



COVID-19'a Karşı Nötralizan Antikor Geliştirilmesi

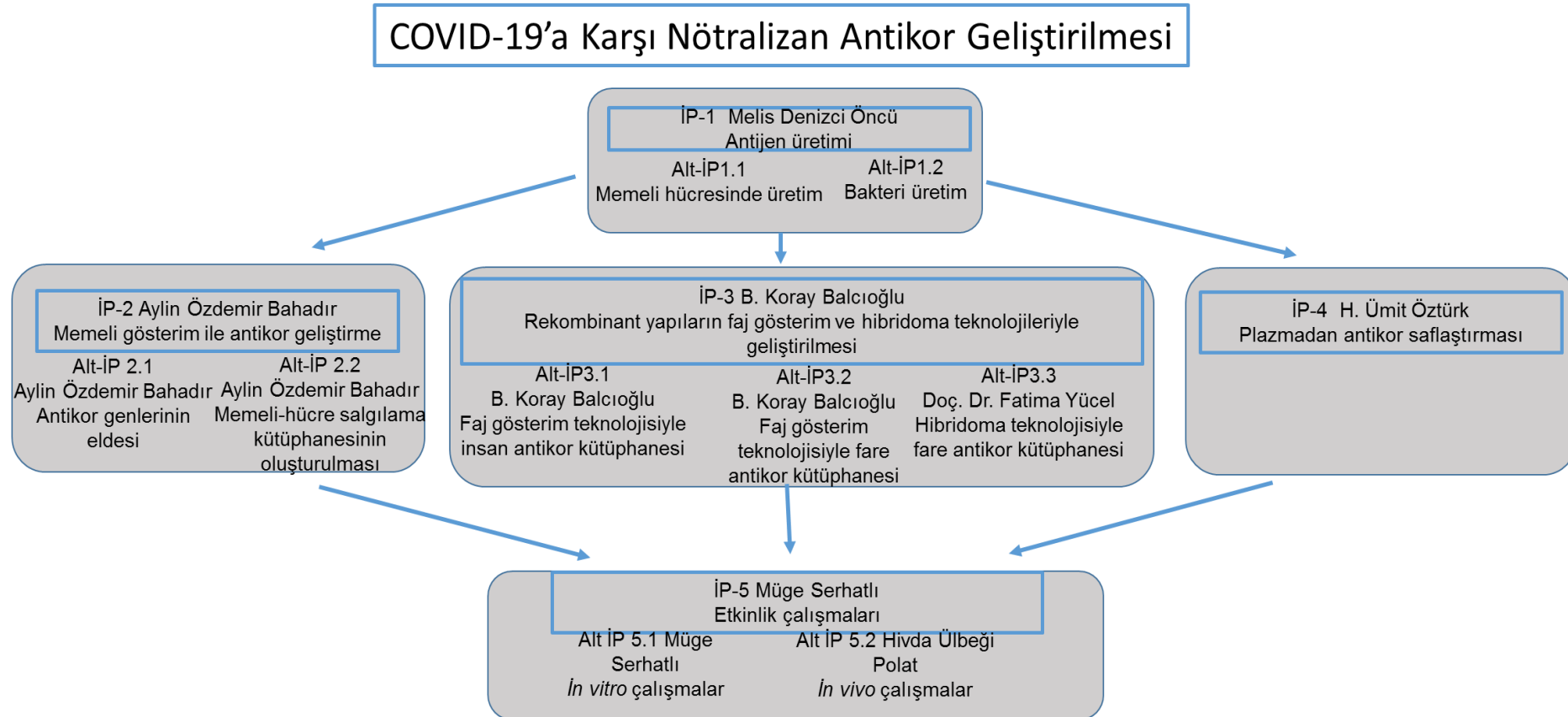
TÜBİTAK 1004 programı 18AG020
Prof. Dr. Şaban TEKİN, Koordinatör
TÜBİTAK MAM GMBE

Proje Yürütücüsü
Dr. Aylin ÖZDEMİR BAHADIR

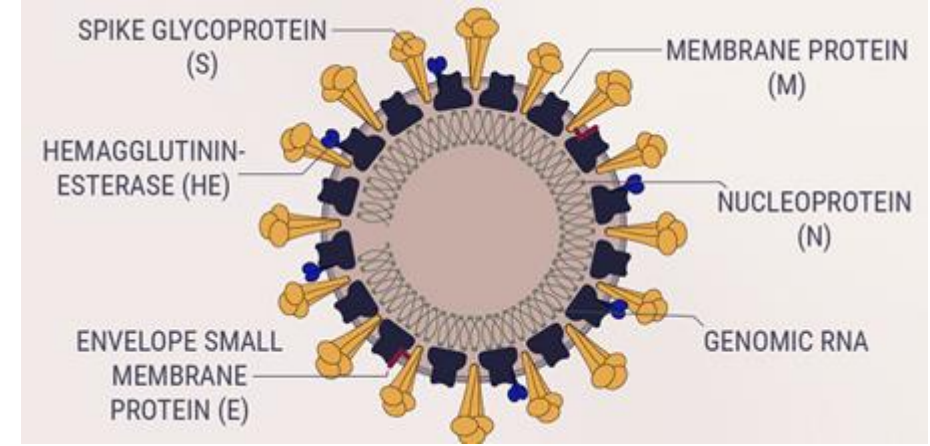
Proje Yürütücü Yardımcısı
Dr. B. Koray BALCIOĞLU

