



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**COVID-19'A KARŞI NANOPARTİKÜLER AŞI
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sena AYÇİÇEK

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**COVID-19'A KARŞI NANOPARTİKÜLER AŞI
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sena AYÇİÇEK

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

**ANKARA
2023**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “COVID-19’a Karşı Nanopartiküler Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Sena AYÇİÇEK

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında Sena AYÇİÇEK tarafından hazırlanan “COVID-19’a Karşı Nanopartiküler Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05.10.2023

İmza

Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Dr.Öğr. Üyesi Devrim DEMİR DORA
Akdeniz Üniversitesi
Üye

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulutarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

COVID-19'a Karşı Nanopartiküler Aşı Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu 2019 koronavirüs hastalığı salgını (COVID-19) hızlı, etkili ve güvenli aşılarla duyulan ihtiyacı dünya genelinde göstermiştir. Bu çalışmada subunit protein nanoaşısı geliştirilmiş ve formülasyona ilişkin parametrelerin (hazırlama yöntemi, kullanılan materyal ve yöntem basamakları) hazırlanan nanopartiküler taşıyıcı sistem üzerindeki etkisi incelenerek aşılarda geliştirilmesi ve uygulanmasında karşılaşılan sorunları iyileştirmek amaçlanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında nanopartiküler subunit protein aşısı çalışılmış olup protein olarak SARS-CoV-2 Spike proteini reseptör bağlanma alanı (RBD) kullanılmıştır. RBD proteini konakçı hücreler üzerindeki ACE2 reseptörü ile doğrudan etkileşime girmesi ve yüksek nötralize edici epitoplar içermesi sebebiyle tercih edilmiştir.

RBD yüklü PEG-PCL nanopartiküllerinin hazırlanması için modifiye su/yağ/su emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği kullanılmış; partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği değerleri ile değerlendirilmiştir. Nanopartiküllerin morfolojisi, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. Ardından optimize edilmiş nanopartiküller ile *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır. Üretim sürecinin antijen ve *in vitro* salım numunelerinin yapısal bütünlüğü üzerindeki etkisini değerlendirmek için SDS-PAGE çalışması yapılmıştır. Nanopartiküllerin fiziksel stabilitesi 1 aylık bir süre boyunca fiziksel stabilite çalışmaları yapılarak belirlenmiştir. L929 hücre hattı kullanılarak yapılan MTT analizi % hücre canlılığı tayin edilmiş, J774 fare makrofaj hücre hattı kullanılarak RBD yüklü nanopartiküllerin *in vitro* aktivitesini gözlemek amacıyla Nitrik Oksit tayini yapılmıştır.

Bu araştırmada RBD-NP'lerin partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli hedeflenen aralıkta (partikül boyutu <300 nm, PDI <0,3, Zeta potansiyel $\pm 10-15$ mV) bulunmuş ve antijen etkin bir şekilde kapsüllenmiştir. TEM görüntüleri, NP'lerin küre şeklinde olduğunu ortaya çıkarmıştır. NP formülasyonları RBD'nin %50'sini 4 saat içinde açığa çıkarmış, salım 96 saate kadar devam ederek etkin maddenin yaklaşık %68'i salındığında salım platoya ulaşmıştır. SDS-PAGE sonuçları ile üretim sürecinin antijenin yapısında değişikliğe neden olmadığı ve salım süresince antijenin stabil kaldığı gözlenmiştir. Stabilite çalışmaları sonucunda NP'lerin +4°C'de ve trihaloz ilavesi ile -20°C'de fiziksel olarak stabil kaldığı bulunmuştur. Hücre canlılığı ve *in vitro* biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda ise 72 saatlik inkübasyonlar sonunda en yüksek konsantrasyonlarda dahi toksik olmadığı ve immünoestimulan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu bulgular, geleneksel aşılarla alternatif olarak, subunit protein nanoaşı sistemlerinin COVID-19 gibi gelecekte de olması muhtemel viral salgınlarda etkili taşıyıcı sistem olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: aşı, COVID-19, immünite, nanopartikül, SARS-CoV-2.

SUMMARY

Development and Evaluation of Nanoparticulate Vaccine Formulations Against COVID-19

The 2019 coronavirus disease outbreak (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has demonstrated the need for rapid, effective and safe vaccines worldwide. In this study, subunit protein nanovaccine was developed and it is aimed to improve the problems encountered in the development and application of vaccines by examining the effects of formulation-related parameters (preparation method, material used and method steps) on the prepared nanoparticle carrier system.

In this study, nanoparticulate subunit protein vaccine has been studied and the SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain (RBD) has been used as a protein. The RBD protein was chosen because it interacts directly with the ACE2 receptor on host cells and contains highly neutralizing epitopes.

Modified water/oil/water (W1/O/W2) emulsion-solvent evaporation technique has been used for the preparation of RBD-loaded PEG-PCL nanoparticles; the nanoparticles have been evaluated in terms of particle size and distribution, zeta potential and encapsulation efficiency. The morphology of the nanoparticles was visualized by transmission electron microscopy (TEM). Then, *in vitro* release studies have been carried out with optimized nanoparticles. SDS-PAGE study has been performed to evaluate the effect of the manufacturing process on the structural integrity of the antigen and *in vitro* release samples. The physical stability of nanoparticles has been determined by performing physical stability studies for 1 month. MTT analysis performed using the L929 cell line determined % cell viability, and Nitric Oxide determination was performed using the J774 mouse macrophage cell line to observe the *in vitro* activity of RBD-loaded nanoparticles.

In this research, the particle size, distribution and zeta potential of RBD-NPs were found to be in the targeted range (particle size <300 nm, PDI <0.3, Zeta potential ± 10 –15 mV) and the antigen was effectively encapsulated. TEM images revealed that the nanoparticles were spherical. NP formulations released 50% of the RBD within 4 hours, and the release continued for up to 96 hours, reaching a plateau when approximately 68% of the active substance was released. SDS-PAGE results showed that the production process did not cause any changes in the structure of the antigen and that the antigen remained stable throughout the release period. As a result of stability studies, it was found that NPs remained physically stable at +4°C and -20°C with the addition of trihalose. As a result of cell viability and *in vitro* biological activity studies, it was determined that it was non-toxic and showed immunostimulatory activity even at the highest concentrations after 72 hours of incubation.

Within the scope of these findings, subunit protein nanovaccine has been successfully formulated and characterized. It has been seen that the subunit protein nanovaccine system, which was developed as an alternative to traditional vaccines, has great potential in future viral outbreaks such as COVID-19.

Key words: COVID-19, immunity, nanoparticle, SARS COV-2, vaccine.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. COVID-19	3
1.1.1. Koronavirüs Filogenetik ve Taksonomisi	3
1.1.2. SARS-CoV-2'nin Yapısı	4
1.1.3. SARS-CoV-2'nin Yapısal Proteinleri	5
1.1.3.1. Diken Proteini (S)	5
1.1.3.1.1. Reseptör Bağlama Alanı (RBD)	6
1.1.3.2. Zarf Proteini (E)	7
1.1.3.3. Membran Proteini (M)	7
1.1.3.4. Nükleokapsid Proteini (N)	8
1.2. Sars-Cov-2 Hücrelere Giriş Mekanizması	8
1.3. COVID-19 Patogenezi ve İmmün Yanıt	9
1.4. SARS-CoV-2'ye Karşı Geliştirilmekte Olan Aşılar	11
1.4.1. Tüm Virüs Aşıları	12
1.4.1.1. İnaktif (Ölü) Virüs Aşıları	12
1.4.1.2. Canlı-Zayıflatılmış Aşılar	13
1.4.1.3. Viral Vektör Aşıları	13
1.4.2. Protein ve Peptit Subunit (Alt birim) Aşıları	14
1.4.2.1. VLP (Virüs Benzeri Parçacık) Aşıları	15
1.4.3. Nükleik Asit Aşıları	15
1.4.3.1. DNA Aşıları	15
1.4.3.2. m-RNA Aşıları	16
1.5. Aşı Adjuvanları	17
1.5.1. Aşı Adjuvanlarının Sınıflandırılması	18
1.5.2. Adjuvanların Aşı Formülasyonlarına İlave Edilme Nedenleri	19
1.5.3. İdeal Bir Adjuvanın Sahip Olması Gereken Özellikler	19
1.6. Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler	20
1.7. Polimerik Nanopartiküller	22
1.7.1 Polietilen glikol (PEG)- Poli-ε-kaprolakton (ε-PCL) Polimerik Nanopartikülleri	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	25
2.1. Gereçler	25
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	26
2.2. Yöntemler	26
2.2.1. Polimerik Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları	26
2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması	30
2.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları	30
2.2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Ölçümü	30
2.2.3.2. Zeta Potansiyel Ölçümü	30
2.2.3.3. Yükleme Etkinliğinin Tayini	31
2.2.3.4. Geliştirilen Polimerik Nanopartikül Formülasyonunun Tekrarlanabilirliğinin Tayini	32
2.2.3.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	32
2.2.3.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	32
2.2.3.7. Kısa Süreli Fiziksel Stabilitate Çalışmaları	33
2.2.3.8. İn-vitro Antijen Salım Çalışmaları	33
2.2.3.9. Yapısal Bütünlük Kontrolleri (SDS-PAGE)	34
2.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	36
2.2.4.1. Hücre Canlılığı Analizi	36
2.2.4.2. Nitrik Oksit Tayini	37
3. BULGULAR	39
3.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına Dair Bulgular	39
3.2. Model Protein (BSA) ile Yapılan Çalışmalara Dair Bulgular	44
3.2.1. İn-vitro Antijen Salım Bulguları	44
3.2.2. Yapısal Bütünlük Bulguları	45
3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Bulguları	47
3.2.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Bulguları	47
3.2.5. Kısa Süreli Fiziksel Stabilitate Bulguları	48
3.3. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Dair Bulgular	52
3.3.1. Partikül Büyüklüğü, Dağılımı, Zeta Potansiyeli ve Yükleme Etkinliği Bulguları	52
3.3.2. İn-vitro Antijen Salım Bulguları	54
3.3.3. Yapısal Bütünlük Bulguları	56
3.4. Hücre Kültürü Çalışmalarına Dair Bulgular	57
3.4.1. Hücre Canlılığı Bulguları	57
3.4.2. Nitrik Oksit Tayini Bulguları	60
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	83

ÖNSÖZ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu 2019 koronavirüs hastalığı salgını (COVID-19) hızlı, etkili ve güvenli aşılar duyulan ihtiyacı dünya genelinde göstermiştir. Bu çalışmada subunit protein nanoaşısı geliştirilmiş ve formülasyona ilişkin parametrelerin (hazırlama yöntemi, kullanılan materyal ve yöntem basamakları) hazırlanan nanopartiküler taşıyıcı sistem üzerindeki etkisi incelenerek aşılarda geliştirilmesi ve uygulanmasında karşılaşılan sorunları iyileştirmek amaçlanmaktadır.

Lisansüstü öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca her zaman desteğini gösteren, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, karşılaştığımız her zorlukta tüm imkanlarıyla bana yardımcı olan, saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı zamanında tamamlamama imkân veren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Eski Başkanı Sayın Prof. Dr. Ayşe Nurten ÖZDEMİR ve Eczacılık Teknolojisi Bölümü Yeni Başkanı Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL başta olmak üzere Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın sayın öğretim üyelerine,

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, her zorlukta yanımda olan, çözüm üreten Dr. Öğr. Üyesi Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Dr. Öğr. Üyesi Umut Can ÖZ ve tez çalışmalarım boyunca yol arkadaşım olan Uzm. Ecz. Selin KURTER'e,

Tez çalışması kapsamında yaptığım analizlerde microBCA ölçüm cihazını kullanmama imkân sağlayan Doç. Dr. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN'a, tez çalışmalarım boyunca bilimsel birikimini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ongun Mehmet SAKA, Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU, Dr. Öğr. Üyesi Devrim DEMİR DORA, Ecz. Süheyl Furkan KONCA, Uzm. Ecz. Naile Merve GÜVEN ve Dr.Ecz. Sezen YILMAZ SARIALTIN'a

SARS-CoV-2 RBD antijenini üretip saflaştırarak hem Türkiye'de bilim dünyasına büyük katkı sağlayan, ayrıca çalışmalarımda benimle paylaşan Prof. Dr. Mehmet İNAN'a,

Hücre kültürü çalışmalarındaki destekleri için Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN ve Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana manevi olarak destek olan tüm dostlarıma, tecrübeleri ile karşılaştığım zorluklarda bana yol gösteren çalışma arkadaşlarım Dr. Ecz. Ayşe GENÇER, Dr. Ecz. Safiye AKKIN, Dr. Ecz. Fatma Betül ÇAM'a, SDS-PAGE analizleri sırasında tecrübelerini ve kaynaklarını benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım Kim. Müh. Emre ÖZÇELİK, Bio. Buket KOÇER, Dr. Bio. Duygu ŞİMŞEK ve Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayata karşı duruşu ile bana rol model olan, akademik yolda ilerlememi ve başarılı olmamı benden daha çok isteyen, emeklerimin sonucunu görmesini en çok isteyeceğim insan olan canım babam merhum Hüseyin AYÇİÇEK'e, hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, sevgisi ve güveniyle bana her zaman güç veren canım annem Gülemdam AYÇİÇEK'e, çok sevgili kardeşlerim Hamza ve Benginur AYÇİÇEK'e, yaptığım her işte destekçim ve güven kaynağım olan yol arkadaşım, sevgili eşim Ulaş Arda CAN'a

Teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Antijen Sunan Hücre
BCA	Bikinkoninik Asit
BSA	Bovin Serum Albumin
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı 2019
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin
IVIVC	<i>İn vitro-İn vivo</i> Korelasyon
MA	Molekül Ağırlığı
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NO	Nitrik Oksit
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tamponu
PDMS	Polidimetilsiloksan
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG-PCL	Poli (etilen glikol)-blok-poli(ϵ -kaprolakton)
PRR	Patern Tanıma Reseptörü
RBD	Reseptör Bağlayıcı Alan
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SS	Standart Sapma
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi Coronaviridae taksonomisi şeması (Muralidar ve ark., 2020)	4
Şekil 1.2. SARS-CoV-2'nin yapısal proteinleri (Chung ve ark., 2021)	5
Şekil 1.3. SARS-CoV-2 Hücrelere Giriş Mekanizması (Havasi ve ark., 2022)	9
Şekil 1.4. SARS-CoV-2'ye karşı doğal immün yanıt (Mohammed ve ark., 2022)	11
Şekil 1.5. SARS-CoV-2'ye karşı adaptif immün yanıt (Mohammed ve ark., 2022)	11
Şekil 1.6. Organik nanopartiküllerin şematik olarak gösterimi (Prabhu ve ark., 2015)	21
Şekil 1.7. PEG, PCL ve PEG-PCL kopolimerinin kimyasal yapısı (Grossen ve ark., 2017)	23
Şekil 2.1. Nanopartiküllerin üretim yöntemine ilişkin akış şeması	28
Şekil 2.2. SDS-PAGE aparatları	34
Şekil 3.1. %1 PVA ile hazırlanan BSA çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)	39
Şekil 3.2. F1 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	40
Şekil 3.3. F4 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	41
Şekil 3.4. F9 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	41
Şekil 3.5. F13 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	42
Şekil 3.6. F18 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	43
Şekil 3.7. F19 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik	44
Şekil 3.8. pH 7,4 PBS ile hazırlanan BSA çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)	44
Şekil 3.9. Model protein BSA ile üretilen nanopartikül formülasyonundan in vitro salım profili (n=3)	45
Şekil 3.10. Salım ortamında 8, 24, 48, 96 saat tutulan saf BSA numunelerine ait bantlar	46
Şekil 3.11. 8, 24, 48, 96 saat nanopartiküllerden salınan BSA numunelerine ait bantlar	46
Şekil 3.12. Hazırlanan nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.	47

Şekil 3.13. DSC termogramları (B1: Boş polimerik nanopartikül, D1: BSA yüklü polimerik nanopartikül)	48
Şekil 3.14. +4 °C ve -20°C 'de ve trehaloz eklenerek -20°C 'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül boyutu sonuçları (n=3)	50
Şekil 3.15. +4 °C ve -20°C 'de ve trehaloz eklenerek -20°C 'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül boyutu sonuçları (n=3)	50
Şekil 3.16. BSA-NP'leri +4°C'de, 60. gün TEM görüntüleri	51
Şekil 3.17. BSA-NP'leri -20°C'de, 60. gün TEM görüntüleri	51
Şekil 3.18. Trihalozlu BSA-NP'leri +4°C'de, 60. gün TEM görüntüleri	52
Şekil 3.19. %1 PVA ile hazırlanan RBD çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)	53
Şekil 3.20. RBD yüklü nanopartikül formülasyonuna (PB1) ait partikül boyutu ve dağılımı grafiği	53
Şekil 3.21. RBD yüklü nanopartikül formülasyonuna (PB1) ait zeta potansiyeli dağılımı grafiği	54
Şekil 3.22. pH 7,4 PBS ile hazırlanan RBD çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)	54
Şekil 3.23. RBD antijeni ile üretilen nanopartikül formülasyonundan <i>in vitro</i> salım profili (n=3)	55
Şekil 3.24. Saf RBD'ye ait salım profili (n=3)	55
Şekil 3.25. RBD ile üretilen nanopartikül ve RBD antijenine ait SDS-PAGE jeli	56
Şekil 3.26. RBD proteinine ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)	57
Şekil 3.27. Polimer olarak kullanılan PEG-PCL'ye ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)	58
Şekil 3.28. Boş nanopartiküle ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)	59
Şekil 3.29. RBD proteini yüklü nanopartiküle ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)	59
Şekil 3.30. NO tayin sonuçları (n=3)	60

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Aşıllarda adjuvan kullanımının avantaj ve dezavantajları (Edelman, 2000)	19
Çizelge 1.2. COVID-19 için geliştirilen farklı nanopartiküler formülasyonların avantajları ve dezavantajları (Yang, 2021)	21
Çizelge 2.1. BSA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının bileşimi	29
Çizelge 2.2. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler	35
Çizelge 2.3. devam. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler	36
Çizelge 3.1. Birinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi (n=3)	40
Çizelge 3.2. İkinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi (n=3)	40
Çizelge 3.3. Sonikasyon gücünün partiküllere etkisi (n=3)	41
Çizelge 3.4. Polimer miktarının partiküllere etkisi (n=3)	42
Çizelge 3.5. Antijen miktarının partiküllere etkisi (n=3)	43
Çizelge 3.6. Dış faz hacminin partiküllere etkisi (n=3)	43
Çizelge 3.7. BSA yüklü nanopartikül <i>in vitro</i> salım kinetikleri	45
Çizelge 3.8. +4 °C’de saklanan BSA yüklü nanopartikül dispersiyonlarına ait kısa süreli stabilite verileri (n=3)	49
Çizelge 3.9. -20 °C’de saklanan BSA yüklü nanopartikül dispersiyonlarına ait kısa süreli stabilite verileri (n=3)	49
Çizelge 3.10. -20 °C’de saklanan ‘trehaloz’ ilave edilmiş BSA yüklü nanopartikül dispersiyonlarına ait kısa süreli stabilite verileri (n=3)	49
Çizelge 3.11. RBD yüklü final nanopartikül formülasyonuna ait partikül büyüklüğü, dağılımı, zeta potansiyeli ve yükleme etkinliği bulguları (n=3)	53
Çizelge 3.12. RBD yüklü nanopartikül <i>in vitro</i> salım kinetikleri	55

1. GİRİŞ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu koronavirüs hastalığı salgını (COVID-19) 2019 Aralık ayında Çin'in Wuhan şehrinde solunum yolu rahatsızlıkları belirtileriyle ortaya çıkmış ve damlacık yoluyla bulaşarak kısa süre içinde dünyaya yayılmıştır. 2020 yılı Mart ayında ise DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından COVID-19 salgını 'pandemi' olarak tanımlanmıştır. COVID-19 ortaya çıktığı ilk günden bu yana neredeyse bütün dünyayı etkisi altına almış ve birçok ülkenin sağlık sisteminin böylesi küresel bir salgında yetersiz kaldığını göstermiştir. DSÖ Eylül 2023 verilerine göre 700 milyondan fazla vaka, 7 milyona yakın ise ölüme neden olmuştur (WHO, 2023b). Son yıllarda yaşanan en büyük küresel problem olan COVID-19 salgınına karşı toplumsal bağışıklığı sağlamak ve SARS-CoV-2'nin yayılmasını kontrol etmek için etkili, güvenli ve uzun süre koruyucu bir aşı geliştirmek için dünya çapında yoğun çabalar sarf edilmiştir.

Aralık 2019 tarihinden Aralık 2022 tarihine kadar Dünya'da en az bir ülke tarafından 50 farklı aşı ruhsat almış; bunların 11'i DSÖ tarafından Acil Kullanım Listesine (EUL) eklenmiştir (TRACKER, 2023). Dünya Sağlık Örgütü Mart 2023 verilerine göre halihazırda klinik aşamada 183, pre-klinik aşamada ise 199 aşıya ait çalışmalar yürütülmeye devam etmektedir (WHO, 2023a).

2020 yılı Nisan ayı itibarıyla başlayan aşı geliştirme yarışı piyasaya çıkan birçok aşı olmasına rağmen halen devam etmektedir. RNA aşıları, DNA aşıları, inaktive virüs aşıları, viral vektör aşıları, virüs benzeri partiküller, subunit protein aşıları en sık kullanılan aşı platformlarıdır. DSÖ Mart 2023 verilerine göre çalışmaları yürütülen aşılardan %32'sini subunit protein aşıları, %24'ünü RNA aşıları, %12'sini inaktive virüs aşıları, %14'ünü viral vektör aşıları, %9'unu DNA aşıları, %4'ünü ise virüs benzeri partiküller oluşturmaktadır (WHO, 2023a). Özellikle subunit protein, DNA ve RNA aşılarında nanoteknolojik yöntemlerle hazırlanan antijen taşıyıcı yeni sistemler (lipozom, polimerik nanopartikül, katı lipid nanopartikül, polimerik misel vb.) kullanılmaktadır.

İnaktif ve canlı zayıflatılmış aşılar genellikle uzun süreli bağışıklık sağladıkları için geleneksel aşı geliştirme stratejilerinde ilk akla gelen yöntemlerdir. Bununla birlikte üretim aşamasında zorlukları, yüksek maliyetleri ve stabilite yönünden dezavantajlara sahiptirler.

Ayrıca bu tür aşıların inaktif hale getirilmesi veya zayıflatılmasının tam olarak yapılamamış olması ile otoimmün veya alerjik reaksiyonlara neden olabilecekleri için asıl endişe güvenlikleriyle ilgilidir (Bellini ve Horvati, 2020). Subunit aşılar bulaşıcı virüslerin yalnızca belirli immünojen parçalarını içeren sentetik peptitleri veya rekombinant proteinleri içerdikleri için etkililik ve güvenilirlik açısından daha avantajlı görülür. Ayrıca subunit aşıların aşılama bölgesinde yan etki oluşturma olasılığı diğer aşı türlerine kıyasla daha düşüktür. Stabil formlara getirilebilmesi ve patojenin belirli parçasının kullanılması sebebiyle güvenilir bir üretim prosesleri vardır. Subunit aşılar tüm bu avantajları nedeniyle yeni nesil aşı geliştirme yarışında dikkat çeken bir aşı adayı olmuştur (Pandey vd., 2020).

