sitometri, ELIspot, Sitokin ELISA, MTT assay, Nötralizan antikor testi)
  - ✓ Stabilite
  - ✓ Toksisite





# Teşekkürler