Projede, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknolojisi Enstitüsü bünyesindeki mevcut olanak ve teknolojiler kullanılarak, tüm dünyayı etkisi altına alan SARS-CoV-2 virüsüne karşı bir **nötralizan rekombinant antikor yapısının** geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu kapsamda Enstitümüzde uygulanmakta olan Memeli gösterim, Faj gösterim ve Hibridoma Teknolojileri kullanılarak anti Covid-19 insan ve/veya fare scFv yapılarının geliştirilmesi ve fare scFv'lerinin insansılaştırılması hedeflenmektedir.

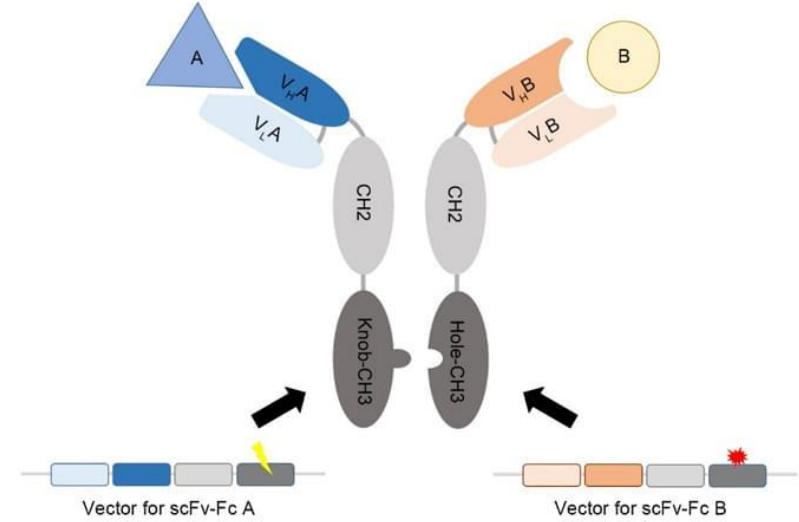
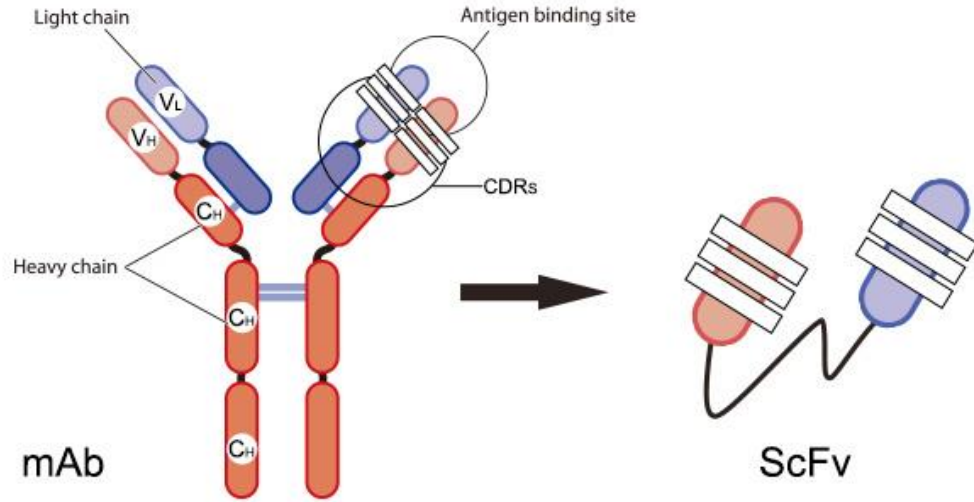


