FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ DERSİ

Doç.Dr. Çağla BOZKURT-GÜZEL

İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34116 Beyazıt-İstanbul

E-posta: caglabozkurt@hotmail.com

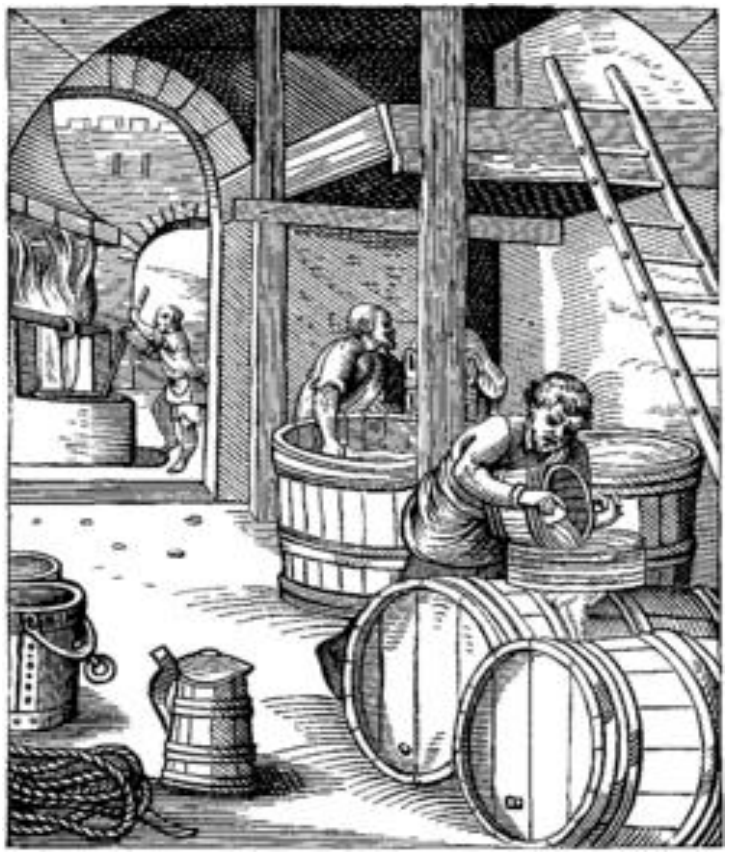
- Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
- Biokimya Anabilim Dalı
- Farmakognozi Anabilim Dalı
- Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı





Biyoteknolojinin ilk uygulaması MÖ 3000-4000'e kadar uzanmaktadır…



Eski Mezopatamya ve Mısır'da maltın işlenmesi sonucu elde edilen bira, bir ürün geliştirmek için bir biyolojik sistemin kullanıldığı ilk biyoteknolojik uygulamadır.

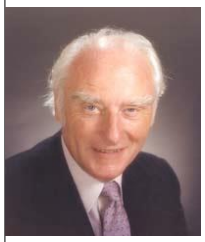


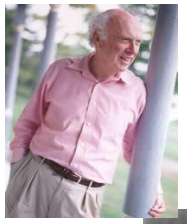


Moleküler Biyoteknolojinin Tarihsel Gelişimi-I

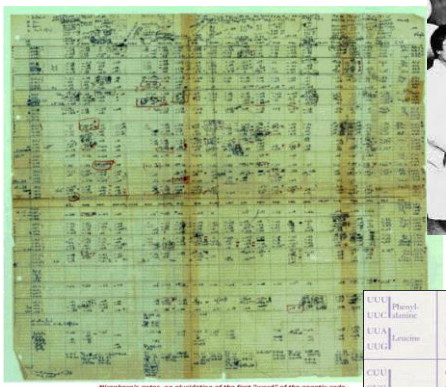
- 1917 Karl Ereky ilk olarak *biyoteknoloji* terimini kullandı: Canlıların yardımıyla ham materyalden ürünlerin elde edilmesi için kullanılan her türlü işlem
- 1940 A. Jost ilk olarak *genetik mühendisliği* terimini kullandı
- 1943 Penisilin endüstriyel ölçekte üretildi
- 1953 Watson ve Crick DNA nın yapısını aydınlattılar
- 1966 Genetik şifrenin tamamı çözüldü
- 1970 İlk restriksiyon endonükleaz enzimi izole edildi



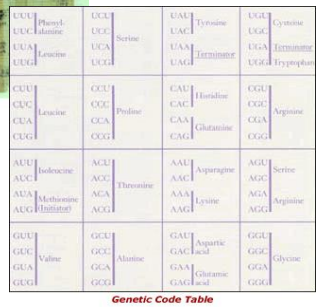


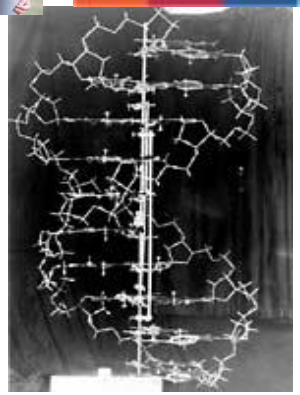





Nirenberg's notes, an elucidation of the first "word" of the genetic code.

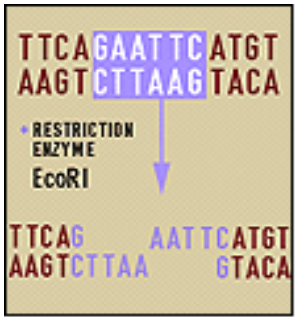



Genetic Code Table



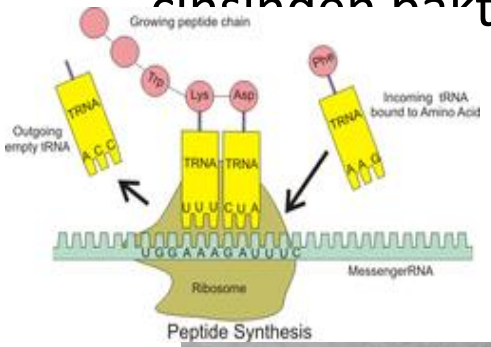




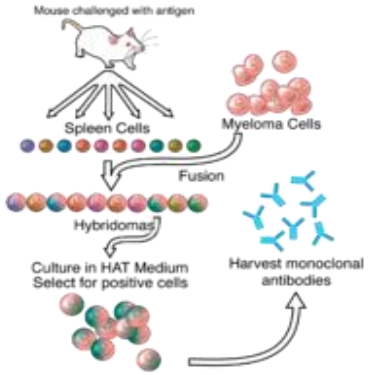


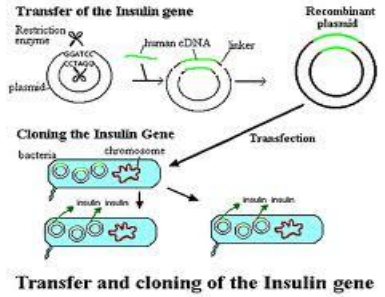
Moleküler Biyoteknolojinin Tarihsel Gelişimi-II

- 1972 Khroana ve ark ilk olarak bir tRNA geninin tamamını sentezlediler
- 1973 Boyer ve Cohen *rekombinant DNA teknolojisinin* ilkelerini ortaya koydular
- 1975 Köhler ve Milstein *monoklonal antikorların* üretimini tanımladılar
- 1976 DNA dizisinin tayini için teknikler geliştirildi.
- 1978 Genentech *E. coli* de insan insülini üretti.
- 1980 ABD Anayasa Mahkemesi ilk defa genetiği değiştirilmiş mo nın patentlenebileceğini kabul etti: General Electric için çalışan Ananda Chakrabarty nin geliştirdiği ve ham benzini parçalayabilen *Pseudomonas* cinsinden bakteri













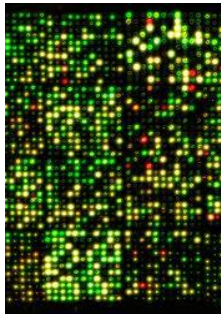




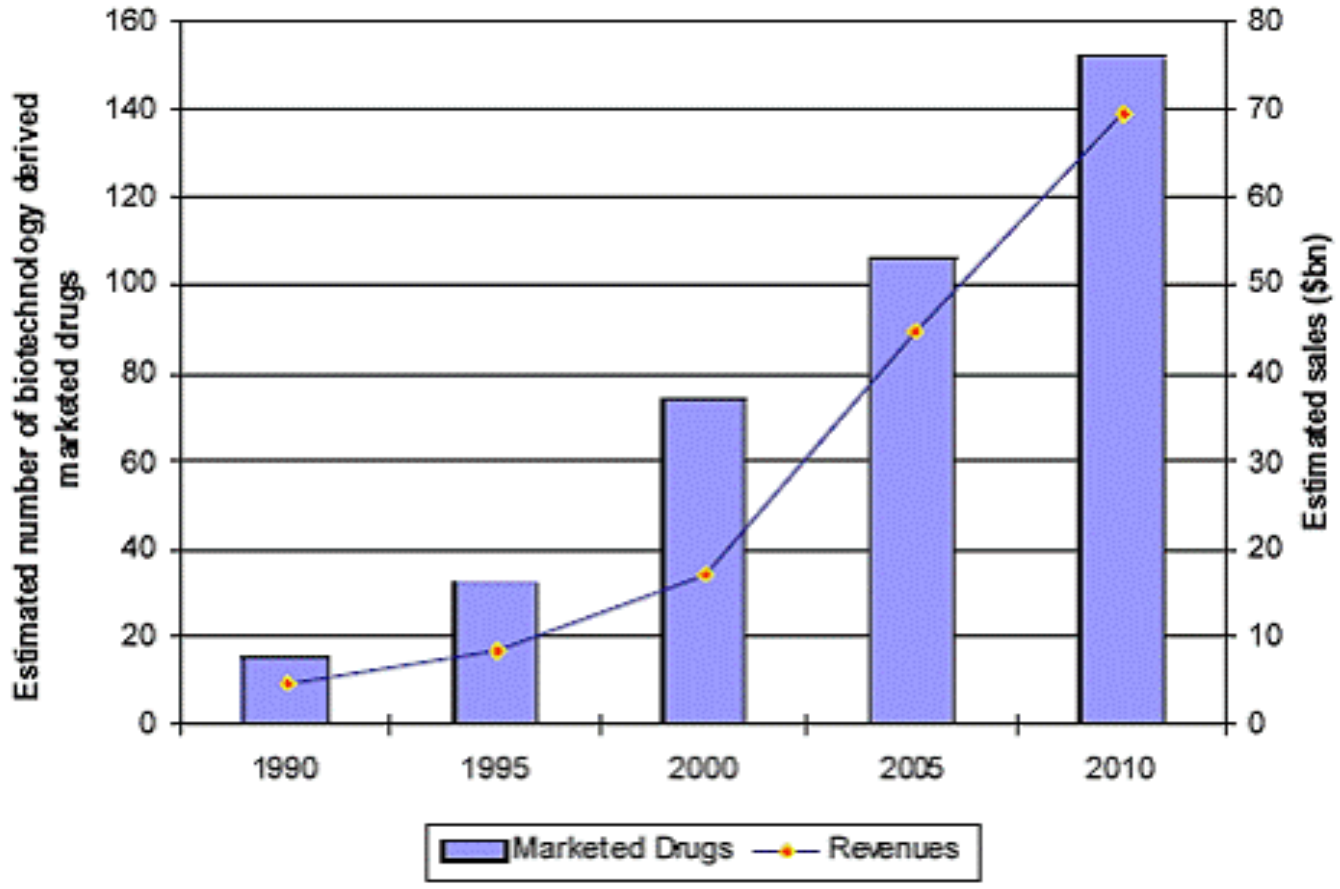
Moleküler Biyoteknolojinin Tarihsel Gelişimi-III

- 1981 ABD'de tanıda kullanılmak üzere ilk monoklonal antikor içeren içeren diyagnostik kit onaylandı
- 1982 Hayvanda kullanılmak üzere rDNA teknolojisiyle üretilen ilk aşı onaylan
- 1988 ABD genetik mühendisliğiyle geliştirilen kansere duyarlı fareyi patentle
- 1989 PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tanımlandı
- 1990 İnsan Genom Projesi (HUGO) resmi olarak başlatıldı
- 1996 Bir ökaryatik organizma olan *Saccharomyces cerevisiae* mayasının tüm kromozomlarının DNA dizisinin tayini tamamlandı
- 1996 Genetiği değiştirilmiş tarım ürünlerinin ticari kullanıma açılımı
- 1997 Bir memelinin (Doly'nin) klonlanması
- 1999 FDA ilk rekombinant füzyon proteinini onayladı (difteri-IL-2)
- 2000 ABD de biyoteknoloji firmalarının yıllık sermayesi 33 milyar doları aştı
- 2001 HUGO tamamlandı ve insan genom dizisi ortaya çıkartıldı
- İnsan geninin mikrodizileri (10.000 geni bir anda test edebilen gene chips) ticari olarak mevcut hale geldi
- ……



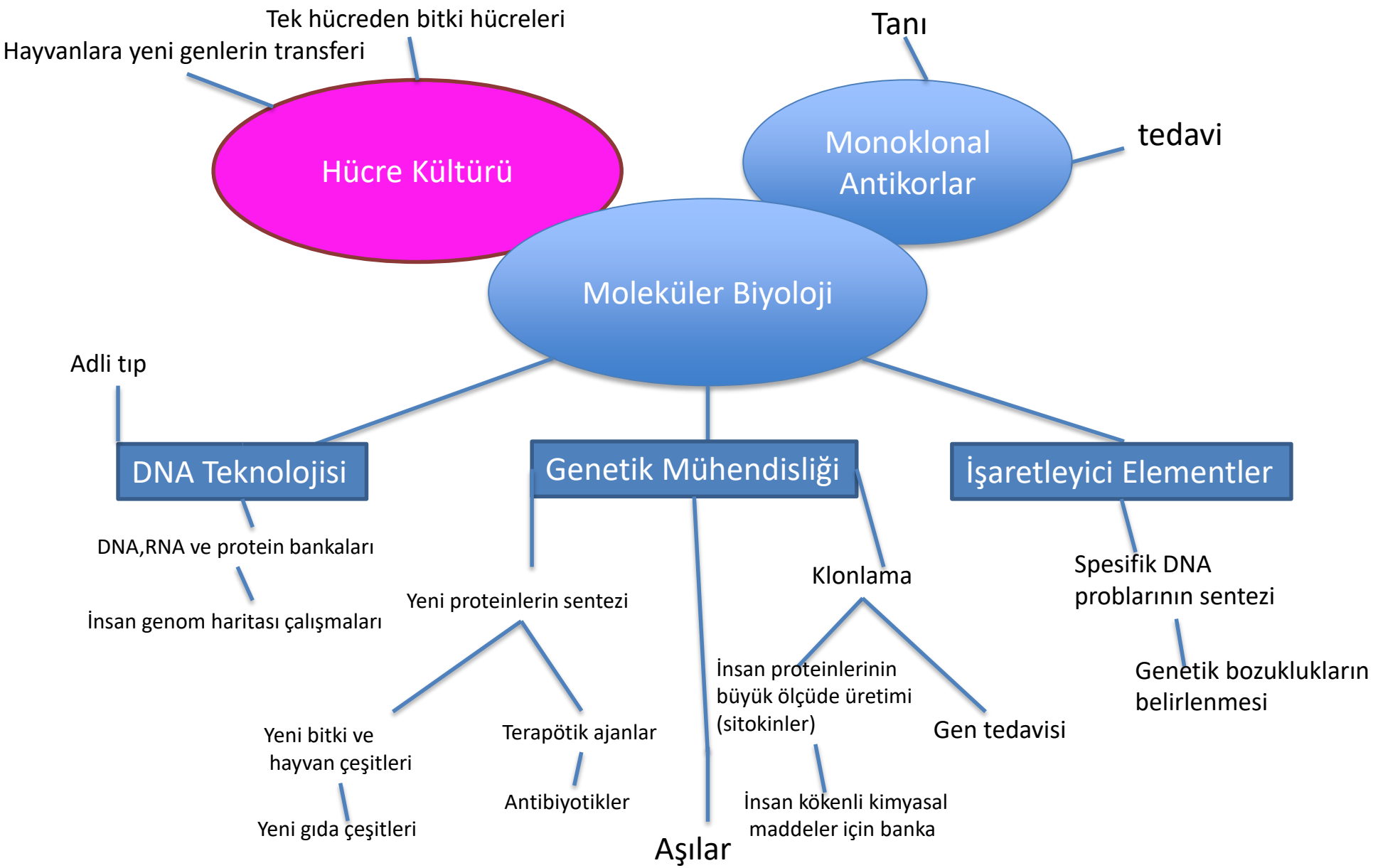


Biyoteknoloji Ürünü İlaç Pazarı



Source: The Biogenerics Market Outlook

Biyoteknolojinin bazı uygulama alanları



Biyoteknolojinin Sağlık Alanındaki Uygulamaları

- Farmasötik Ürünler
- Farmakogenom
- Gen Tedavisi
- Genetik Testler

Biyoteknoloji nedir?

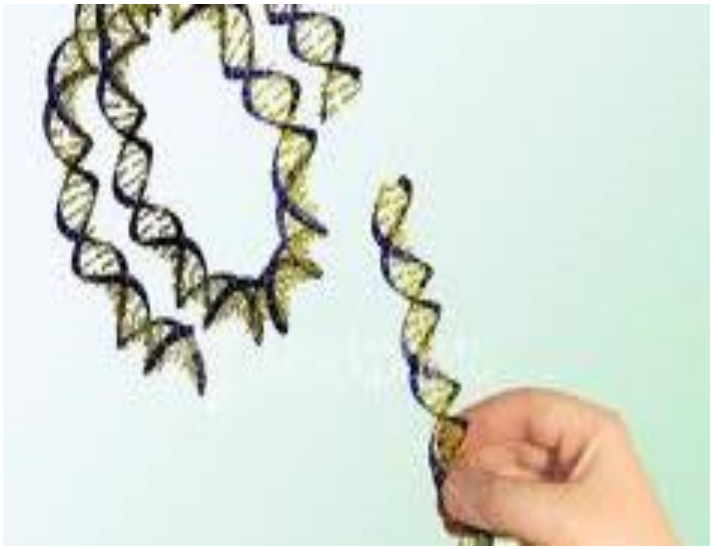


Belirli bir amaç için bir ürünü veya yöntemi oluşturmak veya modifiye etmek amacıyla biyolojik sistemlerin, yaşayan organizmaların veya derivatiflerinin kullanıldığı bilim ve teknolojik uygulamadır.

Amaç: Edinilen bilgiyi ve deneyimlerin endüstriye uygulanmasıdır

Yöntemler: *Genetik mühendisliği* veya *rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi* şeklinde isimlendirilen tekniklerdir

Rekombinant DNA (rDNA) Teknolojisi



Rekombinant DNA (rDNA) Teknolojisi Konu Başlıkları



- rDNA teknolojisinin avantajları
- DNA nın yapısı ve replikasyonu
- Transkripsiyon, translasyon
- Rekombinant ürünlerin elde edilmesinde kullanılan araçlar



rDNA teknolojisinin avantajları



Biyoteknolojinin potansiyel riskleri

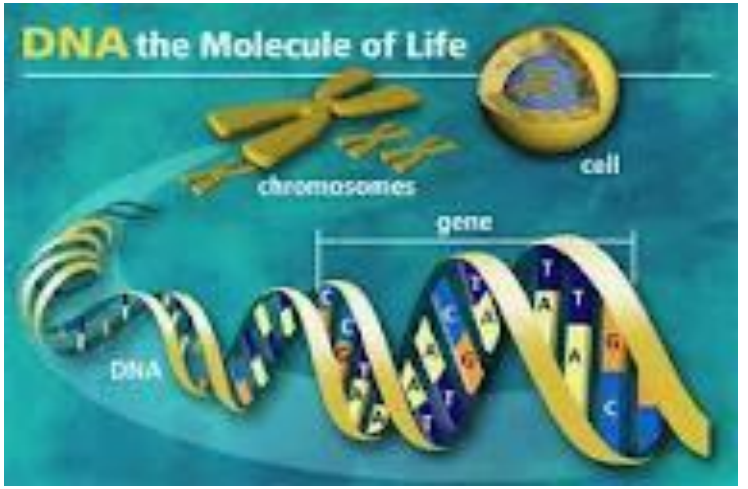
İstenen proteini kodlayan bir genin bir biyolojik sisteme yerleştirilmesiyle, proteinin büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılar

Proteinin istenen bölgesinde modifikasyonların yapılmasını mümkün kılar

Üretimde kullanılan genetiği değiştirilmiş molar ekolojik sistemi bozarak insan ırkı için risk oluşturabilir mi?

Etik olarak yaşayan bir canlının genetiğinin değiştirmek doğru mu?

DNA’nın yapısı



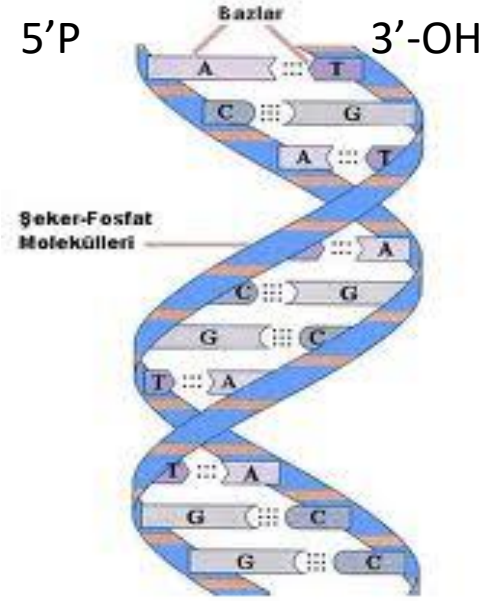
- Sarmal şeklindeki çift zincirli DNA fosfodiester bağlarıyla birbirine bağlanmış 4 çeşit deoksiribonükleotitlerden

  A-adenin

  T- timin

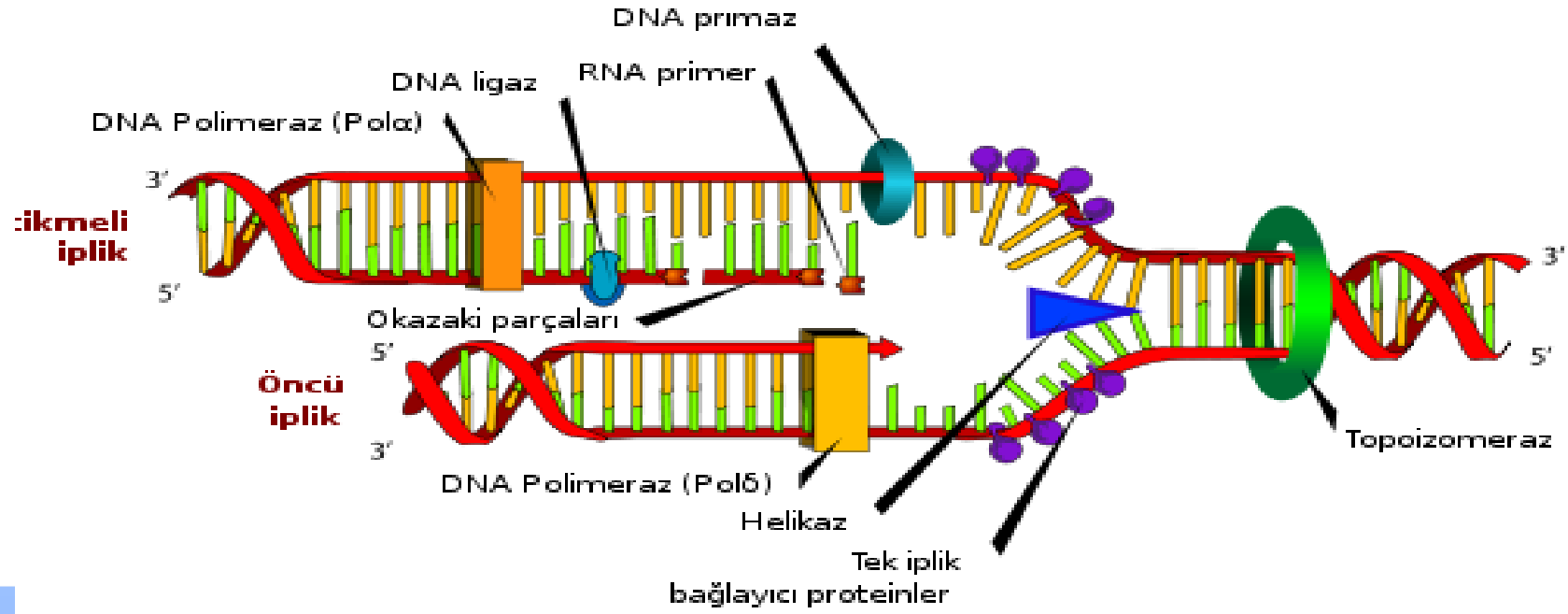
  C- sitozin

  G-guanin den oluşur.
- Zincirler birbirinin antiparelelidir: Bir zincirdeki 5’P uç, tamamlayıcı zincirdeki 3’–OH ucun karşısında yer almaktadır.