Nanoteknolojideki gelişmeler aşı tasarımında büyük bir potansiyel sunar ve benzeri görülmemiş bir hızla yeni aday aşı formülasyonlarının geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Nanopartikül aşı formülasyonu moleküler aşıların tek başına uygulanmasına göre avantajlıdır, çünkü etkin madde bozunmadan hedefe ulaşabilir ve makrofajlar gibi istenmeyen etkenlerden korunur. Ayrıca son gelişmeler boyut, şekil, çözünürlük, hidrofiliklik, hidrofobiklik ve yüzey modifikasyonu gibi istenen fizyokimyasal özelliklere sahip nanopartiküllerin hazırlanmasını sağlayarak, onları aşı dağıtımı için oldukça ayarlanabilir hale getirmiştir. Nanopartikül bazlı formülasyonlar özellikle hedefleme bölgeleri yüzeylerine dahil edildiğinde fagositik APC (antijen sunan hücreler)'ler tarafından alınımı artırabilir. Adjuvanın birlikte verilmesi ise APC hedefleyen nanopartikülleri yüksek antikor üretimi de dahil olmak üzere T ve B hücrelerini verimli ve düzgün bir şekilde kontrol etmek için ideal aşılar yapar (Chung vd., 2021).

Nanoaşılar, antijenlerin bozulmadan korunması, antijenlerin nanopartikül matrisinden verilmesinin kontrol edilmesi, antijen alımının düzenlenmesi ve APC'ler tarafından işlenmesi gibi nanopartikül ile ilgili farklı mekanizmalar aracılığıyla aşı etkinliğini ve immünizasyon stratejilerini iyileştirmek için tasarlanmıştır. Etkili aşı cevapları için hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemi eşzamanlı olarak etkinleştirilmelidir; bu katı lipid nanopartiküller, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, protein nanopartiküller ve virüs benzeri partiküller (VLP) gibi yenilikçi nanoaşı formülasyonlarının yardımıyla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanoaşı formülasyonları doğal yapıyı sürdürerek ve proteolitik bozunmadan koruyarak antijen stabilitesini artırabilir. Ayrıca artırılmış lipofilisiteyi nedeniyle hedef antijenin sürekli salımı avantajını sunarlar (Machhi vd., 2021).

Adjuvanlar, hedef APC'lere antijen verilmesine yardımcı olarak ve hedef dışı yan etkileri azaltarak nanoaşının aracılık ettiği istenen bağışıklık yanıtlarında hayati bir rol oynarlar. Hedeflenen antijen iletimi, küresel talebi karşılamak için SARS-CoV-2 aşılarının geliştirilmesinde önemli olan etkili immün yanıtı ortaya çıkarmak için gereken aşı dozunu azaltır. Antijenler ve adjuvanların birlikte verilmesi için; i. Antijen ve adjuvanın doğrudan konjugasyonu, ii. Nanopartikül içinde veya üzerine tasarlanmış enkapsülasyon, iii. Uygulama aracının adjuvan olarak kullanılması yaklaşımları kullanılır (Machhi vd., 2021).

Biyopolimerlerden hazırlanan partiküler sistemler, aşı uygulaması için taşıyıcı ve adjuvan olarak kullanılmak üzere umut verici özelliklere ve güvenliğe sahiptir. Bu sistemler üç farklı mekanizma sunabilir: Antijenlerin bağışıklık sisteminin ilgili antijen sunan hücrelerine, yani makrofajlara hedeflenmesi, bağışıklık sistemindeki hücrelerin (örneğin sitokinler) doğrudan aktivasyonu ve enkapsüle protein için kontrollü salım özellikleri sağlama ve vücutta immün yanıtın artmasını sağlar (Sarei vd., 2013).

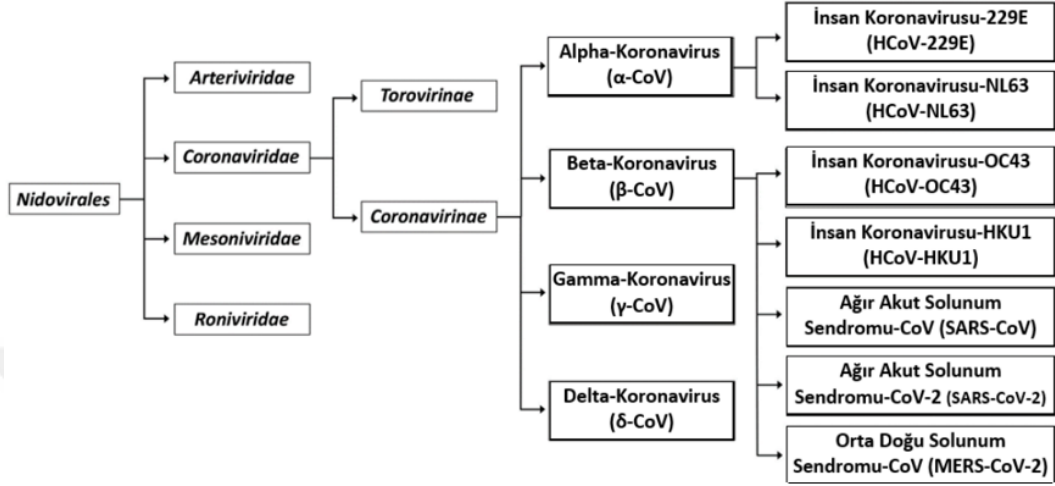
Bu bilgiler değerlendirilerek, tez kapsamında SARS-CoV-2 Spike proteini reseptör bağlanma alanı (RBD) subunit/protein aşısı üzerinde antijen taşıyıcı sistem olarak poli(etilen glikol) (PEG)-poli(ϵ - kaprolakton)(PCL) polimerik nanopartikül sistemi kullanılmış ve formülasyona ilişkin parametrelerin (hazırlama yöntemi, kullanılan materyal ve yöntem basamakları) hazırlanan nanopartiküler taşıyıcı sistem üzerindeki etkisi incelenerek aşılarda geliştirilmesi ve uygulanmasında karşılaşılan sorunlara eczacılık teknolojisi bakış açısıyla katkı sağlamak amaçlanmıştır.

1.1. COVID-19

1.1.1. Koronavirüs Filogenetik ve Taksonomisi

Zarflı, pozitif tek sarmallı, yüzeyinde diken benzeri glikoproteinler içeren RNA virüsü olan SARS-CoV-2, koronavirüsler olarak bilinen bir virüs grubuna aittir. Şimdiye kadar insanlara bulaşabilen altı koronavirüs türü tanımlanmıştır(Zhu vd., 2020). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesince alfakoronavirüs (α -CoV), betakoronavirüs (β -CoV), gamakoronavirüs (γ -CoV) ve deltakoronavirüs (δ -CoV) olmak üzere dört ana grupta sınıflandırılırlar (Muralidar vd., 2020) (Şekil 1.1). Betakoronavirüs ailesinden zoonotik

orijinli türler olan SARS-CoV ve MERS-CoV insanlar için öldürücü olmuştur. SARS-CoV türüne ait yeni bir tür olan SARS-CoV-2, 2019 koronavirüs hastalığı (COVID-19) salgınına neden olmuştur (Mallick ve Duttaroy, 2022).

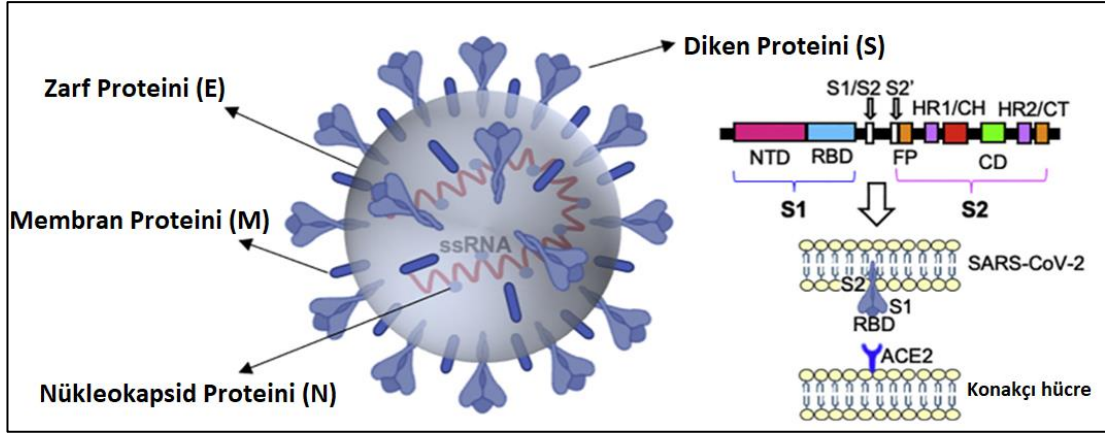


Şekil 1.1. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi Coronaviridae taksonomisi şeması (Muralidar vd., 2020)

1.1.2. SARS-CoV-2'nin Yapısı

SARS-CoV-2 virüsü 120-160 nm çapta, yuvarlak veya çok şekilli yapıdadır. Koronavirüs ailesinde ortak olarak Spike (S) proteinini taşıyan taç yaprağı şeklinde bir çıkıntıya sahiptir (Shi vd., 2020). Enfeksiyon sırasında hücrelere bağlanma ve hücre zarından girişi sağlayan Spike (S) proteini virüsün en karakterisitik parçasıdır. S proteinine ek olarak koronavirüsler Zarf (E), Membran (M) ve Nükleokapsid (N) proteinlerini de içerir. Zarf proteini, virülansın teşvik edilmesinde yer alır ve 74-109 amino asit (aa) içerir. Membran proteini, O- veya N-glikan tarafından modifiye edilmiş N-terminal bölgeye ve hidrofilik C-terminal kuyruğuna sahip, 218 ila 263 amino asit (aa) içeren protein kısmıdır. Nükleokapsid proteini, RNA'nın nükleokapside uygun şekilde katlanmasını kolaylaştıran, RNA'ya bağlı fosforile edilmiş 349 ila 470 aa içeren bir proteindir (King vd., 2011).

1.1.3. SARS-CoV-2'nin Yapısal Proteinleri



Şekil 1.2. SARS-CoV-2'nin yapısal proteinleri (Chung vd., 2021)

1.1.3.1. Diken Proteini (S)

SARS-CoV-2 diken glikoproteini, transmembran segmentiyle viral zara sabitlenmiş trimer oluşturan tip I zar proteinidir. Alt solunum yolu hücrelerinde eksprese edilen reseptör anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanır ve membran füzyonunu desteklemek için yapısal değişikliklere uğrar (Zhang vd., 2021).

İlk salgında ortaya çıkan Wuhan-Hu-1 suşunun tam uzunluktaki S proteini bir N-terminal sinyal peptidi, bir reseptör bağlama bölgesi (S1) ve bir füzyon bölgesi (S2) dahil olmak üzere moleküler ağırlığı yaklaşık 140 kDa olan 1273 amino asit kalıntısına sahiptir. S1 bölgesi ayrıca N-terminal alanı (NTD), reseptör bağlama alanı (RBD) ve C-terminal alanı (CTD1 ve CTD2) bölümlerini içerirken; S2 transmembran segmenti (TM), sitoplazmik kuyruk (CT), merkezi sarmal (CH), konektör alanı (CD), füzyon peptidi (FP), füzyon peptidi yakın bölge (FPPR), heptad tekrarı 1 (HR1) ve heptad tekrarı 2 (HR2) bölümlerini içerir (Zhang vd., 2021). S1 alt birimi konakçı hücreyi enfekte etmek için anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE2) reseptör olarak kullanır. S2 alt birimi ise membran füzyon sürecine aracılık eder (Xia vd., 2020)

Diken (S) proteini SARS-CoV-2'ye karşı aşı geliştirme sürecinde en umut verici antijen formülasyonu olmuştur. Yüzey maruziyetinden dolayı konakçı bağışıklık sistemi tarafından doğrudan tanınabilir. Hedef hücrelere sonraki virüs girişi için gerekli olan, daha

sonra patojeniteye neden olan reseptör ACE2'ye bağlanır, ardından insan akciğerinde tip II pnömositlere girerek viral enfeksiyonun başlamasına neden olur. S proteininin membran füzyonunun yanı sıra reseptör bağlama bölgelerinin bulunması, S proteinine dayalı aşılarda virüsün bağlanmasını ve daha sonra zar füzyonunu önlemesi ve böylece virüs enfeksiyonuna karşı koyan antikorları aktive etmesi muhtemeldir. Ayrıca homolog proteinler SARS-CoV ve MERS-CoV'a karşı aşı geliştirmek için zaten kullanılmış ve etkili oldukları kanıtlanmıştır (Pandey vd., 2020; Shi vd., 2020; Zhang vd., 2020). SARS-CoV'da S proteininin serum nötralize edici antikorlar ürettiği ve Afrika yeşil maymunlarını ve farelerini koruduğu bildirilmiştir (Bisht vd., 2004; Yang vd., 2004). Öte yandan SARS-CoV S proteininin immün açıdan baskın bölgelerinde zararlı olabilecek immün yanıtları ortaya çıkarabilecek nötralize edici olmayan birkaç epitop da mevcut olup, bu tür epitopların tanımlanması ve ortadan kaldırılması zorunludur (Weingartl vd., 2004).

1.1.3.1.1. Reseptör Bağlama Alanı (RBD)

Reseptör bağlama alanı (RBD), S1'in 424-494 amino asit içeren bir alt alanıdır ve peptidaz alanı (PD) olarak bilinen ACE-2 üzerindeki hücre dışı bağlanma bölgesi ile doğrudan etkileşime girer (Shi vd., 2020). S proteininin RBD'si, virüsün ACE2 reseptörlerine bağlanmasını bloke ederek, çoğalmasını ve yayılmasını sınırlayarak konakçı hücrelere viral girişi önlemede SARS-CoV-2'nin antikor aracılı inaktivasyonunu nötralize etmek için birincil hedeftir (Chung vd., 2021).

SARS-CoV-2 ve SARS-CoV reseptör bağlama alanları yapısal açıdan bazı farklılıklar göstermesine rağmen, SARS-CoV-2 reseptör bağlama alanının ACE-2 bağlama yolağı SARS-CoV reseptör bağlama alanı ile neredeyse aynıdır (Lan vd., 2020). Ancak SARS-CoV-2 S proteininin RBD'si SARS-CoV S proteini RBD'sinden daha yüksek bir ACE2 bağlanma afinitesine sahiptir (Shang vd., 2020).

SARS-CoV-2'ye karşı yapılan aşılama çalışmaları sonucu en önemli nötralize edici antikorların RBD'ye karşı olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum RBD'nin aşı tasarımı için uygun bir aday olabileceği ve virüsün konakçı hücreye girişini doğrudan engelleyebileceğini düşündürmektedir (Ghaemi vd., 2022). Bu gözlem RBD fragmanının S proteininin diğer kısımlarına göre daha az glikozile olması ve antijenler için daha erişilebilir olması ile açıklanmaktadır (Gong vd., 2021).

SARS-CoV enfeksiyonunu önlemek için farklı genotipler ile rekombinant proteinler içeren RBD veya RBD'yi kodlayan vektörler kullanılabilmektedir. Bu nedenle SARS-CoV-2'nin RBD alt birimini hedefleyen antikorların üretilmesi, klinik çalışmalar öncesi uygun hayvan modellerinde test edilerek, T hücresi (CD4+ ve CD8+) yanıtları elde etmek önemli bir koruyucu ve tedavi edici stratejisi olacaktır (Pandey vd., 2020).

Farklı platformlarda aşı teknolojilerinde geliştirilebilen bir immünojen olarak RBD'nin yüksek verimli üretim ve maliyeti düşük, büyük ölçekli üretimi, ayrıca RBD ile aşı üretim teknolojilerinde sıcaklığa dayanıklı formülasyonlar geliştirilebilme imkanı aşı tasarımında büyük avantajlar sağlar (Kleanthous vd., 2021).

RBD bazlı aşılar tüm avantajlarına rağmen küçük moleküler boyutlu olması nedeniyle zayıf immünojenisiteye neden olabilir. Bu sebeple antikor yanıtlarını ve dayanıklılığını artırmak için immün güçlendirici adjuvanların kullanılması büyük önem taşımaktadır (Wang vd., 2022).

1.1.3.2. Zarf Proteini (E)

Zarf (E) proteini, 75 amino asit dizisi uzunluğunda, SARS-CoV-2'nin en küçük yapısal proteinidir. Etki mekanizması ve yapısı tamamen aydınlatılamamış olmasına rağmen görünürde viral birleşme, salın ve patogeneze rol oynar (Schoeman ve Fielding, 2019). Yapılan çalışmalarda E proteini içermeyen korona virüslerde viral titrelerin azaldığı, viral olgunlaşmanın bozulduğu ve viral yayılmanın yetersiz olduğu gözlenmiştir (Mukherjee vd., 2020). E proteini, oligomer yapıda olması ve viroporin olarak adlandırılan iyon kanalı proteinini oluşturabilmesi bakımından dikkat çeker (Torres vd., 2005).

1.1.3.3. Membran Proteini (M)

Membran proteini, virüs oluşumunda yer alan ve virüs yüzeyinde en çok bulunan, yaklaşık 25 kDa moleküler ağırlığa sahip bir trans-membran glikoproteindir (Neuman vd., 2011). Membran proteini yaklaşık 220-260 amino asit uzunluğundadır ve iç kısmında COOH terminal bölgesi, dışında ise NH₂ terminal bölgesinden oluşur (Kumar vd., 2023). Virüsün şeklini koruma, diğer proteinlerle etkileşime girme ve nükleokapsid proteinini stabilize etme

işlevine sahiptir (Pandey ve Yadav, 2022). M proteini, aşılama sonrası etkin nötrale edici antikorları ortaya çıkarabilmesi, trans-membran alanının güçlü hücrel bağışıklık tepkisini indükleyebilmesi ve evrim sırasında farklı türler arasında yüksek oranda korunması avantajlarından dolayı SARS-CoV-2 aşısı geliştirmek için aday bir antijen olarak kullanılabilir (Pandey vd., 2020).

1.1.3.4. Nükleokapsid Proteini (N)

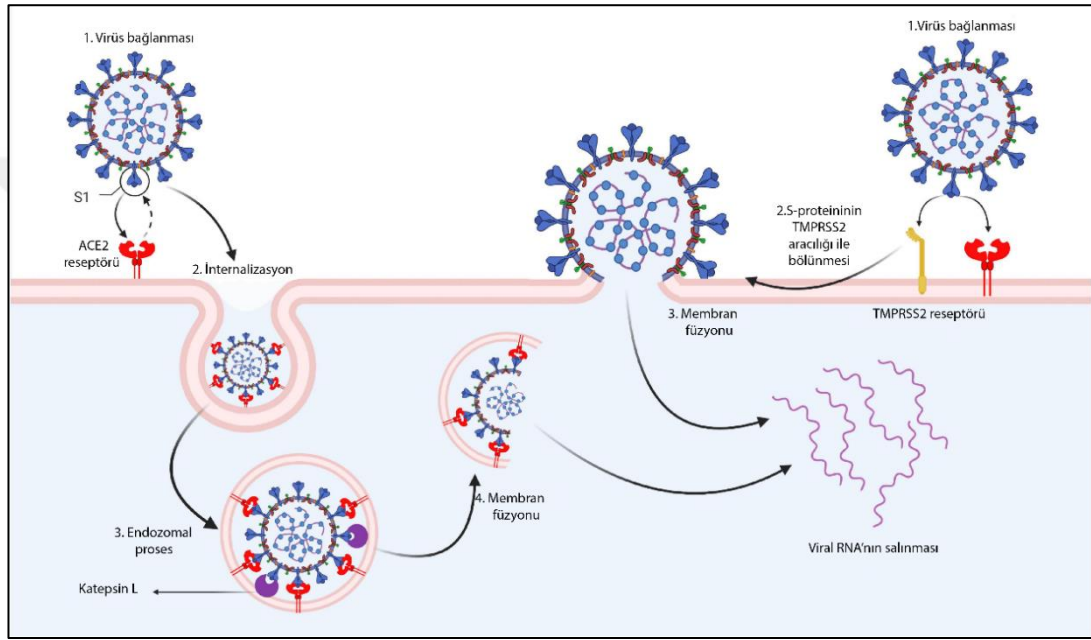
Nükleokapsid (N) proteini, 419 aminoasit (aa) uzunluğunda, yaklaşık 50 kDa moleküler ağırlığında, korona virüsünün yapısında en çok bulunan proteindir (McBride vd., 2014). Viral RNA'ya bağlanarak nükleokapsid oluşumunu destekleyen, virüs tomurcuklanmasına, RNA replikasyonuna ve mRNA replikasyonuna yardımcı olan, diğer yapısal proteinlerle etkileşime giren önemli bir yapısal proteindir (Astuti, 2020). Ayırt edici yapısal farklılıkları olmakla birlikte, SARS-CoV-2 N proteininin SARS-CoV'a yaklaşık %90 oranında benzerliği çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Zeng vd., 2020). SARS-CoV'da hastalığı geçirenlerin çoğu (ELISA ile %89) nükleokapsid proteinine karşı antikor üretmiştir. Bu durum N proteininin tanı ve koruyucu tedavide virüsün önemli bir antijeni olarak öne çıkmasını sağlamaktadır (Leung vd., 2004).

1.2. Sars-Cov-2 Hücrelere Giriş Mekanizması

Virüs partiküllerinin hücrelere girerek konakçı üzerinde replikasyonu ve sitokin salınımı gibi bağışıklık tepkilerinin uyarılması için çoğunlukla çeşitli reseptörlere bağlanması gerekir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörü SARS-CoV-2'nin hücre girişi için anahtar görevi görür (Beyerstedt vd., 2021).

SARS-CoV-2, hücre yüzeyindeki transmembran proteinlerinin varlığına bağlı olarak iki farklı yolla hücrelere giriş yapabilir. Hücre yüzeyinde furin ve TMPRSS2 yeterli oranda bulunuyorsa SARS-CoV-2, S1 alt biriminin parçası olan RBD aracılığıyla ACE2 reseptörüne bağlanır, ardından S proteininin furin proteaz ile etkileşimiyle S1/S2 alt birimlerine ayrılır ve S proteininde konformasyonel değişiklikler oluşur. S1 hücre yüzeyinden koparak S2 alt biriminin hücreye bağlanmasını sağlar. TMPRSS2 proteazı ile etkileşim sonrası S2 alt birimi S2' bölünme bölgesini açığa çıkarır. Ancak hedef hücre yüzeyinde TMPRSS2 yetersiz ise

veya virüs-ACE2 kompleksi TMPRSS2 ile karşılaşmazsa virüs-ACE2 kompleksi klatrin aracılı endositoz yoluyla endolizozomlara girer ve katepsinler aracılığıyla asidik ortamda S2' bölünmesi gerçekleşir. S2' bölünmesi füzyon peptidini (FP) açığa çıkarır ve bu sayede konakçı hücre membranına füzyon gerçekleşir. Membran füzyonu sonrası füzyon poru büyüyerek RNA'nın replikasyon için konak hücre sitoplazmasına salınmasını sağlar (Bestle vd., 2020; Jackson vd., 2022; Yuan vd., 2020). Sars-CoV-2'nin hücrelere giriş mekanizması Şekil 1.3'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.3. SARS-CoV-2 Hücrelere Giriş Mekanizması (Havasi vd., 2022)

1.3. COVID-19 Patogenezi ve İmmün Yanıt

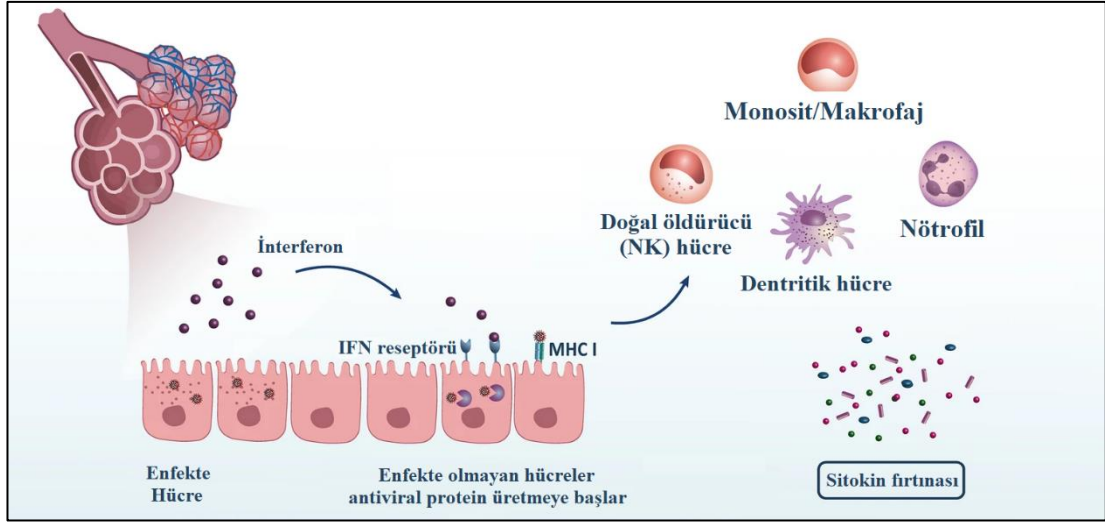
SARS-CoV-2'nin hücrelere girişi ile birlikte konakçı hücrede ilk savunma hattı olarak doğal immün yanıt gelişir. Doğal immün sistem virüse ait RNA ürünlerini tanıyan patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) ve patern tanıma reseptörleri (pattern recognition receptor-PRR) aracılığıyla savunma geliştirir (Medzhitov ve Janeway Jr, 1997; Pasare ve Medzhitov, 2005).