IP1. ANTİJEN ÜRETİMİ



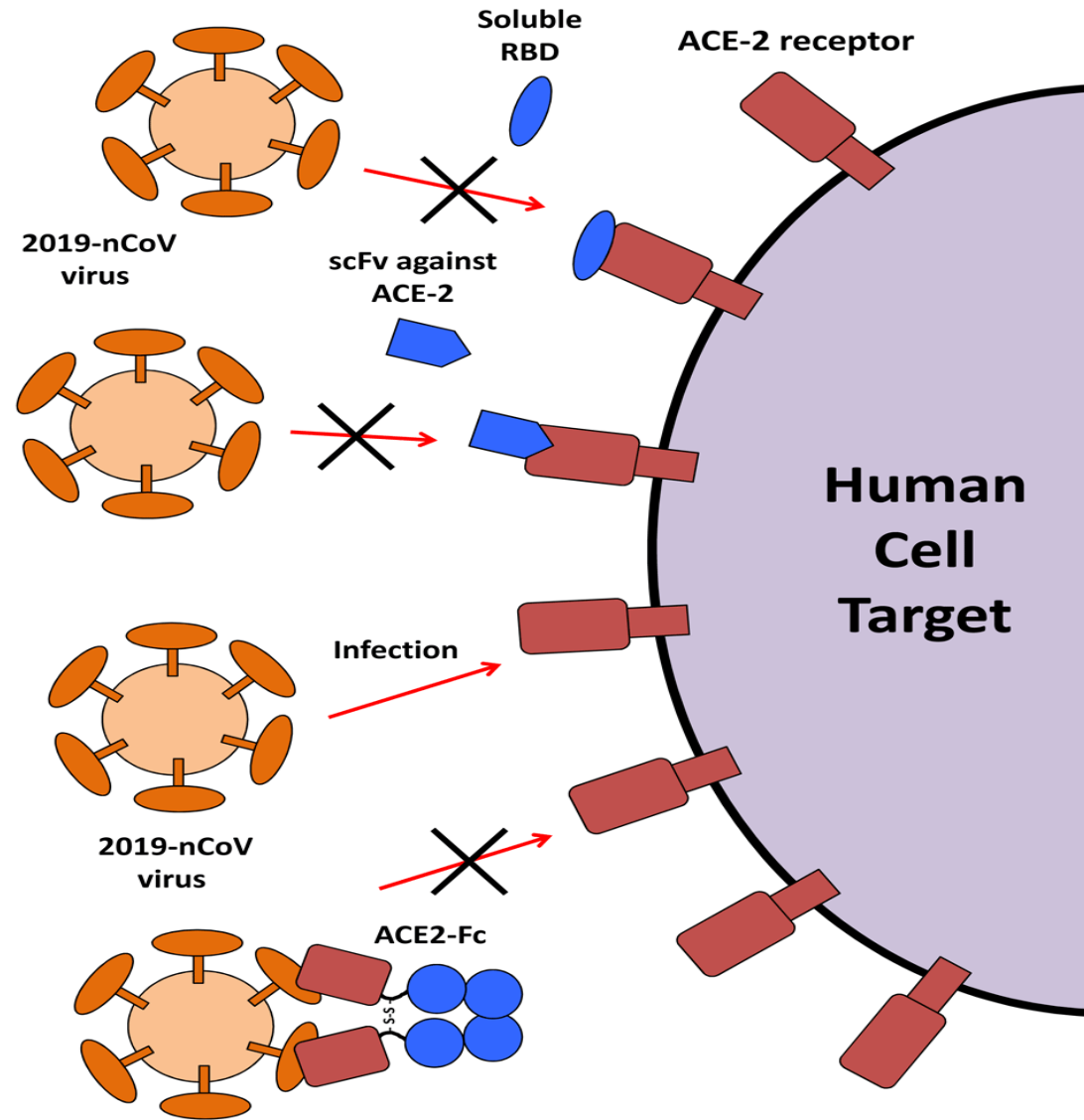
- Covid-19 virüs **spike proteinlerine ait epitop bölgeleri** literatürden belirlenmiş ve peptitler sentezlettirildi.
- **Covid-19 Spike** protein ticari olarak satın alındı.
- **Covid-19 Spike** proteinini içeren memeli ve bakteri ekspresyon vektörleri ticari olarak temin edildi. Bu vektörlerin ekspresyonları uygun sistemlerde yapılarak, saflaştırma çalışmaları ile rekombinant Covid-19 Spike proteini elde edilecektir.
- Diğer viral antijenler ve hücresel hedefler içinde benzer çalışmalar devam etmektedir.
- Elde edilen proteinler ve epitop bölgeleri diğer iş paketlerinde bağışıklama ve seçim çalışmalarında kullanılacaktır.