DNA Çift Sarmalı

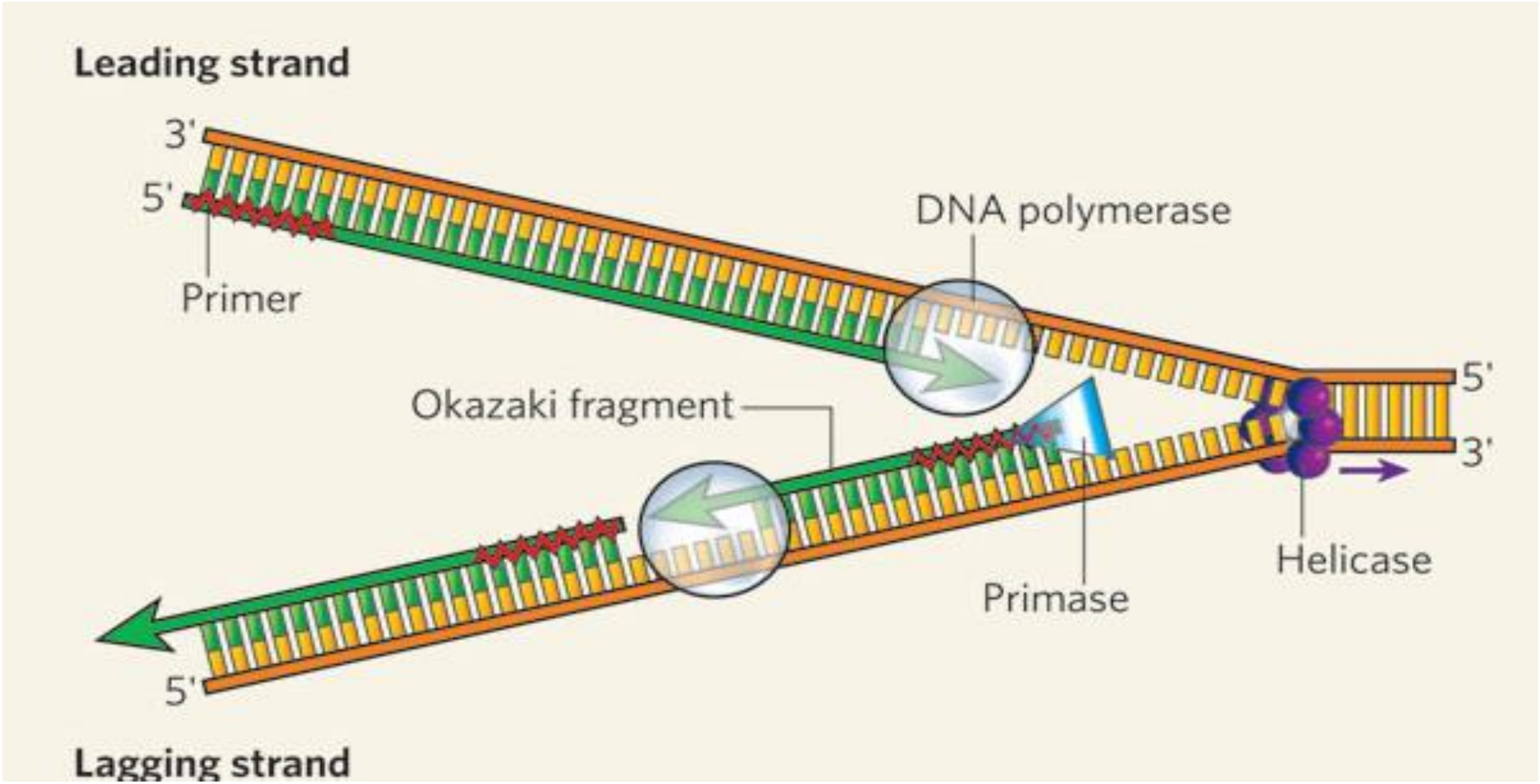
DNA'nın replikasyonu

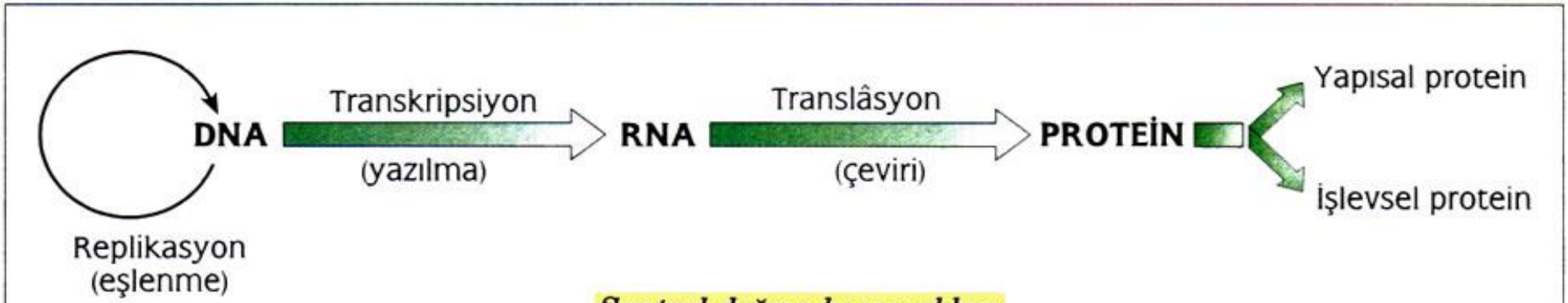


Replikasyon orijini (ori) denilen bölgeden başlar

Bakteri kromozomunda ve plazmitte ökaryatların aksine sadece *ori* bulunur

Enzimlerin yardımıyla zincirler birbirinden ayrılırken, ayrılan zincirlere tamamlayıcı zincirler sentezlenir ve bu şekilde DNA duplike olur

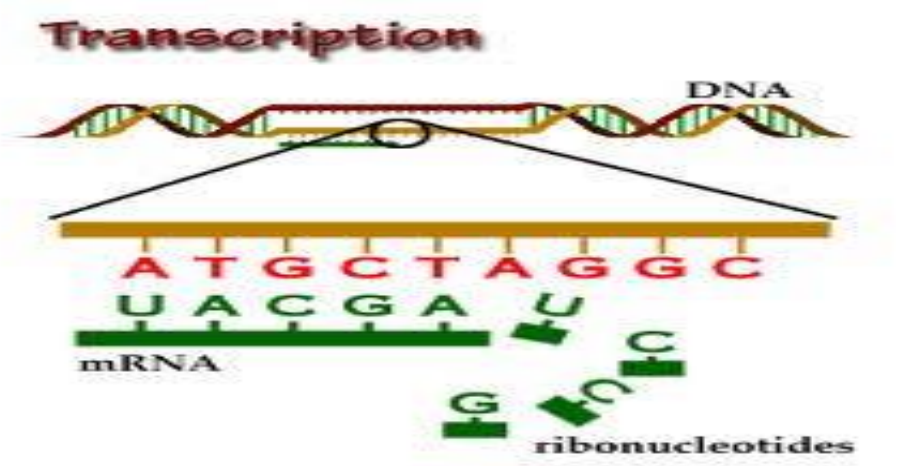

Leading strand
3'
5'
Primer
DNA polymerase
Okazaki fragment
5'
3'
Helicase
Primase
5'
Lagging strand



Santral doğma basamakları

Transkripsiyon-I

- Transkripsiyon: DNA'daki genlerin RNA polimeraz enziminin yardımıyla tamamlayıcı uzunluktaki ribonükleik aside (mRNA haberci RNA) kopyalanmasıdır.
- mRNA'daki üçlü nükleotidden oluşan her kodon bir aminoasidi kodlar ve bu kodonların kodladığı amino asitler genellikle her canlı için üniversaldir.

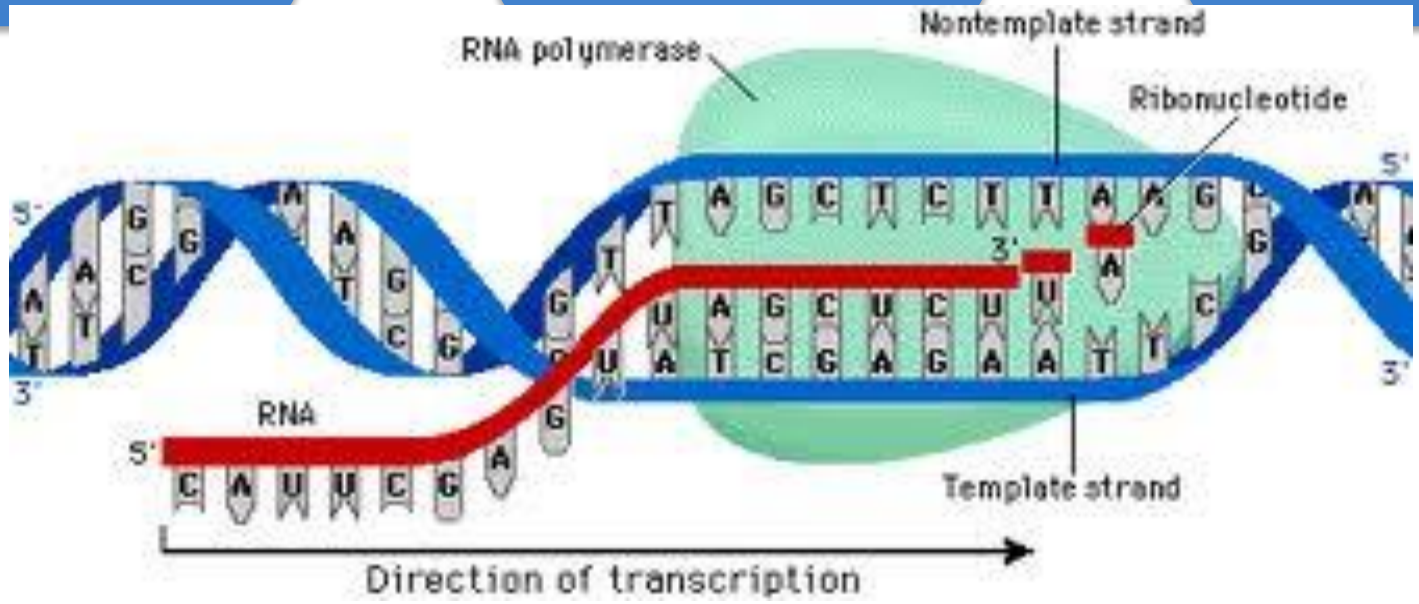


Transkripsiyon-II

Transkripsiyon, RNA polimeraz enziminin okunacak genin önünde bulunan ve *promotör (ilerletici)* denilen bölgeye bağlanmasıyla başlar.

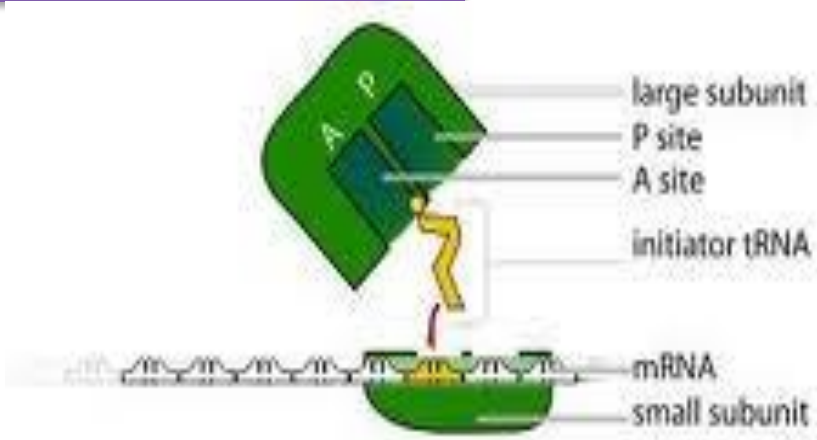
Sarmal DNA kısmen çözülür ve kalıp görevi görerek, RNA nın yapı taşları olan ribonükleotidlerin bağlanmasını sağlar.

Oluşan antiparalel RNA zincirinde DNA zincirini tamamlayan nükleotidler yerleşir: g-t,c-g, t-a, a-u . Transkripsiyon, genin bitiminde yer alan sonlandırıcı kodonun etkisiyle sona erer.



Translasyon

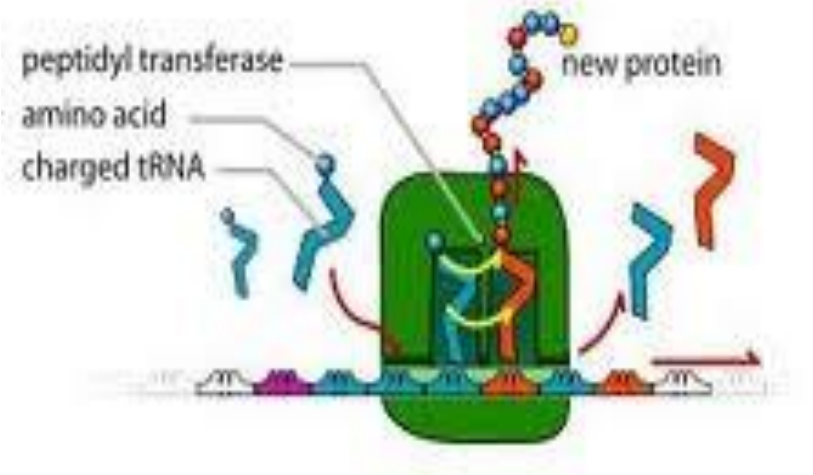
Translasyon: mRNA'daki kodonlara uygun amino asitleri taşıyan tRNA'ların ribozomlarda gerçekleştirdiği protein sürecidir.



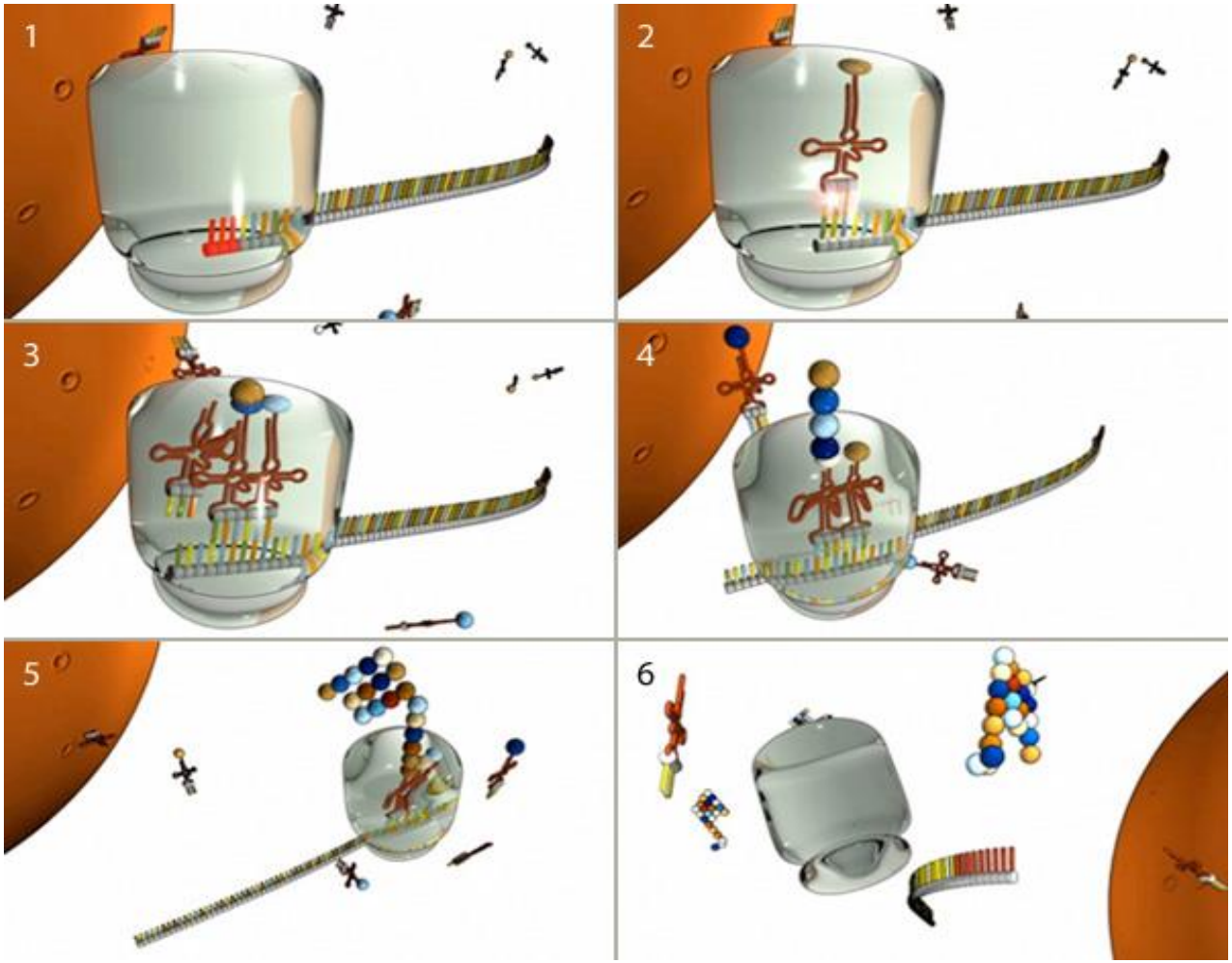
Translasyon, mRNA'daki AUG başlangıç kodonundan başlar.

mRNA'daki kodonun tamamlayacı antikodon dizilerinden ibaret olan tRNA, mRNA'ya bağlanarak taşıdığı aminoasidi oluşan peptıt zincire ilave eder.

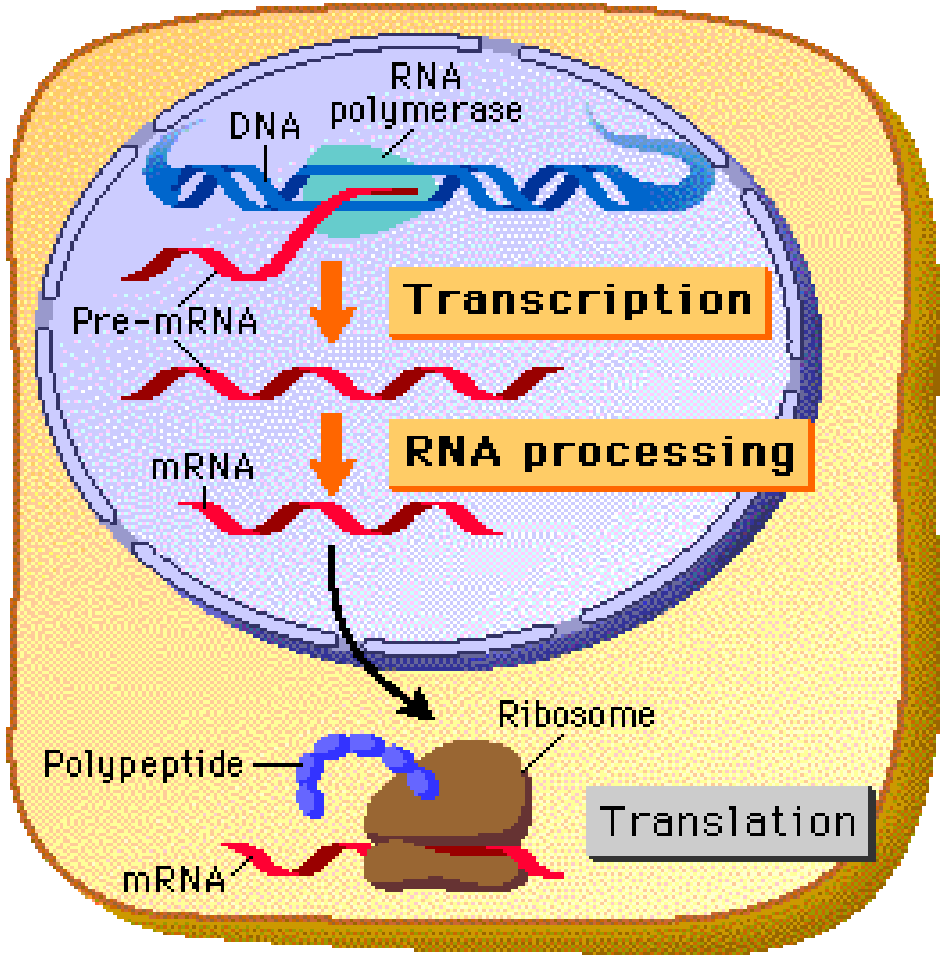
mRNA'dakI sonlandırıcı kodona gelindiğinde peptit zincirin sentezi sona erer.



Translasyon

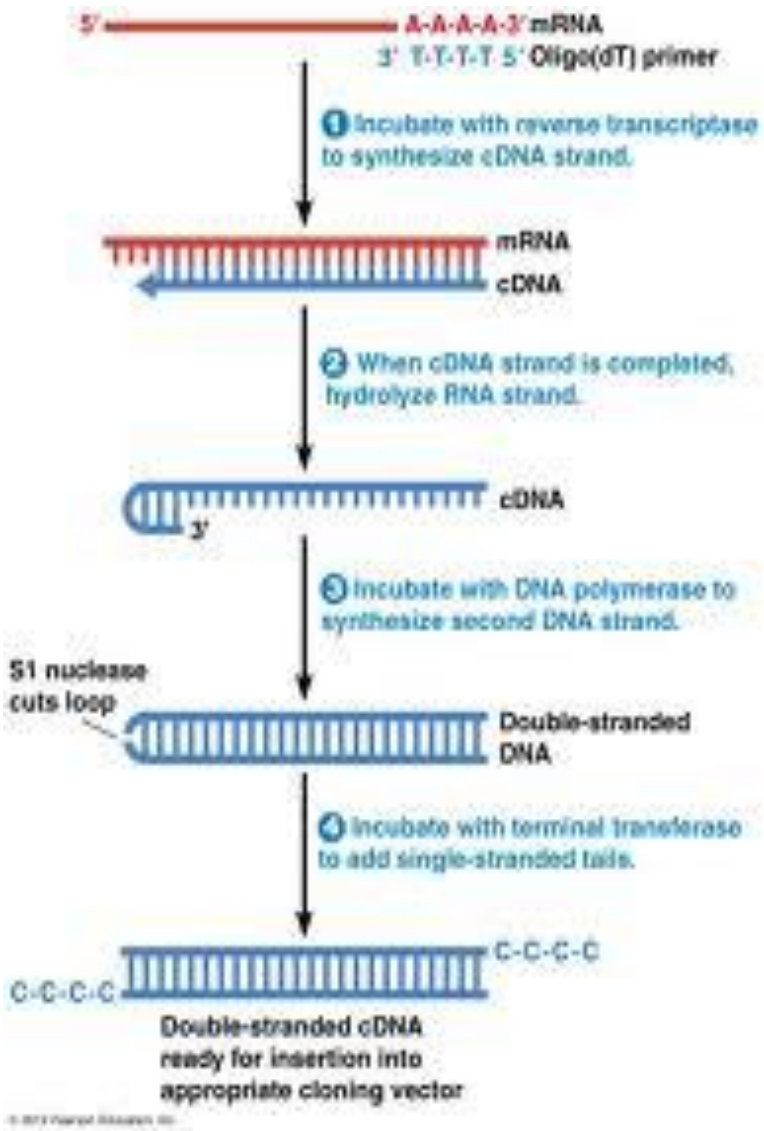


Ökaryotların genetik yapısı



DNA nın transkripsiyonu iki aşamalı olup ilk olarak pre-mRNA

Daha sonra bu zincirden intronların ayrılması ile sadece ekzonlardan oluşan fonksiyonel mRNA oluşur.



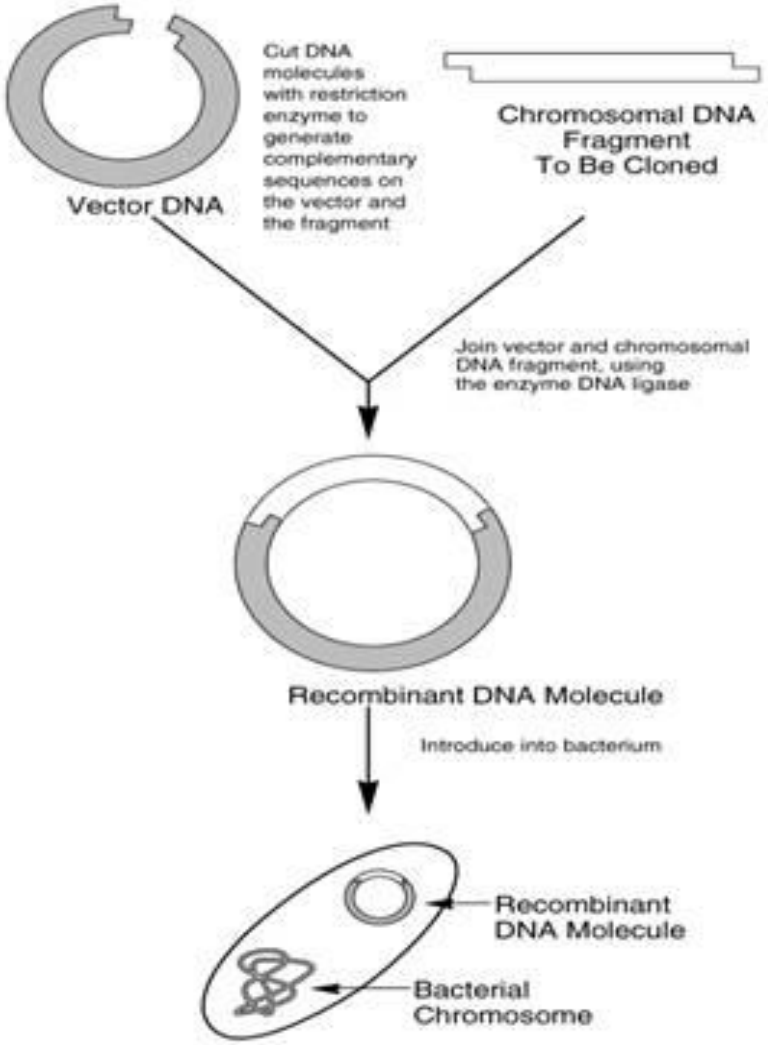
Rekombinant DNA teknolojisinde ökaryot DNA sı plazmide klonlanamaycak kadar büyük olduğundan: intronları içermeyen fonksiyonel m-RNA kullanılarak revers transkriptaz enziminin yardımıyla cDNA (komplementer veya kopya DNA) sentezlenir ve klonlamada elde edilen çift zincirli DNA kullanılır.