Konak hücredeki PRR'ler arasında doğal immün yanıtın oluşmasında en önemlisi viral replikasyon sırasında oluşan RNA'yı tanıyan toll benzeri reseptörlerdir (toll like receptors-TLRs). TLR'ler antijenin nükleik asitlerini tanıyan, hücre içi veziküllerden salınan

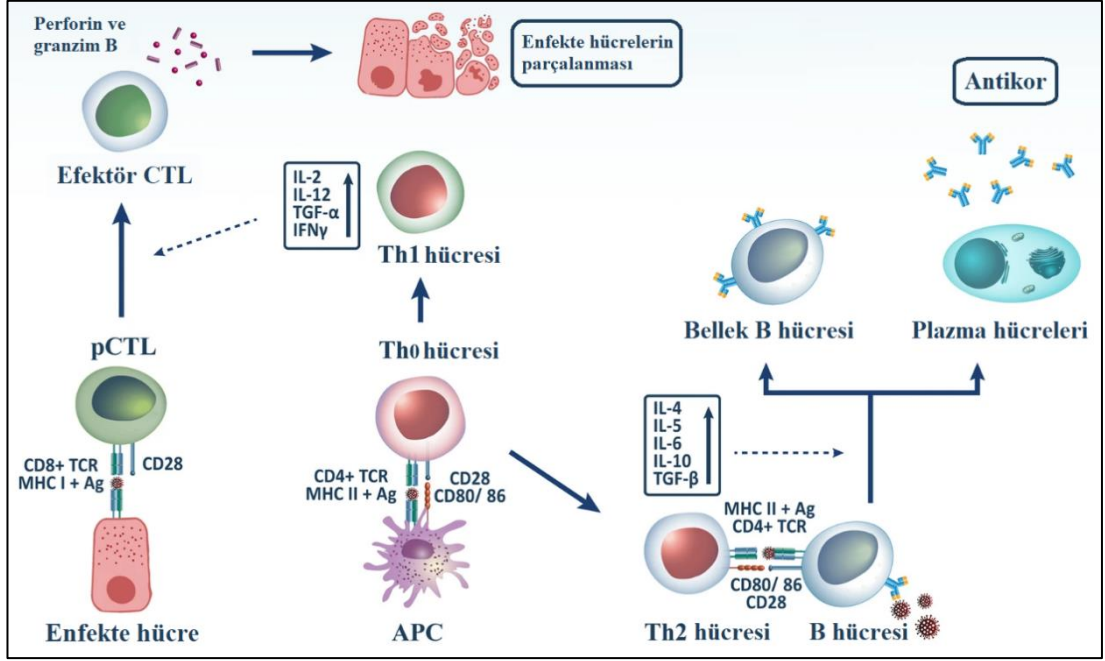
reseptörler (TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9) ve protein, lipit, lipoprotein gibi viral membran bileşenlerini tanıyan, hücrenin yüzeyinden salınan reseptörler (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11) olarak iki gruba ayrılır (Kawai ve Akira, 2010).

Doğal immün yanıtın oluşumunda bir diğer önemli faktör antijen sunan hücrelerdir (antigen presenting cells-APCs). Bu grupta dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar bulunur (Şekil 1.4). APC'ler TLR'ler aracılı lenfositlerine sunarak adaptif immün yanıtın uyarılmasını sağlar. Daha sonra interferon düzenleyici faktörler (interferon regulatory factors-IRFs) gibi hücre içi sinyal yollarını aktifleştirerek enfekte hücrelerden sitokinlerin ve tip I interferonların (tip I IFN) salgılanmasını sağlar (Abbas vd., 2019; Mohammed vd., 2022). IFN'ler RNA bağımlı protein kinaz enzimini uyararak enfekte konak hücrelerde viral replikasyonu sınırlayan ve enfekte olmamış hücreleri enfeksiyona karşı koruyan apoptoz indüksiyonunu indükler. APC'ler MHC-I aracılığıyla virüse ait antijenik yapıları CD80 T lenfositlerine sunar ve IL-12, IFN- α/β gibi sitokinlerin uyarılması ile sitotoksik T lenfositleri aktive edilir (Abbas vd., 2014; Mohammed vd., 2022).

Adaptif immün yanıtta doğal immün yanıtın farklı olarak savunma mekanizması patojene maruz kalma ile birlikte uyarılır. Adaptif immün sistemde T hücreleri sitotoksik T lenfositlerine (CD8+) veya yardımcı T hücrelerine (CD4+) dönüşerek virüs antijeni ile etkileşime girer; ayrıca B hücreleri antikor üretir. Primer sitotoksik T lenfositleri (primary cytotoxic T lymphocytes-pCTLs) enfekte hücrelerdeki MHC-I'e bağlanarak aktive olur. Ardından efektör CTL'ye farklılaşarak Perforin ve Granzim üretir ve enfekte hücreleri parçalar. Bununla birlikte, T yardımcı hücreler (Th1) IL-2, IL-12, TGF- β ve IFN- γ salgılayarak pCTL'nin efektör CTL'ye farklılaşmasını sağlar ve Th2 hücreleri de IL-4, 5, 6, 10 ve TGF- β salgılayarak B hücrelerinin antikor üretmesine yardımcı olur (Mohammed vd., 2022) .



Şekil 1.4. SARS-CoV-2'ye karşı doğal immün yanıt (Mohammed vd., 2022)



Şekil 1.5. SARS-CoV-2'ye karşı adaptif immün yanıt (Mohammed vd., 2022)

1.4. SARS-CoV-2'ye Karşı Geliştirilmekte Olan Aşılar

Aşılar; patojenlerin belirli bölgelerinden alınmış antijenik materyalleri içeren, uygulandıklarında enfeksiyon ve/veya hastalıklara karşı bağışıklık geliştiren biyolojik preparatlardır (Bozkır ve Ayçiçek, 2021).

SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilmekte olan aşılar; tüm virüs aşıları, subunit aşılar ve nükleik asit aşıları olmak üzere üç ana grupta tasarlanır. Bu tasarımların farklılıkları bütün bir virüsü, patojenin sadece bağışıklık sistemini tetikleyen kısımlarını veya virüsün tamamını değil, belirli proteinleri yapmak için bilgiyi sağlayan genetik materyalin kullanılmasında yatmaktadır (WHO, 2021).

1.4.1. Tüm Virüs Aşıları

Tüm virüs aşıları; inaktif aşılar, canlı-zayıflatılmış aşılar ve viral vektör aşıları olarak üçe ayrılır.

1.4.1.1. İnaktif (Ölü) Virüs Aşıları

İnaktif (Ölü) Virüs Aşıları; kimyasal yolla veya ısı ile tamamen inaktive edilerek üretilen, ancak immünojen olarak hareket etme yeteneğini koruyan mikroorganizmaları içeren aşılardır (Pandey vd., 2020). İnaktif virüs aşılarına grip, çocuk felci, kuduz ve hepatit A örnek verilebilir (Yadav vd., 2020). İnaktif aşılar hedef virüsün epitoplarının yapısını korumak ve virüse karşı gelişen bağışıklık tepkisini farklı şekilde açığa çıkarmaktır (Pandey vd., 2020). İnaktif aşıların en hassas noktası ise yetersiz inaktivasyon yapılması patojenin enfeksiyon yapma özelliğine devam etmesine neden olarak organizmaya uygulandığında hastalığa neden olabilir; bunun yanında inaktivasyon olması gerekenden fazla yapılırsa kullanılan antijenin immünojenik özelliğini kaybetmesine ve aşının etkisiz olmasına neden olabilir (Beyazova ve Aktaş, 2007). Ayrıca patojenin sahip olduğu yapısal olmayan antijenlerin varlığına bağlı olarak alerjik reaksiyon riski artabilir (Yadav vd., 2020). Bu sebeple inaktif aşıların güvenliğini değerlendirmek uzun süreli gözlem gerektirir. Ayrıca zayıf bağışık yanıt oluşturabilecekleri için adjuvant kullanımı ve tekrar doz aşı uygulaması gerektirebilir. Avantajları ise; üretim yöntemi geçmişe dayandığı için canlı aşıdan daha güven verir, buzdolabında saklanmaları gerekmez ve stabil aşılar (Beyazova ve Aktaş, 2007).

1.4.1.2. Canlı-Zayıflatılmış Aşılar

Hastalık etmeni olan canlı mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında zayıflatılması ile elde edilen, antijeniteleri devam eden ancak patojeniteleri kaybolmuş aşılardır. Canlı zayıflatılmış aşılar kızamık, kabakulak, kızamıkçık aşısı (MMR) ve su çiçeği aşıları örnek olarak verilebilir (Plitnick, 2013). Canlı zayıflatılmış virüs aşıları neredeyse veya tamamen patojeniteden yoksun olan ancak koruyucu bağışıklık tepkisini indükleme yeteneğine sahip zayıflatılmış suşlardan hazırlanır. Canlı zayıflatılmış aşılar doğal bir enfeksiyona en yakın şey olduğundan bu aşılar bağışıklık sisteminin iyi öğretmenleridir. Zayıflatılmış aşılar güçlü immün koruyucu hücresel ve antikor tepkileri ortaya çıkarır ve genellikle yalnızca bir veya iki dozla ömür boyu bağışıklık sağlarlar. Zayıflatılmış aşıların en büyük dezavantajı, ikincil mutasyonların virülansa dönüşe yol açabilmesi ve dolayısıyla hastalığa neden olabilmesidir. Bağışıklığı baskılanmış, hasar görmüş veya zayıflamış bağışıklık sistemi olan kişilere (kemoterapi, HIV enfeksiyonu ve hatta hamilelik nedeniyle) canlı aşı yapılamaz. Diğer bir sınırlama ise canlı atenüe aşıların etkin şekilde kalabilmeleri için genellikle soğuk zincire ihtiyaç duymalarıdır (Yadav vd., 2020).

1.4.1.3. Viral Vektör Aşıları

Viral vektör aşıları, virüslerin replikasyon özelliklerinin yok edilerek antijen kodlayan genlerin bu virüslere eklenmesi ile geliştirilen aşılardır (Vemula ve Mittal, 2010). Viral vektör aşıları, hücreleri enfekte edip vücutta oldukça uzun süre kalabildikleri ve antijen sunan hücrelere doğrudan tepki gösterebildikleri için bağışıklık tepkisini tetiklemede oldukça etkilidir. Ayrıca bu tür aşılardaki viral proteinler adjuvan gibi davranabilir, böylece bağışıklık tepkisini artırarak daha fazla antikor ve uzun süreli bağışıklık oluşmasını, ayrıca gerekli antijen dozunun azalmasını sağlarlar. Çeşitli viral vektörlerin içlerinde SARS-CoV proteinlerini eksprese edecek şekilde genetik mühendisliğinin yapıldığı SARS-koronavirüs (SARS-CoV) aşısının geliştirilmesi yönünde birkaç girişimde bulunulmuştur. Adenovirüs ve Ankara modifiye aşı virüsü (MVA), SARS-CoV ve MERS-CoV aşılarının geliştirilmesinde kullanılan en yaygın iki viral vektördür (Pandey vd., 2020). Viral vektör aşılarının en önemli dezavantajı ise, yüksek doz öldürücü olabileceği için doz ayarı viral vektörler ile hazırlanan aşılar da en kritik noktadır. Viral vektörlerin replikasyon özelliklerini yeniden kazanma ihtimali ise bir diğer risk faktörüdür. Ayrıca viral vektör aşılarında etkinliği düşebilecek

önemli durumlardan biri de taşıyıcı olarak kullanılan virüslere karşı vücut tarafından önceden geliştirilmiş bağışıklık olmasıdır (Singh vd., 2019).

1.4.2. Protein ve Peptit Subunit (Alt birim) Aşıları

Biyoteknolojideki gelişmeler sayesinde viral antijenlerin ana antijenik bölgelerini kapsayan peptid bölgelerinin tanımlanması sağlanmıştır. Bu sayede bağışıklama için tüm virüsü kullanmak yerine, aşı olarak antijenlerin bağışıklık sistemini en iyi uyarabilen bir alt birim bileşeni kullanılması hedeflenmiştir. Bu tip aşılar için antijenin spesifik olan T hücrelerinin veya antikörlerin tanıdığı ve bağlandığı kısımları kullanıldığından, yan etki riski önemli ölçüde azalır. Alt birim aşıların üretim süreci diğer aşılarla göre daha hızlı olup, çok daha düşük maliyetle yüksek etkinlik elde etmeyi sağlarlar. Ayrıca bu aşıların ticari olarak en önemli avantajlardan biri 2-8° C’de saklanabilir olmasıdır (Koç vd.). Alt birim aşılar, konakçıya enjekte edildiğinde koruyucu etkinlik sergileyen viral proteinlerin bir kısmını içerir. Bununla birlikte koruyucu etkinlik, patojenin yalnızca zayıf immünojen olma eğiliminde olan bazı proteinleri kullanıldığından sınırlı olabilir. Ayrıca alt birim aşılarla uygulanan artan saflaştırma işlemleri immünojenisitede azalmaya yol açabilir. Bu tür durumlarda alt birim aşı immünojenisitesini arttırmak için adjuvanlar kullanılabilir (Shanmugaraj vd., 2022). En iyi bilinen alt birim aşıları Hepatit B, İnfluenza A ve B aşılarıdır (Yadav vd., 2020).

Alt birim aşıların çoğu reseptör bağlanmasından ve membran füzyonundan sorumlu olduğu için SARS-CoV-2 aşı çalışmalarında, S proteinine veya S proteininde bulunan RBD bölgesine odaklanılmıştır (Shanmugaraj vd., 2022). S proteinine dayalı aşılar, viral bağlanmayı ve ardından membran füzyonunu önleyen antikörleri aktive ederek viral enfeksiyonu inhibe eder. SARS-CoV-2, ACE2’yi viral S proteinine bağlanan konak reseptörü olarak tanır. Bu nedenle RBD SARS-CoV-2’ye karşı aşı geliştirilmesinde en olası kaynak olarak tanımlamak çok önemlidir (Tai vd., 2020). RBD bazlı aşının bir avantajı, konak immüno-güçlendirmesini en aza indirme yeteneğidir. Ayrıca RBD alanı, SARS-CoV ve MERS-CoV aşılarının geliştirilmesinde de kullanılmıştır. Yapılan çalışmalara göre SARS-CoV ve SARS-CoV-2’nin RBD alanlarının %80’den fazla amino asit benzerliği gösterdiği ve aynı ACE2 reseptörüne bağlandığına dair ilk bulgular elde edilmiştir (Chen vd., 2020).

1.4.2.1. VLP (Virüs Benzeri Parçacık) Aşıları

Virüs benzeri parçacıklar (VLP'ler), doğal virüslerin yapısını taklit eden ancak viral genomdan yoksun olduğu için replike olamayan çoklu protein yapılarıdır (Roldão vd., 2010). VLP'ler, viral genomdan yoksun oldukları ve bu nedenle bulaşıcı olmadıkları için daha yüksek güvenlik sağlarlar. VLP'ler, doğal enfeksiyöz virüsün yapısını taklit eden, kendiliğinden oluşan makromoleküler yapılardır; bu nedenle, diğer alt birim aşılarla karşılaştırıldığında daha güçlü bağışıklık tepkileri oluşturmaları beklenir (Shanmugaraj vd., 2022). VLP'lerin B hücresi aracılı immün yanıtları uyarma yetenekleri çok yüksektir, ayrıca sitotoksik T lenfosit yanıtlarını uyarmada oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. VLP aşılarının bu özelliğinin etkinliğine büyük bir katkısı olduğu düşünülmektedir (Noad ve Roy, 2003). VLP'ler güvenlikleri, basit yapıları ve hem humoral hem de hücresel bağışıklık tepkilerini indüklemek için uygun immünolojik özellikleri nedeniyle virüslere karşı geleneksel aşılarla yüksek öncelikli bir alternatif olarak geliştirilmektedir (Dai vd., 2018).

1.4.3. Nükleik Asit Aşıları

Nükleik asit bazlı yaklaşımlarda plazmid DNA veya RNA'yı yani mRNA'yı kodlayan antijen kullanılır. Nükleik asit tarafından kodlanan bu antijenler hücre tarafından alınıp eksprese edildikten sonra antikör ve hücre aracılı yanıtı da indükler (Pandey vd., 2020). Nükleik asit bazlı aşılar diğer aşılarla göre farklı bir strateji izlemektedir. Vücuda doğrudan protein antijeni vermek yerine, antijenin genetik kodunu vücuttaki hücrelere iletirler ve hücrelere daha sonra bir bağışıklık tepkisini uyaracak antijeni üretmeleri talimatını verirler (Tiboni vd., 2021).

1.4.3.1. DNA Aşıları

DNA aşıları, DNA plazmitlerinin bir vektör olarak kullanılarak konakçının hücrelerine immünojenik antijenleri kodlayan genlerin veya fragmanlarının verilmesini kapsar. Bu yaklaşım hem humoral hem de hücresel immün yanıtları etkin bir şekilde indükler (Silveira vd., 2021). DNA aşılması, diğer geleneksel yaklaşımlara kıyasla basitliği, kararlılığı, güvenliği ve kolay üretim kabiliyeti nedeniyle bir SARS aşısı geliştirmek için çekici bir

yaklaşım sunar. Koruyucu etkinlik ve güvenliliği kanıtlanmış, insanda kanıtlanmış ilk DNA aşısı olan HIV-1 aşılarının üretilmesiyle DNA aşıları üzerinde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ayrıca, AIDS, sıtma ve grip dahil olmak üzere çeşitli diğer DNA aşıları da insanlar üzerinde denenmektedir. Şimdiye kadar iki SARS-CoV-2 DNA aşısı faz 3 klinik aşamasını tamamlamış, birinin ruhsatlanması onaylanmıştır (TRACKER, 2023; WHO, 2023a). DNA aşıları preklinik aşamalarda verimli bir şekilde çalışsa da, saha koşullarındaki etkinlikleri oldukça yetersizdir ve inaktive edilmiş ve canlı zayıflatılmış virüs aşıları gibi diğer aşılarla kıyasla daha düşük immünojeniteye sahiptirler ve etkinlik açısından iyileştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır (Pandey vd., 2020).

1.4.3.2. m-RNA Aşıları

mRNA aşılarının temel ilkesi, bir veya daha fazla immünojeni kodlayan bir transkriptin konakçı hücre sitoplazmasına iletilmesi, daha sonra hücreye giren transkriptin translasyonu ve ardından oluşan immünojenik proteinlerin eksprese edilmesi ve dışarı salınmasıdır. Burada amaç virüse maruz kalmadan hücrelerin kendi viral protein üretimini sağlamaktır (Kowalzik vd., 2021). Hücre içine girişi sağlamak için m-RNA lipid nanopartikül içine hapsedilir ve aşı uygulandıktan sonra lipid nanopartiküler endositoz yoluyla hücre içine alınır ardından sitoplazmaya salınarak protein sentezini başlatır. Salgılanan proteinler vücutta hem hücresel hem de humoral bağışıklığı tetikler (Wang vd., 2020). mRNA aşıları yüksek potense sahip olmaları nedeniyle, bir veya iki düşük doz aşı uygulaması ile hem CD8+ hem de CD4+ T hücrelerini aktive ederek güçlü immün yanıtları indükleyebilir (Knights vd., 2009). Ayrıca mRNA'nın translasyon sonrası doğal bozunmasına bağlı olarak, m-RNA aşıları potansiyel enfeksiyon ve insersiyon kaynaklı mutagenez riskini en aza indirir (Lim ve Lee, 2015). Klinik ölçekte m-RNA aşılarının tasarımı ve üretimi antijen dizisinin tespit edildiği andan itibaren çok kısa süre içinde mümkündür. Hızlı ve düşük maliyet ile büyük ölçekte üretim kapasitesine sahip olması m-RNA aşılarının en büyük avantajıdır. mRNA aşılarının bu avantajları dünya çapında en çok uygulanan ilk SARS-CoV-2 mRNA aşısının geliştirilmesini sağlamıştır. Ancak nadir görülen orta veya şiddetli reaksiyon vakalarına ilişkin raporlar, ayrıca otoimmün hastalık oluşturma riski güvenlik ve immünojenisite ile ilgili endişeler yaratmaktadır. Ayrıca m-RNA aşılarının büyük çapta kullanımı COVID-19 salgını ile başladığı için uzun vadede yan etkileri henüz bilinmemektedir (Pepini vd., 2017; Wang vd., 2020).

1.5. Aşı Adjuvanları

Adjuvanlar aşı antijenlerine karşı oluşan bağışıklık sistemi tarafından kolayca tanınan ve aşı formülasyonuna eklenme amacı bağışıklık sistemi yanıtını arttırmak, daha hızlı ve uzun süreli bağışık yanıt alınmasını sağlamak olan antijen dışındaki doğal veya sentetik maddelerdir (Bozkır ve Ayçiçek, 2022; Gupta ve Siber, 1995).

Adjuvan kelimesi Latince yardım etmek, arttırmak, çoğaltmak anlamına gelen ‘adjuvare’ terimine dayanmaktadır. 1920’li yıllarda difteri antitoksini üretmek için atlar üzerinde çalışılırken uygulama yerinde apse oluşan atlarda daha fazla yanıt olduğu görülmüş ve sonraki çalışmalarda antijenle birlikte agar, nişasta yağı, ekmek kırıntısı gibi maddeler enjekte edilmiştir. Bu şekilde ‘adjuvant’ terimi ilk kez ortaya çıkmıştır (Yurdakök ve İnce, 2008).

1925 yılında ‘adjuvant’ teriminin tanımlanmasının ardından difteri toksoidi alüminyum içine adsorbe edilerek alüminyum tuzlarının adjuvan etkisi gösterilmiştir. Alüminyum bileşikleri (alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat tuzları) hala en sık kullanılan aşı adjuvanlarıdır (Rock vd., 2005).

Alüminyum adjuvanlar, fagositozu kolaylaştırarak ve antijenlerin enjeksiyon bölgesinden difüzyonunu yavaşlatarak bağışıklık yanıtını artırır (HogenEsch, 2013). Alım SARS-CoV-2 S proteini ile kombinasyon halinde kullanıldığında nötralize edici antikor üretimini arttırmıştır, ancak T hücresi aktivasyonunu desteklememiştir (Coleman vd., 2014).

MF59 içerisinde skualen, Tween 80 ve sorbitol bileşenlerini bulunduran su içinde yağ emülsiyonudur ve halihazırda grip aşılarında kullanılmaktadır. MF59 enjeksiyon bölgesinde geçici bir bağışıklık ortamı yaratarak antijene özgü bağışıklık tepkilerini indüklemek için bağışıklık hücrelerini toplar (Tsai, 2013).