ScFv Nötralizan Rekombinant Antikorlar



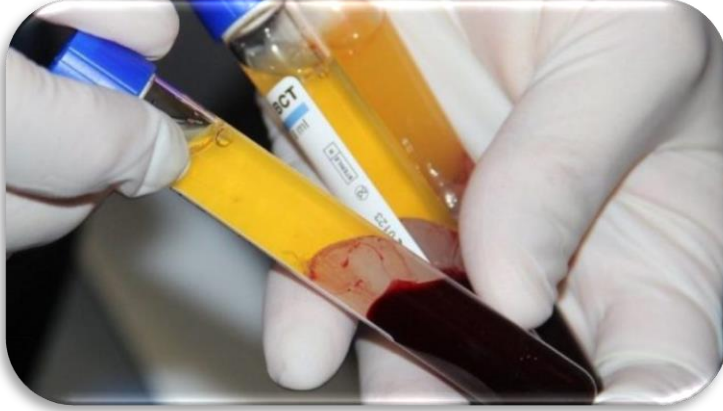
Tek Zincirli Değişken Parça (Single Chain Variable Fragment = ScFv) normal antikor molekülünden farklı olarak birbirlerine 15-20 amino asitlik linker peptit bağlanmış bir ağır (V_H) ve bir hafif (V_L) değişken bölgeden oluşmaktadır. ScFv (V_H & V_L) nin her bir alt ünitesi antijen bağlanmasından sorumlu 3 hypervariable complementary determining bölgeler (CDRs). Bu nedenle, ScFv ler an IgG molekülünün tam bağlanma aktivitesine sahip en küçük ünitesi olup yaklaşık 25 kDa büyüklüğündedirler.

2. HEDEF

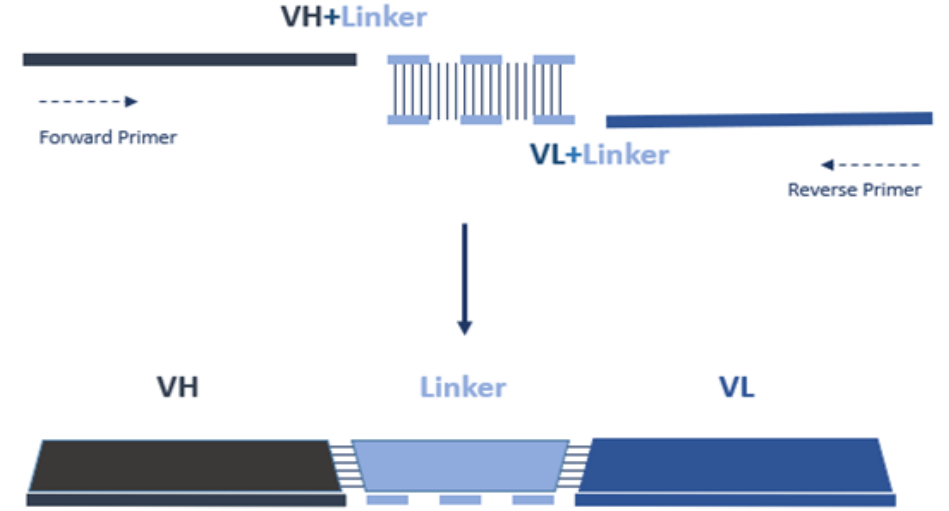


1. HEDEF

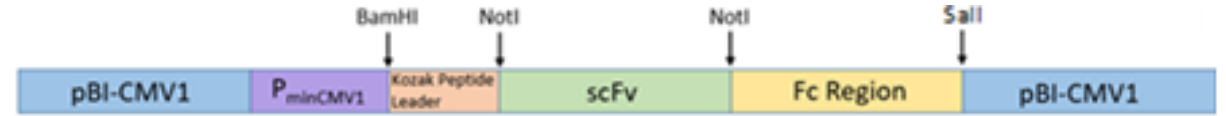
IP2. MEMELİ GÖSTERİM İLE ANTİKOR GELİŞTİRME



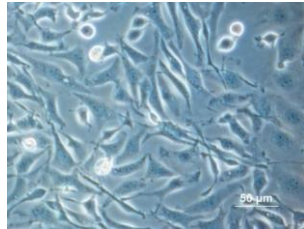
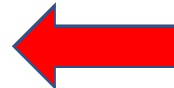
COVID-19 pozitif hasta kanlarından elde edilecek olan cDNA'den insan VH ve VL genleri çoğaltılacaktır.



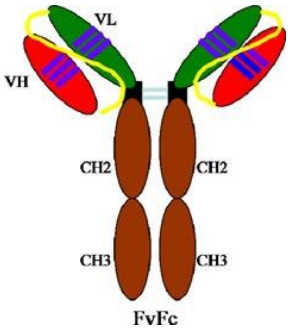
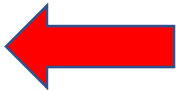
scFv