1-Revers transkriptaz ile inkübasyon

2-cDNA tamamlandığında mRNA hidrolize olur

3-DNA polimeraz ile inkübasyon

rDNA teknolojisi genetik bilginin (DNA) bir organizmadan diğerine aktarılmasını (klonlanmasını) sağlar



DNA bir organizmadan ekstre edilir, enzimatik olarak parçalanır ***(restriksiyon endonükleazlar)*** ve bir diğer DNA oluşumuna (vektör) bağlanarak ***(ligasyon)*** yeni rekombinant bir DNA molekülü elde edilir

Oluşturulan bu rDNA molekülü bir konak hücreye transfer edilir ***(transformasyon)***

rDNA molekülünü alan ***(transforme olan)*** hücreleri almayanlardan ayırmak üzere tanımlanıp izole edilirler.

Rekombinant ürünlerin elde edilmesinde kullanılan araçlar

DNA'yı modifiye eden enzimler

- Restriksiyon endonükleazlar
- DNA ligazlar

DNA (ekspresyon-klonlama) vektörleri

- Plazmit: klonlanabilen max DNA uzunluğu 15 kb
- Bakteriyofaj: 25 ve 100 kb
- Kozmit: 45 kb
- Yapay bakteri-maya kromozomu: 300kb-2000kb

Konak hücreler (ekspresyon sistemleri)

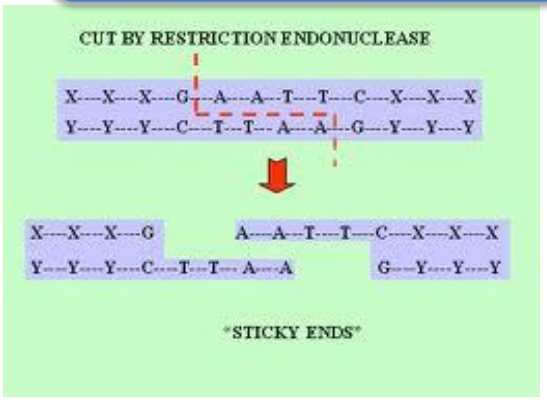
- Prokaryotik hücreler
- Mayalar
- Memeli hücreleri
- Insekt hücreleri
- Transjenik hayvan ve bitkiler

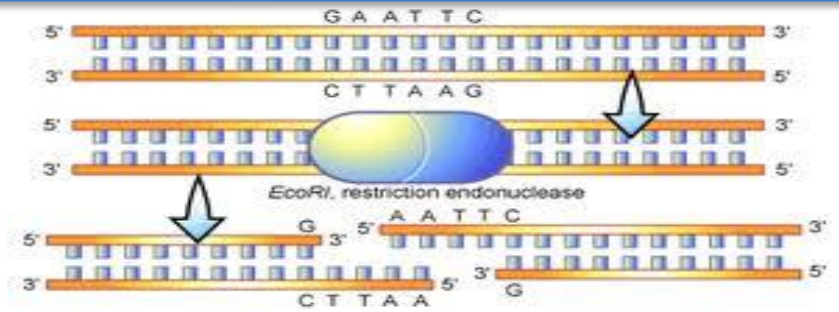
DNA'yı modifiye eden enzimler
1. Restriksiyon endonükleazlar

Moleküler klonlama için hem hedef diziyi içeren kaynak DNA'nın, hem de vektörün süreklilik gösteren, münferit ve yeniden oluşturulabilen fragmanlara parçalanması gerekir.

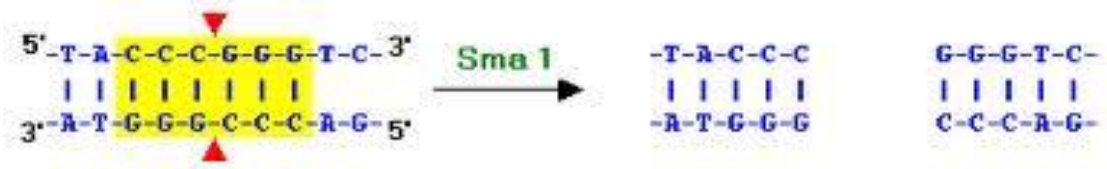
Bakteri ve arkealarda bulunan restriksiyon endonükleazlar nükleotitlerin özgül bir dizisini tanıyarak DNA'nın çift zincirinde bir kesik oluşturular.

DNA'da bağlandıkları bölgeler 4-8 nükleotit uzunluğundaki azotlu bazlar olup palindromik dizilerdir, yani karşılıklı gelen dizileri identik olup ileri ve geri aynı okunur.





G A A T T C
C T T A A G



C C C G G G
G G G C C C

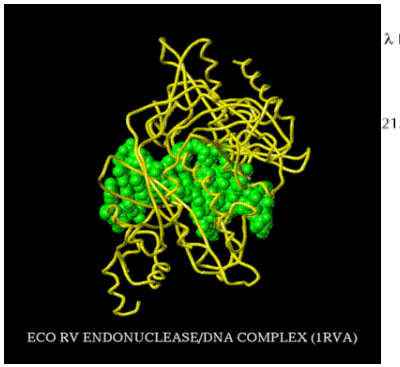
Nomenklatürü

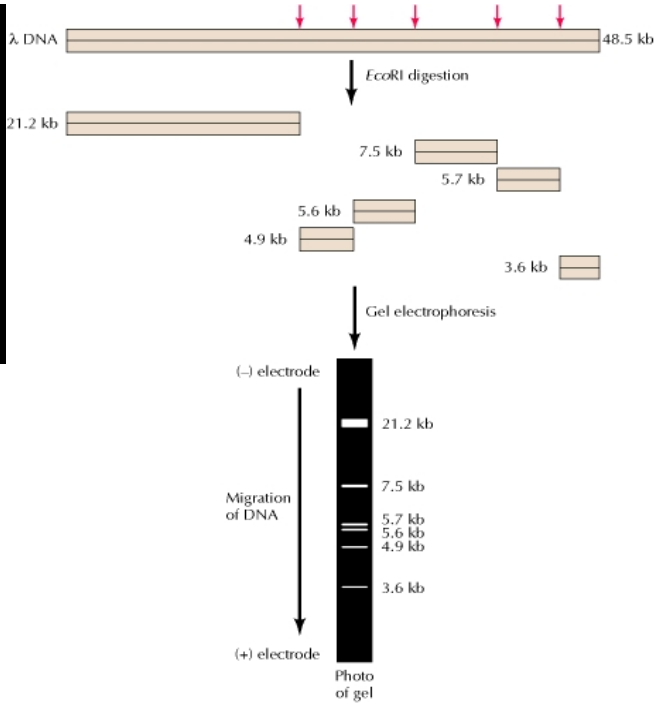
Keşfedilmeye başlandığı 1970'lerden beri farklı bakterilerden 100'den fazla restriksiyon enzimi tanımlanmıştır. Her enzim izole edildiği bakterinin cinsi ve suşun kökenine göre adlandırılır

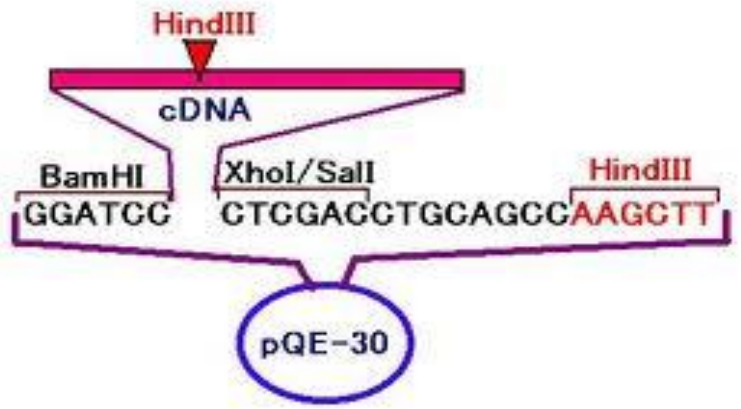
***Eco*RI isminin türeyişi**		
Kısaltma	Anlamı	Tanımı
E	*Escherichia*	Cins
co	*coli*	Tür
R	RY13	Suş
I	Ilk identifiye edilen	Bu bakteriden identifiye edilme sırası

Bazı restriksiyon endonükleazlara örnek

Enzim	Kaynak
*Eco*RI	*Esherichia coli*
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*
*Pst*I	*Providencia stuartii*
*Sau*3AI	*Staphylococcus aureus*
*Sma*I	*Serratia marcescens*
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*
*Not*I	*Nocordia otitidis*

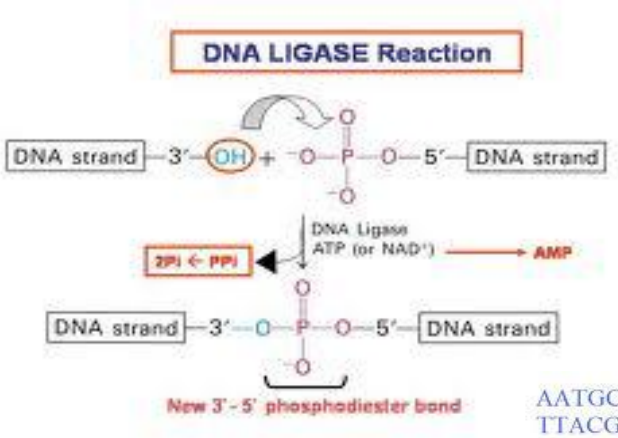


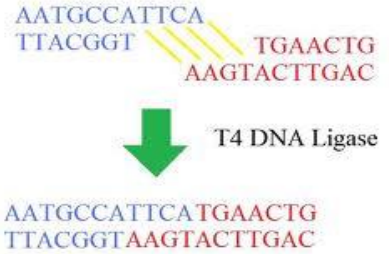


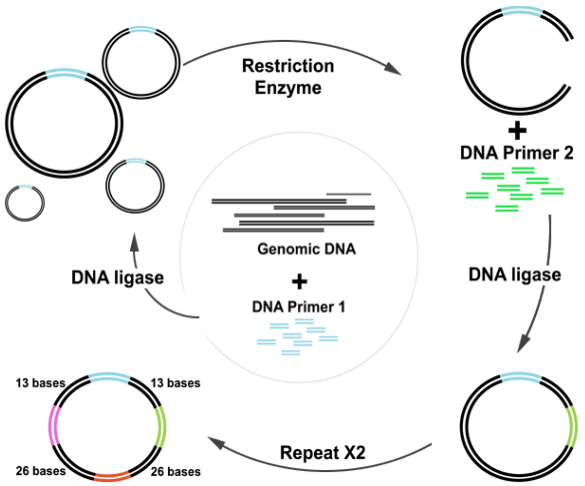


DNA'yı modifiye eden enzimler
2. DNA Ligazlar

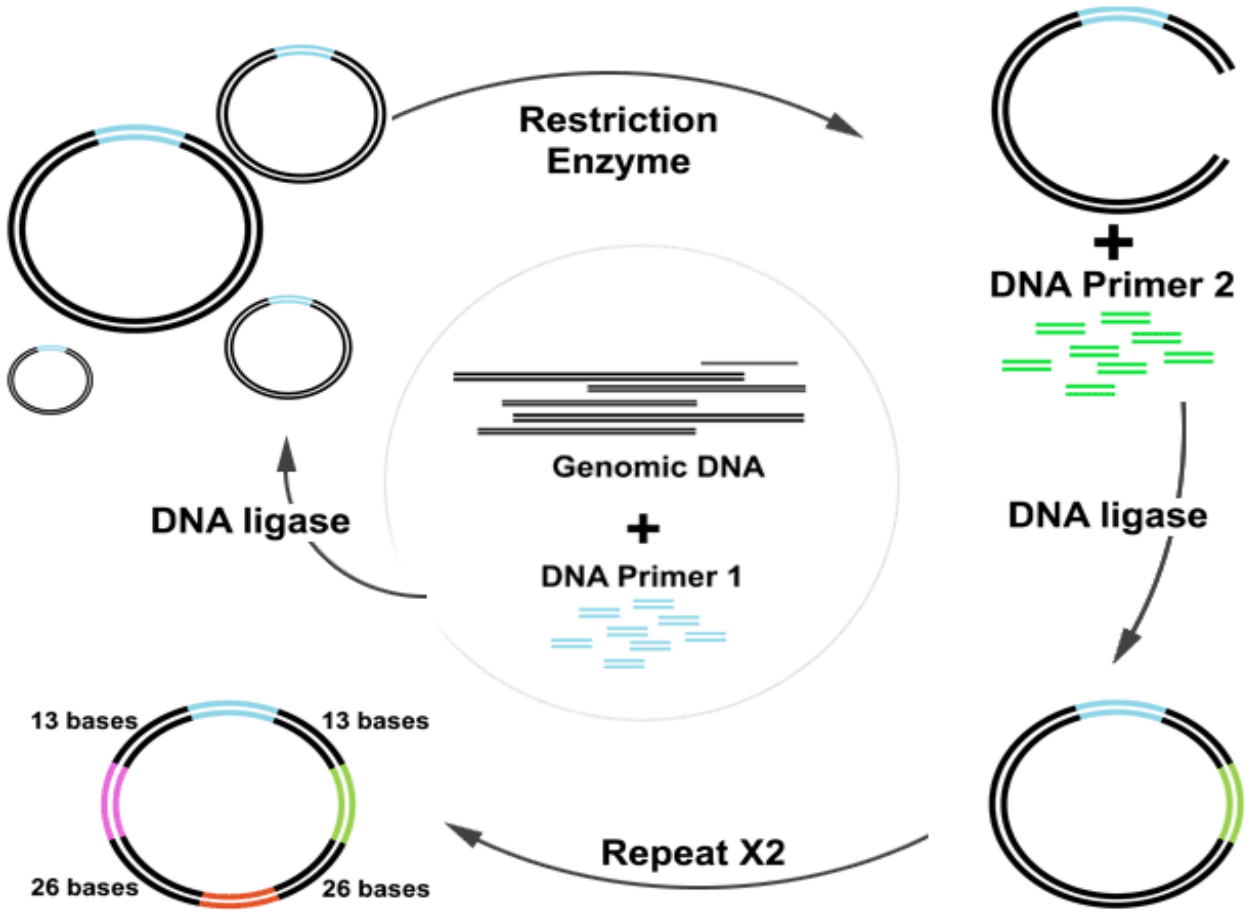
- Bu enzim DNA polimeraz III'ün sentezlediği DNA parçasının 5' fosfat grubu ile, DNA polimeraz I tarafından sentezlenmiş DNA parçasının 3' hidroksil grubunu fosfodiester bağıyla bağlar.
- rDNA teknolojisinde, restriksiyon enzimleri ile elde edilen ve plazmidin içine yerleşen DNA parçalarının kovalan bağlarla plazmide bağlanmasını sağlar ve bu şekilde stabil **rekombinant plazmitlerin** elde edilmesinde kullanılırlar.
- Genellikle bu reaksiyonların katalize edilmesinde bakteriofaj T4den elde edilen T4 DNA ligazı kullanılır.







- **DNA’yı modifiye eden enzimler nelerdir?**

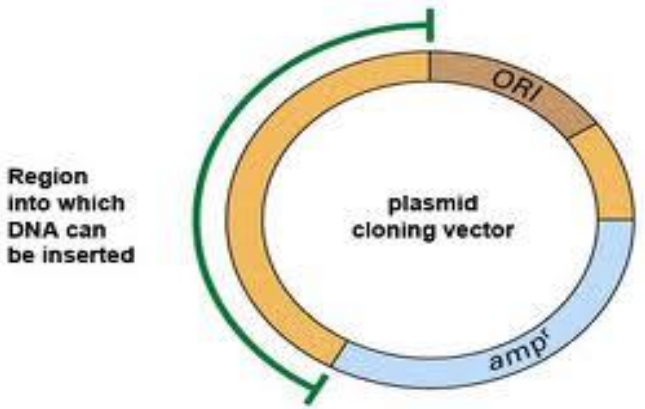

Restriction
Enzyme
DNA Primer 2
DNA ligase
Repeat X2
13 bases
13 bases
26 bases
26 bases
DNA ligase
Genomic DNA
DNA Primer 1

DNA (ekspresyon/klonlama) vektörleri

Vektör, yabancı DNA'yı konak hücreye taşıyan sisteme verilen addır ve bu amaçla en çok ***plazmitler*** kullanılır.

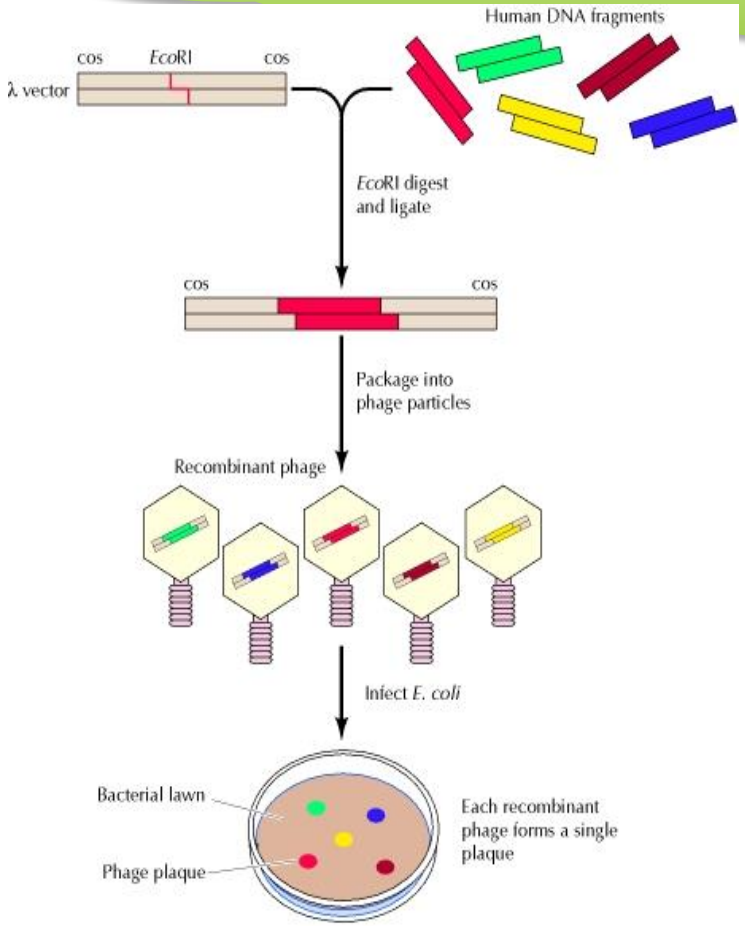
Vektörde bulunması gereken özellikler:

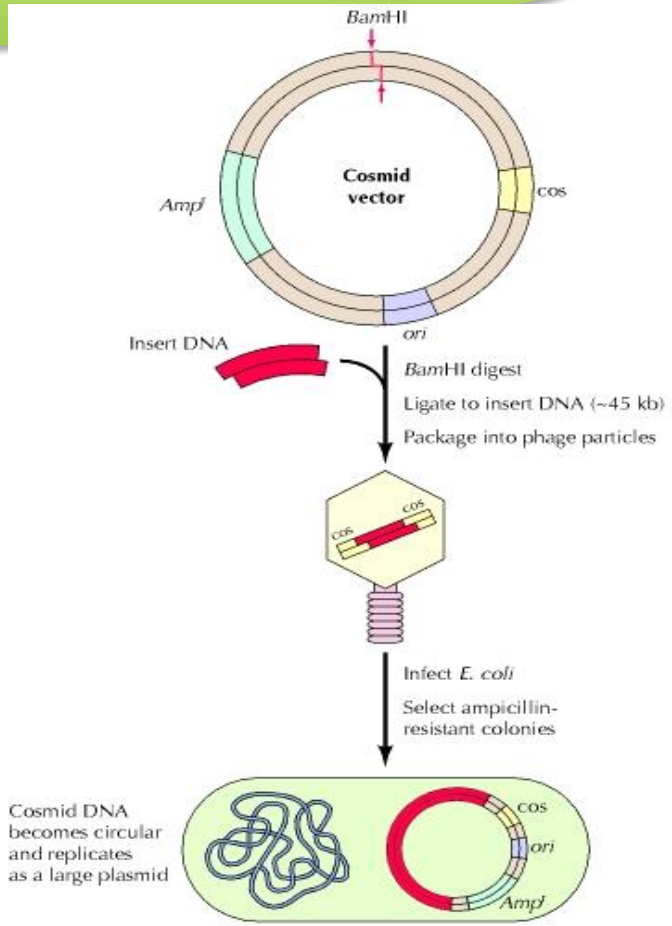
- Alıcı hücrenin kromozomundan bağımsız bir replikon olarak çoğalmasını sağlayan bir *replikasyon orijinine (ori)* sahip olmalıdır.
- Plazmidi taşımayan hücreler arasından seçilebilmesini sağlayan özelliği kazandıran bir *antibiyotik direnç geni* taşımalıdır.
- *Restriksiyon endonükleaz* kesim bölgesi bulundurmalıdır.
- Klonlanan yabancı DNAnın konak hücrede transkripsiyonunu sağlayan bir *promotör (P)* taşımalıdır.
- Bulunduğu ortamdan ayrı bir molekül olarak izole edilebilmelidir. Bu bir virüs ise bakteri kromozomuna entegre olmamalıdır.



Plazmid: klonlanabilen max uzunluğu **15kb**

Klonlanan yabancı DNA'nın boyutu arttıkça vektör olarak kullanılan sistemler değişmektedir



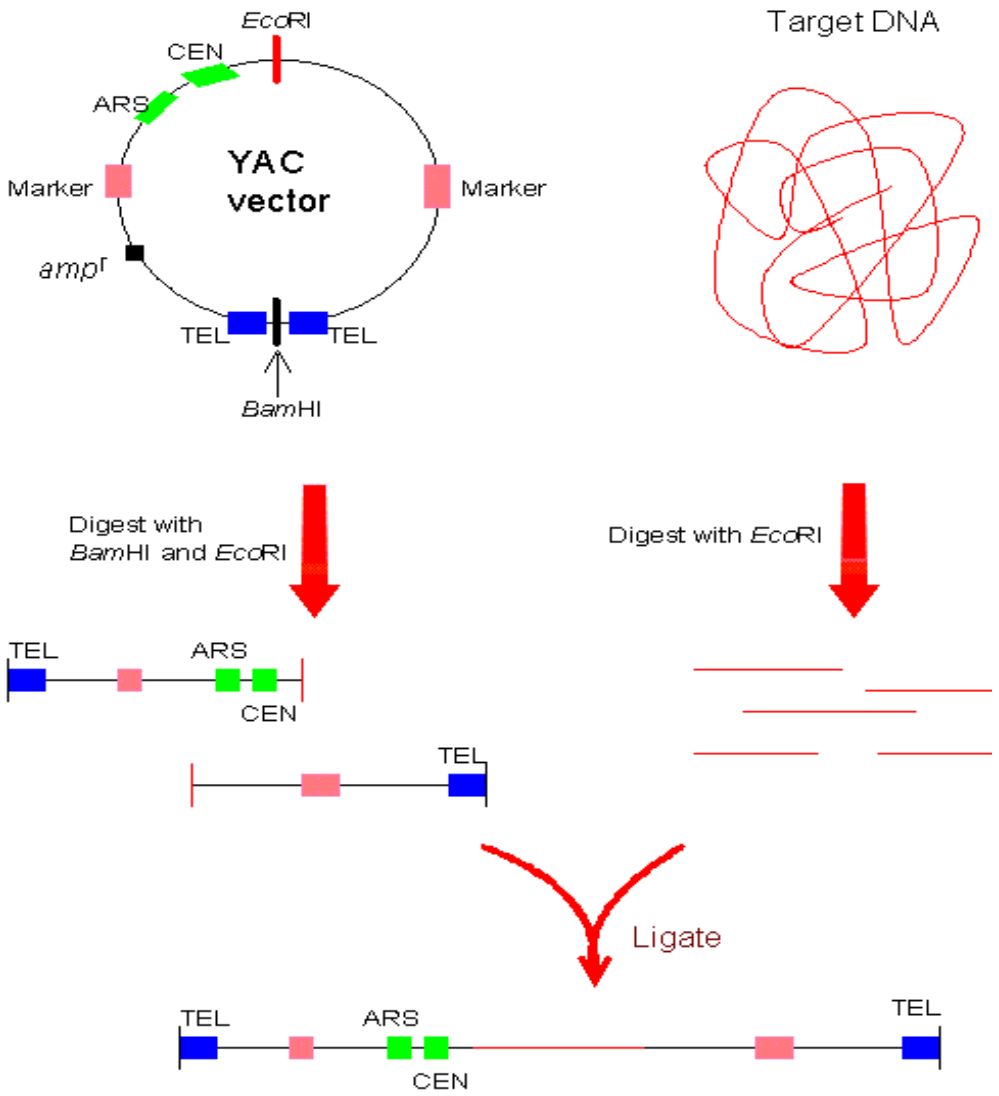


Bakteriyofaj: Klonlanabilen max DNA uzunluğu bakteriyofaj delta için 25kb, P1 için 100kb.