MF95, bir su içinde yağ emülsiyon adjuvanıdır ve MERS-CoV RBD bazlı alt birim aşılarda immünojenitesini arttırdığı, böylece güçlü IgG tepkilerini indüklediği ve fareleri viral enfeksiyona karşı koruduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, MF95'in SARS-CoV-2 alt birim aşıları için uygun bir adjuvan olabileceği düşünülmektedir (Zhang vd., 2016).

AS01, AS02, AS03 ve AS04 GlaxoSmithKline (GSK) tarafından geliştirilen bir dizi adjuvan sistemidir. AS01 bir lipozom adjuvanı, AS02 ve AS03 su içinde yağ emülsiyonudur. AS04 ise alüminyum adjuvandır ve bir insan papilloma virüsü aşısı ve hepatit B virüsü aşısında kullanılmıştır (Petrovsky, 2015). Bu adjuvan sistemlerinin inaktive edilmiş SARS-CoV aşısı çalışmalarında farelerde koruyucu etkinliği arttırdığı gözlenmiştir (Gupta ve Gupta, 2020).

1.5.1. Aşı Adjuvanlarının Sınıflandırılması

Adjuvanlar fizikokimyasal özelliklerine, kökenlerine ve etki mekanizmalarına göre farklı gruplarda değerlendirilebilirler. Etki mekanizmalarına bağlı olarak taşıyıcı sistemler ve immünoestimulanlar (bağışıklık güçlendirici maddeler) olarak ayrılabilir (Singh ve O'Hagan, 2002).

İmmün güçlendiriciler; TLR'ler gibi PRR'ler yoluyla doğuştan gelen bağışıklık sinyal yollarını hedefler. Genel olarak, PRR'lerin agonistleri tarafından aktivasyonu, APC aktivasyonunu indüklerler. Reseptör sinyali Th1 ve Th2 aracılı immün yanıtlarının oluşmasını sağlar. Böylece sitokinler üretilerek bağışıklık hücrelerinin enjeksiyon bölgesine göç etmesi sağlanır (Reed vd., 2013). Saponinler (QS-21), Monofosforil lipid A (MPL), oligodeoksinükleotitler (ODN), muramil dipeptid (MDP) immünoestimulan adjuvanlara örnek olarak verilebilir (Apostolico vd., 2016).

Taşıyıcı sistemler; antijenlerin ilişkilendirilebileceği taşıyıcılar olarak işlev görebilir. Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini enjeksiyon bölgesine toplayarak lokal proinflatuar yanıtlar oluştururlar (Goto ve Akama, 1982). Taşıyıcı sistemler mineral tuzlar, lipid partiküller ve mikro/nanopartiküller olarak üç temel gruba ayrılır.

Virüs benzeri partiküller (VLP), lipid partiküller, mikro/nanopartiküller, lipozomlar, alüminyum tuzları, immün sistemi uyaran bileşikler (ISCOMs) taşıyıcı sistem adjuvanlarına örnek verilebilir (Apostolico vd., 2016). Partiküler adjuvanlar veya antijen taşıyıcı sistemler diğer immünoestimulan adjuvanlara alternatif olarak kabul edilir (Çoban vd., 2022). Son yıllarda antijen taşıyıcı sistemler, rekombinant protein ekspresyon tekniklerinin seçiciliği ve etkinliği nedeniyle özellikle sıklıkla tercih edilen bir araştırma konusudur (Küçüktürkmen vd., 2022).

1.5.2. Adjuvanların Aşı Formülasyonlarına İlave Edilme Nedenleri

- 1) Antijenlerin immün sistem hücreleri tarafından alımını kolaylaştırmak
- 2) Uygun bağışık yanıtları sağlamak veya optimize etmek
- 3) Koruyucu bağışıklık için gerekli antijen miktarını azaltmak
- 4) Hücresel tipte bağışık yanıtları uyarmak
- 5) Aşıların farklı uygulama yollarıyla verilişini sağlamak
- 6) Rekombinant antijenlerin veya saflaştırma işlemi yüksek derecede yapılmış antijenlerin immünojenisitesini arttırmak
- 7) Aşıların özel popülasyonlarda etkinliğini arttırmak (Rock vd., 2005; Yurdakök ve İnce, 2008).

1.5.3. İdeal Bir Adjuvanın Sahip Olması Gereken Özellikler

- 1) Etkili olduğu doz aralığında toksik olmamalı, kısa süreli ve uzun vadede yan etki oluşturmamalı
- 2) Biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olmalı
- 3) Tek başına antijene oranla humoral ve hücresele bağışık yanıtı arttırmalı, uzun süreli bağışıklık sağlamalı,
- 4) Düşük antijen konsantrasyonlarında dahi aşının etkinliğini korumalı,
- 5) Uzun raf ömrüne sahip olmalı, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında stabil olmalı,
- 6) Düşük maliyetli üretim sağlamalıdır (Aguilar ve Rodriguez, 2007; Marciani, 2003).

Aşılarda adjuvan kullanımının avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.1’de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Aşılarda adjuvan kullanımının avantaj ve dezavantajları (Edelman, 2000)

Avantajları	Dezavantajları
-İmmün yanıt oluşturmak için gereken antijen miktarını azaltırlar	-Lokal akut veya kronik enflamasyon oluşabilir
-Peptitlerin antijenik özelliğini arttırırlar	-Uygulama yerinde yara, kalıcı nodül, veya ağrılı apse oluşabilir
-Güçlü antijenlere karşı oluşan bağışık yanıtın hızı, etkinliği ve sürekliliğini geliştirirler	-Grip benzeri ateşli hastalık durumu olabilir
-Antikorun antijene spesifikliğini ayarlayarak immün yanıtı arttırırlar	-Doku ve organlar üzerinde kimyasal toksik etkiler görülebilir
-Sitotoksik T hücre yanıtını geliştirerek hücresele bağışıklığı uyarırlar	-Ig E tipi aşırı duyarlılık veya anafilaksi gelişebilir
-Kombine aşılardaki olası antijen yarışını önlerler	-Otoimmün mekanizmaların uyarılmasına neden olabilir

1.6. Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemler

Taşıyıcı sistemler antijen ve adjuvan yüklerini korumak ve iletmek için tasarlanabilmeleri ve gelişmiş bağışıklık tepkisi ile daha etkili aşılamalara katkıda bulunabildikleri için ilaç ve aşı formülasyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Shin vd., 2020). Nanoteknolojideki gelişmeler aşı tasarımında büyük bir potansiyel sağlamaktadır ve yeni aday aşı formülasyonlarının çok daha hızlı geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Lurie vd., 2020). Nanopartiküler yapıda antiviral araştırmalarda araştırılan birçok virüs, koronavirüs ailesindendir veya SARS-CoV-2 ile benzer bir yapıyı paylaşır. COVID-19 aşılarını nanoteknolojik yöntemlerle geliştirmenin potansiyel hedefleri viral enfeksiyonun reseptör bağlanmasını ve hücre girişini bloke etmek, viral replikasyonu ve proliferasyonu bloke etmek, virüsü doğrudan etkisiz hale getirmek, uzun süreli bağışıklamada aşı malzemelerinin stabilitesini arttırmak, antijenin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini geliştirmek ve adjuvanlarla birlikte verilerek bağışıklık tepkisini geliştirmektir (Medhi vd., 2020; van Riel ve de Wit, 2020).

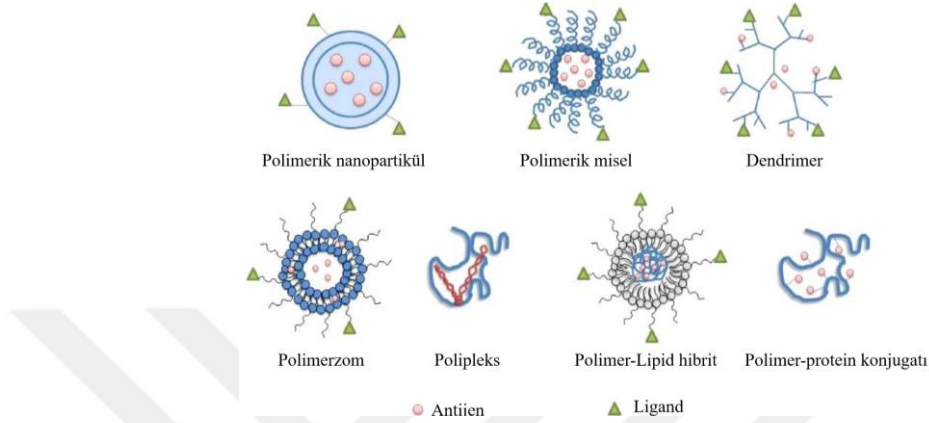
Nanopartiküller boyutları 1-1000 nm arasında değişen, üretimi büyük ölçüde seçilen malzemelere (polimer, protein, lipid, metal ve hücresel veziküller), antijen yüküne (peptit, protein, RNA, DNA veya tüm virüs), fiziko kimyasal özelliklerine, yapılarına ve boyutlarına bağlı olan katı kolloidal partiküllerdir (Li vd., 2020; Youssef vd., 2019).

Nanopartiküler aşı formülasyonları ile antijenlerin makrofajlar gibi istenmeyen hedeflerden ve proteolitik bozunmadan korunması, tek başına moleküler aşılarda uygulanmasına göre en büyük avantajdır. Ayrıca boyut, şekil, çözünürlük, hidrofiliklik, hidrofobiklik ve yüzey modifikasyonu gibi istenen fizyokimyasal özelliklere sahip nanopartiküllerin hazırlanması aşı taşıyıcı sistemlerin formülasyonunda büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Ayrıca nanopartiküler aşılarda liyofilize edilebildiği için soğuk zincir uygulamasına gerek kalmayabilir (Chung vd., 2021; Diaz-Arévalo ve Zeng, 2020).

Nanopartiküler aşılarda fagositik APC'ler tarafından antijen alımını arttırırlar, kontrollü ve/veya sürekli salım ile antijen salımını sağlayabilirler. Bu sayede yüksek antikor üretimi uzun süreli bağışıklık sağlanabilir (Zhu vd., 2014).

NP'ler kullanılan malzemeye göre organik ve inorganik nanopartiküller olarak ikiye ayrılır. Organik NP'ler lipozomlar, polimerik nanopartiküller, miseller, dendrimerler;

inorganik NP'ler metalik, silika, manyetik nanopartiküller, karbon nano tüpler ve kuantum noktalarıdır (Oravczová vd., 2021). Organik nanopartiküller şematik olarak Şekil 1.6'da gösterilmiştir. Ayrıca Çizelge 1.2'de COVID-19 için geliştirilen farklı nanopartiküler formülasyonların avantajları ve dezavantajları gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Organik nanopartiküllerin şematik olarak gösterimi (Prabhu vd., 2015)

Çizelge 1.2. COVID-19 için geliştirilen farklı nanopartiküler formülasyonların avantajları ve dezavantajları (Yang, 2021)

Nanopartikül Tipi	Avantajlar	Dezavantajlar
Polimer Nanopartiküller	-Yüksek stabilite -İlaç salınımının kontrolü ve kalıcılığı -Kimyasal ve fiziksel özelliklerin ayarlanabilirliği -Hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar için uygunluk	-Zor ölçeklenebilirlik -Yetersiz toksikolojik değerlendirme
Lipozomlar	-Azaltılmış toksisite -Seçici hedef özgüllüğü -Patojenlere karşı ilaç aktivitesinin artırılması -Geliştirilmiş farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler	-Sterilizasyon zorluğu -Kararsızlık nedeniyle kısa raf ömrü -Kan dolaşımından uzaklaştırılma oranı
Dendrimerler	-Yüksek hücre penetrasyonu -Yüksek yapısal homojenlik -Yüksek karışabilirlik ve çözünürlük -Kontrol edilebilir sentez ve degradasyon	-Yüksek üretim maliyeti -Temel araştırmalarda klinik uygulamanın zorluğu -Kalite yönetiminin iyileştirilmesi ihtiyacı
Altın Nanopartiküller	-Yüksek biyouyumluluk -Kontrol edilebilir partikül boyutu -Çeşitli biyoaktif ajanların sentezi ve konjugasyonu kolaylığı	-Nanopartikül agregasyonu -Biyolojik bozunma zorluğu -Büyük ölçekli üretimin yüksek maliyeti
Virüs Benzeri Partiküller	-Disülfid bağları ile stabilizasyon -Hüresiz protein sentezi ile üretilme -Küçük molekül, nükleik asit ve protein yükleme kapasitesi -Spesifik hücre hedeflemesi için antikor fragman gösteriminin işlevselleştirilmesi	-Düşük stabilite -Fagositik kaçınma -Kan damarından ekstrasvazasyon

1.7. Polimerik Nanopartiküller

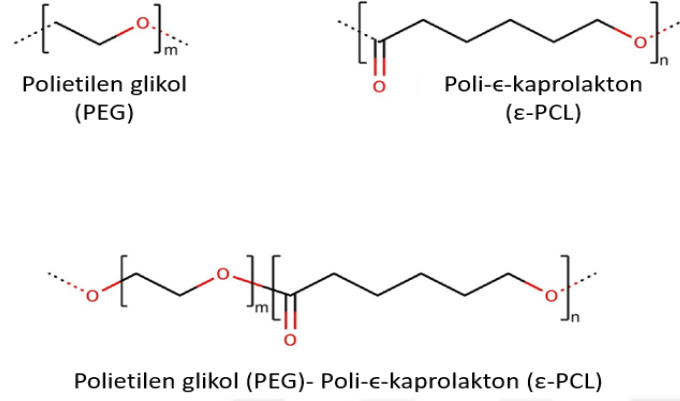
Polimerik NP'ler, terapötik maddenin polimer matris üzerinde çözündüğü, hapsedildiği, kapsüllendiği veya adsorbe edildiği katı koloidal sistemlerdir. NP'lerin yapısı hazırlanış yöntemlerine bağlı olarak, polimerik nanoküreler (ilacın partiküller etrafında dağıldığı matris sistemleri) ve nanokapsüller (ilacın tek bir polimerik zarla çevrelenmiş sulu veya yağlı bir boşlukla tutulduğu veziküler rezervuar sistemleri) elde edilebilir (Letchford ve Burt, 2007; Parveen ve Sahoo, 2008).

Polimerik NP'ler, biyouyumluluk ve biyoparçalanabilirlik, arttırılmış geçirgenlik, kararlılık, düşük toksisite, arttırılmış biyoyararlanım, hedefleme, kontrollü ve sürekli salım olanağı dahil olmak üzere avantajlı özellikleri nedeniyle bulaşıcı ve enflamatuvar hastalıkların teşhis, takip, tedavisinde ve koruyucu olarak umut verici ve yenilikçi adaylar olarak ortaya çıkmıştır (Muthu vd., 2014).

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polilaktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL), kitosan, polietilenimin (PEI) ve PLGA–polietilen glikol (PEG) gibi polimerler geçmişte diğer koronavirüslere (SARS-CoV, MERS-CoV veya hCoV) karşı nanopartiküler aşı hazırlamak için yaygın olarak kullanılmıştır (Medhi vd., 2020).

Tez kapsamında Polietilen glikol (PEG)- Poli-ε-kaprolakton (ε-PCL) kopolimeri polimerik nanopartikül sisteminde kullanılmıştır.

1.7.1 Polietilen glikol (PEG)- Poli-ε-kaprolakton (ε-PCL) Polimerik Nanopartikülleri



Şekil 1.7. PEG, PCL ve PEG-PCL kopolimerinin kimyasal yapısı (Grossen vd., 2017)

Poli-ε-kaprolakton (ε-PCL) ε-kaprolaktonun bir katalizör varlığında halka açma polimerizasyon reaksiyonuyla hazırlanan yarı kristalli bir polyesterdir (Şekil 1.7) (Sinha vd., 2004). Biyolojik olarak geçimli bir polimer olan PCL, yüksek molekül ağırlığına sahip, hidrofobik ve kısmen kristal yapıda ve yavaş parçalan bir polimerdir. PCL'un erime sıcaklığı 58°C – 63°C ve camsı geçiş sıcaklığı ise -65°C ile -60°C arasındadır. Asetonda, kloroformda, etil asetatda, diklorometanda, tetrahidrofuranda, dimetil formamide ve hegzafloizopropanolde çözünebilmektedir ("Handbook of Pharmaceutical Excipients," 2009). PCL'nin en önemli özelliklerinden biri ise çözünme sırasında yüklü protein/peptitin antijenitesini olumsuz yönde etkileyebilecek asidik bir ortam oluşturmamasıdır (Sinha vd., 2004). PCL nanopartiküllerinin en önemli dezavantajı ise hidrofobik yüzeyi nedeniyle hücrelere adhezyonun düşük olmasıdır (Dobrzański vd., 2015).

PEGilasyon hücre içine adhezyona yardımcı olan en önemli faktörlerden biridir. Nanopartiküllerin yüzey yükleri hücrelerle etkileşimi ve adhezyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Hücre yüzeyi negatif yüklü olduğu için pozitif yüklü nanopartiküller hücre ile daha fazla etkileşime girerek hücre içine daha iyi alınır. PEGilasyon ile negatif yüklü nanopartiküller nötre yakın veya pozitif yüklü hale getirilebilmektedir (Danhier vd., 2012).

Polietilen glikol (PEG) biyoyumlu, sulu ve organik ortamlarda çözünen, toksik olmayan ve vücuttan kolay atılabilen FDA onaylı doğrusal veya dallı yapıda bir polieter dioldür (Harris vd., 2001). PEGilasyon ile proteine bağlanan PEG polimeri, her bir etilen glikol alt birimi için iki veya üç su molekülü ile birleşir ve bu özellik konjuge proteini

enzimatik bozunmadan, immünojenik ve antijenik reaksiyonlardan koruyan, renal klirensi önemli ölçüde azaltan hidrofilik kalkan oluşturur. Bu sayede peptit veya proteinlerin farmakokinetik ve farmakodinamik yapısını geliştirmeye katkıda bulunmuş olur (Milla vd., 2012).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-merkapto etanol	Sigma, Almanya
Akrilamid	Sigma, Almanya
Amonyum persülfat	Sigma, Almanya
Amonyum sülfat	Merck
Asetik asit	Sigma Aldrich
Bikinkoninik asit (BCA)	Thermo Scientific, ABD
Bromfenol mavisi	Merck
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma, Almanya
Etanol 96°	Carlo Elba, İtalya
Gliserol	Aklar Kimya
Glisin	Sigma, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma, Almanya
Karboksimetil selüloz	Sigma, Almanya
Kloroform	Sigma Aldrich
Marker	Biolegend, ABD
N,N'-Metilen-Bis-Akrilamid	Sigma, Almanya
N,N,N',N'- Tetrametiletildiamin	Sigma Aldrich
Örnek tamponu	Sigma Aldrich
Polivinil alkol (PVA) MW:13000-23000	Sigma, Almanya
Polivinil alkol (PVA) (4-88)	Fluka
Polivinil alkol (PVA) MW: 72000	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma Aldrich
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Trehaloz	Sigma, Almanya
Tris bazı	Sigma, Almanya

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Cam malzeme	İldam, Türkiye
Çalkalayıcı su banyosu	Jeio Tech, Kore
Derin dondurucu	Heto, Almanya
DSC cihazı	TA DSC Q2000, Çin
Elektrikli terazi	Mettler Toledo, Almanya
Etüv	Heraeus T 5042, Almanya
Filtre	İsolab, Türkiye
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC, Kanada
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Mikroplak okuyucu	Molecular Devices, Spectra Max 190, İngiltere
Mikroplak (96 kuyucuklu)	Greiner Bio-One, Almanya
Parafilm	Bemis Packaging, ABD
Partikül büyüklüğü analizi cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere
Plastik enjektör	Set inject, Türkiye
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Santrifüj	Sigma 2-16 P, Almanya
Santrifüj tüpleri	Sigma, Almanya
Sonikatör	Bandelin Sonoplus
Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Tecnai G2, Japonya
Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30, Almanya
Vorteks cihazı	Heidolph Reax Top, Almanya
Zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere

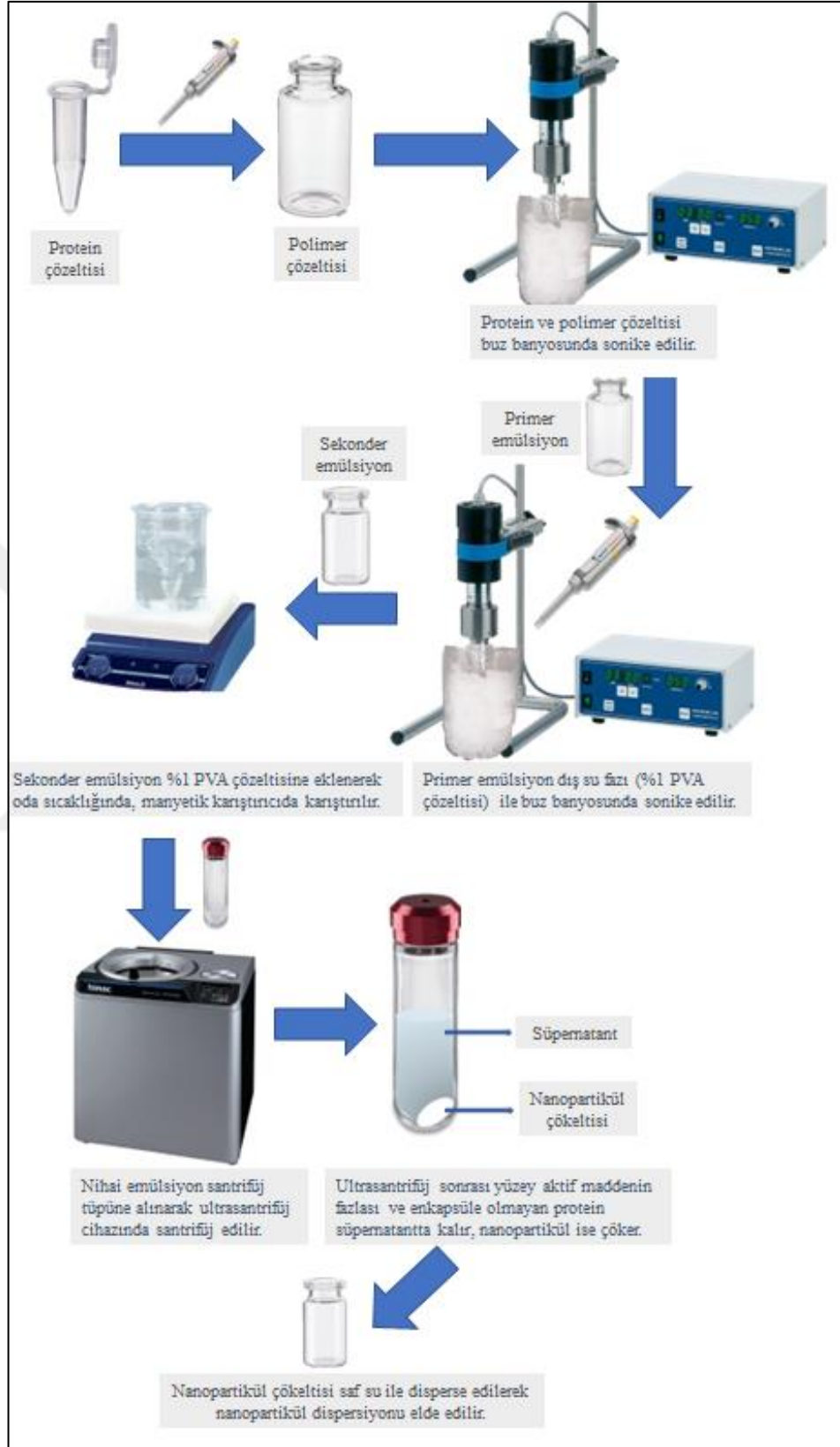
2.2. Yöntemler

2.2.1. Polimerik Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları

Tez kapsamında polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en sık tercih edilen yöntem olan çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmış olup su/yağ/su

(S/Y/S) tipi emülsiyon oluşturularak hazırlanmıştır. Yöntem sulu etkin madde fazının organik polimer çözeltisine eklenip sonikasyon ile karıştırılarak s/y emülsiyonunun oluşturulması, oluşan s/y emülsiyonunun ikinci bir su fazına ilave edilerek karıştırılmaya devam edilmesi, s/y/s çoklu emülsiyonunun elde edilmesi ve oluşan çoklu emülsiyondan organik çözücünün buharlaştırılması esasına dayanır. Organik çözücü tamamen buharlaştırıldıktan sonra polimerler santrifüj ile çöktürülür ve nanopartiküller izole edilir (Çomoğlu, 2010). Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemi Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.