İnsan scFv kütüphanesinin memeli vektörüne klonlanması



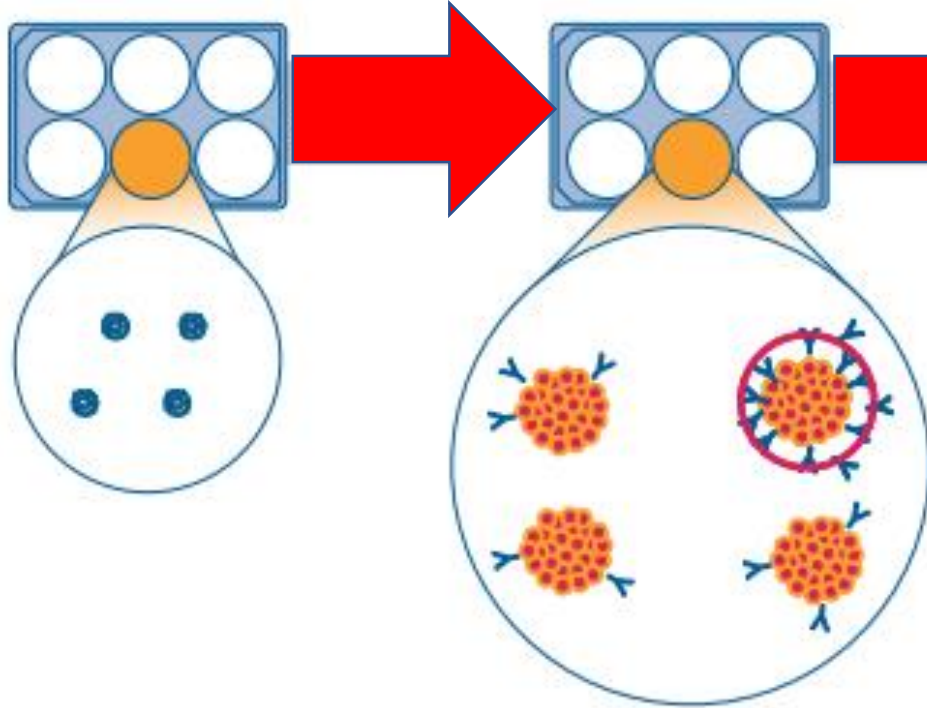
CHO-K1 hücrelerine transfeksiyon ve human scFv-Fc eksprese eden stabil hücre havuzunun eldesi



İnsan scFv-Fc kütüphanesinin eldesi

COVID-19 scFv-Fc eksprese eden hücre hatlarının *in-situ* ortamda otomatize cihaz ile belirlenmesi ve seçimi

İnsan scFv-Fc kütüphanesi
eksprese eden stabil CHO-K1
hücrelerinin semi solid
ortama ekilmesi

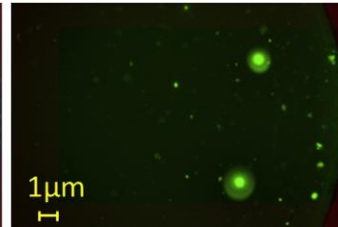
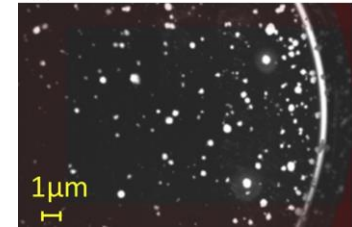
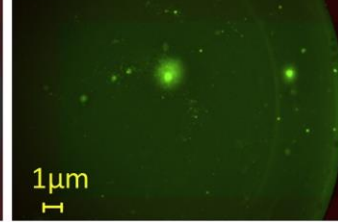
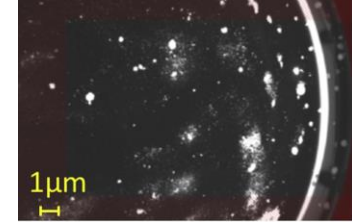
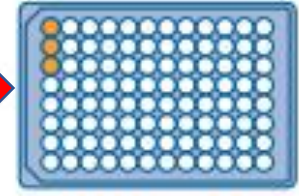


Human scFv-Fc
eksprese eden CHO-K1
klonlarının büyümesi

scFv-Fc salgılayan
kolonilerin, floresan-
COVID-19 antijen
özelliklerine göre
belirlenmesi