Kozmit: Klonlanabilen max DNA uzunluğu 45kb

Klonlanan yabancı DNA'nın boyutu arttıkça vektör olarak kullanılan sistemler değişmektedir

Yapay bakteri maya kromozomu: bakteri 300kb, maya 2000kb



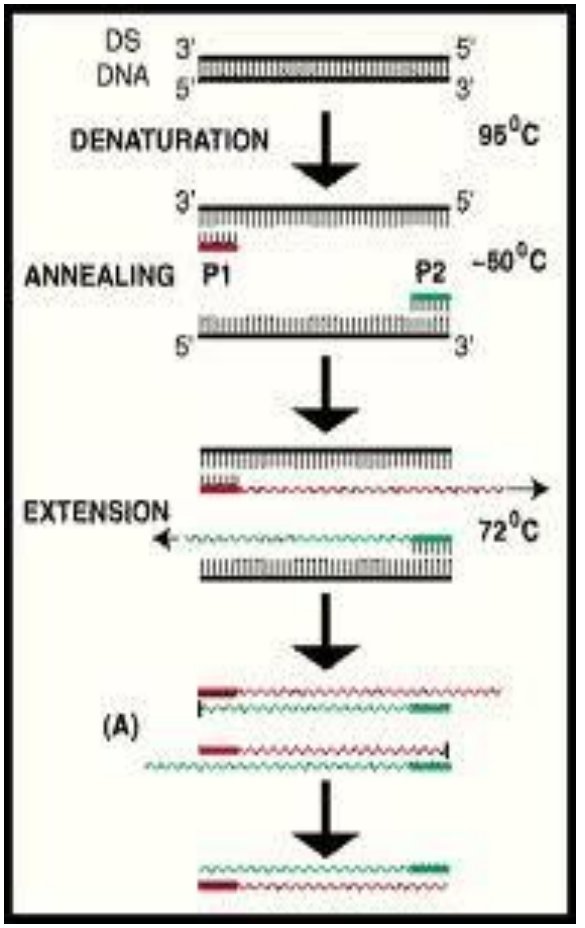
Rekombinant DNA teknolojisiyle hedeflenen farmasötik ürünü kodlayan genin konak hücreye klonlanması

- Memeli DNA'sı intronlar içerdiğinden plazmide klonlanamayacak kadar büyük genlerden oluşur. Ancak hedef proteini kodlayan ve intron içermeyen mRNA'nın izole edilip, revers transkriptaz enziminin yardımıyla önce tek zincirli cDNA, daha sonra çift zincirli DNA'nın oluşturulması bunu mümkün kılar.
- Seçilen plazmide göre endonükleaz restriksiyon enzimi ilave edilir **(PCR).** DNA ligaz enzimi ile kesilen uçlar bağlanır.
- **Oluşan ekspresyon vektörü**: antibiyotik direnç genleri, ori, promotör bölge ve hedef proteini kodlayan DNA'yı içerir.
- **Plazmit *E.coli*'ye transforme edilir.** Sadece plazmidi taşıyan hücreler antibiyotik içeren besiyerinde ürerler.
- DNA probların yardımıyla hibridizasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla **hedef proteini içeren plazmid seçilir**.
- İlgili klon seçildikten sonra, konak hücrede plazmid çoğaltılarak, hedeflenen **proteinin ekspresyonu sağlanır.**

Polimeraz zincir reaksiyonu

(PCR=*polymerase chain reaction*)

- **DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan reaksiyondur.**
- Reaksiyon 94-98 ^{0}C'de gerçekleşen *denatürasyon*, 37-65 ^{0}C'de gerçekleşen *tavlama* ve 72 ^{0}C'de *uzama* aşamalarından oluşur ve bu döngülerin belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır.
- Bu yöntemin gelişmesi, yüksek ısıya dayanıklı olan ve *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen bir DNA polimeraz enzimi olan *Taq polimeraz*'ın *keşfiyle gerçekleşmiştir.*
- **rDNA teknolojisindeki** bir diğer önemi: reaksiyona giren primerların yardımıyla, çoğaltılan DNA dizisinin uçlarına restriksiyon enzimlerine ait nükleotid dizilerin ilave edilmesine olanak vermesidir.



Denaturation
@ 94 -95° C

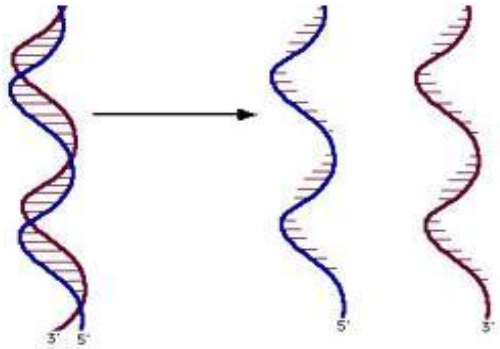
Annealing
@ 40 -60 ° C

Extension
@ 70-74 ° C

Denaturation of double stranded DNA into single strands

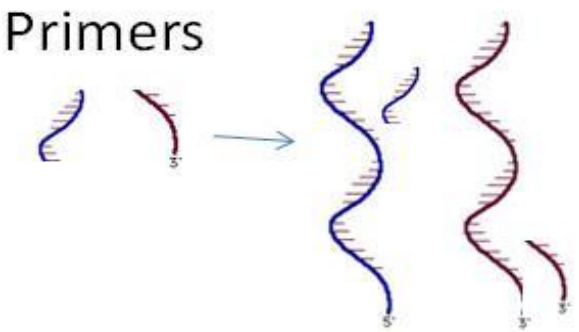
Primers bind to their complementary sequence on the target DNA

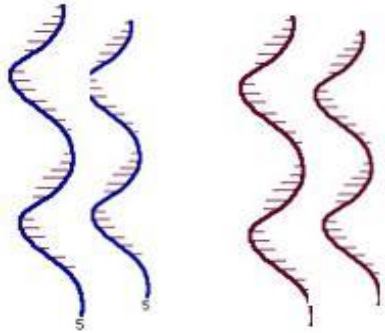
Once annealed to the strand, primer extend by a DNA polymerase to synthesize the complementary 2nd strand



1 double stranded DNA

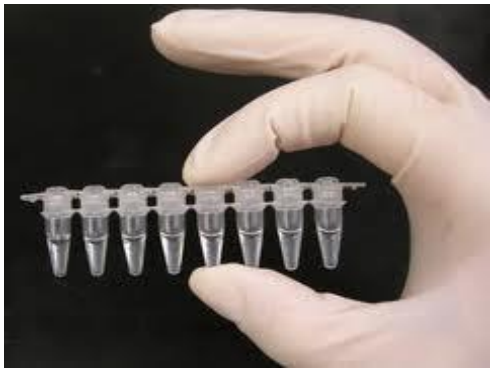
2 single stranded DNA





2 double stranded DNA

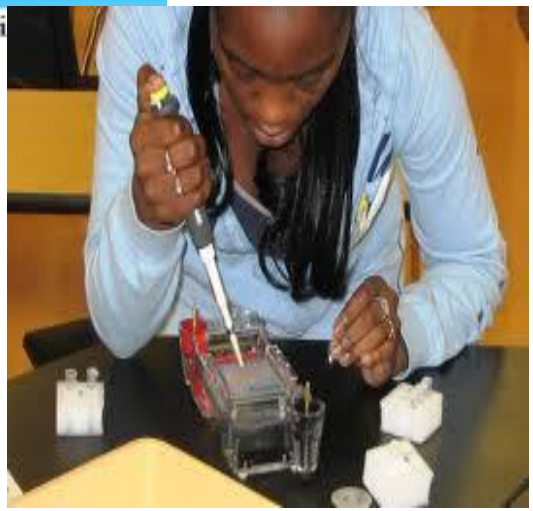




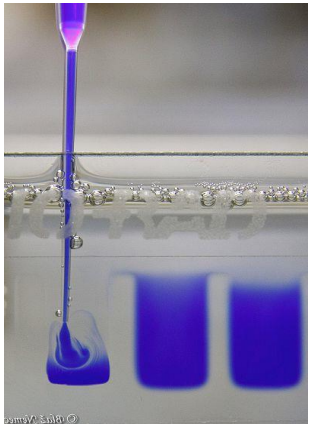


"Did they miniaturize the Polymerase Chai
to atomic level?"

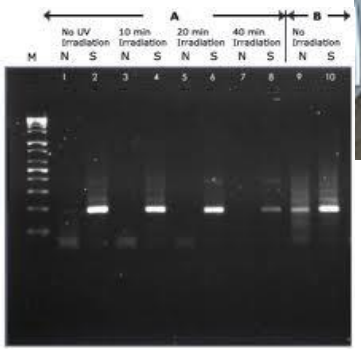












Oluşturulan rDNA moleküllerinin konak hücreye transfer edilmesi Transformasyon

- **Doğal fizyolojik yollarla transformasyon**

Endüstriyel biyoteknolojide kullanılan *Bacillus subtilis* gibi bazı bakteriler doğal fizyolojik koşullar altında DNA'yı hücre içine alma yeteneğine sahiptir.

- **Yapay yollarla transformasyon**

Yüksek konsantrasyonlarda CA^{+2} iyonlarının varlığında uygulanan ısı şoku (42 ^{0}C'de 30-120 sn) hücre membranını DNA ya geçirgen kılar.

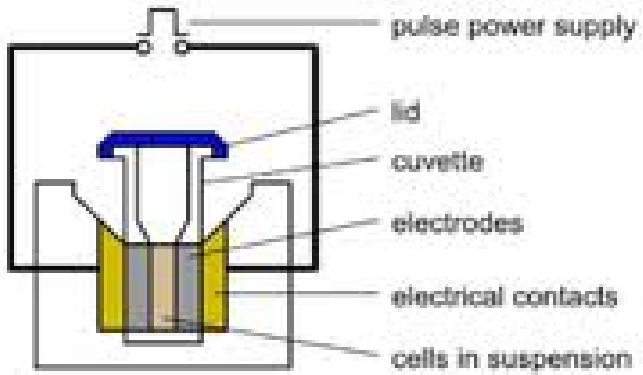
Elektroporasyon: Hücreye uygulanan 10-20kV cm düzeyinde bir elektrikli alan, membranında DNA'nın kolaylıkla geçebileceği deliklerin açılmasına neden olur. Bu yöntem daha büyük rekombinant vektörlerin hücreye transformasyonu için elverişlidir.

Bakteriyofaj infeksiyonu (transdüksiyon): rDNA, bakterileri infekte eden virüsler olan bakteriyofajların kapsidine yerleştirilip, ardından doğal yolla bakteri infekte edildiğinde DNA bakteriye geçer.

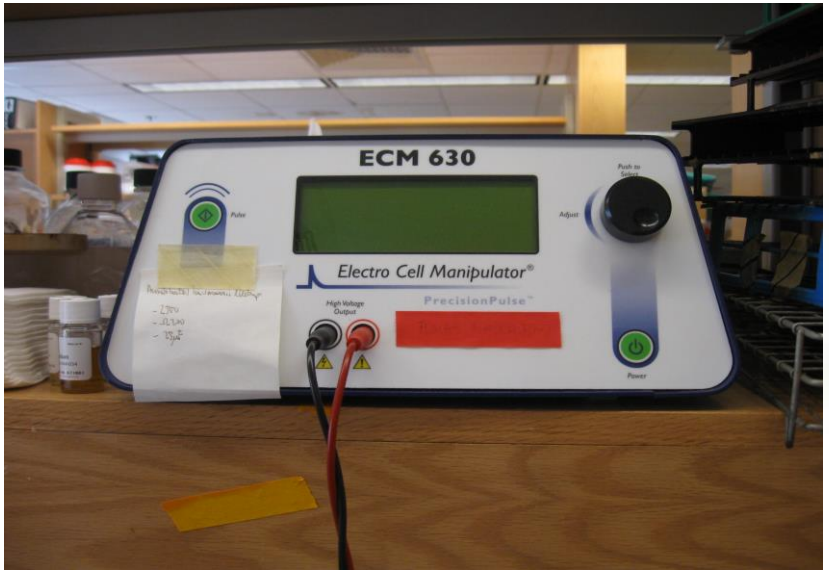
Konjugatif plazmitler: İki bakteri hücresinin yakın teması sonucunda özel bir grup plazmit olan konjugatif plazmitlerin aracılığıyla DNA bir hücreden diğerine aktarılır.

elektroporasyon

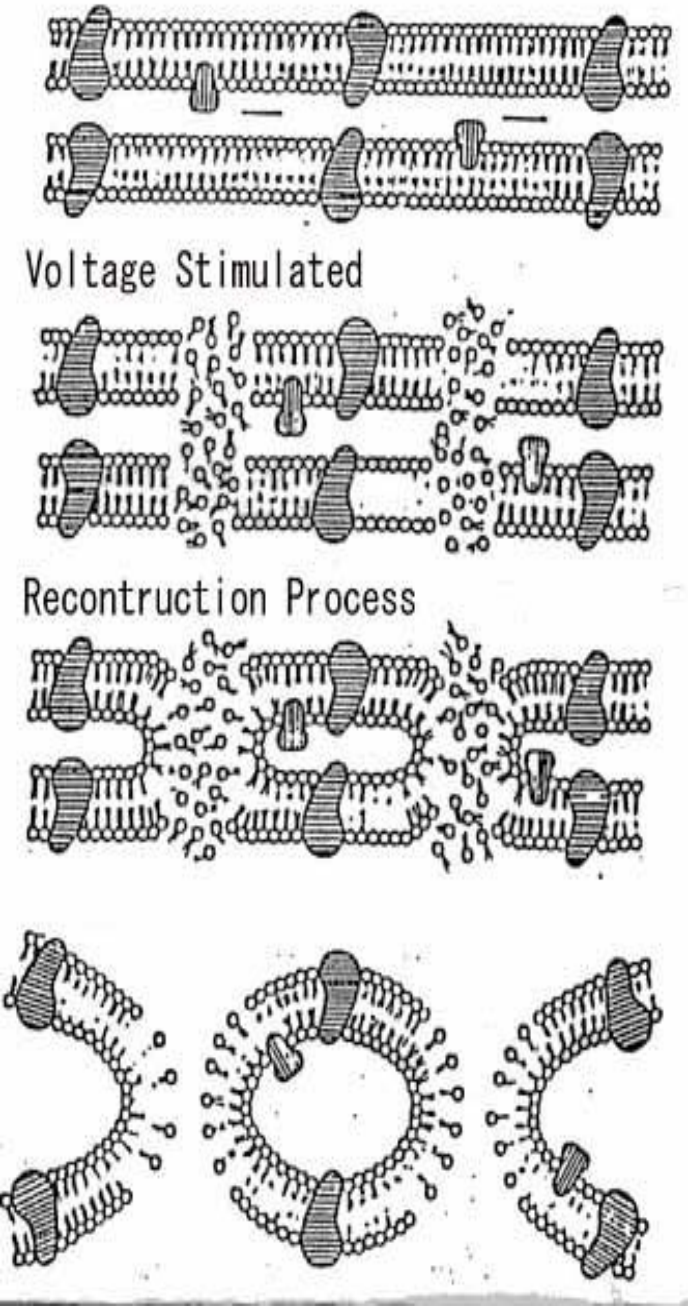












Electroporation





Cell Membrane
Before Pulse



Cell Membrane
During Pulse



Cell Membrane
After Pulse
(Cell returns to original state)

Rekombinant protein ekspresyon sistemleri

Prokaryatik ekspresyon sistemleri

- *Escherichia coli*
- *Lactococcus lactis* ve diğer bakteriler (ör: *Bacillus* türleri)

Maya

- *Saccharomyces cerevisiae (ekmek mayası)*
- *Pichia pastoris, P. maethanolica)*

Memeli hücreleri

- Virüsle infekte hücre (ör: CMV, SV40, adenovirüs, retrovirüs)
- İndüklenebilir ekspresyon sistemleri

Artropot hücreleri (İnsekt)

- Baculovirüs, stabil rekombinant soyları, *E. coli,* Schneider hücreleri

Diğerleri

- Transjenik fare, transjenik hayvan sütleri, transjenik bitkiler, Xenopus oositleri

E. coli ekspresyon sistemi

- rProteinlerin *E.coli'*de eksprese edilmesinin başlıca avantajları:
  a)Basit üreme koşulları b)düşük maliyet c)yüksek verim

- Ancak memeli hücrelerinde görülen glikozilasyon veya protein katlanması gibi birçok **translasyon sonrası modifikasyonu** gerçekleştirememektedir. Bu nedenle stabilitesi ve biyolojik aktivitesi düşük olan proteinler üretilmektedir.

- ***E.coli'*de üretilen ve onaylanan rekombinant farmasötik ürünler arasında:**
- kan faktörleri (kan faktör VIII),
- hormonlar (insülin, somatropin),
- büyüme faktörleri (GM-CSF),
- sitokinler (INF-α, INFβ-, INF-Y. TNF-α, IL-2, IL-11,IL-1Ra),
- rekombinant altbirim aşıları (Lyme *etkeni Borellia burgdorferi* nin OspA yüzey antijenini içeren aşı)

S. cerevisiae ekspresyon sistemi

- rProteinlerin *S. cerevisiae'*de eksprese edilmesinin başlıca avantajları

a)Basit üreme koşulları, insekt ve memeli hücrelerine oranla düşük maliyet ve yüksek verim

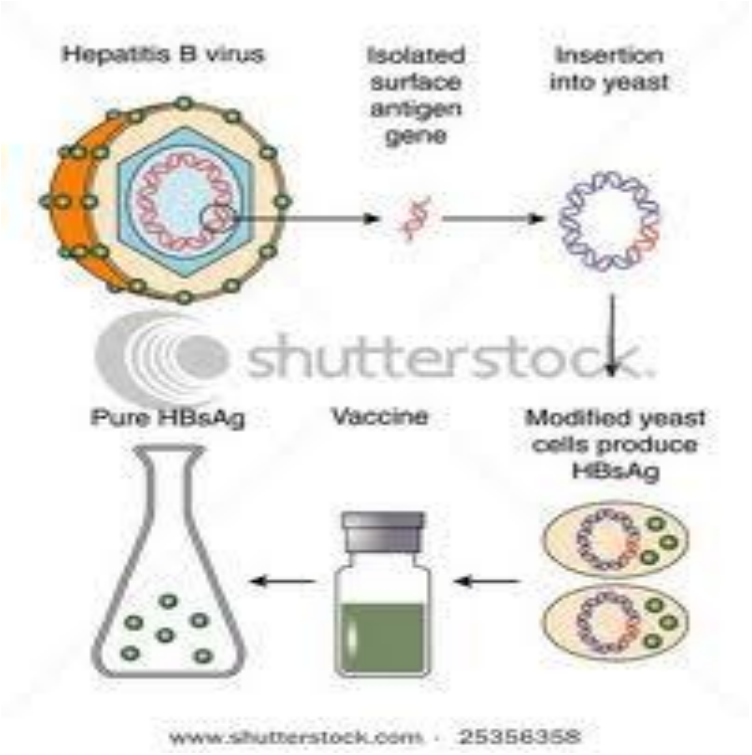
b)Ekmek mayası olarak yıllardır güvenle kullanılmış olması güvenliğini arttırmaktadır.

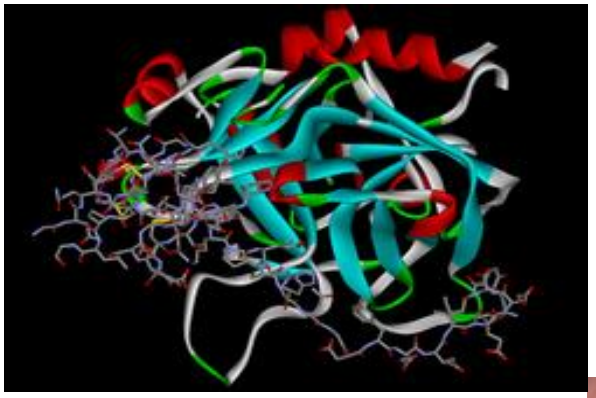
c)Memeli hücrelerinde görülen **translasyon sonrası modifikasyonu gerçekleştirilmektedir**. Bu nedenle *E. coli'ye* oranla stabilitesi ve biyolojik aktivitesi daha yüksek proteinler üretir.

d)Ürettiği proteini besiyerine salgıladığından ve *S. cerevisiae* normalden düşük sayıda protein ürettiğinden saf protein elde edilmesi kolaydır.

S. cerevisiae'de üretilen ve onaylanan rekombinant farmasötik ürünler

- Anti-koagülanlar (hirudin)
- Hormonlar (insülin, somatropin)
- Rekombinant altbirim aşıları (hepatit B etkeni HBVnin HBsAg yüzey antijenini içeren aşı)









İnsekt hücre ekspresyon sistemi

- rProteinlerin insekt hücrede eksprese edilmesinin başlıca avantajları

a) Memeli hücrelerine oranla düşük maliyet ve kısa sürede yüksek verim

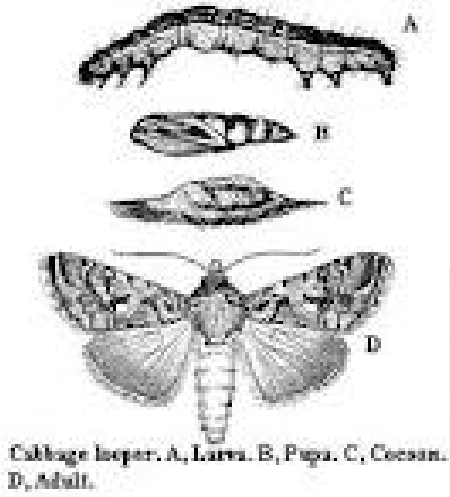
b) Ekspresyon vektörü olarak insektleri infekte eden baculovirüs ailesindeki virüsler kullanılır.

c) Memeli hücrelerinde görülen birçok ***translasyon sonrası modifikasyonu*** mayalara oranla daha yüksek kalitede gerçekleştirilmektedir.

rProteinlerin ekspresyonu için en çok kullanılan konak insekt hücreler ***Spodoptera frugiperde*** **nin over hücreleri** ile ***Trichoplusia ni*** **nin yumurta hücreleri** yer alır.

İnsekt hücrede üretilen ve onaylanan rekombinant farmasötik ürünler

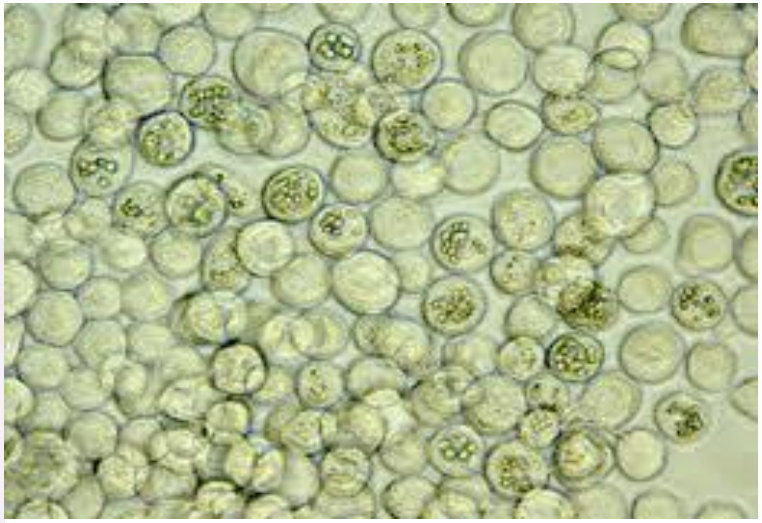
- *Trichoplusia ni'*de üretilen ve papilloma virüsünün L1 kapsit antijenini içeren aşı



Cabbage leaper. A, Larva. B, Pupa. C, Cocoon. D, Adult.