Ön Formülasyon çalışmalarında model protein olarak bovin serum albümin (BSA) kullanılmış olup çalışmalarda sonikasyon süresi, sonikasyon gücü, iç/dış faz oranları, etkin madde ve polimer miktarları değiştirilerek farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Enkapsülasyon etkinlikleri, partikül boyutu ve PDI değeri açısından kıyaslanarak ideal formülasyona ulaşmak hedeflenmiştir. Formülasyon parametreleri Çizelge 2.1’de verilmektedir.



Şekil 2.1. Nanopartiküllerin üretim yöntemine ilişkin akış şeması

Çizelge 2.1. BSA içeren polimerik nanopartikül formülasyonlarının bileşimi

Kod	BSA (ug)	PEG-PCL (mg)	İç Faz PVA (%)	İç Faz PVA (ml)	Dış Faz PVA (%)	Dış Faz PVA (ml)	S1 süre (sn)	S2 süre (sn)	S. Güç (%)	K. süre (sa.)
F1	25	20	1	2,5	1	5	30	120	30	2
F2	25	20	1	2,5	1	5	15	120	30	2
F3	25	20	1	2,5	1	5	60	120	30	2
F4	25	20	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F5	25	20	1	2,5	1	5	30	60	30	2
F6	25	20	1	2,5	1	5	30	30	30	2
F7	25	20	1	2,5	1	5	30	15	30	2
F8	25	20	1	2,5	1	5	30	90	20	2
F9	25	20	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F10	25	20	1	2,5	1	5	30	90	40	2
F11	25	10	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F12	25	30	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F13	25	40	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F14	25	20	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F15	12,5	40	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F16	25	40	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F17	50	40	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F18	100	40	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F19	100	40	1	2,5	1	5	30	90	30	2
F20	100	40	1	2,5	1	7,5	30	90	30	2
F21	100	40	1	2,5	1	12,5	30	90	30	2
F22	100	40	1	2,5	1	17,5	30	90	30	2

2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum formülasyon parametreleri kullanılarak RBD yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. 200 µl RBD tamponu (100 µg RBD'nin PBS tampon içindeki çözeltisi), 20 mg PEG-PCL polimerinin kloroform içindeki çözeltisine eklenip %30 sonikasyon gücü ile buz banyosu içerisinde sonikatörde 30 saniye karıştırılarak s/y emülsiyonu hazırlanmıştır. Oluşan s/y emülsiyonu %1 (a/h) konsantrasyonda, 2,5 ml hacimde yüzey aktif maddenin (PVA) sulu çözeltisine ilave edilerek %30 sonikasyon gücü ile buz banyosu içerisinde sonikatörde 90 saniye karıştırılarak s/y/s çoklu emülsiyonu elde edilmiştir. Ardından ikincil emülsiyon 5 ml hacimde %1 PVA çözeltisine ilave edilerek, oluşan çoklu emülsiyondan organik çözücünün buharlaştırılması amacıyla oda sıcaklığında (25°C) manyetik karıştırıcıda 3 saat karıştırılmıştır. Ardından nanopartiküller santrifüj cihazında 5°C'de, 35000 rpm'de, 1 saat santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Nanopartikül çökeltisi steril su ile disperse edilerek +4°C'de saklamıştır. Oluşan süpernatant ise karakterizasyon çalışmalarında enkapsülasyon etkinliği belirlemede kullanılmıştır.

2.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Ölçümü

Hazırlanmış olan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımını belirlemek için dinamik ışık saçılımı yöntemi (Malvern Zetasizer NanoZS) kullanılmıştır. 2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan nanopartikül dispersiyonu ultra saf su ile seyreltilmiş, ardından Malvern Mastersizer ZS cihazı kullanılarak 3 seri halinde ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.2. Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan polimerik nanopartiküllerin yüzey yüklerini tespit etmek için zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. 2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan nanopartikül dispersiyonu ultra saf su ile seyreltilmiş,

ardından Malvern Mastersizer ZS cihazı kullanılarak 3 seri halinde ölçüm gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.3. Yükleme Etkinliğinin Tayini

RBD antijeninin nanopartiküllere yükleme etkinliğinin belirlenmesi amacıyla dolaylı (indirekt) yöntem kullanılmıştır. 2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması bölümünde belirtildiği gibi santrifüj sonrası süpernatanda yüklenmeden kalan antijen miktarı üzerinden hesaplama yapılmıştır. Yükleme etkinliği ‘mikro bikinkoninik asit (mikro- BCA) tekniği’ kullanılarak yapılmıştır.

Bikininik asit yöntemi, peptit ve protein yapısındaki maddelerin miktar tayininin yapılmasında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Çok düşük miktarlardaki peptit ve proteinlerin tayininde ise çok daha hassas bir yöntem olan mikrobikininik asit yöntemi tercih edilmektedir. BCA yöntemi ile 100-1200 µg/ml’ye kadar hassaslıkta ölçüm yapılırken, mikroBCA yöntemi ile 0,5-250 µg/ml’ye kadar hassaslıkta ölçüm yapılabilmektedir (Smith vd., 1985; Walker, 2009).

Yükleme etkinliğinin belirlenebilmesi için model protein olarak kullanılan BSA ve RBD proteinin mikroBCA yöntemi ile kalibrasyonu yapılmıştır. Bunun için stok protein çözeltisinden 0,5-50 µg/ml arasında belirlenen sekiz farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden, mikropalakada bulunan kuyucuklara üç paralel şekilde 100’er µl ekilmiştir. Ayrıca Bölüm 2.2.2’de bahsedildiği şekilde süpernatanda yüklenmeden kalan antijen miktarını tespit etmek için süpernatantlar da aynı şekilde üç paralel şekilde 100’er µl ekilmiştir. Ardından analiz protokolü gereğince Reajan A ile Reajan B 50:1 oranında karıştırılmış ve her bir kuyucuğa bu karışımdan da 100’er µl eklenmiştir. Mikropalaka 60°C’deki etüvde buharlaşmayı önlemek amacıyla alüminyum folyoya sarılı şekilde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından mikropalaka oda sıcaklığında 15 dk soğutulularak mikropalaka okuyucusunda 562 nm’de absorbans ölçülmüştür. Antijen konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara denk gelen absorbans değerleri kullanılarak standart doğru denklemi oluşturulmuştur. Süpernatantlara ait absorbans bu denklemde yerine konarak nanopartiküllere yüklenmeden kalan antijen miktarı bulunmuştur. Bu değer Eşitlik 2.1’de verilen formülde yerine koyularak yükleme etkinliği hesaplanmıştır (Smith vd., 1985; Walker, 2002).

Yükleme etkinliği aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 2.1) kullanılarak hesaplanmaktadır:

$$\text{Yükleme Etkinliği (\%)} = (A/B) \times 100 \quad (2.1)$$

A: Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (μg) – Süpernatanda bulunan antijen miktarı (μg)

B: Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (μg)

2.2.3.4. Geliştirilen Polimerik Nanopartikül Formülasyonunun Tekrarlanabilirliğinin Tayini

Hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonunun tekrarlanabilir olup olmadığını gözlemlemek için formülasyonda kullanılan maddeler ayrı ayrı hazırlanarak benzer koşullarda 3 adet üretim yapılmıştır. Nanopartiküllerin partikül büyüklükleri, partikül büyüklüğü dağılımları, zeta potansiyelleri ve yükleme etkinlikleri kıyaslanarak formülasyonun tekrarlanabilirliği gösterilmiştir.

2.2.3.5. Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonu Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. 2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan antijen yüklü ve boş nanopartikül dispersiyonları 1:100 oranında ultra saf su ile seyreltilmiş ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı (ODTÜ MERLAB) bünyesinde incelenmiştir. Örnekler 200 mesh bakır grid üzerine damlatılarak %2 uranil asetat çözeltisi ile 2 dakika boyanmış, ardından oda sıcaklığında kurutularak Geçirimli Elektron Mikroskopu ile görüntülenmiştir.

2.2.3.6. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi ile model protein olarak kullanılan BSA, PEG-PCL polimeri, boş polimerik nanopartikül ve BSA yüklü polimerik

nanopartikülün camsı geçiş sıcaklığı, faz geçiş sıcaklığı ve erime noktası gibi termal özellikleri incelenmiştir. DSC analizinde numuneler ısıtılırken soğurulan enerji miktarı ölçülmüş ve elde edilen termogramlar serbest ilaç varlığını/yokluğunu belirlemek için kullanılmıştır. Ölçümler ‘İLKO İlaç San. ve Tic. A.Ş.’ bünyesinde Q-2000 DSC (TA Instruments, ABD) cihazı ile yapılmıştır. 2-3 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pan içine yerleştirilerek sıkıştırılmış, ardından örnekler 5-300°C sıcaklık aralığında 5°C/dak doğrusal ısıtma hızında analiz edilmiştir. Boş pan kör olarak kullanılmıştır.

2.2.3.7. Kısa Süreli Fiziksel Stabilité Çalışmaları

Geliştirilen nanopartiküllerin saklama koşulunu belirlemek ve saklama sırasındaki kararlılığını gözlemek amacıyla kısa süreli stabilite çalışması yapılmıştır. Model protein olan BSA yüklü PEG-PCL nanopartikülleri, ultra saf su içerisinde disperse edildikten sonra 1 ay boyunca +4 °C ve -20°C 'de saklanmıştır. Ayrıca -20 °C'de dondurma işleminden korumak amacıyla formülasyona kriyoprotektan olarak ‘trehaloz’ eklenerek nanopartiküllerin stabilitesi gözlenmiştir. 0, 1, 15 ve 30. günlerde partikül dispersiyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür.

Ayrıca +4 °C ve -20°C 'de saklanan numuneler ve trehaloz eklenerek -20°C 'de saklanan numune 2. ayda alınarak partikül büyüklüğündeki ve yüzey yapısındaki değişim Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile 2.2.3.5. Morfolojik Değerlendirme bölümünde belirtildiği şekilde incelenmiştir.

2.2.3.8. İn-vitro Antijen Salım Çalışmaları

Polimerik nanopartiküllerin salım profilinin belirlenmesi amacıyla tüp yöntemi (sample and separate) kullanılmıştır (Maghsoudi vd., 2008). RBD proteini yüklü nanopartiküller 1,6 mL pH 7,4 PBS ile disperse edilmiştir. Dispersiyon 500'er µL olarak 3 ependorfa ayrılmış ve çalışma 3 tekrarlı yürütülmüştür. Salım numuneleri ısıtıcı yatay çalkalayıcıda 50 rpm'de, 37°C'de, salım için belirlenen süre boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında numune alınarak santrifüj cihazında 15.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek nanopartiküller çöktürülmüştür. Sink koşulu sağlamak amacıyla alınan süpernatant kadar yerine taze tampon ilave edilmiştir. Süpernatant salınan RBD'lerin miktar

taini için ayrılmıştır. Nanopartikülleri içeren çökeltiliye 500 µL pH 7,4 PBS eklenerek ultrasonik banyoda disperse edilmiş ve salıma devam edilmiştir. Bu işlem her salım noktasında uygulanmıştır. Süpernatandaki salınan RBD'lerin miktar tayini '2.2.3.3. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi' bölümünde belirtildiği gibi BCA analizi ile yapılmıştır.

2.2.3.9. Yapısal Bütünlük Kontrolleri (SDS-PAGE)

Antijenlerin partiküllere yüklendikten sonra ve in vitro antijen salımının ardından bozunmadan yapısal bütünlüğünü koruduklarını göstermek amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi yapılmıştır. SDS-PAGE yönteminde, ayrışmanın sadece molekül ağırlığına bağlı olmasını sağlamak amacıyla SDS tüm molekülleri negatif yükle kaplar.

SDS-PAGE için %10'luk poliakrilamid ayırma jeli hazırlanmış, ardından mandalla sıkıştırılmış iki adet cam arasına dökülmüş ve üzerine kuyucuklara uygulama tırağı yerleştirilmiştir (Şekil 2.2). Jelin donması için oda sıcaklığında 45 dakika bekletilmiş ve taraklar yavaşça çıkartılmıştır.



Şekil 2.2. SDS-PAGE aparatları

40 µl antijen çözeltisi üzerine 10 µl örnek tamponu ilave edilerek vorteks ile karıştırılmış ve proteinleri denatüre etmek amacıyla 95°C'de 5 dk bekletilmiştir. Ardından ilk kuyucuğa proteinin molekül ağırlığına yakın aralıkta marker ekilmiş ve diğer kuyucuklara 20 µl örnek uygulanmıştır. Örnek yüklenmesinden sonra 60 voltluk gerilim uygulanarak 2 saat boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Bantlar jelin alt sınırının 1 cm üzerine kadar sürüklendiğinde akım durdurularak elektroforez işlemi sonlandırılmıştır. Jel cam plakalar arasından çıkarılarak bantların jel üzerinde sabitlenmesi için içeriği Çizelge 2.2’de verilen fiksasyon çözeltisinde 1 saat, sensitizasyon çözeltisinde 2 saat boyunca çalkalandıktan sonra boyama çözeltisinde bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün boyanan bantların net görünmesi için jelin yüzeyindeki boyanın temizlenmesi amacıyla 1 saat destaining I çözeltisinde, ardından jelin yüzeyi temizlenene kadar yaklaşık 3 saat destaining II çözeltisinde çalkalanmıştır. Jelin görüntüsü alınarak saklanmak üzere %5 h/h’lık asetik asit çözeltisinde bekletilmiştir. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler Çizelge 2.2’de listelenmiştir.

Çizelge 2.2. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler

Ayrırma Jeli (%10’luk)	5 ml/10 ml
%30 Akrilamid Karışımı	1,7 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml
Distile su	1,9 ml
%10 a/h SDS	0,05 ml
%10 a/h Amonyum persülfat	0,05 ml
TEMED	0,082 ml
(TEMED ve %10 a/h amonyum persülfat polimerizasyonu başlattığı için en son ilave edilmelidir.)	
%30 Akrilamid Karışımı	100 ml için
Akrilamid	29 g
N,N’-metilenbisakrilamid	1 g
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	100 ml
Tris	18,2 g
Distile su y.m.	100 ml
(Konsantre HCl ile pH’sı 8,8’e ayarlanır.)	
%10 SDS	100 ml
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	10 g
Distile su y.m.	100 ml
(pH 7,2’ye ayarlanır.)	
%10’luk Amonyum persülfat	2 ml
Amonyum persülfat	0,2 g
Distile su y.m.	2 ml
Elektroforez tamponu	1000 ml
Tris	3 g
Glisin	14,4 g

Çizelge 2.3. devam. SDS-PAGE çalışmasında kullanılan çözeltiler

Fiksasyon çözeltisi	100 ml
Etanol	40 ml
Metanol	10 ml
Distile su	40 ml
Asetik asit	10 ml
SDS	1 g
Distile su y.m. (pH 8,3'e ayarlanır.)	1000 ml
Sensitizasyon çözeltisi	100 ml
Amonyum sülfat	10 g
Distile su	89 ml
Asetik asit	1 ml
Boyama çözeltisi	100 ml
Etanol	45 ml
Distile su	50 ml
CBBR-250	0,125 g
Asetik asit	5 ml
Destaining çözeltisi-I	100 ml
Etanol	40 ml
Distile su	55 ml
Asetik asit	5 ml
Destaining çözeltisi-II	100 ml
Etanol	67 ml
Distile su	30 ml
Asetik asit	3 ml

2.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamındaki hücre kültürü çalışmaları (hücre canlılığı, *in vitro* sitokin salımı) Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı üyesi Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.1. Hücre Canlılığı Analizi

Nanopartiküllerin sitotoksik etkisi, L929 fare fibroblast hücreleri ile MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi yapılarak değerlendirilmiştir. L929 fare fibroblast hücreleri, özellikle memeliler üzerinde polimerik materyallerin toksisitesinin

tain edilmesinde USP (Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi) için ABD tarafından önerilen bir hücre hattı ve analiz yöntemidir.

MTT analizi için L929 hücreleri 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılarak 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerle temas edecek şekilde belirli konsantrasyonlarda antijen yüklü nanopartiküller (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 2 mg/ml , 5 mg/ml , 10 mg/ml); aynı şekilde hazırlanan boş nanopartiküller; belirli konsantrasyonlarda saf antijen (50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$); belirli konsantrasyonlarda PEG-PCL polimeri (10 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$) kuyucuklara ekilerek 24 saat ila 72 saat arasında 37°C 'de nemli bir atmosferde inkübe edilmiştir.

Hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için 72 saat inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 10 mg/ml MTT solüsyonundan 10 μl eklenerek 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından canlı hücrelerin içerisinde oluşacak formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 μl DMSO aktarılmıştır. 30 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında tutulan mikrolakların her bir kuyucuğundaki optik yoğunluk değeri bu sürenin ardından 540 nm'de ELISA Reader'da okutulmuştur. Canlı hücrelerin sayısı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır;

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Antijen/formülasyon OD değeri}}{\text{Toplam antijen}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2.2})$$

2.2.4.2. Nitrik Oksit Tayini

Nitrik oksit (NO), virüslerde konak hücre savunmasında rol oynayan, vücutta sitokin üretimini uyararak makrofajlar aracılığıyla hücre içi patojenlerin yok edilmesine ve enfeksiyonlara karşı bağışıklık tepkinin artmasına yardımcı olan önemli bir moleküldür. Bu özellikleri nedeniyle NO, aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Antijen maruziyetinin ardından NO seviyelerinin artması, immün yanıtın oluştuğunun göstergesidir (Derman vd., 2015).

NO analizi, J774 fare makrofaj hücre hattı kullanılarak hücre canlılığı analizi sonrası belirlenen toksik olmayan konsantrasyondaki RBD antijeni ve antijen yüklü nanopartikül formülasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu mikrolaklar J774 makrofaj hücre

hatlarıyla kaplanarak belirlenen 2 mg/ml konsantrasyondaki örneklerden 50 µl alınarak kuyucuklara ekilmiştir. Mikroplaklar 37 °C'de 96 saat inkübe edilmiş, ardından kuyucuklardaki süpernatantlar yeni bir plakaya ekilmiştir. Analiz için hazırlanan standartlardan da 50'şer µl kuyucuklara ekilmiştir. Her bir kuyucuk üzerine 50 µl Griess reaktifi eklenmiştir. Mikroplaka 10 dk karanlıkta bekletildikten sonra 540 nm'de UV ölçümü yapılmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak her bir örnek için NO üretim miktarı hesaplanmıştır.



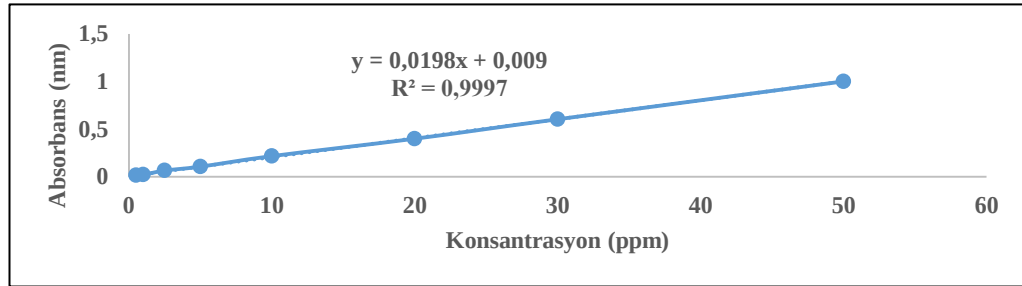
3. BULGULAR

3.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına Dair Bulgular

Ön Formülasyon çalışmalarında sırasıyla sonikasyon süresi, sonikasyon gücü, iç/dış faz oranları, etkin madde ve polimer miktarları değiştirilerek “2.2.1. Polimerik Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları” kısmında anlatıldığı şekilde farklı formülasyonlar hazırlanmıştır.

Değişen parametrelerle üretilen nanopartiküllere ilişkin Zetasizer NanoZS cihazı ile elde edilen partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli sonuçları; ayrıca yüzde yükleme etkinliği bulguları değerlendirilerek final formülasyona karar verilmiştir. Analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama±SS olarak verilmiştir.

Yüzde yükleme etkinliği “2.2.3.3. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi” bölümünde belirtilmiş yöntem doğrultusunda yapılmış olup formülasyonun dış fazı (%1 PVA) ile seyreltilen BSA ile yapılan kalibrasyona ait grafik ve denklem Şekil 3.1’de verilmiştir.



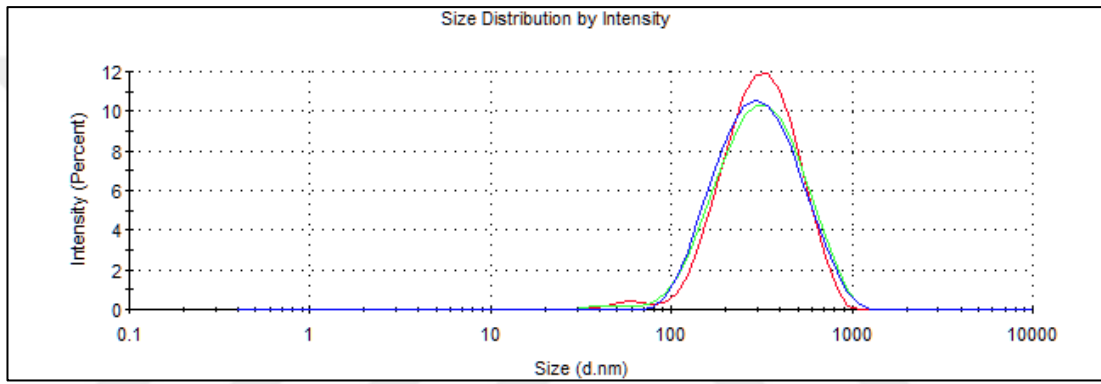
Şekil 3.1. %1 PVA ile hazırlanan BSA çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)

Sonikasyon süresi, partikül boyutunu ve dağılımını etkileyen en önemli formülasyon parametrelerinden biridir. Sonikasyon emülsiyon damlacıklarını parçaladığı için genel olarak sonikasyon süresinin artmasıyla parçacık boyutu ve dağılımının azalması beklenir (Topal vd., 2023). Sonikasyon süresinin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla primer emülsiyonu oluşturmak için yapılan 1.sonikasyon süresi 15, 30 ve 60 saniye olarak üç farklı sürede ayarlanarak formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.1’de verilmiştir. 30 sn sonikasyon partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon açısından değerlendirildiğinde en

iyi sonucu vermiştir. F1 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.2’de verilmiştir. Çalışmalara 1. sonikasyon 30 sn olarak devam edilmiştir.