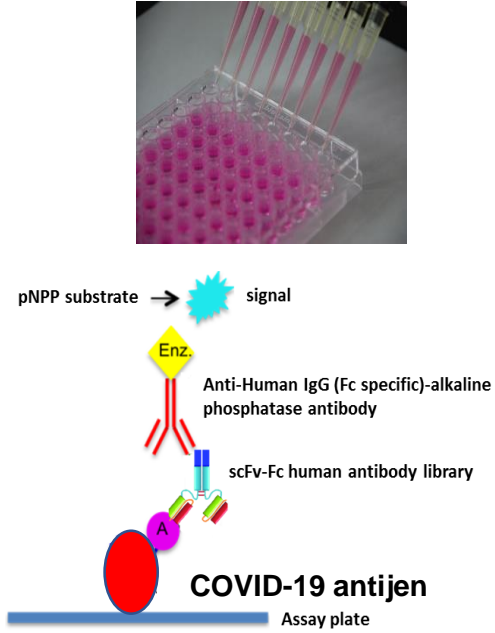


ClonePix cihazının
görüntüleri analiz
edip, istenilen
klonları toplaması



Antikorum Karakterizasyonu

ELISA



SDS-PAGE

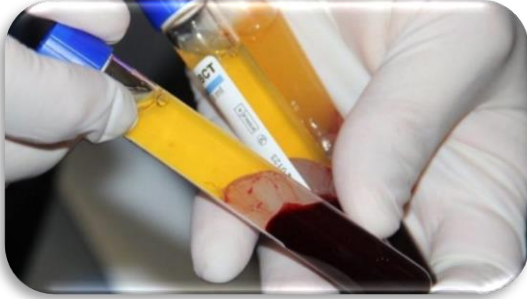


SPR

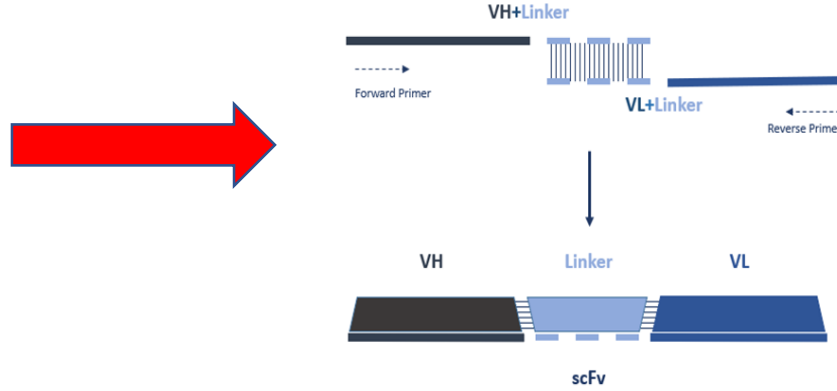


Antikorlar ELISA, SDS-PAGE, WesternBlot ve Surface Plazmon Resonans yöntemleri ile kontrol edilecektir

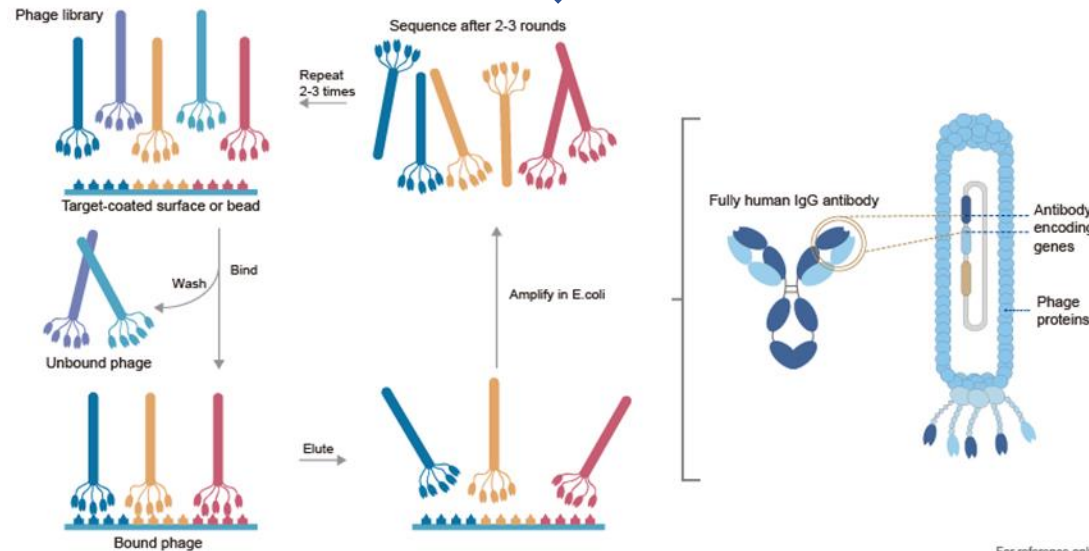
IP3.1 ve IP3.2 REKOMBİNANT ANTİKOR YAPILARIN FAJ GÖSTERİM ve HİBRİDOMA TEKNOLOJİLERİYLE GELİŞTİRİLMESİ



COVID-19 pozitif hasta kanlarından elde edilecek olan cDNA'den insan VH ve VL genleri çoğaltılacaktır.