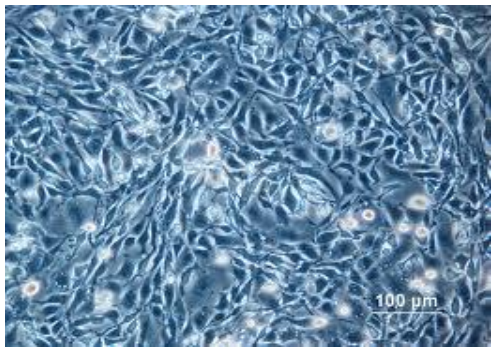






Memeli hücre ekspresyon sistemi

- **rProteinlerin memeli hücrelerinde eksprese edilmesinin başlıca avantajı**: *translasyon sonrası modifikasyonlarının* diğer ökaryotik sistemlere göre **daha karmaşık** olmasıdır (Bazı proteinler ve glikoproteinler için gerekli olan modifikasyonlar –sülfatasyon, amidasyon ve karboksilasyon- ancak memeli hücrelerinde üretildiklerinde kazanılmaktadır).
- **Dezavantajı:** maliyetin yüksek olmasıdır (hücrelerin üreme hızları yavaş, ekspresyon düzeyleri düşük, karmaşık besiyeri gereksinimi vardır, kültürlerin yapılması için gelişmiş cihazlara ihtiyaç duyulur).



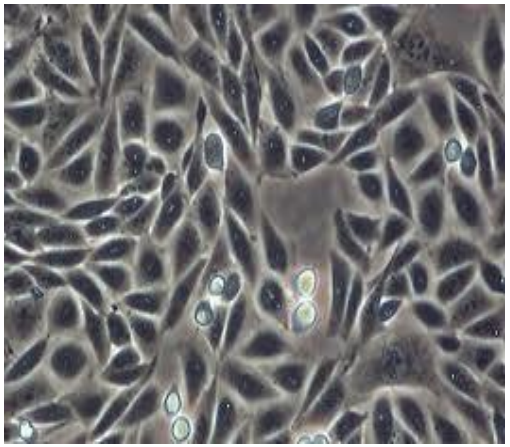


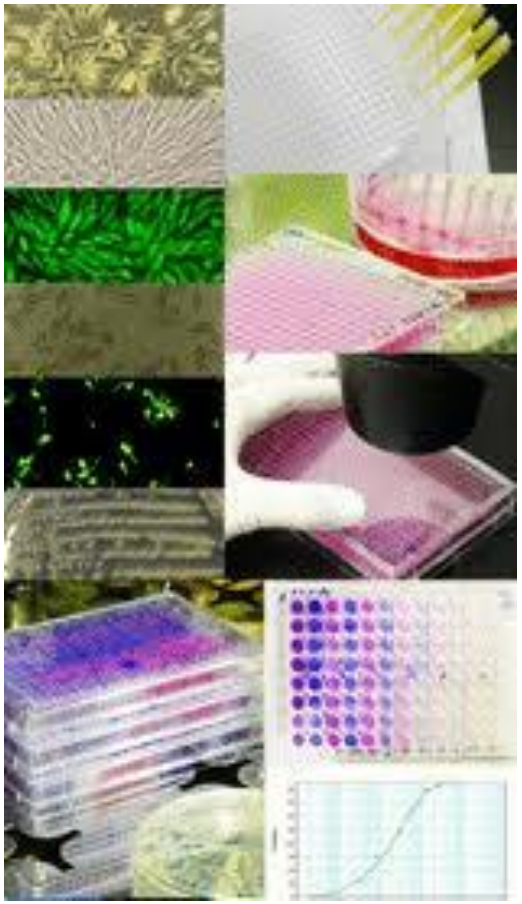


rProteinlerin ekspresyonu için en çok kullanılan konak memeli hücreler

- CHO- Chinese Hamster Over (uzun süreli stabil gen ekspresyonu)
- BHK- Baby Hamster Kidney
- COS- (Afrika yeşil maymunu böbrek)
- HEK-239- İnsan embriyonik böbrek







CHO hücrelerinde üretilen ve onaylanan farmasötik ürünler

- Koagülasyon faktörleri
- Hormonlar: FSH
- Sitokinler: INF
- Üreme faktörleri: EPO
- Rekombinant altbirim aşıları: hepatit B virüsünün HBsAg içeren aşı
- Monoklonal antikorlar
- BHK hücrelerinde: kan faktör VIII

Memeli ekspresyon vektörleri

- Memeli hücrelerinde yabancı genin ekspresyonu için viral kökenli vektörler kullanılır: Simian virus 40 (SV-40), Epstein Barr Virüs, adenovirüs, herpes simplex virüs, sinbis virüs
- Virüsün özelliğine göre vektörler memeli hücresinde otonom şekilde replike olur veya konak hücrenin kromozomuna integre olur.
- Ekspresyon vektörüyle transfekte edilen memeli hücre ölümsüz çoğalma yeteneğine sahiptir.

Bir memeli ekspresyon vektörünün başlıca bileşenleri

- Ökaryotik replikasyon orijini (SV40)
- Promotör ve transkripsiyon terminasyon dizileri
- İntron
- *E. coli* replikasyon orijini ve antibiyotik direnç geni

Memeli hücrelerin üretilmesi

- **Hücre kültürlerinin muhafaza edilmesi:**

✓ Memeli hücreler genellikle 37 ^{0}C'de, % 5 CO_2 gazı bulunan özel inkübatörlerde ürerler.

✓ pH indikatörlerinin besiyerine ilavesi gerekmektedir.

✓ Glukoz, aminoasitler, vitaminler ve tuzların konsantrasyon ayarları çok önemlidir.

✓ Üreme faktörü olarak genellikle hayvan yavrularına ait seruma (FBS) ihtiyaç duyarlar.

✓ Laminar air flow da çalışılmalı, kontaminasyonu azaltmak için antibiyotik (penisilin-streptomisin) yada antifungaller (amfoterisin B) ilave edilir.

















Memeli hücrelerin üretilmesi-devam

- Besiyerinin değiştirilmesi: hücrelere yüzeye yapışık ise besiyeri aspire edilip tazesiyle değiştirilir.
- Hücrelerin pasajlarının yapılması: düzenli bir şekilde pasajların yapılması, hücre yoğunluğunun artmasına bağlı olarak yaşlanmayı önler. Hücreler yüzeye yapışık ise *tripsin-EDTA* ile muamele edilir, santrifüjlenir ve yeni şişeler alınır.





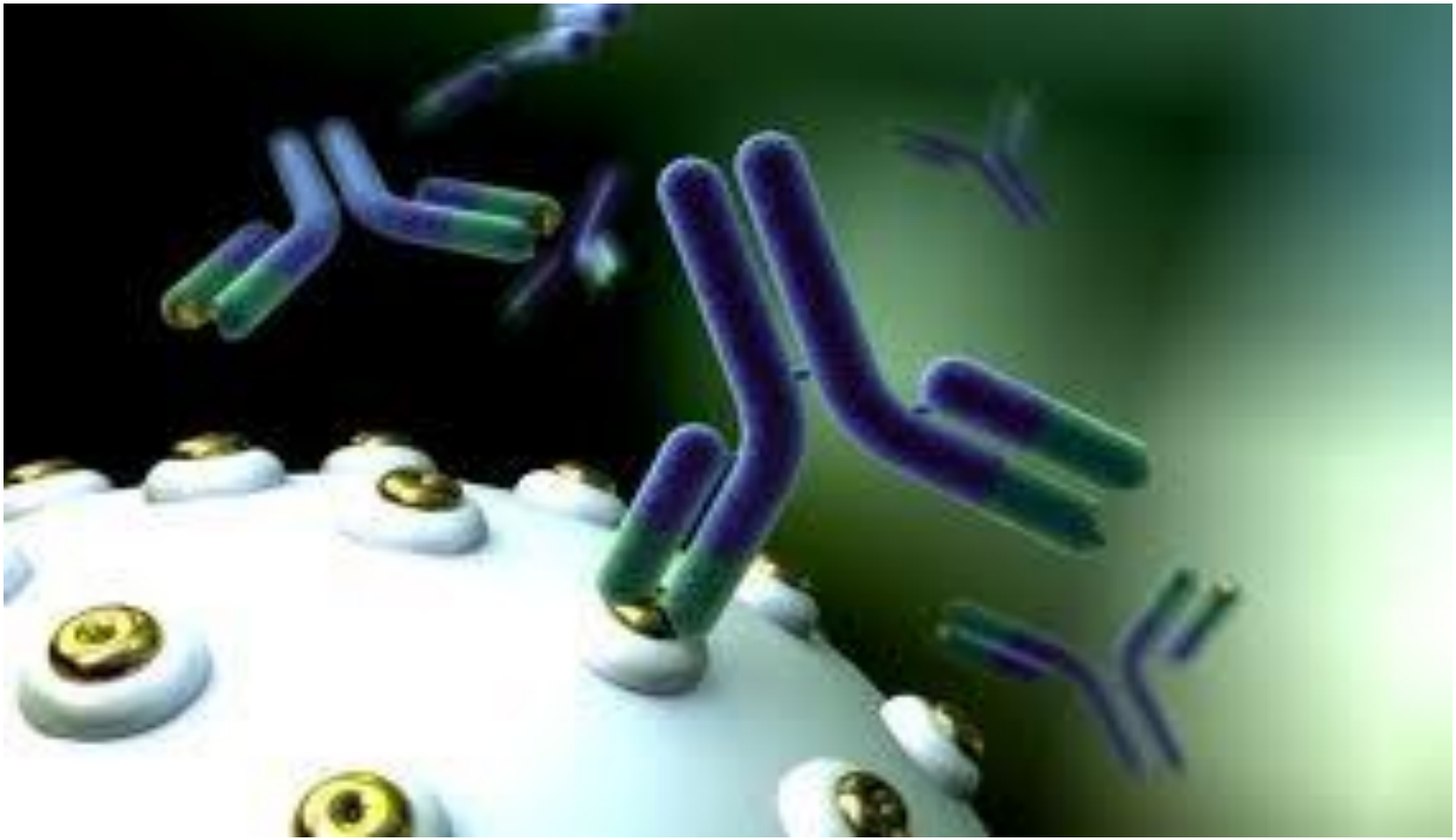


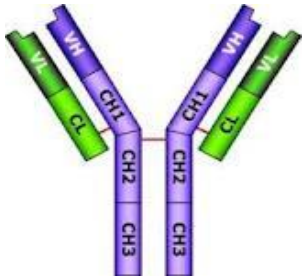






MONOKLONAL ANTİKORLAR



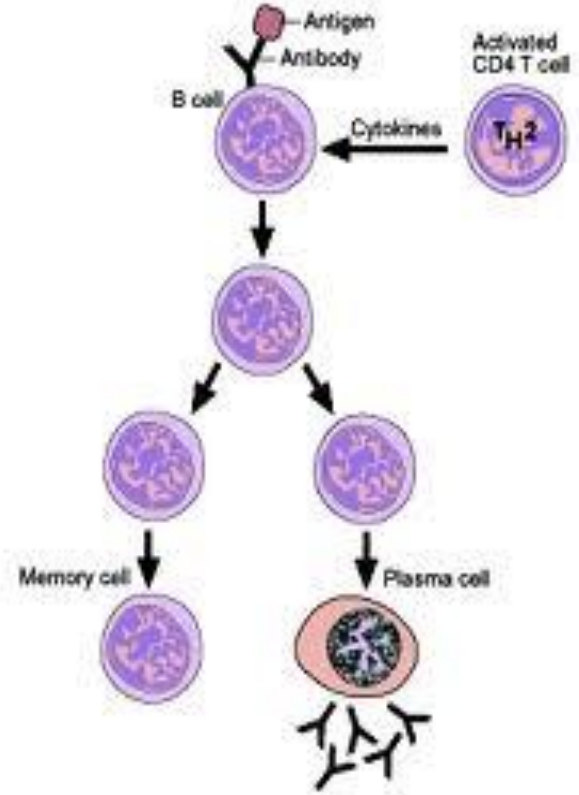


MONOKLONAL ANTİKORLAR

*Antikorlar **B lenfositleri** tarafından üretilirler*

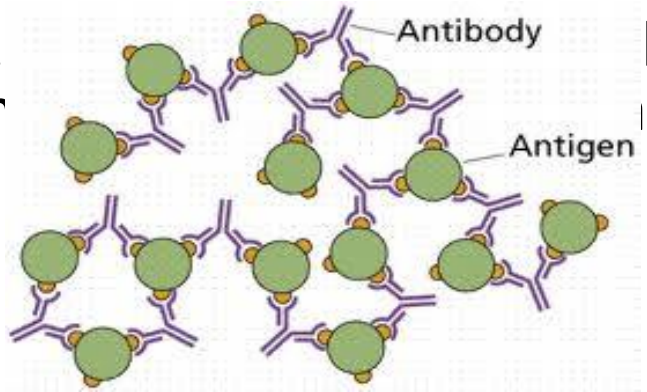
B lenfositleri:

- Kemik iliğinde olgunlaşırlar
- Yüzeyinde özgül antijenine spesifik olarak bağlanmayı sağlayan **reseptörlerle** kemik iliğinii terk eder
- Bir ***antikor molekülü*** olan bu B-hücre reseptörleri antijeni tek başına tanıma yeteneğine sahiptir
- Reseptörüne özgü antijeni ile uyarıldığında ***bellek B lenfositleri ve plazma hücrelerine*** dönüşürler
- Plazma hücresinden hümoral immün yanıtın effektör molekülleri olan ***antikorlar*** salgılanır.



Hümoral immün yanıtın effektör molekülleri olan **antikorların** başlıca görevleri

- Antijenler arasında çapraz köprüler kurarak, fagositik hücrelerce kolay sindirilecekleri kümelere dönüşmelerini
- Toksinlerin ve virüslerin yüzeyini kaplayarak nötralize etmeleri sonucunda, konak hücreye bağlanıp zarar vermelerine engel olmalarını,
- Kompleman sistemini aktive ederek, yabancı mo nın erimesine,
- Mo ların opsonizasyonunu ve fagosite edilmelerini,
- Kompleman sistemini aktive ederek iltihap yanıtına yol açan anaflaktik ve kemotaktik etkili maddelerin açığa çıkmasını sağlarlar
- (izotoplarından baz lmekte, salgılarda bulunmakta veya m bilmektedir.)



Belirli bir hastalığa karşı aşılanmış kişilere veya hayvanlara ait serumun *(hiperimmün globülin veya immüngama globülin)* toplanıp saflaştırılmasıyla hazırlanan immünoglobülinlerle **pasif bağışıklama** sağlanarak tedavi veya korunma amacıyla kullanılır

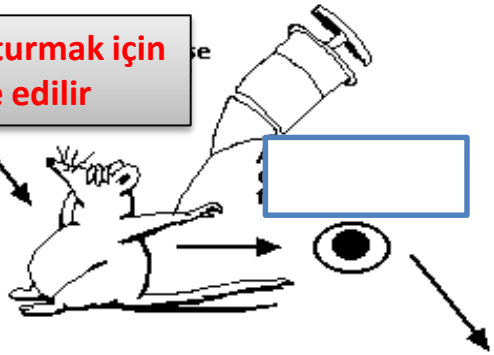
Hastalıklar	Serumlar	Kullanım şekli
Antibakteriyel		
Şarbon Boğmaca	Beygirde hazırlanan bağışık serum İnsan immüngama globülini (HIG)	Tedavi amacıyla, im, iv Kuluçka süresince hastalığı önlemede
Antitoksin		
Difteri Tetanoz Botulismus Gazlı gangren	Beygir antitoksini	Koruma ve tedavi
Antiviral		
Hepatit A ve B Kuduz Kızamıkçık Çoçuk felci Kabakulak	HIG	Önce veya sonra
Antivenom		
Akrep sokması Örümcek zehiri Yılan zehiri	Beygir antivenomu	Akrep sokmasından hemen sonra Siyah dul örümceğin göründüğü ülkelerde Yılan sokmasından hemen sonra

Birçok araştırmada, tanı ve tedavi amaçlı kullanımlarda sadece tek bir klondan türeyen, dolayısıyla sadece bir tek epitopa özgü olan **monoklonal antikorlar** tercih edilir

Monoklonal Antikor Üretimi

1-Antikor oluşturmak için fare immünize edilir

2-Farenin dalağından antikor oluşturan hücreler izol edilir

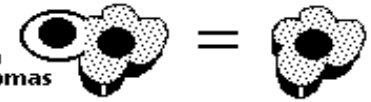


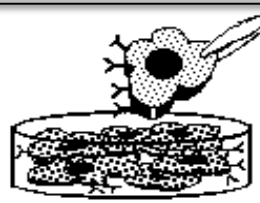
3-Tümör hücreleri hücre kültüründe üretilir



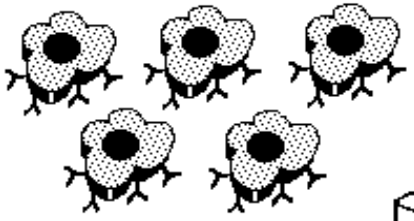


4-Antikor oluşturan hücreler hibridomaların oluşturmak için tümör hücreleri ile füzyona uğratılır

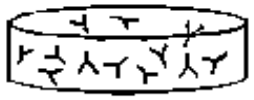




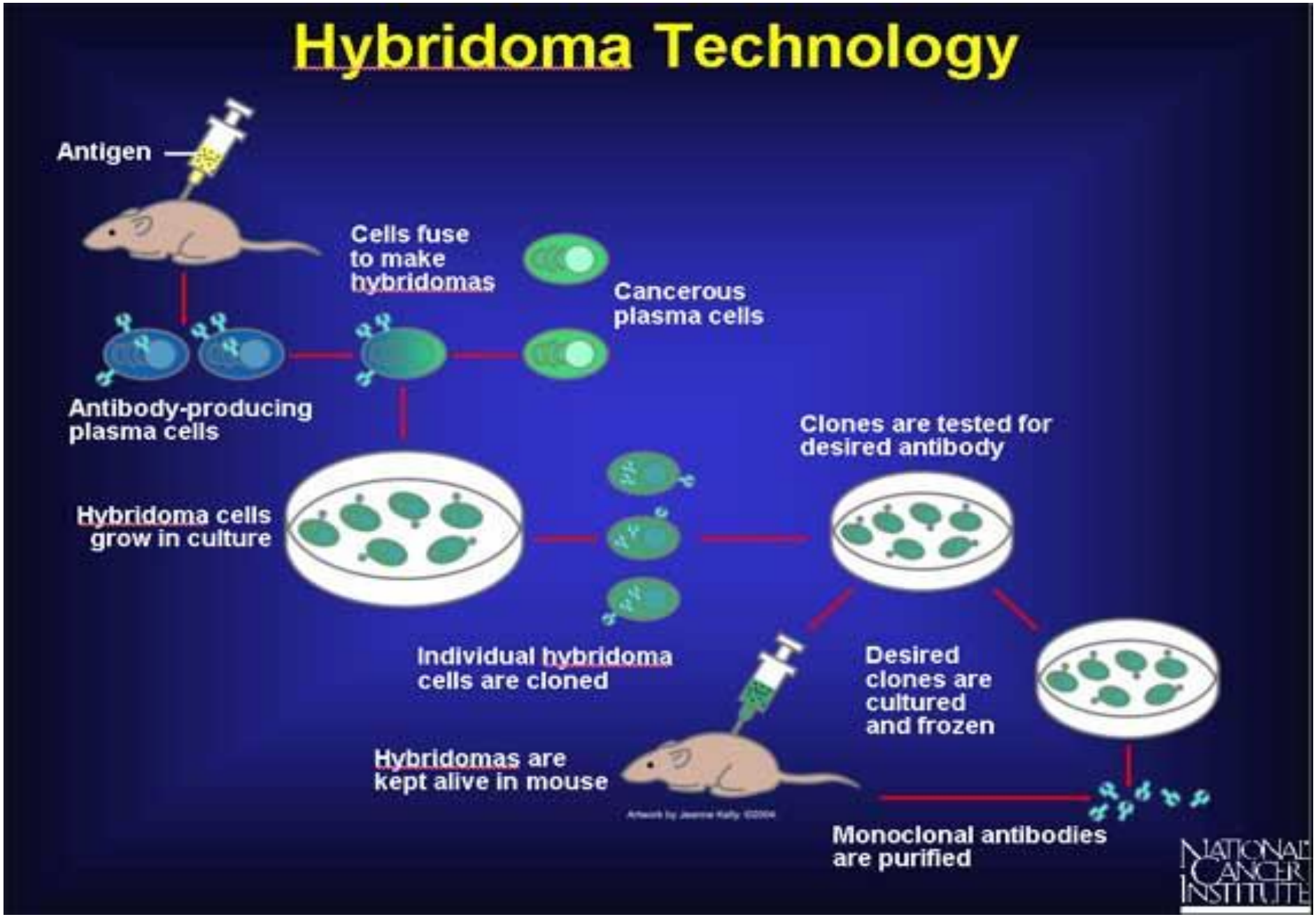
5-Hibrodomalar antikor oluşumu için taranır



6-Antikor oluşturan hibrodomalar klonlanır



7-Monoklonal antikorlar kültür için izole edilir


Hybridoma Technology
Antigen
Cells fuse to make hybridomas
Cancerous plasma cells
Antibody-producing plasma cells
Hybridoma cells grow in culture
Individual hybridoma cells are cloned
Clones are tested for desired antibody
Desired clones are cultured and frozen
Hybridomas are kept alive in mouse
Monoclonal antibodies are purified
NATIONAL CANCER INSTITUTE

Hibrid hücrelerin oluşumu ve seçimi

- **B hücresi**
  - Farenin dalağından ayrılan B hücrelerinden herbiri antijenin farklı epitoplarına karşı antikorlar üretir
  - Ömürleri kısadır
  - Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi taşır

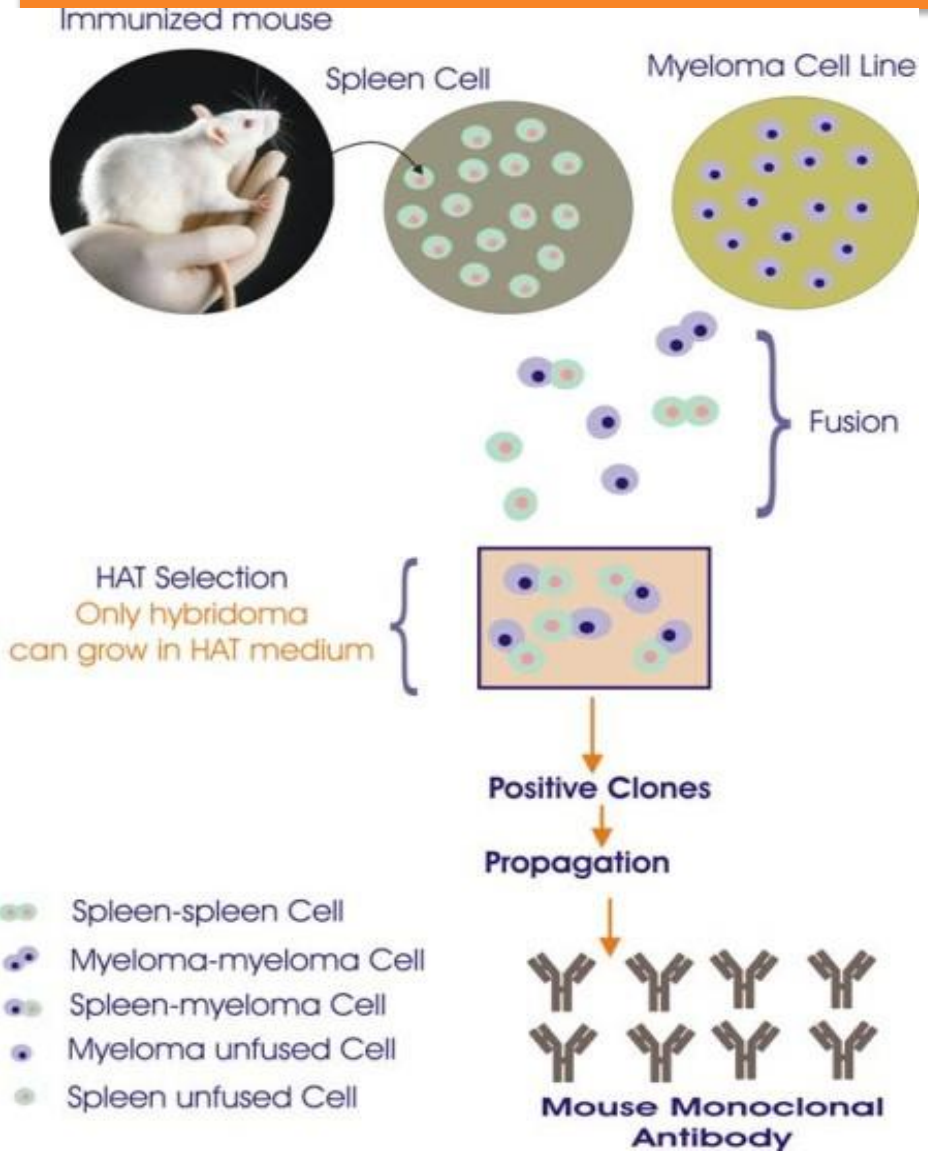
- **Miyeloma hücresi**
  - Aynı cins fareden izole edilen kanserli plazma hücresidir, ölümsüzdür
  - Immünoglobülin sentezleyemezler
  - Mutasyon sonucu HGPRT oluşumu ortadan kalkmıştır