Çizelge 3.1. Birinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi (n=3)

Formül No	Sonikasyon 1 (sn)	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)
F1	30	73,51±0,003	262,7±5,335	0,226±0,008
F2	15	76,58±0,001	378,1 ±0,008	0,272±0,007
F3	60	68,16±0,008	288,9 ±0,005	0,209±0,003

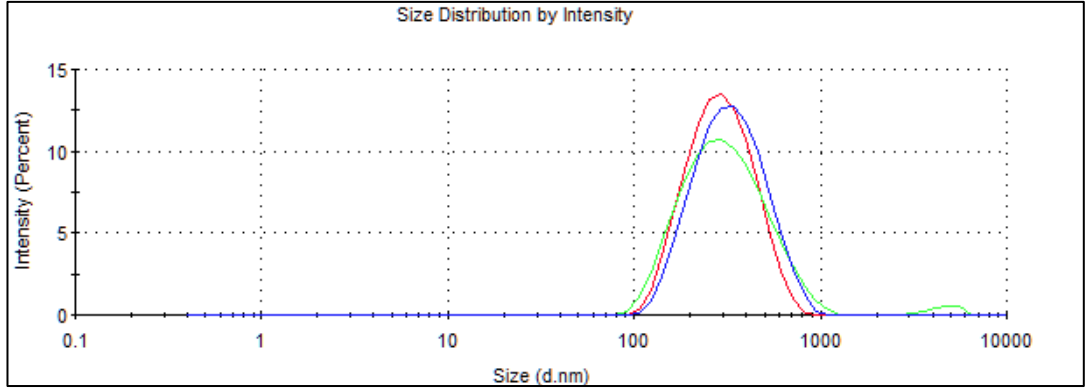


Şekil 3.2. F1 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik

Sonikasyon süresinin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla sekonder emülsiyonu oluşturmak için yapılan 2.sonikasyon süresi 15, 30, 60, 90 ve 120 saniye olarak beş farklı sürede formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.2’de verilmiştir. 90 sn sonikasyon partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. F4 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.3’te verilmiştir. Çalışmalara 2. sonikasyon 90 sn olarak devam edilmiştir.

Çizelge 3.2. İkinci sonikasyon süresinin partiküllere etkisi (n=3)

Formül No	Sonikasyon 2 (sn)	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)
F1	120	73,51±0,003	262,7±5,335	0,226±0,008
F4	90	94,23±0,009	265,8±2,926	0,247±0,012
F5	60	65,61±0,001	251,2±4,398	0,228±0,013
F6	30	71,95±0,001	271,5±7,559	0,247±0,013
F7	15	81,29±0,004	270,0±5,033	0,242±0,019

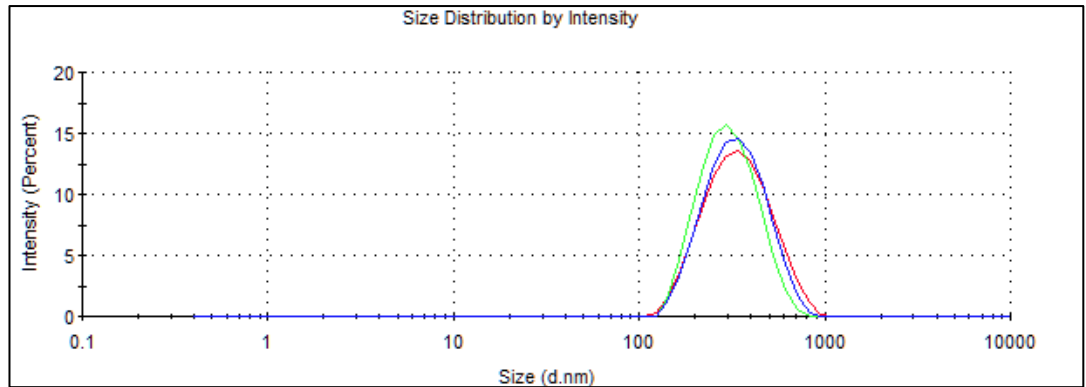


Şekil 3.3. F4 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik

Sonikasyon gücünün partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla primer ve sekonder emülsiyonu oluşturmak için uygulanan sonikasyon gücü yüzde 20, 30 ve 40 olarak üç farklı güçte sonikasyon yapılarak formülasyonlar hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.3'te verilmiştir. %30 sonikasyon gücü partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. F9 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.4'te verilmiştir. Çalışmalara sonikasyon gücü %30'a ayarlanarak devam edilmiştir.

Çizelge 3.3. Sonikasyon gücünün partiküllere etkisi (n=3)

Formül No	Sonikasyon gücü (%)	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)
F8	20	74,49±0,001	330,5±9,425	0,267±0,010
F9	30	85,35±0,004	285,6±9,265	0,193±0,008
F10	40	85,86±0,005	287,2±11,38	0,210±0,013

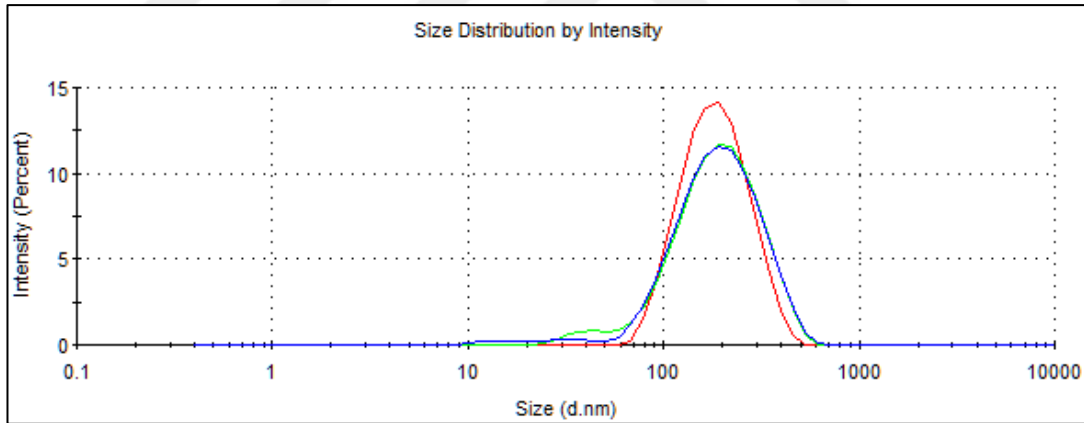


Şekil 3.4. F9 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik

Polimer miktarının partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla 10, 20, 30 ve 40 mg olarak dört farklı miktarda polimer (PEG-PCL) ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.4’de verilmiştir. 40 mg PEG-PCL partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. F13 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.5’te verilmiştir. Çalışmalara 40 mg PEG-PCL ile devam edilmiştir.

Çizelge 3.4. Polimer miktarının partiküllere etkisi (n=3)

Formül No	Polimer miktarı (mg)	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)
F11	10	60,37±0,004	247,6±5,518	0,183±0,019
F12	30	77,73±0,007	262,7±5,254	0,188±0,007
F13	40	92,12±0,001	276,9±3,143	0,174±0,003
F14	20	83,23±0,004	281,1±6,614	0,188±0,019

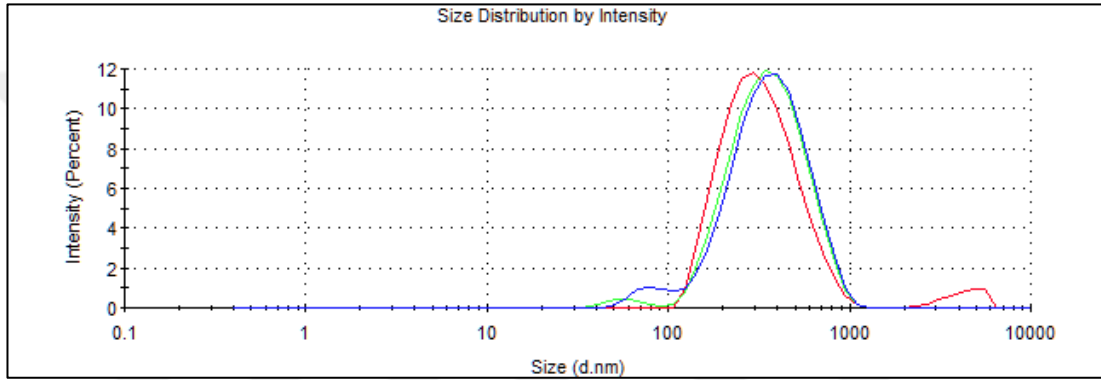


Şekil 3.5. F13 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik

Antijen miktarının partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla 12.5, 25, 50 ve 100 µg olarak dört farklı miktarda model protein BSA ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.5’de verilmiştir. 100 ug/200 ul BSA miktarı partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. F18 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.6’da verilmiştir. Çalışmalara 100 ug/200 ul BSA miktarı ile devam edilmiştir.

Çizelge 3.5. Antijen miktarının partiküllere etkisi (n=3)

Formül No	Antijen (BSA) miktarı (µg)	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)
F15	12,5	36,63±0,003	354,8±7,101	0,317±0,046
F16	25	64,57±0,005	274,8±4,215	0,186±0,011
F17	50	80,05±0,004	360,2±5,050	0,304±0,014
F18	100	83,06±0,004	297,5±1,015	0,227±0,010

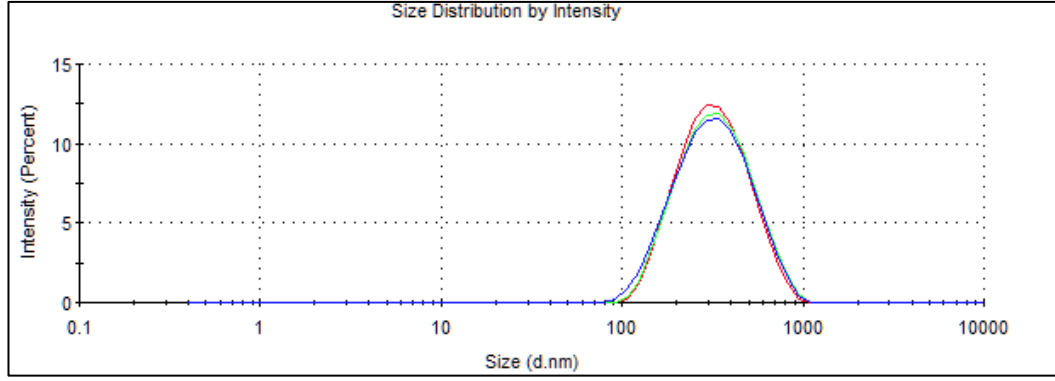


Şekil 3.6. F18 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik

Dış faz hacminin partiküllere etkisini gözlemlemek amacıyla nihai emülsiyon 5, 7.5, 12.5 ve 17.5 ml olarak dört farklı hacimde dış faz (%1 PVA) ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Çizelge 3.6’da verilmiştir. 5 ml dış faz hacmi partikül boyutu, PDI değeri ve enkapsülasyon açısından değerlendirildiğinde en iyi sonucu vermiştir. F19 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.7’de verilmiştir. Çalışmalara 5 ml dış faz hacmi ile devam edilmiştir.

Çizelge 3.6. Dış faz hacminin partiküllere etkisi (n=3)

Formül No	Dış faz hacmi (ml)	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)
F19	5	84,5±0,007	281,6±4,073	0,197±0,005
F20	7,5	81,02±0,005	300,4±1,002	0,236±0,009
F21	12,5	91,41±0,001	299,4±1,686	0,211±0,010
F22	17,5	95,89±0,002	310,0±2,650	0,232±0,007

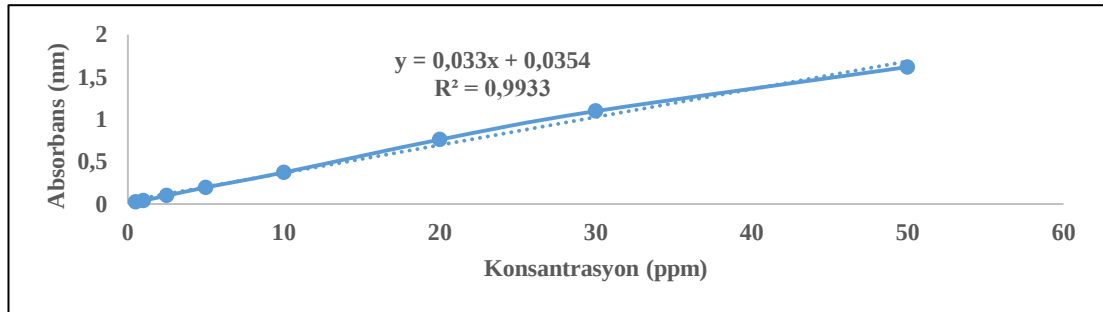


Şekil 3.7. F19 kodlu formülün partikül boyutu ve dağılımına ait grafik

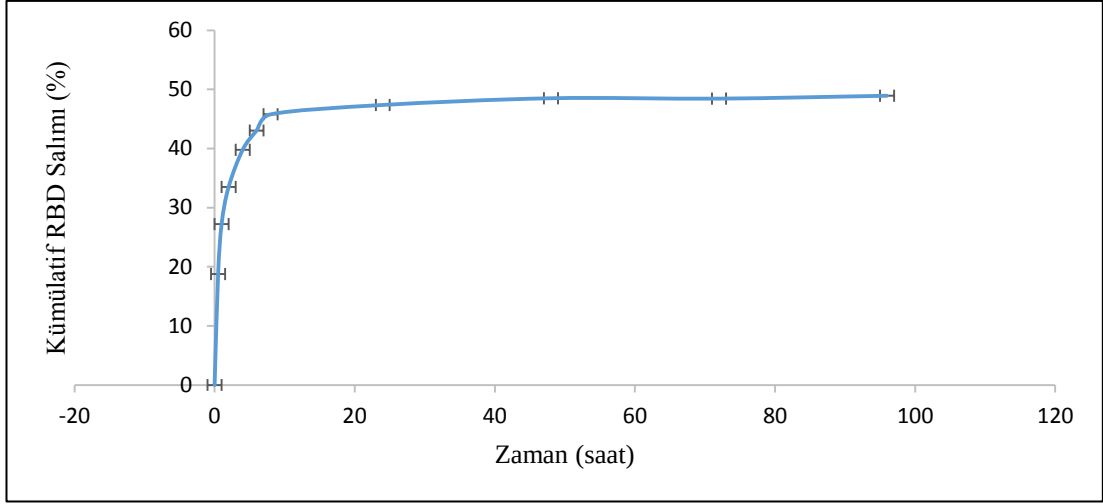
3.2. Model Protein (BSA) ile Yapılan Çalışmalara Dair Bulgular

3.2.1. İn-vitro Antijen Salım Bulguları

“2.2.3.9. İn-vitro Antijen Salım Çalışması” bölümünde belirtildiği gibi BSA yüklü nanopartiküllerin salım profilinin belirlenmesi amacıyla tüp yöntemi (sample and separate) kullanılarak analiz yapılmıştır. RBD yüklü nanopartiküller pH 7,4 PBS ortamında, 50 rpm’de, 37°C’de inkübe edilerek belirlenen zaman aralıklarında numuneler alınmıştır. Alınan örneklerdeki salınan BSA miktarı ‘mikro bikinkoninik asit (mikro- BCA) tekniği’ kullanılarak hesaplanmış olup salım ortamı (pH 7,4 PBS). ile seyreltilen BSA ile yapılan kalibrasyona ait grafik ve denklem Şekil 3.8’de verilmiştir. Salım sonuçlarına ait grafik ise Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.8. pH 7,4 PBS ile hazırlanan BSA çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)



Şekil 3.9. Model protein BSA ile üretilen nanopartikül formülasyonundan *in vitro* salım profili (n=3)

In vitro salım çalışmaları sonucunda BSA ile üretilen nanopartikül formülasyonlarının salım kinetikleriyle ilgili veriler Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. BSA yüklü nanopartikül *in vitro* salım kinetikleri

	0. derece	1.derece	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Weibull
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,329	0,386	0,535	0,779	0,352
n	0,268	0,004	3,409	0,154	0,003

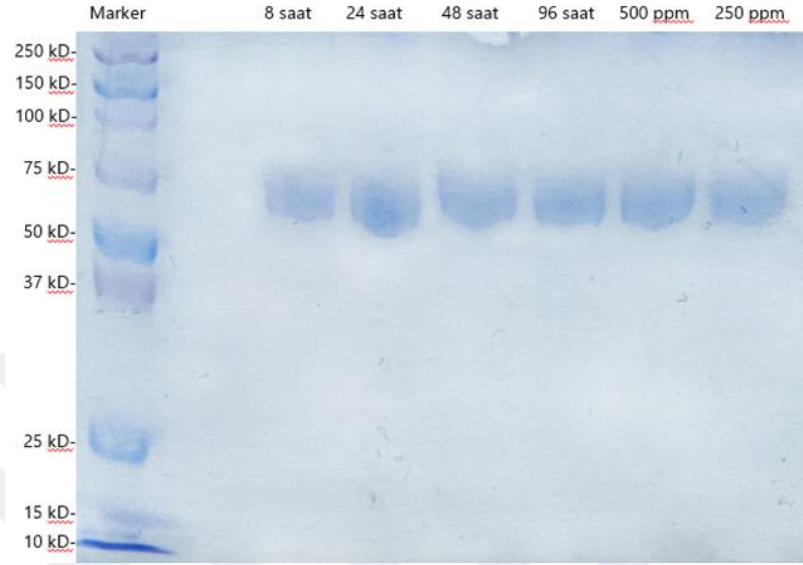
BSA yüklü nanopartiküllerden yapılan *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen verilerden hareketle yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda salımın Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

3.2.2. Yapısal Bütünlük Bulguları

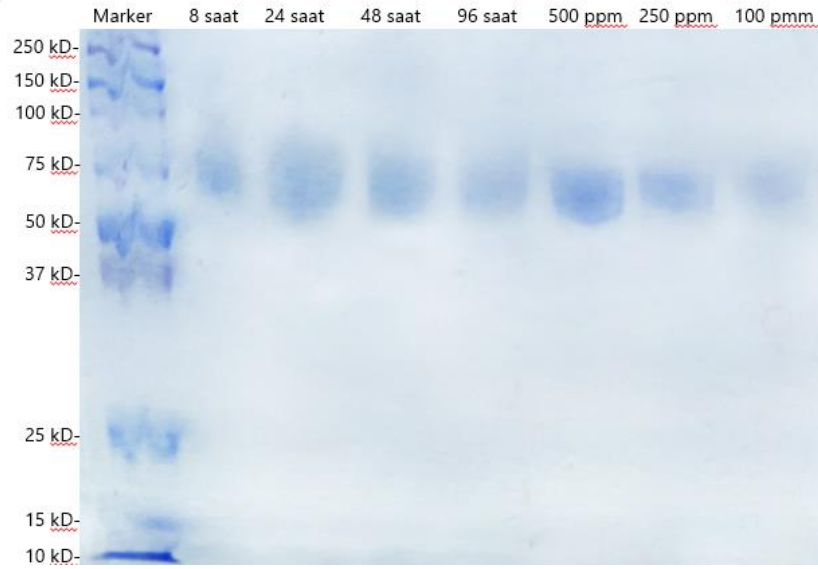
Üretim sürecinin antijenin yapısal bütünlüğü üzerindeki etkisini değerlendirmek ve *in vitro* salım ortamında tek başına antijenin ve nanopartiküllerden salınan antijenin zamanla bozulup bozulmadığını gözlemlemek amacıyla SDS-Poliakrilamid Jel elektroforez çalışması yapılmıştır. Model protein olan BSA’nın molekül ağırlığı 66.28 kDa’dur.

Şekil 3.10’da salım ortamında 8, 24, 48, 96 saat tutulan saf BSA numunelerine ait bantlar, kalibrasyon olarak kullanılan 500 ppm ve 250 ppm konsantrasyondaki BSA

numunelerine ait bantlar ile aynı hizada ve BSA molekül ağırlığına denk gelmektedir. Şekil 3.11’de 8, 24, 48 ve 96 saatlik *in vitro* salım çalışmalarında nanopartiküllerden salınan BSA numunelerine ait bantlar yine benzer hizada çıkmıştır.



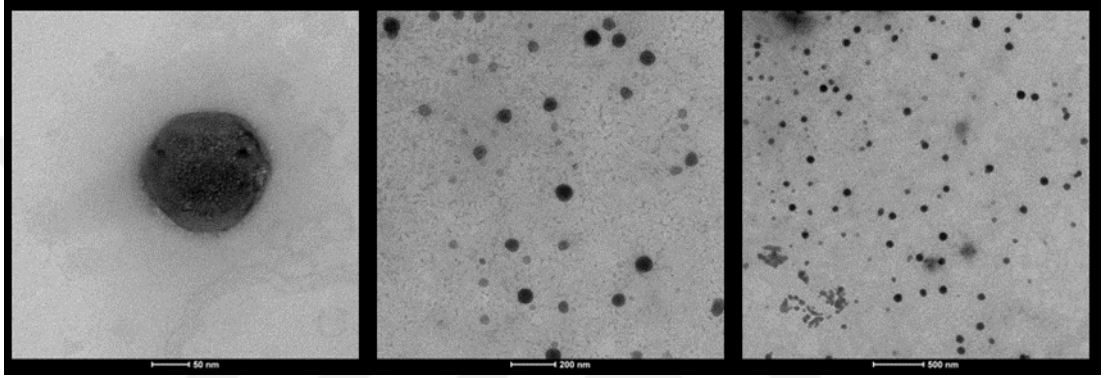
Şekil 3.10. Salım ortamında 8, 24, 48, 96 saat tutulan saf BSA numunelerine ait bantlar



Şekil 3.11. 8, 24, 48, 96 saat nanopartiküllerden salınan BSA numunelerine ait bantlar

3.2.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Bulguları

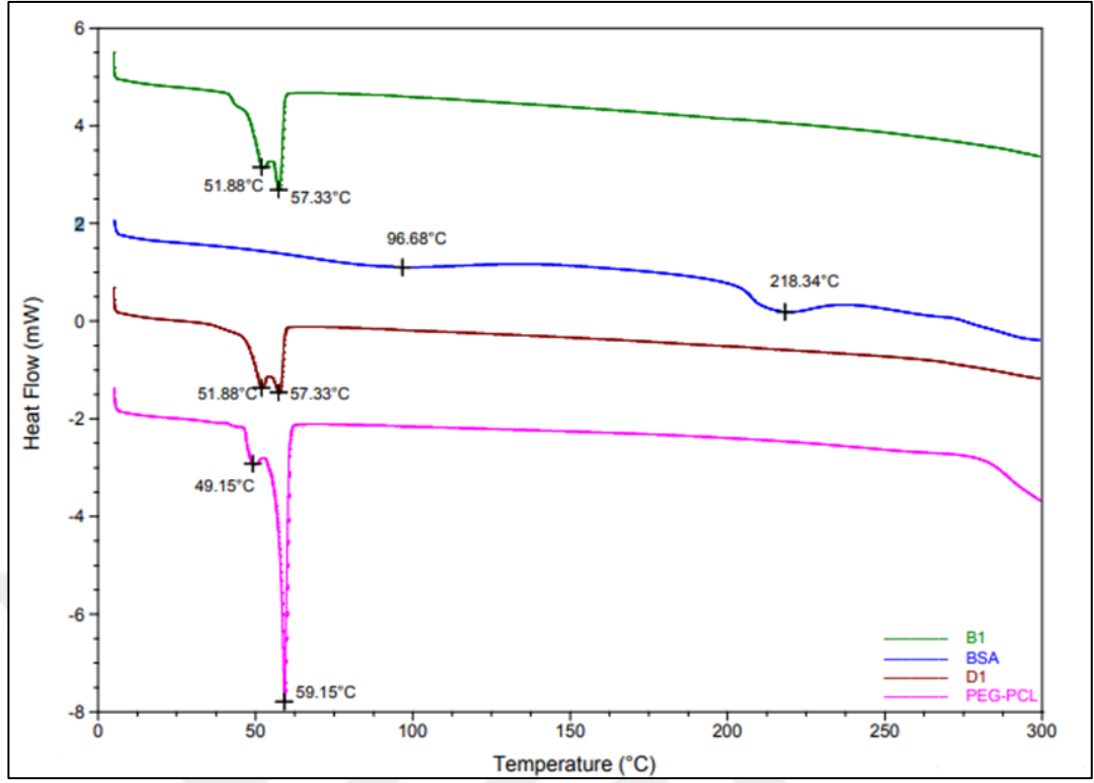
Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonu Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Şekil 3.12’de sunulan TEM görüntüsü incelendiğinde nanopartiküllerin küresel olduğu, monodispers bir şekilde dağıldığı ve agregasyon oluşmadığı görülmüştür. Ayrıca lazer ışık saçılımı yöntemiyle elde edilen bulgularla tutarlı olduğu görülmüştür.