İnsan ve fare scFv kütüphanesi oluşturulması ve Fajmit vektöre klonlanması



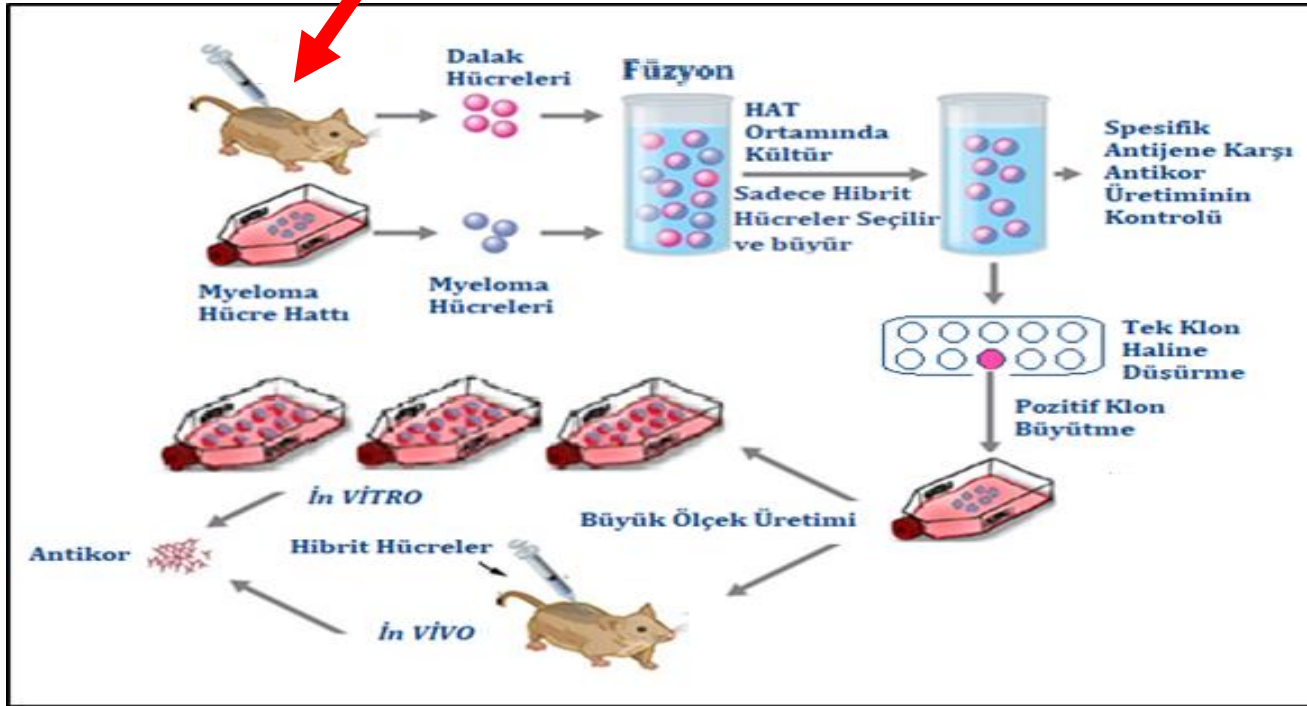
Fare dalak VH ve VL genlerinin çoğaltılması

Farelerin Covid S antijeni ve/veya Antijen epitop bölgeleri ile immünizasyonları

Biopanning ile hedef yapıya özgün antikorların seçilimi

IP3.3 Fare Antikorlarının Hibridoma Teknolojileriyle Geliştirilmesi

Farelerin Covid S
antijeni ve/veya Antijen
epitop bölgeleri ile
immünizasyonları



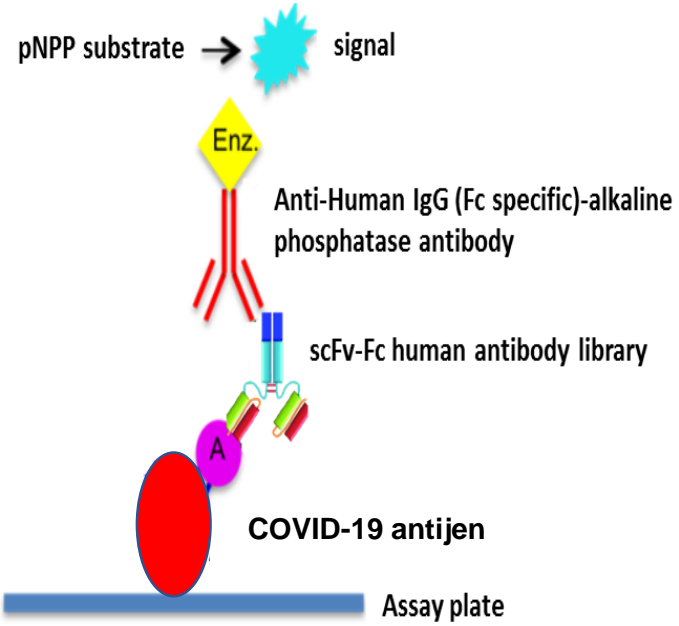
Monoklonal antikor üretimi için Füzyon uygulamaları