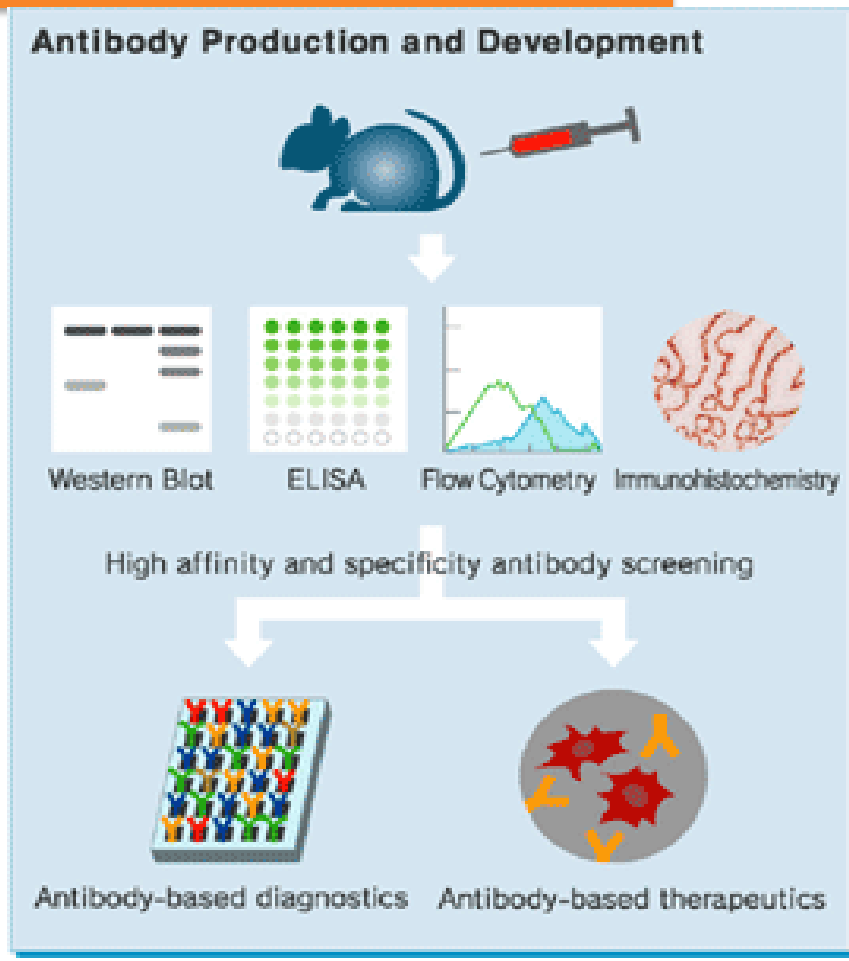
- **Polietilen glikol**
  - B hücresi ile miyelomanın plazma membranlarını birleştirip, hücrelerin füzyona uğramısını ve dolayısıyla her iki hücreye ait çekirdekleri taşıyan melez hücrenin oluşumunu sağlar
  -

- **HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) besiyeri**
  - Aminopterin: folik asid analoğu olup endojen pürin sentezini bloke eder
  - hipoksantin-timidin: DNA sentezinde ortamda olması gereken nükleotidler

- **Hibridoma**
  - **Ölümsüzdür**
  - **Immünglobülin sentezler**
  - **HGPRT taşırlar**

Monoklonal antikorların üretilmesi: **Köhler ve Milstein 1984 de Nobel Ödülü**





Fare kökenli monoklonal antikorların insana enjekte edilmesinin iki olumsuz etkisi vardır:

- İmmün sistem tarafından yabancı algılanan fare kökenli antikorlar gelişen immün yanıtın etkisiyle dolaşımdan hızla arındırılır
- Fare ve insana ait antikorların birleşmesi sonucunda oluşan immünokomplekslerin böbrek gibi organlara birikmesi sonucunda yaşamı tehdit eden allerjik reaksiyonlar ortaya çıkar
- Ayrıca in vivo şartlarda insan antikorları kadar etkili bir şekilde biyolojik işlevlerini yerine getiremezler

Hibridoma tekniğiyle insan monoklonal antikorların üretilmesi mümkün değildir

- Fare miyeloma hücreleriyle füzyona uğrayan insan kökenli lenfositlerin kromozomları sabit kalmadığı gibi, oluşan hibridomalar **çok az monoklonal antikor** üretebilmektedir
- Fare miyeloma hücrelerinin yerini alabilecek **insan miyeloma hücresi** henüz keşfedilmedi
- İnsana terapötik amaçların dışında bir antijenin verilmesi ve ardından antikor üreten hücrelerin seçilmesi için kısmi **splenektominin** uygulanması pek kabul edilebilir bir durum değildir.

İnsana uygun monoklonal anikorların elde edilmesinde uygulanan teknikler

I-Rekombinant DNA teknolojisinin kullanılmasıyla fare kökenli antikorların insanlaştırılması- kimerik ve insanlaştırılmış monoklonal antikorlar

II-Transjenik farelerin aracılığıyla tamamiyle insan kökenli monoklonal antikorların geliştirilmesi

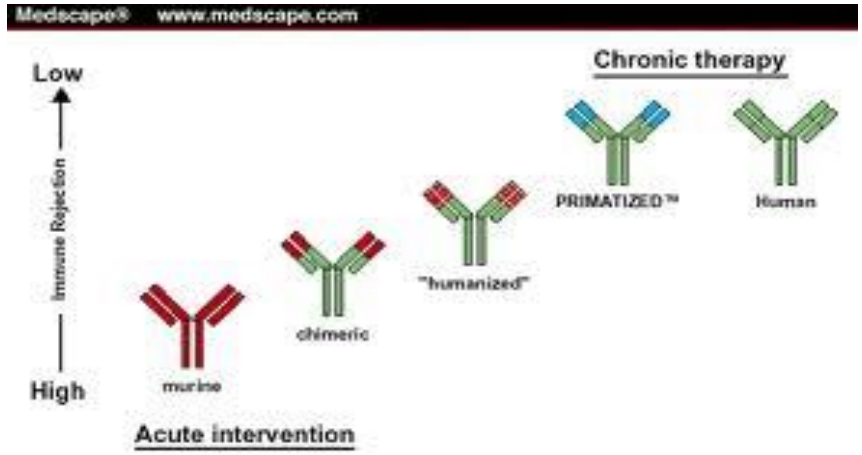
III-Bakteriyofajlar aracılığıyla tamamiyle insan kökenli monoklonal antikorların geliştirilmesi- phage display library

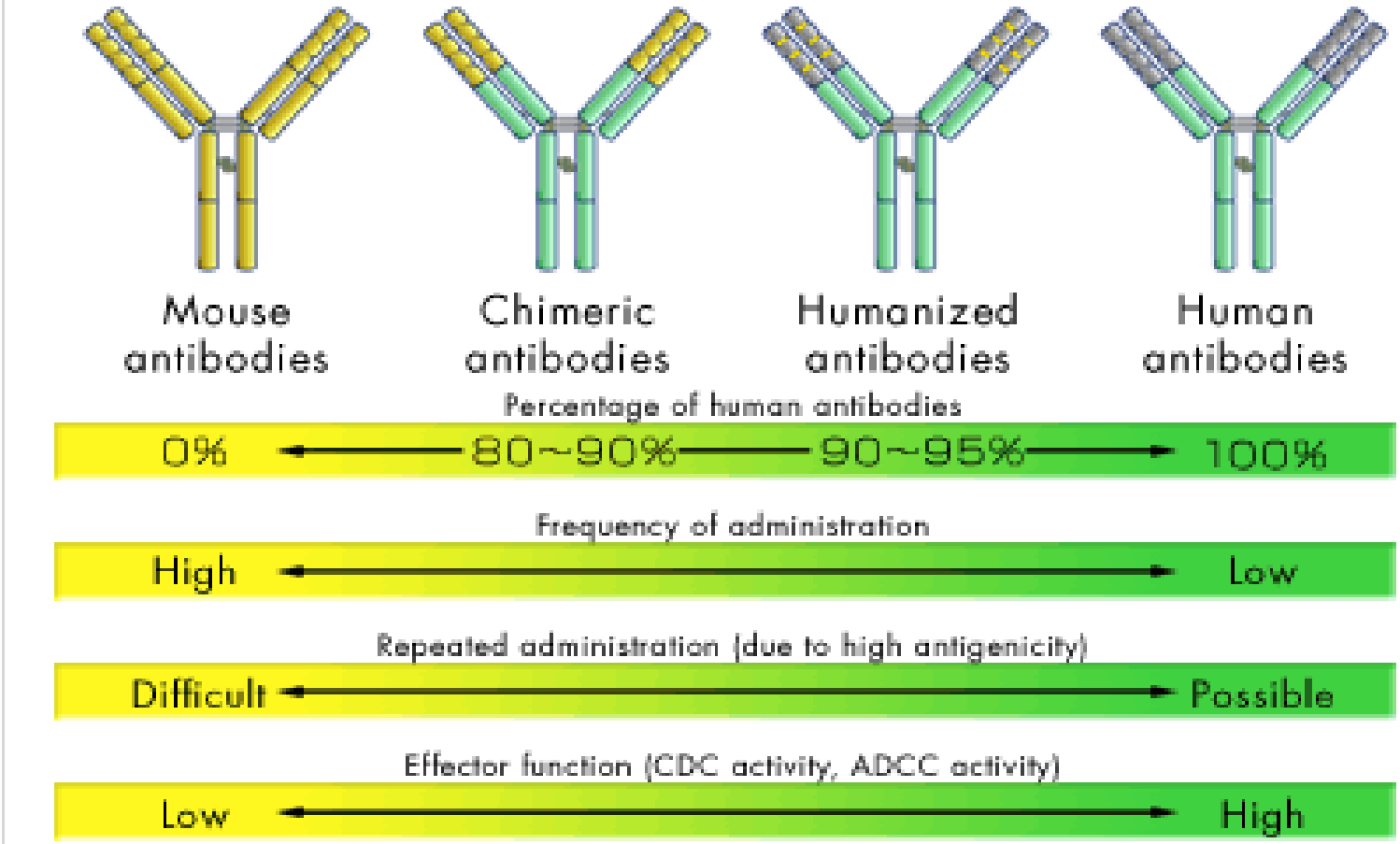
I-Rekombinant DNA teknolojisinin kullanılmasıyla fare kökenli antikorların insanlaştırılması

- A- Kimerik antikorlar
- B- İnsanlaşmış antikorlar
- C- Taşıyıcı antikorlar (immünokonjugatlar)

  İmmünotoksinler
  Radioimmünokonjugatlar
  Abzimler
  İmmünositokinler
  İmmünolipozomlar
- D- Bispesifik heterokonjugatlar

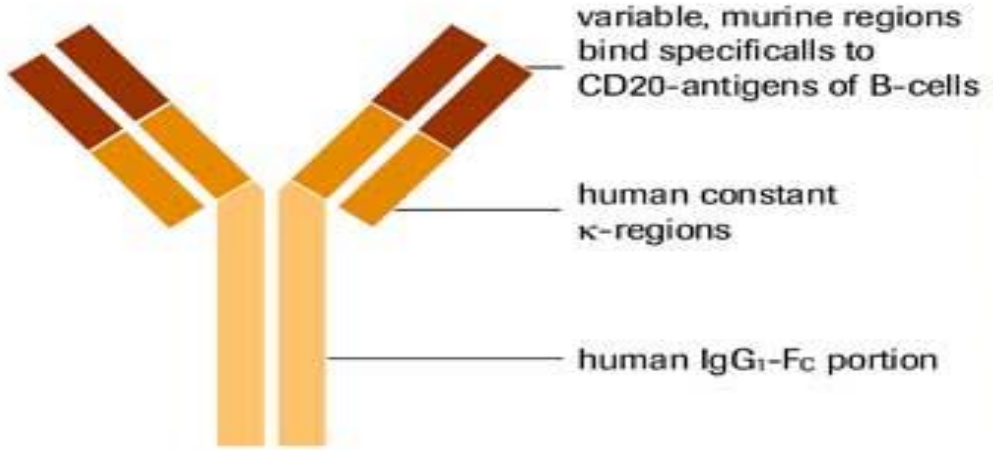
  Biyosentetik
  Kimyasal

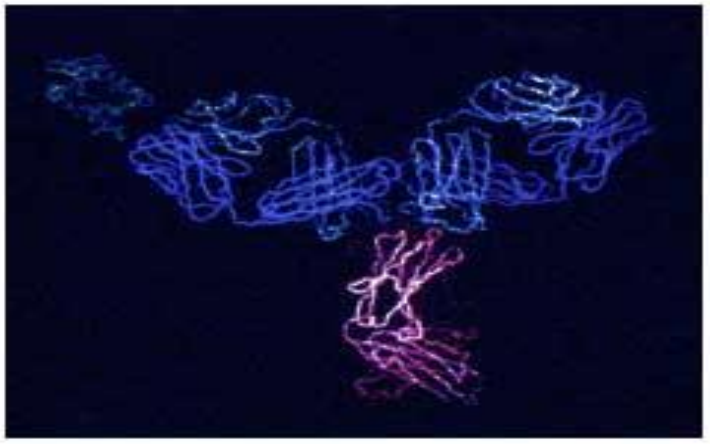



Mouse antibodies
Chimeric antibodies
Humanized antibodies
Human antibodies
Percentage of human antibodies
0%
80~90%
90~95%
100%
Frequency of administration
High
Low
Repeated administration (due to high antigenicity)
Difficult
Possible
Effector function (CDC activity, ADCC activity)
Low
High

Kimerik monoklonal antikorlar

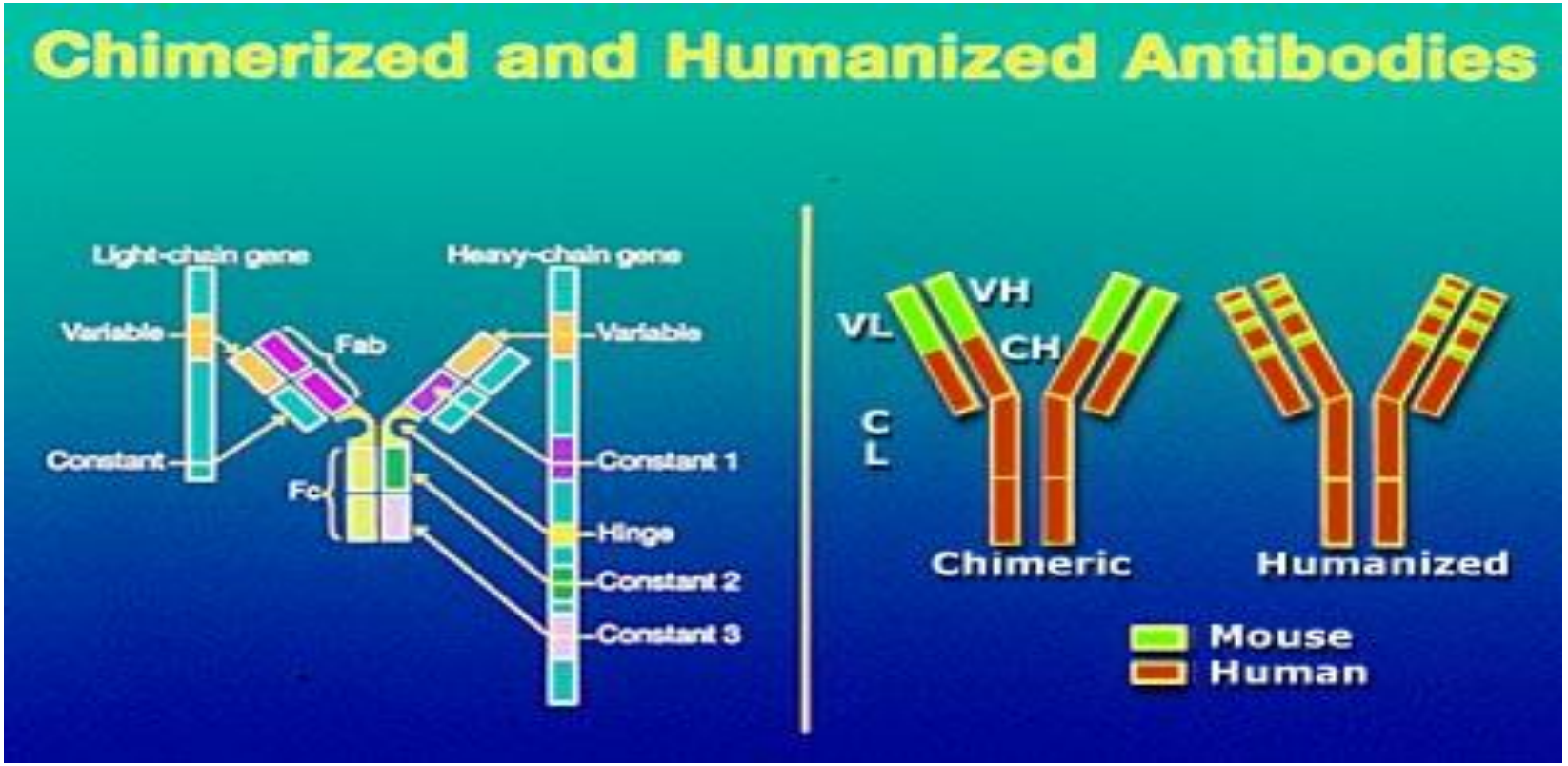
- **Değişken** bölgelerinde fareye, **sabit** bölgelerinde ise insana ait genler tarafından kodlanan aa ler taşır
- Kimerik antikorların yaklaşık %70si insan ve %30 u fareye ait DNA dizilerini taşır
- Bu nedenle, fare kökenli monoklonal antikorlara göre daha az olumsuz immünojenik reaksiyona neden olur ve serumda yarılanma ömrü uzundur
- FDA onaylı kimerik Mab : **Rituximab, infiliximab, abciximab, basiliximab**





İnsanlaşmış monoklonal antikorlar

- İnsan kökenli mabların değişken bölgelerinde yer alan hiper değişken bölgeleri sadece fare kaynaklıdır
- yaklaşık %95'i insan ve %5'i fareye ait DNA dizilerini taşır
- Bu nedenle, antijene bağlanma afinitesini kaybetmeden kimerik antikorlara oranla çok daha az
- FDA onaylı 12 İnsan kökenli Mab



İmmünokonjugatlar-I

- İmmünotoksinler: kanser tedavisinde kullanılır ve letal bir toksine bağlanmış tümöre özgü mab dan oluşur. (*Ricinus communis'*in **ricin-A'**sı, *Abrus precatorious'*un **abrin'**i, *Corynebacterium diphteriae'*nin **difteri toksini**, *Shigella dysenteriae'*nin **toksini**, *Pseudomonas aeruginosa'*nın **ekzotoksini**)

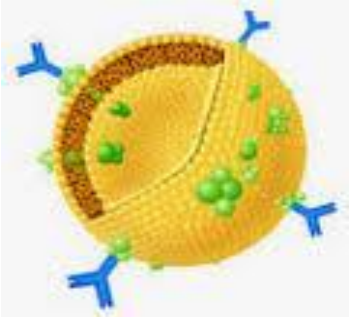
- Radioimmünokonjugatlar: radionükleotidle konjuge edilir. (**ibritumomab tiuxetan, tositumomab**)

- İmmünositokinler: İmmün sistemin efektör hücrelerinin gelişmesinde ve aktive olmasında düzenleyici roller oynayan sitokinlerin tümöre özgü mablara konjuge edilip, tümör hücresine yönlendirilmesi tedavinin amacını oluşturur.(**IL-1 ve IL-2**)

İmmünokonjugatlar-II

- **Abzimler:** Antikorla-yönlendirilmiş enzim öncül madde tedavisinde (ADEPT) tümör hücreleri üzerine toksik etkili olan bir ajanın öncül maddesini aktive eden enzimle konjuge edilmiş tümöre özgü mablar kullanılır.

- **İmmünolipozomlar:**



İlaç taşıyan sistemlerdir

Lipozomlar kendiliğinden biraraya gelen fosfolipit tabakalar olup, keseciğini oluştururken aktif maddenin etrafını sarar.

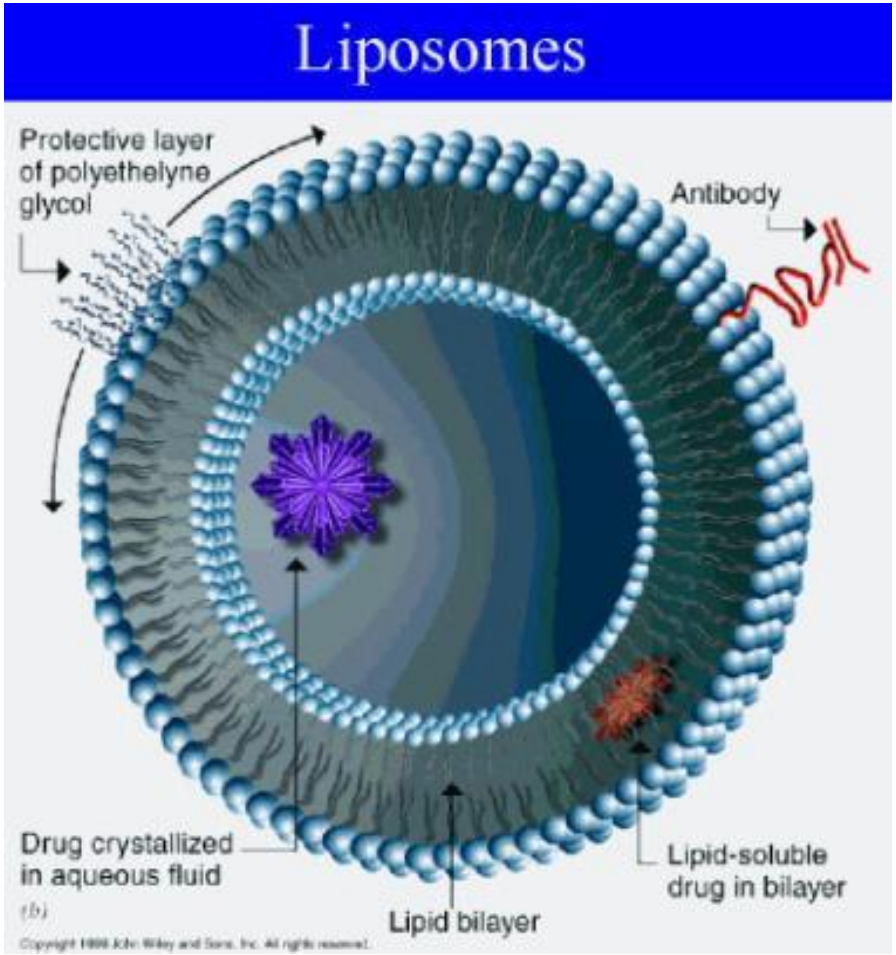
- İmmünolipozomların avantajları

  Lipozomlara çeşitli kimyasal maddeler hatta genler yüklenebilir.