Şekil 3.12. Hazırlanan nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.

3.2.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Bulguları

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi ile model protein olarak kullanılan BSA, PEG-PCL polimeri, boş polimerik nanopartikül ve BSA yüklü polimerik nanopartikülün termal özellikleri incelenmiştir. Şekil 3.13’te söz konusu örneklerle ait DSC termogramları verilmiştir. BSA’ya ait pikler 96,68 °C ve 218,34 °C’de ekzotermik pik oluşturmuştur. Şekil 3.13’te D1 in verdiği piklere bakıldığında nanopartikül sistemi içinde BSA’nın tepe noktasının kaybolduğu görülmüştür.



Şekil 3.13. DSC termogramları (B1: Boş polimerik nanopartikül, D1: BSA yüklü polimerik nanopartikül)

3.2.5. Kısa Süreli Fiziksel Stabilité Bulguları

Geliştirilen nanopartiküllerin saklama koşulunu belirlemek ve saklama sırasındaki kararlılığını gözlemlemek amacıyla BSA yüklü PEG-PCL nanopartikülleri için yapılan kısa süreli stabilité çalışmasına ait veriler Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da sunulmuştur.

Çizelge 3.8'de saf su ile disperse edildikten sonra 1 ay boyunca +4 °C'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.8. +4 °C’de saklanan BSA yüklü nanopartikül dispersiyonlarına ait kısa süreli stabilite verileri (n=3)

Parametre	Partikül Boyutu	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Başlangıç	191±1,51	0,148±0,014	-25,8± 0,321
1. gün	188,1±3,732	0,139±0,009	-21,5±5,02
15.gün	178,1±2,060	0,119±0,018	-17,8±0,346
30.gün	177,3±1,127	0,118±0,007	-13,2±0,265

Çizelge 3.9’da saf su ile disperse edildikten sonra 1 ay boyunca -20°C’de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.9. -20 °C’de saklanan BSA yüklü nanopartikül dispersiyonlarına ait kısa süreli stabilite verileri (n=3)

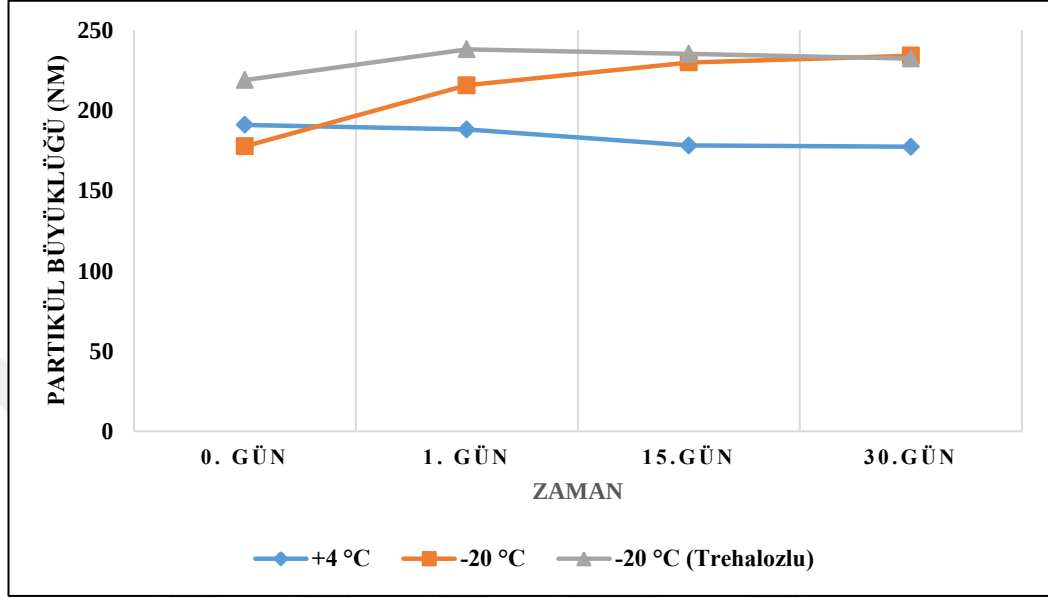
Parametre	Partikül Boyutu	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Başlangıç	177,6±0,5859	0,146±0,009	-23,4±0,866
1. gün	215,6±3,305	0,203±0,006	-13,4±0,231
15.gün	229,8±2,007	0,154±0,012	-13,0±0,451
30.gün	234,0±1,940	0,244±0,006	-14,5±0,551

Çizelge 3.10’da saf su ile disperse edildikten sonra dondurma işleminin proteine zarar vermesini önlemek amacıyla formülasyona kriyoprotektan olarak (%1) trihaloz eklenerek 1 ay boyunca -20°C’de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri verilmiştir.

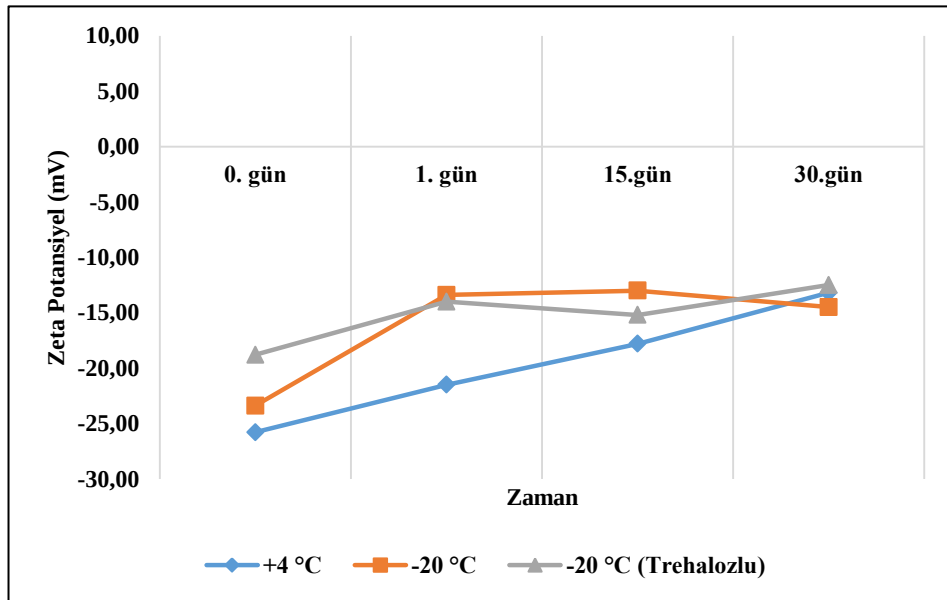
Çizelge 3.10. -20 °C’de saklanan ‘trehaloz’ ilave edilmiş BSA yüklü nanopartikül dispersiyonlarına ait kısa süreli stabilite verileri (n=3)

Parametre	Partikül Boyutu	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Başlangıç	218,9±2,761	0,163±0,021	-18,8±0,321
1. gün	238,0±5,372	0,189±0,014	-14,0±0,721
15.gün	235,2±1,124	0,252±0,006	-15,2±0,252
30.gün	232,2±3,219	0,148±0,005	-12,5±0,173

+4 °C ve -20°C 'de ve trehaloz eklenerek -20°C 'de saklanan numunelerin stabilite süresinde değişen partikül boyutu ve zeta potansiyel değerlerine ait karşılaştırmalı grafik Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'de sunulmuştur.

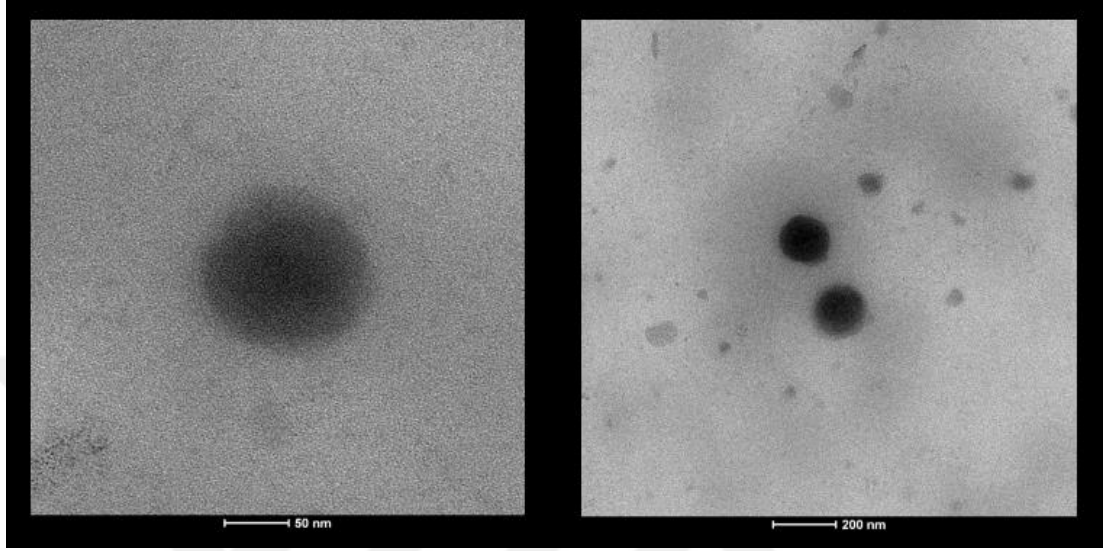


Şekil 3.14. +4 °C ve -20°C 'de ve trehaloz eklenerek -20°C 'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül boyutu sonuçları (n=3)

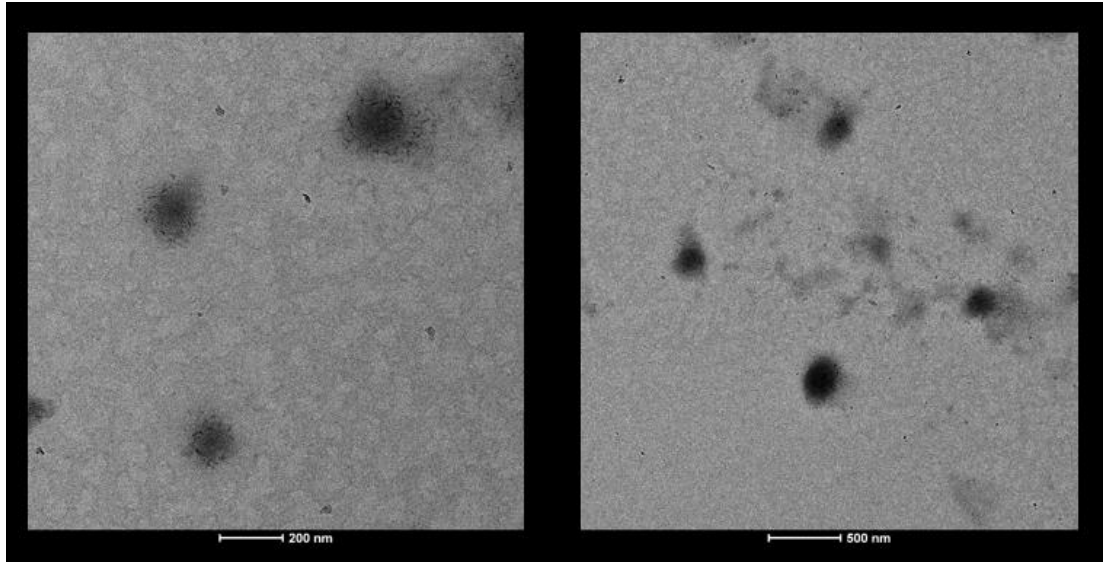


Şekil 3.15. +4 °C ve -20°C 'de ve trehaloz eklenerek -20°C 'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün partikül boyutu sonuçları (n=3)

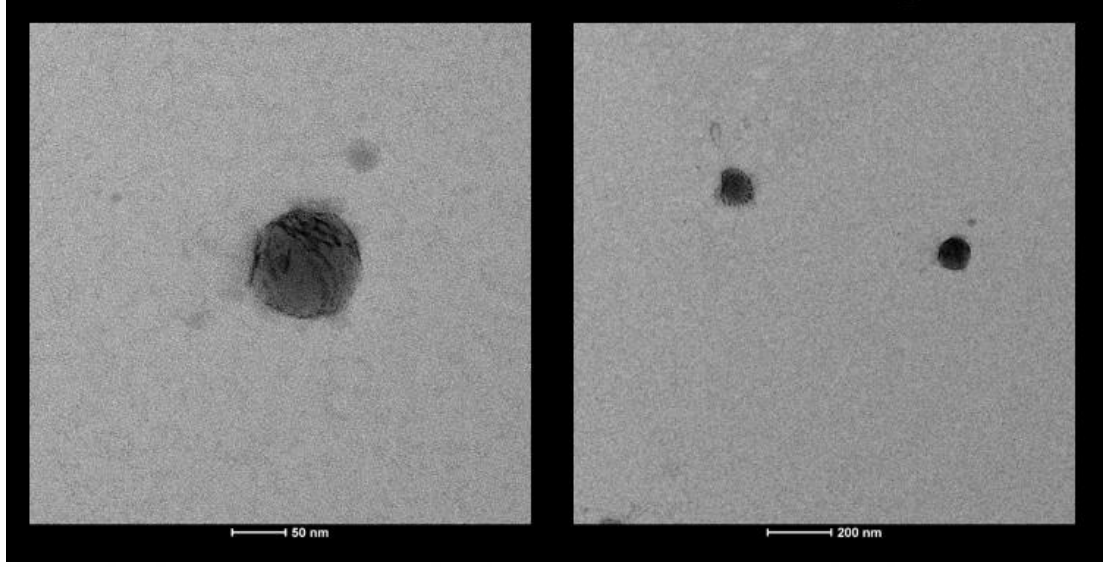
Ayrıca +4 °C ve -20°C 'de saklanan numuneler ve trehaloz eklenerek -20°C 'de 2 ay saklanan numune 2. Ay saklanan numunelere ait TEM analizi sonuçları Şekil 3.16, Şekil 3.17 ve Şekil 3.18’de verilmiştir.



Şekil 3.16. BSA-NP’leri +4°C’de, 60. gün TEM görüntüleri



Şekil 3.17. BSA-NP’leri -20°C’de, 60. gün TEM görüntüleri



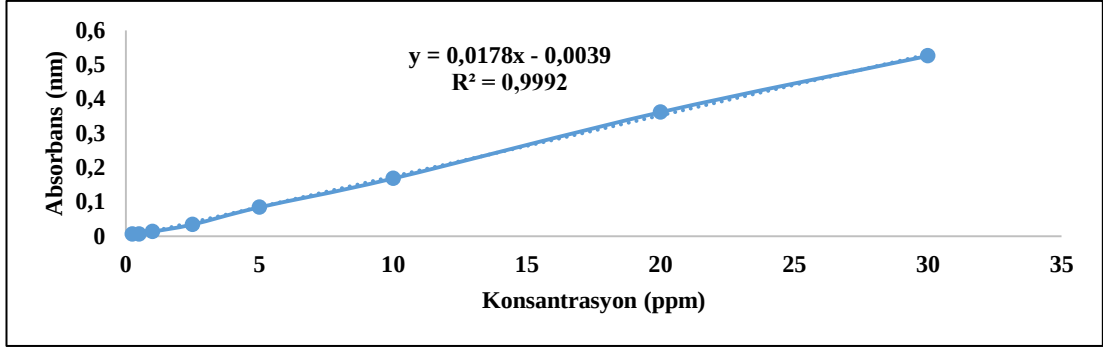
Şekil 3.18. Trihalozlu BSA-NP'leri +4°C'de, 60. gün TEM görüntüleri

3.3. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonuna Dair Bulgular

3.3.1. Partikül Büyüklüğü, Dağılımı, Zeta Potansiyeli ve Yükleme Etkinliği Bulguları

Ön formülasyon çalışmaları sonrası sonuçlar doğrultusunda karar verilen nihai formülasyona antijen yüklenerek “2.2.2. RBD Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması” bölümünde belirtildiği gibi üretim yapılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyelini belirlemek için dinamik ışık saçılımı yöntemi (Malvern Zetasizer NanoZS) kullanılmıştır. Yükleme etkinliği ise ‘mikro bikinkoninik asit (mikro- BCA) tekniği’ kullanılarak tayin edilmiştir.

Yüzde yükleme etkinliği “2.2.3.3. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi” bölümünde belirtilmiş yöntem doğrultusunda yapılmış olup formülasyonun dış fazı (%1 PVA) ile seyreltilen RBD ile yapılan kalibrasyona ait grafik ve denklem Şekil 3.19’da verilmiştir.

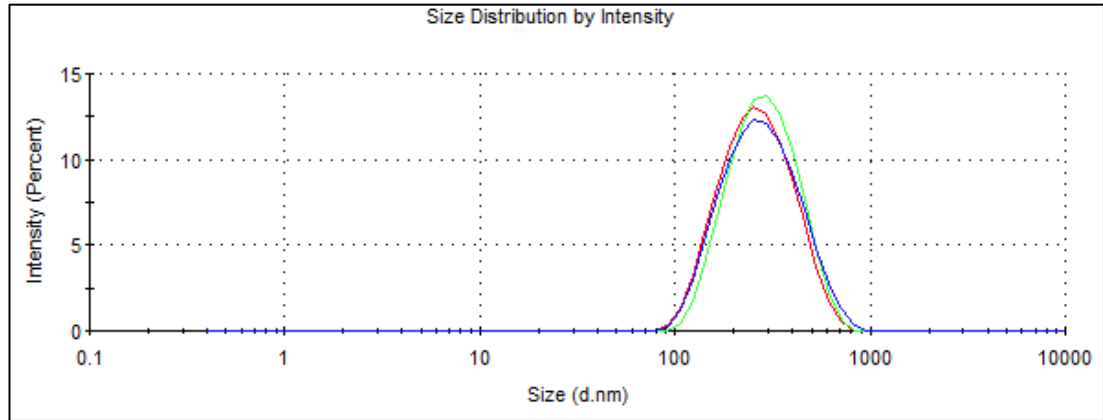


Şekil 3.19. %1 PVA ile hazırlanan RBD çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)

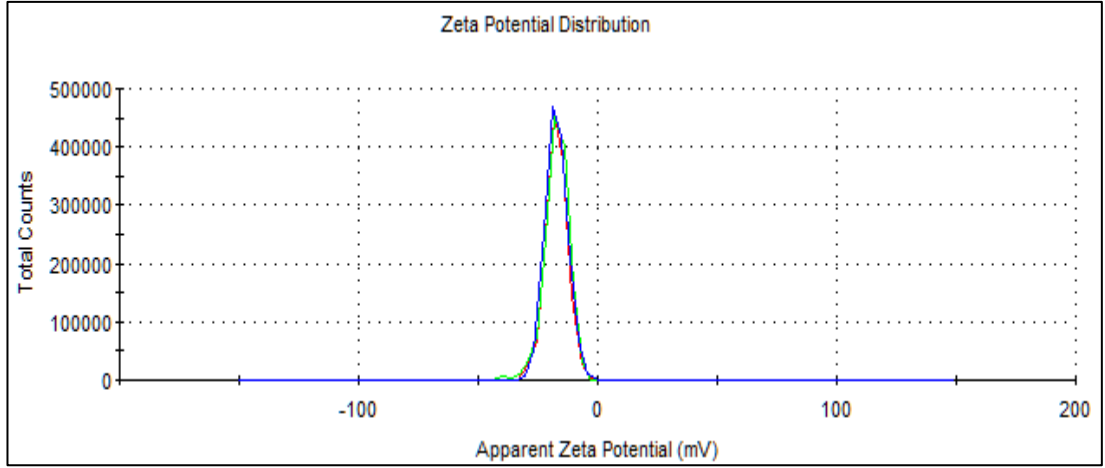
RBD yüklenecek üretilen nanopartiküllere ait veriler Çizelge 3.11’de verilmiştir. RBD yüklü nanopartikül formülasyonuna (PB1) ait partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.20’de, zeta potansiyeli dağılımına ait grafik Şekil 3.21’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. RBD yüklü final nanopartikül formülasyonuna ait partikül büyüklüğü, dağılımı, zeta potansiyeli ve yükleme etkinliği bulguları (n=3)

Formül No	EE (%±SS)	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI(Ort±SS)	Zeta Potansiyel (mV)
PB1	86,4±0,007	254,0±5,645	0,197±0,020	-11,8±0,416



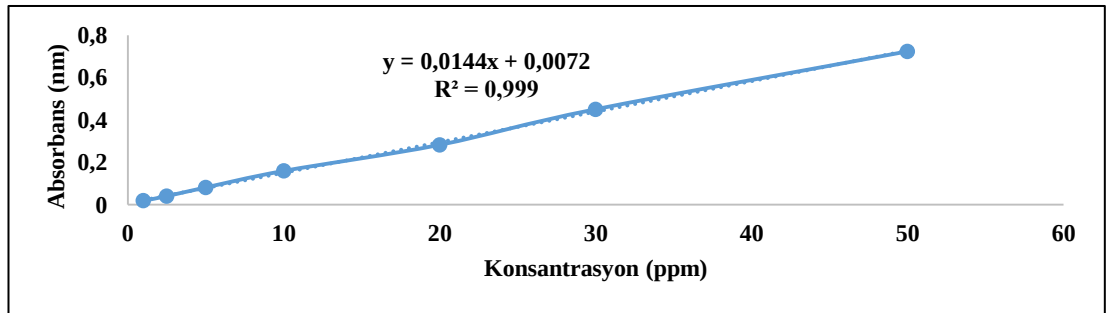
Şekil 3.20. RBD yüklü nanopartikül formülasyonuna (PB1) ait partikül boyutu ve dağılımı grafiği



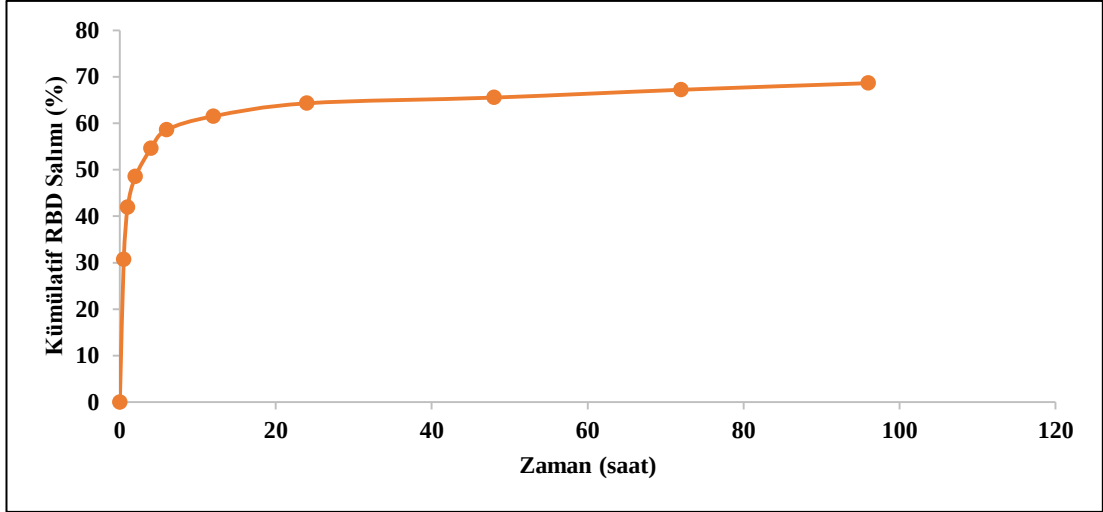
Şekil 3.21. RBD yüklü nanopartikül formülasyonuna (PB1) ait zeta potansiyeli dağılımı grafiği

3.3.2 İn-vitro Antijen Salım Bulguları

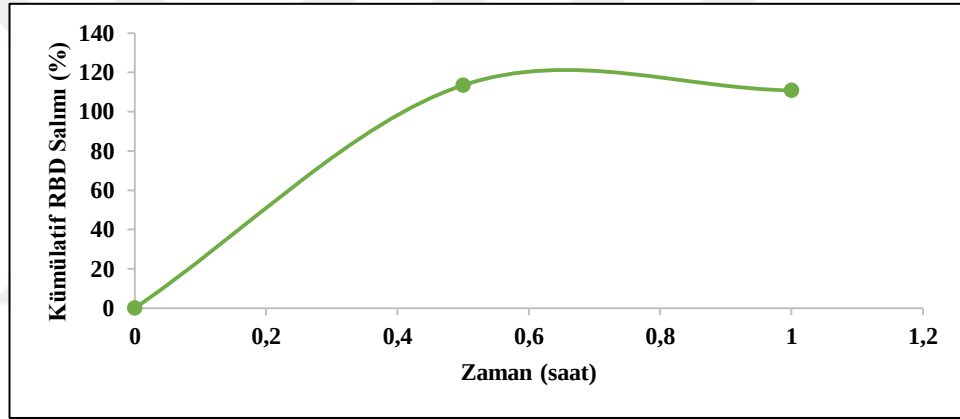
“2.2.3.9. İn-vitro Antijen Salım Çalışması” bölümünde belirtildiği gibi RBD yüklü nanopartiküllerin salım profilinin belirlenmesi amacıyla tüp yöntemi (sample and separate) kullanılarak analiz yapılmıştır. RBD yüklü nanopartiküller pH 7,4 PBS ortamında, 50 rpm’de, 37°C’de toplam 312 saat inkübe edilerek belirlenen zaman aralıklarında numuneler alınmıştır. Alınan örneklerdeki salınan BSA miktarı ‘mikro bikinkoninik asit (mikro- BCA) tekniği’ kullanılarak hesaplanmış olup salım ortamı (pH 7,4 PBS) ile seyreltilen RBD ile yapılan kalibrasyona ait grafik ve denklem Şekil 3.22’de verilmiştir. Salım sonuçlarına ait grafik Şekil 3.23’te ve Şekil 3.24’te verilmiştir.