Seçilen fare antikor yapılarının scFv
formatına dönüştürülmesi

Fare scFv yapılarının
insansılaştırılması

Antikorum Karakterizasyonu

ELISA



SDS-PAGE



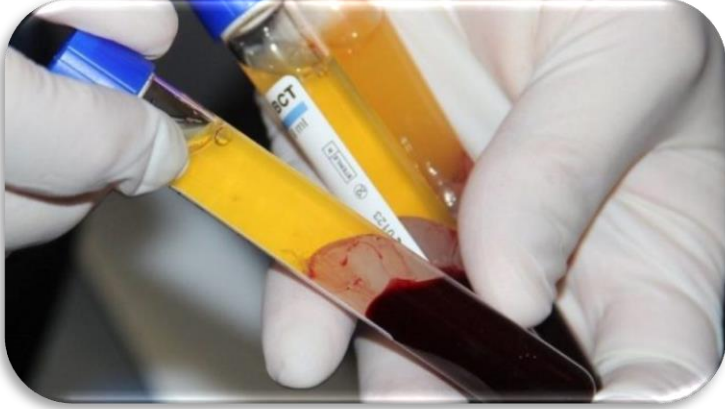
SPR



Antikorum ELISA, SDS-PAGE, WesternBlot ve Surface Plazmon Resonans yöntemleri ile kontrol edilecektir

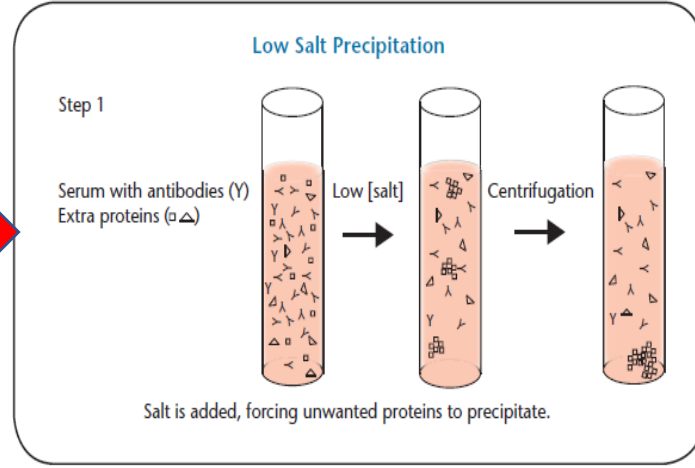
IP4. PLAZMADAN ANTİKOR SAFLAŞTIRILMASI

Serum Saflaştırma



Covid-19 bulaştıktan sonra iyileşmiş donör kanlarından, **aferez veya santrifuj yöntemi** ile, içerisinde antikor bulunan serum ve kan hücreleri birbirinden ayrıştırılacak

Kaprilik Asit Çöktürme



Serumlara **Kaprilik asit veya ammonyum sülfat** ile çöktürmeye uygulanacaktır, istenmeyen proteinlerin çoğunluğunun çökmesi sağlanacaktır.

Affinite Saflaştırma



Protein A/Protein G affinite kolonları kullanılarak protein safsızlıklarından kurtulunması hedeflenmektedir.

İhtiyaç halinde iyon değişim kromatografi basamakları gibi ekstra basamaklar eklenecektir.



Antikorların Karakterizasyonu

SDS-PAGE



Saflaştırma sonunda antikorların safsızlıkları ve yapıları SDS-PAGE ve WesternBlot yöntemi ile kontrol edilecektir

SPR



Surface Plazmon Resonans yöntemi ile proteinlerin bağlanma kinetik analizleri yapılacaktır

SEC-HPLC



Antikorların agregat analizleri bu yöntem ile yapılacaktır.

IP5. ETKİNLİK ÇALIŞMALARI

Yukarıda bahsi geçen yöntemlerden elde edilecek anti-COVID-19 human/kimerik scFv antikörlerinin etkinlik çalışmaları gerçekleştirilecektir.

5.1. *in vitro* çalışmalar

- Plak-azaltma nötralizasyon testi, (Plaque Reduction Neutralization Test-PRNT)
- Virüs nötralizasyon deneyi.

5.2. *in vivo* çalışmalar

Karşı Koyma Deneyleri

MEVCUT DURUM

IP1

- Peptit yapılarının belirlenmesine yönelik analizler tamamenmiş ve proje ortağımız acıbadem **üniversitesinde sentezlendi.**
- **Haftaya immünizasyona başlıyoruz.**
- Proteinini kodlayan rekombinant plazmitlerinin memeli ve bakteri ekspresyon plazmitlerinin satın alınmıştır.

IP2 ve IP3.1

- **Covid-19 pozitif 8 hastadan kan temin edildi.**
- Kanlardan mRNA izolasyonları gerçekleştirildi. cDNA ya çevrildikten sonra rekombinant insan scFv yapıları oluşturulup memeli gösterim ve faj gösterim teknolojileri ile taramaları geçilecektir.



**MAM GMBE COVID-19 ÇALIŞMALARI
BAŞLADI – 26.03.2020**



TEŞEKKÜRLER