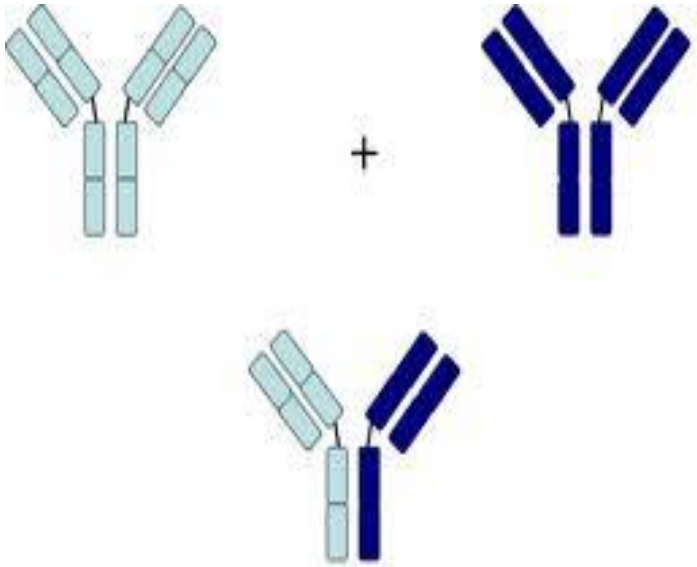
  Daha fazla molekül yüklenebilir

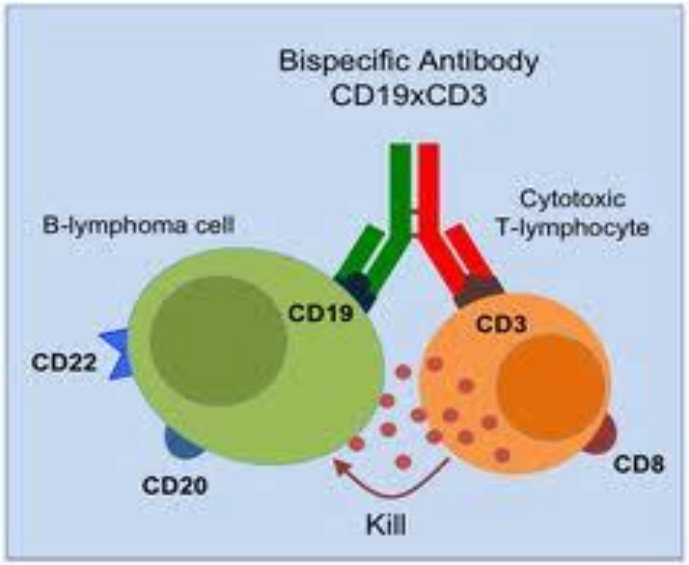
  İlacın in vivo yarılanma ömrünü uzatır

  Taşıdığı maddenin sistemik toksik etkisini düşürür



Bispesifik heterokonjugatlar





- İki farklı antijenik epitopa bağlanma yeteneğine sahiptir
- Biri tümör hücresinin yüzey antijenine özgü iken, diğeri sitotoksik etkili bir lökositin yüzey antijenine özgüdür

II-Transjenik farelerin aracılığıyla tamamiyle insan kökenli monoklonal antikorların geliştirilmesi

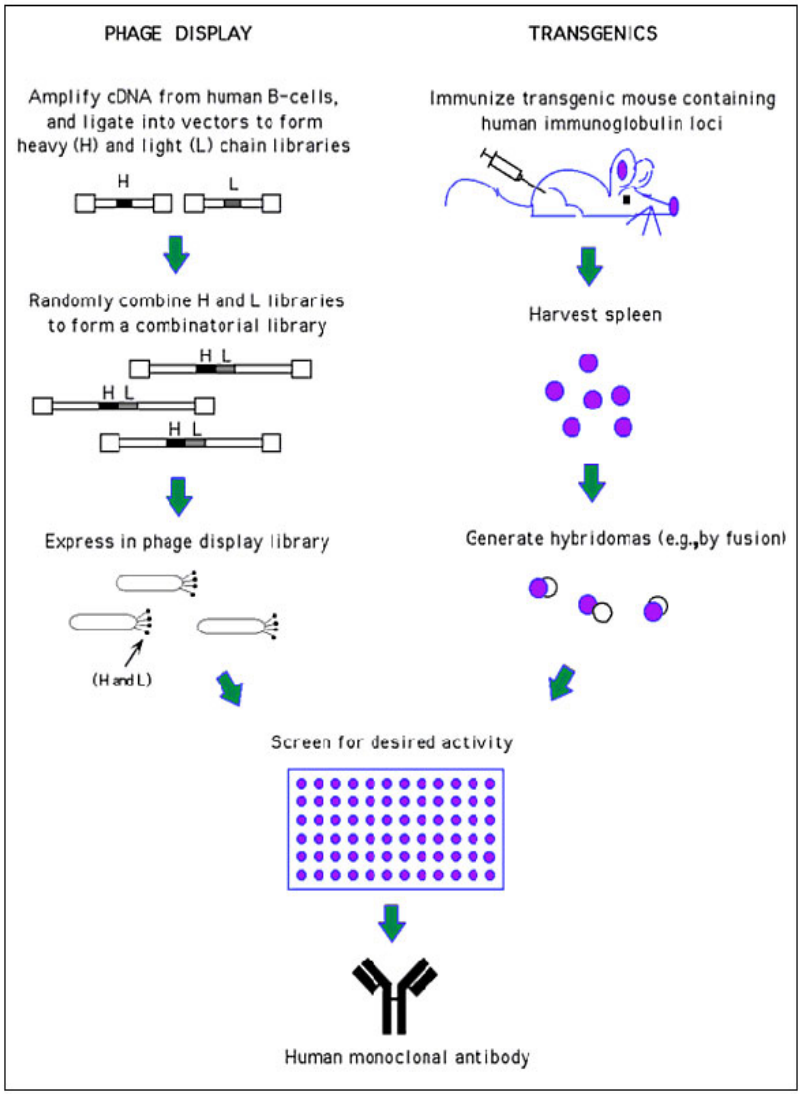
- esası: Farenin ağır ve hafif zincire ait genleri kodlayan lokusların insanınkiyle değiştirilmesi
- FDA onaylı: panitumumab (kolerektal ca)
- Güçlü yönleri:

  Sığır, keçi gibi hayvanlara da uygulanabilir



"At first I was happy I made smart transgenic mice.."

III-Bakteriyofajlar aracılığıyla tamamiyle insan kökenli monoklonal antikorların geliştirilmesi



esası: Ağır ve hafif zincirin değişken bölgelerine ait genlerden ibaret repertuvarların filamentöz bakteriyofajlarda rastlantısal biçimde birleşmelerini sağlayarak monoklonal kısımların oluşturulmasıdır

avantajı: hibridoma teknolojisine gerek yok yani bağışıklama yapılmadan istenilen her türlü antijene karşı in vitro koşullarda insan mabları üretilebilir

Monoklonal antikorların kullanım alanları

- **Tanı**

✓ Gebeliğin, çeşitli moların tanısı, ilaç ve hormonların serumdaki seviyelerinin ölçülmeleri

✓ Bazı primer ve metastatik tümörlerin erken tanısında radyoaktif madde ile işaretlenmiş mablar in vivo yolla kullanılır

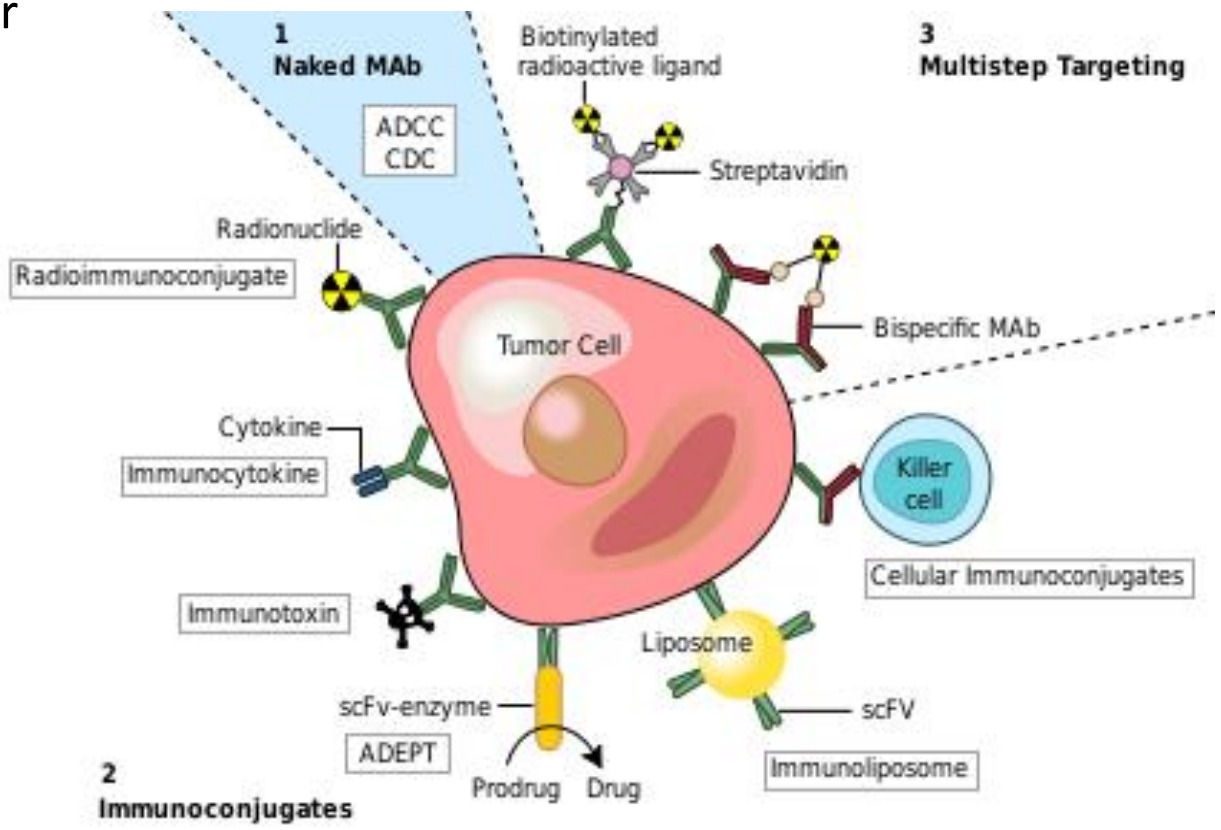
- **Tedavi**

✓ Kanser, otoimmün hastalıklar, organ reddinin önlenmesi, hematolojik ve kardiyovasküler hastalıklar, viral infeksiyonlar, allerjik astım, deri ve göze ait hastalıklar

✓ Patojen moların yada toksik moleküllerin nötralize edilmesi

Monoklonol antikorların tedavideki kullanım şekilleri

- Monoklonal antikorların **çıplak ve bütün şekli**- fare, kimerik, insanlaşmış
- Monoklonal antikorların **türevleri**- Fab veya ScFv kısmı
- Monoklonal antikorların **taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemler**- immünokonjugatlar
- **Bispesifik** monoklonal antikorlar

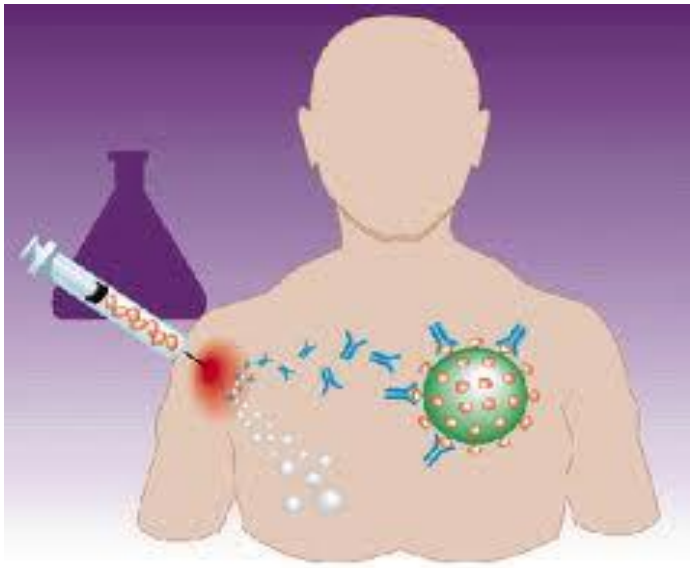


Monoklonal antikorların üretilmesi

- Fermentasyon (hibridoma-memeli hücreler)
- Santrifüj filtrasyon (hücreler ayrılır)
- Ultrafiltrasyon (filtratın konsantrasyonu)
- Afinite kromatografisi (IgG için protein A agaroz)
- İlave kromatografi (iyon değiştirici ve jel filtrasyon)
- Gerekliyse konjugasyon (toksin, radionükleotit)
- Son ürünün formülasyonu
- Steril filtrasyon ve aseptik dolum
- **Sıvı ürün** yada **liyofilize toz ürün**



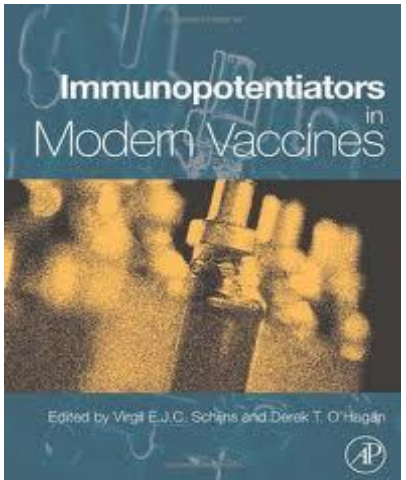
AŞILAR ve ADJUVANLAR



Günümüzdeki aşı araştırmalarının hedefleri

- Aşı ile sağlanan aktif bağışıklamanın hedefi ***koruyucu bağışıklığı*** ve ***immünolojik belleği*** arttırmaktadır.
- Hızla gelişen yeni aşı teknoljilerinde amaçlanan hedefler:

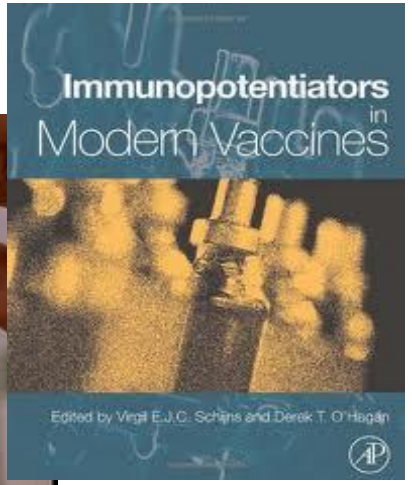
1. Mevcut aşıların iyileştirilmesi
2. Henüz aşısı bulunmayan hastalıklara karşı yeni aşıların geliştirilmesi



Modern aşı teknolojisinin hedeflediği ideal aşının özellikleri

- Her yaştan kişiye %100 etkili olması
- Tek uygulamayla ömür boyu koruyuculuk sağlaması
- Güvenli olup, herhangi bir istenmeyen etki oluşturmaması
- Çeşitli koşullar altında stabil olması (ısı, ışık, transport)
- Uygulanışının kolay olması (oral)
- Sınırsız miktarda üretilebilir olması
- Ekonomik olması





Geleneksel ve modern teknolojik yöntemlerin kullanılmasıyla elde edilen aşı tipleri

Aşı tipi	Teknoloji	Canlı/sız	Örnek
Attenüe	geleneksel	canlı	BCG, tifo, kızamık, kızamıkçık, influenza
İnaktif ölü	geleneksel	cansız	Boğmaca, kolera, tifo, hepatit A
Altbirim	geleneksel	cansız	Difteri, tetanoz,
Genetiği iyileştirilmiş canlı aşılar	rDNA	canlı	Vaccinia, poliovirüs, adenovirüs
Genetiği iyileştirilmiş altbirim	rDNA	cansız	HBsAg- maya veya memeli hücreleri
Anti-idiyotip	Mab	cansız	Hepatit B, kuduz
Sentetik peptit	sentez	cansız	İnfluenza, hepatit B
DNA	rDNA	cansız	Malarya, HIV, influenza

Geleneksel yöntemlerle üretilen aşıların kısıtlayıcı yönleri

- İnfeksiyöz etkenlerin tümü kültürde üretilemediğinden ***birçok hastalığa karşı geliştirilememiş*** aşı bulunmaktadır
- Virüslerin üretilmesi için ***hücre kültürleri*** gerekmekte, ve bu yolla uzun sürede düşük miktarda ürün elde edildiğinden maddi yük getirmektedir.
- Üretim sırasında patojen etkenin personel ile ***temasa gelmemesi*** için geniş güvenlik önlemlerinin alınması gereklidir.
- Üretilen partideki etkenin tam olarak inaktive veya attenüe suşların ***virülan şekle dönüşme riski*** bulunmaktadır
- Tüm hastalıklara karşı (ör: AIDS) geleneksel yöntemlerle hazırlanmış aşılarla korunma ***sağlanamamaktadır***
- Hazırlanan bu aşıların ***raf ömürleri*** sınırlı olup, aktivitelerini yitirmemeleri için ***soğukta*** saklanmaları ve taşınmaları gerekmektedir.



Rekombinant DNA teknolojisinin yeni aşıların geliştirilmesinde sağladığı olanaklar

- İnfeksiyon etkeninin etkili bir immün yanıt oluşturma yeteneğini kaybetmeden **virülans genleri** çıkartılabilir.
- Bu şekilde elde edilen canlı avirülan suşlar taşıyıcı sistemler gibi kullanılarak, güçlü immün yanıt oluşturan başka patojen etkenlerin antijenleri ile yüklenebilinir (***rekombinant vektör aşıları***)
- Kültürü yapılamayan infeksiyon etkenlerinin protein yapısındaki determinantlarını kodlayan genler izole edilip, klonlanıp, alternatif bir konak hücre sisteminde eksprese edilebilir. Klonlanan gene ait proteinler (***rekombinant antijen aşıları***) veya genin kendisi aşı (***DNA aşıları***) olarak formüle edilebilir.

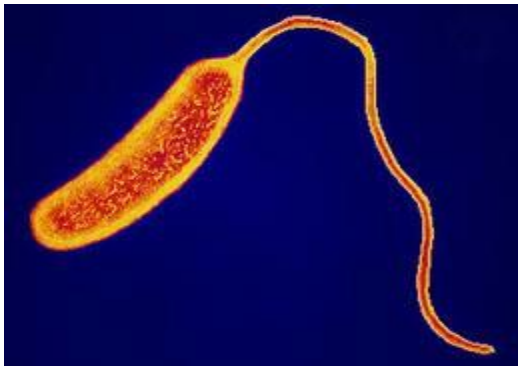
Rekombinant DNA teknolojisiyle hazırlanan aşılar

- Genetik manipülasyonla attenüe edilen mo aşıları
- Rekombinant antijen aşıları
  - Konak hücrede eksprese edilen proteinler
  - Genetik olarak detoksifiye edilen proteinler
  - Rekombinant peptit aşıları
- Rekombinant vektör aşıları
- DNA aşıları

Genetik manipülasyonla attenüe edilen mo aşıları:

Bakteri veya virüsün etkili bir immün yanıt oluşturma yeteneğini kaybetmeden virülans genlerinin modifiye edilmesi veya çıkarılmasıyla hazırlanan canlı aşılar

- ***Vibrio cholera-*** toksin A ve B- A1 geni izole edilir, plazmide klonlanır, restriksiyon enzimlerinin yardımıyla A1 i kodlayan dizi çıkarılır ve elde edilen plazmit *V. cholera* nın DNA sına konjuge edilir.



- Elde edilen stabil suş **enterotoksin** oluşturmadığı gibi, doğal suşun tüm **immünolojik** özelliklerini taşımakta ve denenen gönüllülerde % 90 koruyuculuk sağlamaktadır.
- ***Salmonella, Leishmania,*** **Herpes Simplex Virüs**

Genetik manipülasyonla attenüe edilen mo aşılarının:

Avantajları:

- ✓ Geleneksel yöntemlerle attenüe edilen suşlar gibi virülans şekle dönüşme riski yoktur
- ✓ Doğal infeksiyonu taklit eder
- ✓ Uzun süreli hümoral ve hücresel immün yanıtın yanı sıra sİgA ların üretimini sağlar
- ✓ Rapellere gerek duyulmaz
- ✓ Toplumda virülan suşun yerini alır

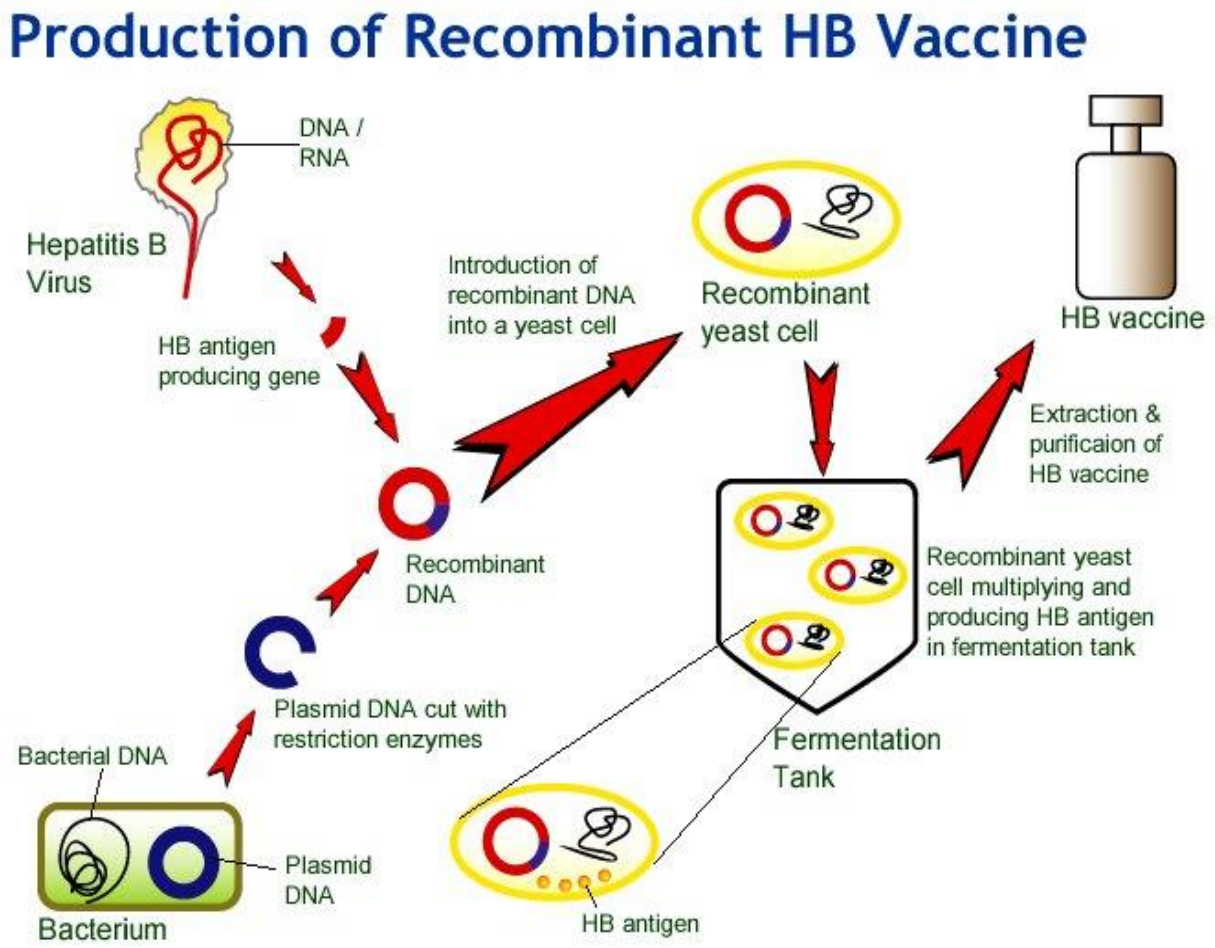
Dezavantajları:

- Hazırlandığı kültür ortamından allerjik maddelerin veya latent virüslerin bulaşma riski vardır
- İmmün sistemi baskılanmış kişilerde inatçı infeksiyonların ortaya çıkma riski vardır
- Raf ömrü kısa olup, saklanması ve transferi belirli koşulları ve soğuk zinciri gerektirir.

Rekombinant antijen aşıları

1- Konak hücrelerde eksprese edilen proteinler

Antijenik determinantları kodlayan genlerin bakteri, maya, memeli veya artropot hücrelerine klonlamaları sonucunda elde edilen antijenlerin saflaştırılmasıyla hazırlanırlar



Papilloma virüs
Herpes Simplex tip 1
Neisseria meningitidis

Konak hücrelerde eksprese edilen proteinlerle ilgili gelişmeler

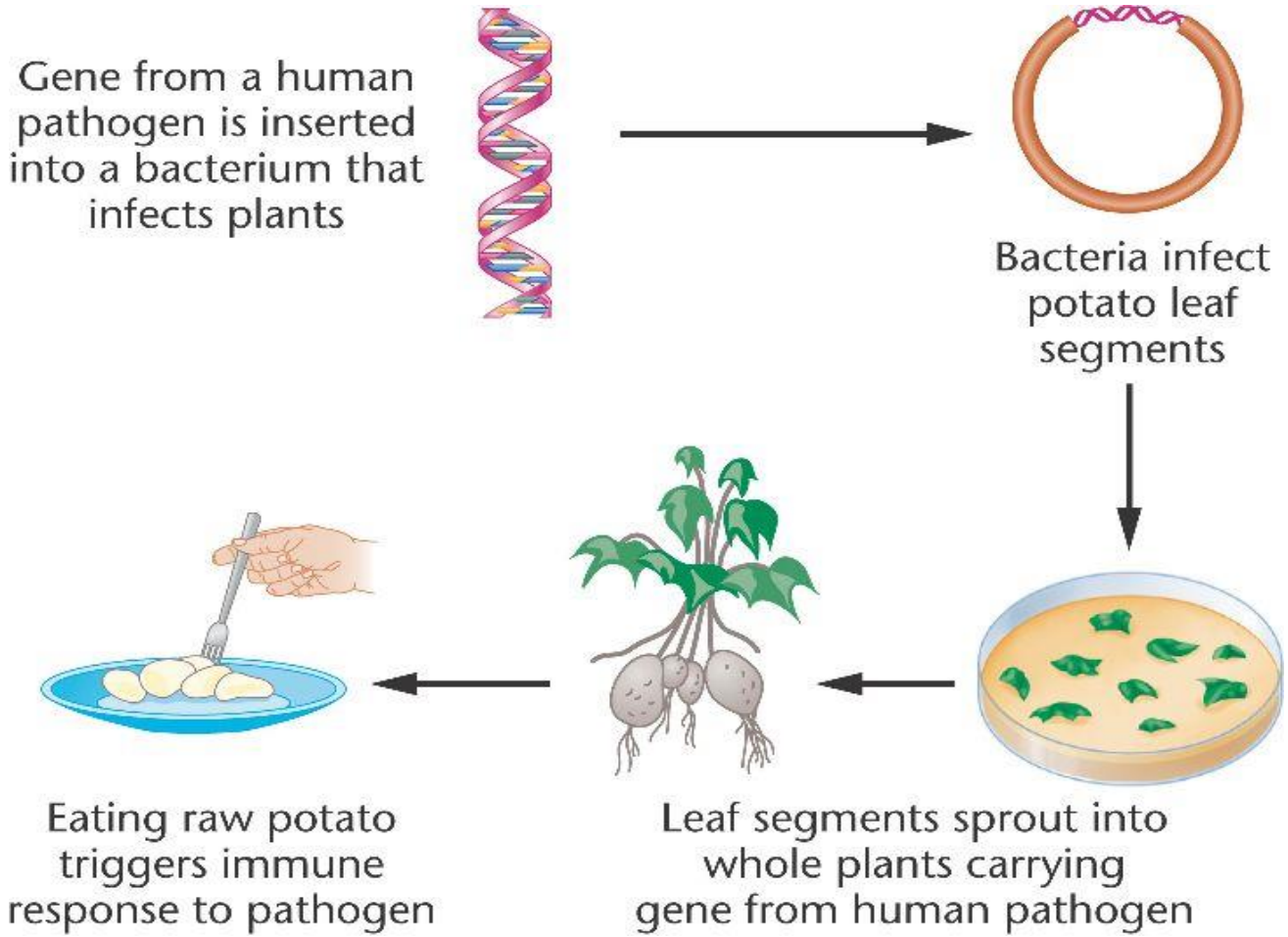
- Transjenik bitikilerin kullanılması
- Amaç: antijenin bitkinin yenebilir kısmında (muz gibi) eksprese edilmesidir
- Yenebilir aşıların avantajları:

✓ Antijenik protein saflaştırılması zorunluluğu ortadan kalkar

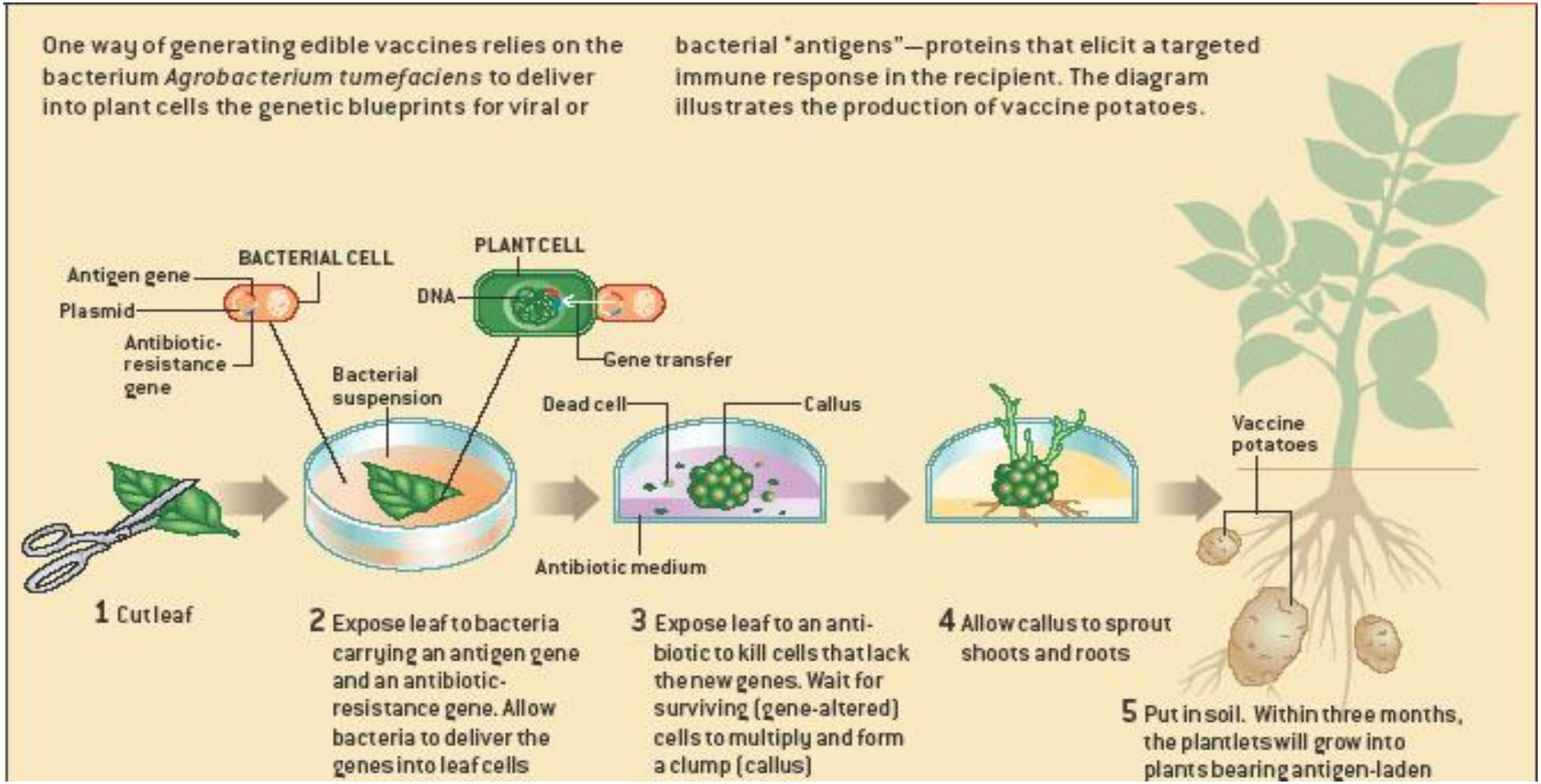
✓ Kolay immünizasyon sağlar

✓ Gelişen ülkelerde lokal üretme imkanı sağlar




Gene from a human pathogen is inserted into a bacterium that infects plants
Bacteria infect potato leaf segments
Leaf segments sprout into whole plants carrying gene from human pathogen
Eating raw potato triggers immune response to pathogen

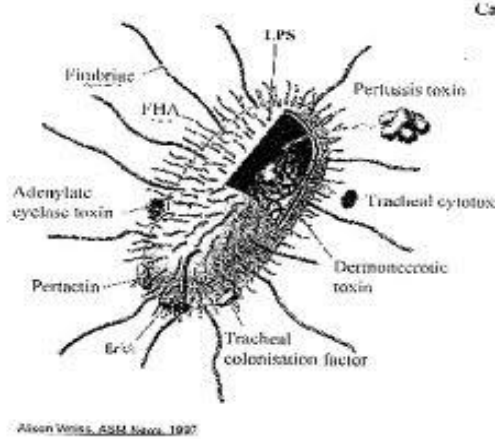
Yenilebilir aşı



II-Genetik olarak detoksifiye edilmiş proteinler

- *Bordetella pertussis*'in klonlanan pertussis toksini geninde iki aai kodlayan kodonun modifiye edilmesi sonucunda elde edilen proteinin immünolojik özellikleri bozulmadan toksisitesi geriye dönüşümsüz bir şekilde ortadan kaldırılır
- Kolera toksini, *E. coli* enterotoksini,

  difteri toksini ve tetanoz toksini



III-Rekombinant peptit aşıları

- Koruyuculuk sağlayan epitopların belirlenmesi, ilgili peptit dizileri kodlayan genlerin rekombinant DNA teknolojisi ile T-hücre epitoplarını içeren taşıyıcı proteine klonlamayı mümkün kılmaktadır.
- Rekombinant hepatit B, *Plasmodium falciparum*

Rekombinant antijen aşılarının

avantajları:

- patojen etkenin kendisini değil de sadece antijenik determinantlarını içermesinden dolayı aşının kullanımı güvenli
- Konak hücrede üretilebilmesi daha fazla, daha saf, kalitenin kolay kontrol edilebilmesini sağlar

dezavantajı:

- sadece hümoral yanıtı uyarmaları (rapel gereksinimi)

Onaylanıp kullanımda olan bazı rekombinant antijen aşıları

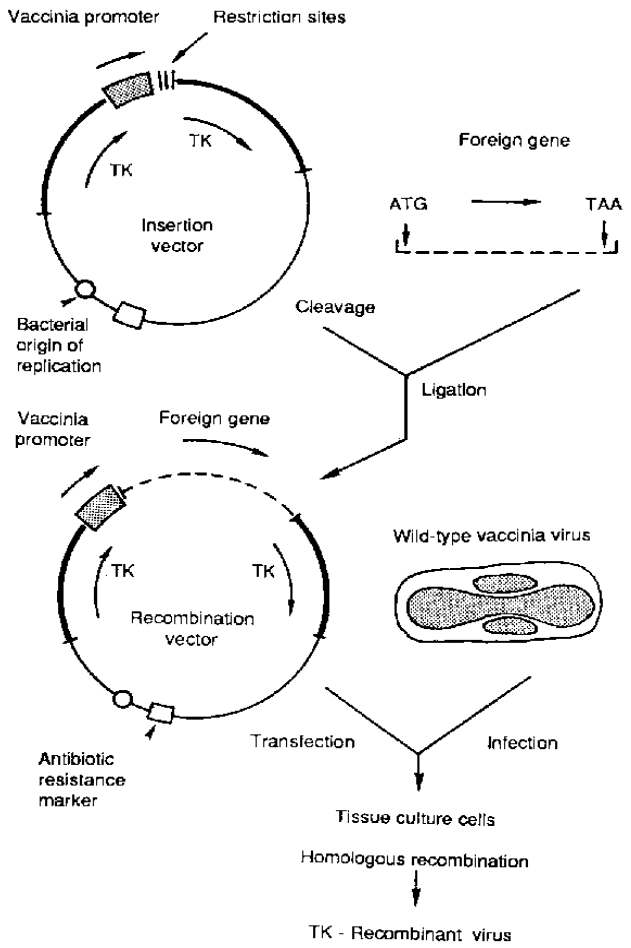
Ürün	Üretici firma	Kullanıldığı yerler
Recombivax (*S. cerevisiae* da üretilen rHBsAg)	Merck	Hepatit B ye karşı bağışıklık
Engerix B (*S. cerevisiae* da üretilen rHBsAg)	SmithKline Beecham	Hepatit B ye karşı bağışıklık
Hepacare (memeli hücresinde üretilen hepatit BrS)	Medeva	Hepatit B ye karşı bağışıklık
Comvax (kombine aşı, *S. cerevisiae* da üretilen rHBsAg)	Merck	Yeni doğan H. influeanzae
İnfranx-Hep B (kombine aşı, *S. cerevisiae* da üretilen rHBsAg)	SmithKline Beecham	Hepatit B, boğmaca, difteri, tetanoz
Lymerix (*E. coli* de üretilen *B. burgdorferi* yüzey Ag rOspA)	SmithKline Beecham	Lyme hastalığına karşı
Gardasil (*Trichoplusia ni* de üretilen HPV-6, 11, 16,18 rL1)	Merck	İnsan papilloma virüsüne karşı

Rekombinant vektör aşıları

- Canlı ancak zararsız olan (attenüe veya patojen olmayan) bakteri veya virüs suşlarının farklı patojenlerin antijenlerini kodlayan genlere taşıyıcı olarak kullanılmaları esasına dayanır. Bu taşıyıcılara vektör denir
- ***Vektör olarak kullanılan virüs ve bakteriler***:

Çiçek aşısı virüsü (vaccinia), canarypox virüsü, attenüe poliovirüsü, *Salmonella* nın attenüe suşları, *M. bovis* in BCG suşu

Vaccinia virüs aşısı



Araştırılan bazı rekombinant vektör aşıları

Vektör	Antijenlerin alındığı patojenler	vektörün avantajları	dezavantajları
Viral			
vaccinia	RSV, HIV, VSV, kuduz	Insanda yaygın kullanılmış	Yan etki, immünojenitesi yüksek
canarypox	Kuduz virüsü, kızamık virüsü	Insanda aiırı replike olur	
poliovirüs	V. cholerae, influenza virüsü, HIV	Güvenli, canlı oral ve inaktif iv form	Genomu küçük
adenovirüsler	RSV, HBV, EBV, HIV, CMV	Oral	Genomu küçük
Bakteriyel			
Salmonella sp	*B. pertussis*, HBV, influenza, plasmodium	Güçlü mukozal immün yanıt	
Mycobacteria	*B. burgdorferi*	güvenli	
E.coli	*B. pertussis*		

DNA Aşıları

- *Antijeni kodlayan DNA nın* bir plazmide klonlanmasıyla hazırlanan rekombinant plazmit DNA nın aşı olarak kullanılması, konak hücrenin yabancı proteini eksprese etmesini ve immün yanıtı uyarmasını sağlar
- ***DNA aşılarının uygulama şekilleri:*** Çıplak DNA, Gene gun tekniği, Mikropartiküller, lipitle konjuge veya lipozomlar içerisinde DNA, sitokin ve kemokinlere ait genlerin plazmit DNA ya ilave edilmesi

DNA aşılarının avantajları

- Tehlikeli infeksiyöz ajanların kültürlerinin yapılmasına gerek duyulmaması
- Herhangi bir organizma içermediğinden immün sistemi baskılanmış kişilere uygulanması sorun yaratmaz
- Konak hücrede üretilen antijenik protein modifikasyona veya denütrasyona uğramadığından, oluşan yapı diğer konak sistemlerine oranla daha fazla doğal şekline yakındır
- Hem hümoral hem de hücresel immün yanıtı uyarır
- Büyük miktarlarda kolay şekilde ve düşük maliyetle üretilir
- DNA stabil olduğundan ısıya dayanıklıdır

ADJUVANLAR

- ***Adjuvan***: *adjuvare* yardım anlamında
- Birlikte kullanıldıkları antijenin oluşturduğu hümoral yada hücresel immün yanıtın gücünü arttıran ve uzatan maddelerdir
- Ayrıca yeterli immün yanıtın oluşabilmesi için daha az miktarda antijenin kullanılmasını sağlarlar

Adjuvanların etki mekanizmaları

- İnfeksiyon bölgesinde depolanarak antijenin ağır bir şekilde salınmasını, dolayısıyla antijenik uyarının daha uzun süreli olmasını sağlar
- ASH tarafından antijenin hücre içine alınmasını ve sunulmasını kolaylaştırır
- İnfeksiyon bölgesinde iltihap yanıtını uyarır
- Yardımcı T hücrelerine uyarıların iletilmesinde görev alan faktörlerin miktarını arttırır
- Lenfositlerin spesifik olarak çoğalmasını sağlar

İdeal bir adjuvanın sahip olması gereken özellikler

- Güvenli olmalıdır (istenmeyen lokal ve sistemik reaksiyonlar olmamalı)
- Zayıf olan immünojenler dahil olmak üzere koruyucu bağışıklığı arttırmalıdır
- Pirojen olmamalıdır
- Kimyasal yapısı aydınlatılmış olmalı
- Yeni doğanda ve çocuklarda etkili olmalıdır
- Antijenle stabil bir formülasyon oluşturmalıdır
- Biyoparçalanabilir olmalı
- Kendisi immünojen olmamalı

Kullanılan ve araştırılan bazı adjuvanlar

Adjuvan	Yapısı ve özellikleri
Kollodial aluminyum tuzları (alum)	Mineral bileşik, antijenin adsorbe olması önemli
Freud un komple veya inkomple adjuvanı	Emülsiyon, amfifilik adjuvan
M. tuberculosis	Bakteriye ait ürünler, bakterinin ölü şekli
B. pertussis	Bakteriye ait ürünler, bakterinin ölü şekli
LPS	Bakteriyal endotoksin
IL-2-4-12, INF-ϒ, TNF-α	Sitokinler,protein veya rDNA sı
lipozomlar	Fosfolipit kesecikler

SİTOKİNLER

- Yunanca: cyto-hücre –kinos- hareket
- Protein, peptit veya glikoprotein yapıda
- Çeşitli hücrelerin aktive olmasını, farklılaşıp, çoğalmalarını uyararak veya önleyerek immün yanıtın ***tipini, gücünü*** ve ***süresini*** belirler.
- ***Sitokin çeşitleri***

İnterlökinler (IL)

İnterferonlar (INF) α, β, γ

Tümör Nekroz Faktörü (TNF) α, β

Kemokinler

Sitokin ve reseptörlerinin tedavideki bazı kullanım alanları

- Nötropeni: kemoterapi veya akut miyeloid lösemi gibi nötrofil sayısının ciddi bir şekilde azaldığı durumlarda
- Doku reddinin baskılanması:
- Kanser tedavisinde: INF lar, TNF
- Allerjenin tedavisinde: IL-4 e karşı hazırlanan Mab lar

FDA tarafından onaylanan sitokinler

- **IL-2:** metastatik karsinom
- **IL-11:** trombositopeni
- **IL-1 reseptör antogonisti**: romatoid artrit
- **EPO:** renal hastalıklara bağlı anemi
- **TNF-α:** yumuşak doku sarkomu
- **INF-α:** Kaposi sarkomu
- **INF-β:** MS, heaptit A ve B
- **INF-γ**: Kronik granülomatöz hastalıklar

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS | ONE

Synthesis and Evaluation of a Conjugate Vaccine Composed of *Staphylococcus aureus* Poly-N-Acetyl-Glucosamine and Clumping Factor A

Tomás Maira-Litrán*, Leticia V. Bentancor, Cagla Bozkurt-Guzel, Jennifer M. O'Malley, Colette Cywes-Bentley, Gerald B. Pier

Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America

Abstract

The increasing frequency, severity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* infections has made the development of immunotherapies against this pathogen more urgent than ever. Previous immunization attempts using monovalent antigens resulted in at best partial levels of protection against *S. aureus* infection. We therefore reasoned that synthesizing a bivalent conjugate vaccine composed of two widely expressed antigens of *S. aureus* would result in additive/synergetic activities by antibodies to each vaccine component and/or in increased strain coverage. For this we used reductive amination, to covalently link the *S. aureus* antigens clumping factor A (ClfA) and deacetylated poly-N-β-(1–6)-acetyl-glucosamine (dPNAG). Mice immunized with 1, 5 or 10 μg of the dPNAG-ClfA conjugate responded in a dose-dependent manner with IgG to dPNAG and ClfA, whereas mice immunized with a mixture of ClfA and dPNAG developed significantly lower antibody titers to ClfA and no antibodies to PNAG. The dPNAG-ClfA vaccine was also highly immunogenic in rabbits, rhesus monkeys and a goat. Moreover, affinity-purified, antibodies to ClfA from dPNAG-ClfA immune serum blocked the binding of three *S. aureus* strains to immobilized fibrinogen. In an opsonophagocytic assay (OPKA) goat antibodies to dPNAG-ClfA vaccine, in the presence of complement and polymorphonuclear cells, killed *S. aureus* Newman and, to a lower extent, *S. aureus* Newman Δ*clfA*. A PNAG-negative isogenic mutant was not killed. Moreover, PNAG antigen fully inhibited the killing of *S. aureus* Newman by antisera to dPNAG-ClfA vaccine. Finally, mice passively vaccinated with goat antisera to dPNAG-ClfA or dPNAG-diphtheria toxoid conjugate had comparable levels of reductions of bacteria in the blood 2 h after infection with three different *S. aureus* strains as compared to mice given normal goat serum. In conclusion, ClfA is an immunogenic carrier protein that elicited anti-adhesive antibodies that fail to augment the OPK and protective activities of antibodies to the PNAG cell surface polysaccharide.

Citation: Maira-Litrán T, Bentancor LV, Bozkurt-Guzel C, O'Malley JM, Cywes-Bentley C, et al. (2012) Synthesis and Evaluation of a Conjugate Vaccine Composed of *Staphylococcus aureus* Poly-N-Acetyl-Glucosamine and Clumping Factor A. PLoS ONE 7(9): e43813. doi:10.1371/journal.pone.0043813

Editor: Riccardo Manganelli, University of Padova Medical School, Italy

Received June 16, 2012; **Accepted** July 26, 2012; **Published** September 6, 2012

IAI
Journals.ASM.org

Poly-*N*-Acetyl-β-(1-6)-Glucosamine Is a Target for Protective Immunity against *Acinetobacter baumannii* Infections

Leticia V. Bentancor, Jennifer M. O'Malley, Cagla Bozkurt-Guzel, Gerald B. Pier, and Tomás Maira-Litrán

Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Acinetobacter baumannii **has emerged as a highly troublesome, global pathogen. Treatment is complicated by high levels of antibiotic resistance, necessitating alternative means to prevent or treat *A. baumannii* infections. We evaluated an immunotherapeutic approach against *A. baumannii*, focusing on the surface polysaccharide poly-*N*-acetyl-β-(1-6)-glucosamine (PNAG). We used a synthetic oligosaccharide of 9 monosaccharide units (9Glc-NH_2) conjugated to tetanus toxoid (TT) to induce antibodies in rabbits. In the presence of complement and polymorphonuclear cells, antisera to 9Glc-NH_2-TT mediated the killing of *A. baumannii* S1, a high-PNAG-producing strain, but not its isogenic PNAG-negative, in-frame deletion mutant strain, S1 Δ*pga*. Complementing the *pgaABCD* locus in *trans* in the shuttle vector pBAD18kan-ori, plasmid Δ*pga*-c, restored the high levels of killing mediated by antibody to PNAG observed with the wild-type S1 strain. No killing was observed when normal rabbit serum (NRS) or heat-inactivated complement was used. Antiserum to 9Glc-NH_2-TT was highly opsonic against an additional four unrelated multidrug-resistant clinical isolates of *A. baumannii* that synthesize various levels of surface PNAG. Using two clinically relevant models of *A. baumannii* infection in mice, pneumonia and bacteremia, antisera to 9Glc-NH_2-TT significantly reduced levels of *A. baumannii* in the lungs or blood 2 and 24 h postinfection, respectively, compared to levels of control groups receiving NRS. This was true for all four *A. baumannii* strains tested. Overall, these results highlight the potential of PNAG as a vaccine component for active immunization or as a target for passive antibody immunotherapy.**

IAI
Journals.ASM.org

Evaluation of the Trimeric Autotransporter Ata as a Vaccine Candidate against *Acinetobacter baumannii* Infections

Leticia V. Bentancor, Abhisek Routray, Cagla Bozkurt-Guzel, Ana Camacho-Peiro, Gerald B. Pier, and Tomás Maira-Litrán

Channing Laboratory, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Acinetobacter baumannii **is a multidrug-resistant (MDR) nosocomial pathogen for which immunotherapeutic alternatives are needed. We previously identified a surface autotransporter of *A. baumannii*, Ata, that bound to various extracellular matrix/basal membrane proteins and was required for full virulence, biofilm formation, and the adhesion of *A. baumannii* to collagen type IV. We show here that Ata binding to collagen type IV was inhibited by antibodies to Ata. In addition, in the presence of complement and polymorphonuclear cells (PMNs), antibodies to Ata were highly opsonic against *A. baumannii* ATCC 17978 and showed low to moderate killing activity against four heterologous *A. baumannii* strains, whereas in the absence of PMNs, antibody to Ata efficiently promoted complement-dependent bactericidal killing of all of the tested *A. baumannii* isolates. Using a pneumonia model of infection in both immunocompetent and immunocompromised mice, we found that, compared to normal rabbit sera, antisera to Ata significantly reduced the levels of *A. baumannii* ATCC 17978 and two MDR strains in the lungs of infected mice. The ability of Ata to engender anti-adhesive, bactericidal, opsonophagocytic, and protective antibodies validates its potential use as an antigenic target against MDR *A. baumannii* infections.**

Efficacy of Antibody to PNAG Against Keratitis Caused by Fungal Pathogens

Ge Zhao,[*,†,1] Tanweer S. Zaidi,[1] Cagla Bozkurt-Guzel,[‡,1] Tauqeer H. Zaidi,[1] James A. Lederer,[2] Gregory P. Priebe,[1,3] and Gerald B. Pier[1]

[1]Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States
[2]Department of Surgery, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States
[3]Division of Critical Care Medicine, Department of Anesthesiology, Perioperative and Pain Medicine, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts, United States

Correspondence: Gerald B. Pier, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02115-5804, USA;
gpier@bwh.harvard.edu.

Current affiliation: *Shandong Eye Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao, China.
†China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, China.
‡Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, Beyazit, Istanbul, Turkey.

Submitted: July 19, 2016
Accepted: November 9, 2016

Citation: Zhao G, Zaidi TS, Bozkurt-Guzel C, et al. Efficacy of antibody to PNAG against keratitis caused by fungal pathogens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:6797–6804. DOI: 10.1167/iovs.16-20358

Purpose. Developing immunotherapies for fungal eye infections is a high priority. We analyzed fungal pathogens for expression of the surface polysaccharide, poly-N-acetyl glucosamine (PNAG), and used a mouse model of ocular keratitis caused by *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, or *Fusarium solani* to determine if PNAG was an immunotherapy target and requirements for ancillary cellular and molecular immune effectors.

Methods. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or immunofluorescence was used to detect PNAG on fungal cells. Keratitis was induced by scratching corneas of C57BL/6, IL-17R KO, RAG-1 KO, or IL-22 KO mice followed by inoculation with fungal pathogens. Goat antibodies to PNAG, a PNAG-specific human IgG1 monoclonal antibody, or control antibodies were injected either prophylactically plus therapeutically or therapeutically only, and corneal pathology and fungal levels determined in infected eyes at 24 or 48 hours after infection.

Results. All tested fungal species produced PNAG. Prophylactic or therapeutic treatment by intraperitoneal (IP) injection of antibody to PNAG combined with post-infection topical application of antibody, the latter also used for *A. fumigatus*, led to reduced fungal levels, corneal pathology, and cytokine expression. Topical administration only of the PNAG monoclonal antibodies (MAb) reduced fungal loads and corneal pathology. There was no antibody protection in IL-17R KO, RAG-1 KO, or IL-22 KO mice.

Conclusions. Poly-N-acetyl glucosamine is produced by clinically important fungal ocular pathogens. Antibody to PNAG demonstrated protection against Aspergillus and Fusarium keratitis, requiring T cells producing IL-17 and IL-22. These findings indicate the potential to prevent or treat fungal infections by vaccines and immunotherapeutics to PNAG.

Keywords: fungal keratitis, PNAG, vaccine, MAb, immunotherapy