Şekil 3.22. pH 7,4 PBS ile hazırlanan RBD çözeltilerine ait kalibrasyon grafiği (n=3)



Şekil 3.23. RBD antijeni ile üretilen nanopartikül formülasyonundan *in vitro* salım profili (n=3)



Şekil 3.24. Saf RBD'ye ait salım profili (n=3)

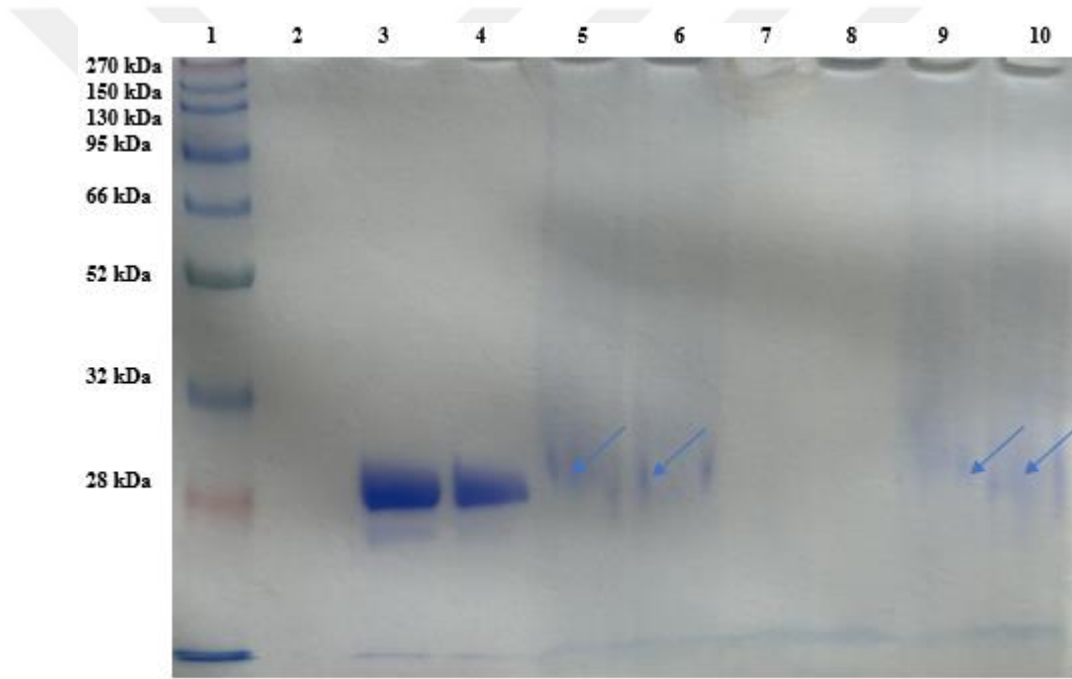
Çizelge 3.12. RBD yüklü nanopartikül *in vitro* salım kinetikleri

	0. derece	1.derece	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Weibull
Determinasyon Katsayısı (r^2)	0,496	0,727	0,656	0,901	0,650
n	0,132	0,003	2,638	0,113	0,001

RBD yüklü nanopartiküllerden yapılan *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen verilerden hareketle yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda BSA yüklü nanopartiküllerde olduğu gibi salımın Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür.

3.3.3. Yapısal Bütünlük Bulguları

Üretim sürecinin RBD antijeninin yapısal bütünlüğü üzerindeki etkisini değerlendirmek ve *in vitro* salım ortamında tek başına antijenin ve nanopartiküllerden salınan antijenin zamanla bozulup bozulmadığını gözlemlemek amacıyla SDS-Poliakrilamid Jel elektroforez çalışması yapılmıştır. RBD proteininin molekül ağırlığı yaklaşık 25 kDa'dur. Şekil 3.25'te salım ortamında 24 ve 96 saatlik *in vitro* salım çalışmalarında nanopartiküllerden salınan RBD numunelerine ait bantlar, kalibrasyon olarak kullanılan 500 ppm ve 250 ppm konsantrasyondaki RBD numunelerine ait bantlar ile aynı hizada ve RBD molekül ağırlığına denk gelmektedir.



Şekil 3.25. RBD ile üretilen nanopartikül ve RBD antijenine ait SDS-PAGE jeli

Jel uygulama sırası: 1.kuyucuk: Marker, 2.kuyucuk: Boş, 3.kuyucuk: 500 ppm RBD, 4. Kuyucuk: 250 ppm RBD, 5. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 24. Saat salım numunesi, 6. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 96. Saat salım numunesi, 7. Kuyucuk: Boş nanopartikül 96.saat numunesi, 8. Kuyucuk: Boş nanopartikül, 9. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 24. saat salım numunesi, 10. Kuyucuk: 50 µg RBD içeren nanopartikül 96. saat salım numunesi

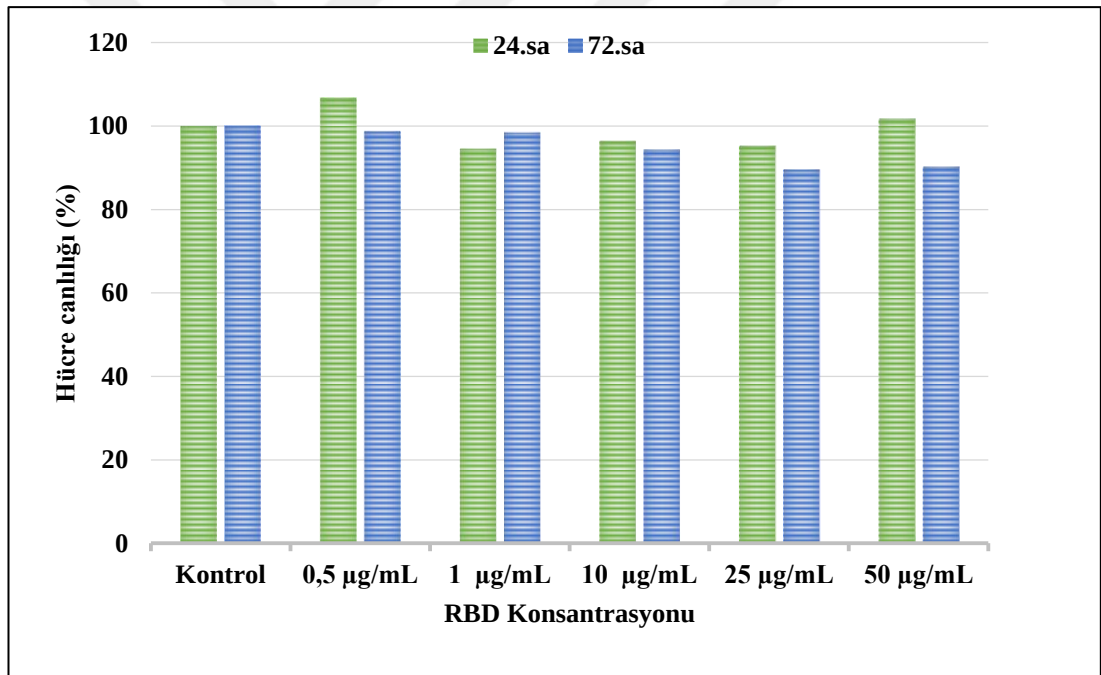
Sonuçta, nanopartikül hazırlama sürecinin proteinin yapısında bozunmaya neden olmadığı ve salım süresinde proteinin stabil kaldığı gözlenmiştir.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmalarına Dair Bulgular

3.4.1. Hücre Canlılığı Bulguları

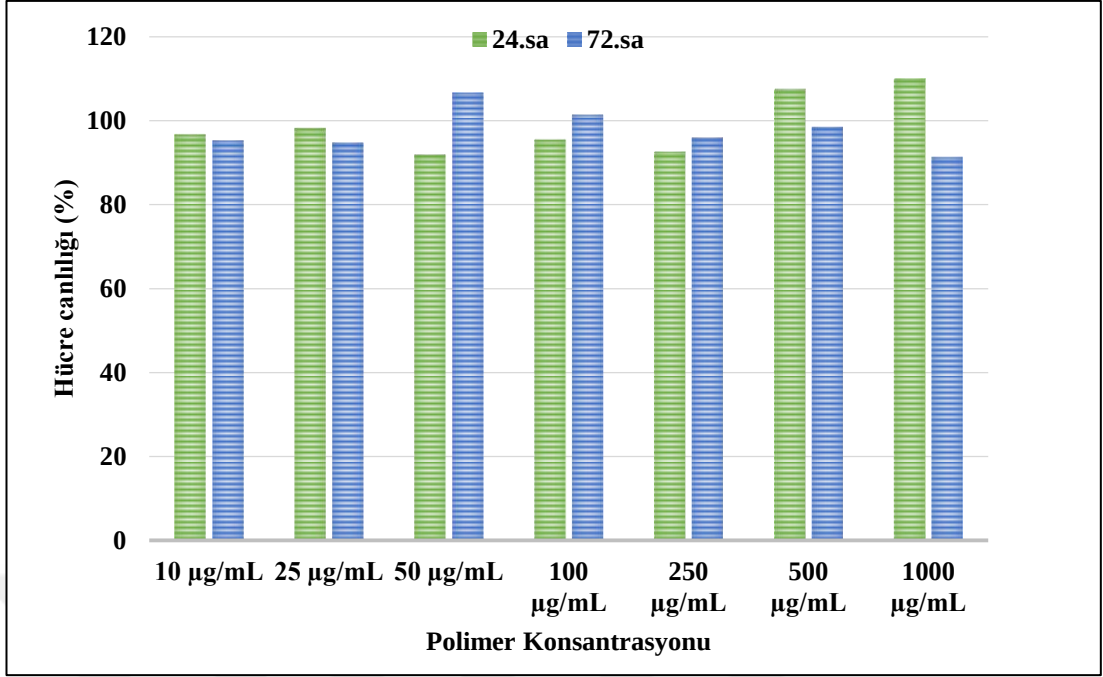
“2.2.4.1 Hücre Canlılığı” bölümünde belirtilen yöntemle L929 fare fibroblast hücrelerinde yürütülen MTT analizine ait bulgular Şekil 3.26, Şekil 3.27, Şekil 3.28 ve Şekil 3.29’da verilmiştir.

Şekil 3.26’da belirli konsantrasyonlarda (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml) RBD ile yapılan MTT analizine ait 24. saat ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir.



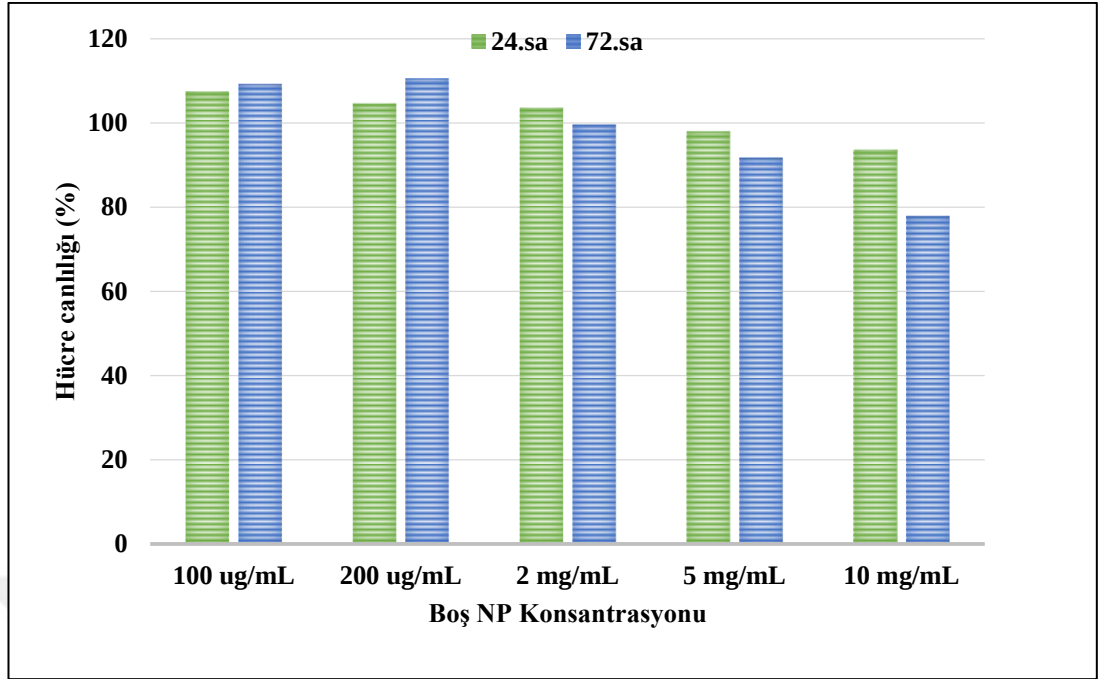
Şekil 3.26. RBD proteinine ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)

Şekil 3.27’de belirli konsantrasyonlarda (10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 1000 µg/ml) PEG-PCL polimeri ile yapılan MTT analizine ait 24. saat ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir.

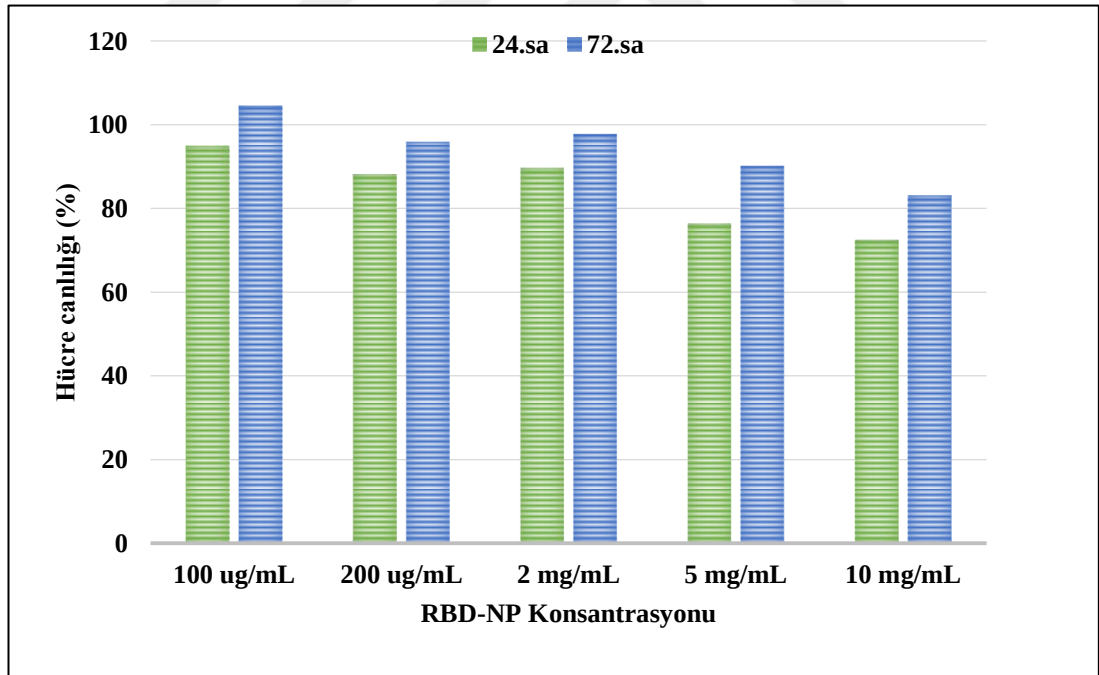


Şekil 3.27. Polimer olarak kullanılan PEG-PCL'ye ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)

Şekil 3.28 ve Şekil 3.29'da belirli konsantrasyonlarda (100 µg/ml, 200 µg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) RBD yüklü nanopartiküller; aynı şekilde hazırlanan boş nanopartiküller ile yapılan MTT analizine ait 24. saat ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir.



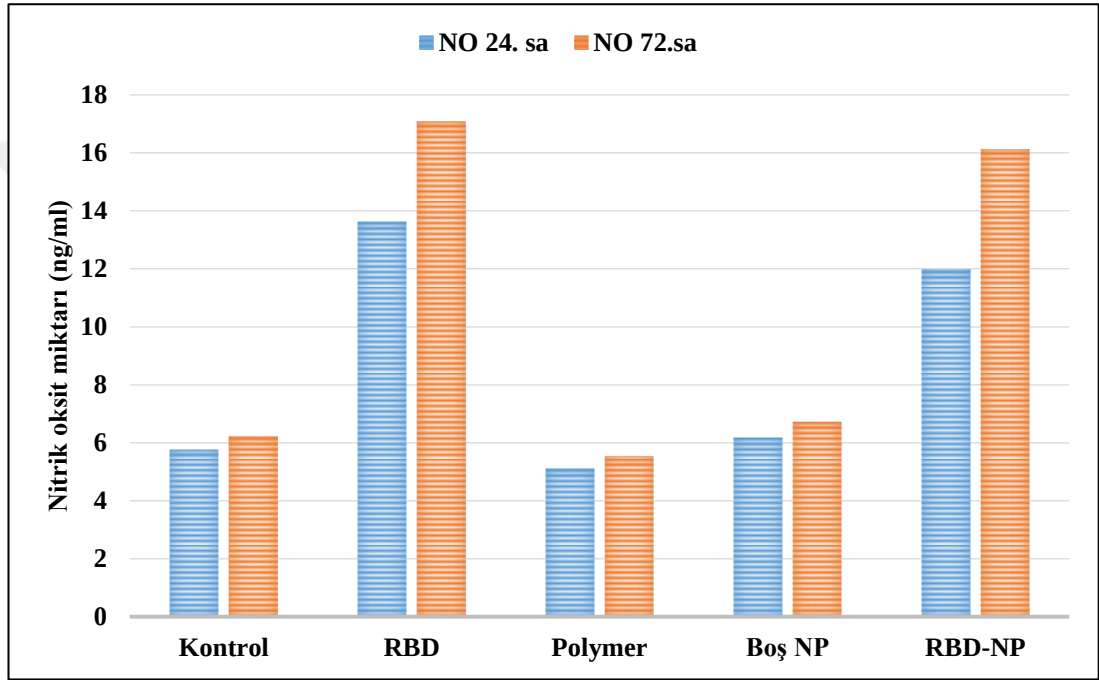
Şekil 3.28. Boş nanopartiküle ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)



Şekil 3.29. RBD proteini yüklü nanopartiküle ait farklı konsantrasyonlardaki 24. ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları (n=3)

3.4.2. Nitrik Oksit Tayini Bulguları

“2.2.4.2 Nitrik Oksit Tayini” bölümünde belirtilen yöntemle J774 fare makrofaj hücre hattı kullanılarak yapılan *in vitro* etkinlik çalışmasına ait bulgular Şekil 3.30’da verilmiştir. J774 makrofaj hücreleri 24 ve 72 saat boyunca RBD, PEG-PCL polimeri, Boş-NP ve RBD-NP ile muamele edilmiş, ardından süpernatanttaki nitrik oksit miktarları Griess reaktifi kullanılarak ölçülmüştür. NO tayinine ilişkin sonuçlar Şekil 3.20’de sunulmuştur.



Şekil 3.30. NO tayin sonuçları (n=3)

4. TARTIŞMA

Tez kapsamında SARS-CoV-2 Spike proteini reseptör bağlanma alanı (RBD) subunit/protein aşısı üzerinde antijen taşıyıcı sistem olarak poli(etilen glikol) (PEG)-poli(ε-kaprolakton)(PCL) polimerik nanopartikül sistemi kullanılmış ve formülasyona ilişkin parametrelerin (hazırlama yöntemi, kullanılan materyal ve yöntem basamakları) hazırlanan nanopartiküler taşıyıcı sistem üzerindeki etkisi incelenerek aşılarda geliştirilmesi ve uygulanmasında karşılaşılan sorunlara eczacılık teknolojisi bakış açısıyla katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında, polimer olarak biyouyumlu, biyoparçalanır ve FDA onaylı bir polimer olan PEG ve PCL'un kopolimer olarak modifiye edilmiş formu kullanılmış; S/Y/S çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretim yapılmıştır.

Taşıyıcı sistemler ya doğrudan lenfatik sisteme antijen alımını teşvik ederek ya da daha sonra lenf düğümlerine göç edecek hareketli APC'lere antijen alımını teşvik ederek lokal lenf düğümlerindeki antijen konsantrasyonunu üst düzeye çıkarmayı hedefler. Bu sebeple aşılarda taşıyıcı sistem kullanılmasındaki temel hedeflerden biri bağışıklık tepkisinin uyarılmasından sorumlu hücrelere veya dokulara ulaşan antijen miktarını arttırmaktır (O'Hagan ve Valiante, 2003). Antijenlerin APC'ler tarafından alımı, reseptör etkileşimlerinin yanı sıra boyut, şekil, yüzey yükü, hidrofobiklik ve hidrofiliklik gibi taşıyıcı sistemin özelliklerine de bağlıdır (Bachmann ve Jennings, 2010).

Nanopartikül boyutu APC'ler tarafından etkili bir şekilde alınabilmeleri için önemli bir faktördür. Literatüre göre 300 nm'den küçük partikül boyutuna sahip polimerik nanopartiküllerin daha yüksek antikor titreleri oluşturduğu tespit edilmiştir (Shah vd., 2014). Bu nedenle nihai formülasyon için partikül büyüklüğü <300 nm olarak hedeflenmiştir. Polidispersite indeksi (PDI) ise nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımının genişliği hakkında bilgi vermektedir. PDI değeri 0,3'ün altında olan formülasyonların monodispers dağılım gösterdiği kabul edilmektedir (Danaei vd., 2018). Bu nedenle nihai formülasyon için PDI değeri <0,3 olarak hedeflenmiştir.

Ön Formülasyon çalışmalarında literatür araştırmaları sonucu belirlenen kritik parametreler doğrultusunda sırasıyla sonikasyon süresi, sonikasyon gücü, iç/dış faz oranları, etkin madde ve polimer miktarları değiştirilerek farklı formülasyonlar hazırlanmış; değişen parametrelerle üretilen nanopartiküllere ilişkin partikül boyutu, partikül dağılımı, zeta potansiyeli yüzde yükleme etkinliği bulguları literatür doğrultusunda değerlendirilerek final formülasyona karar verilmiştir.

Çizelge 2.1’de bileşimi sunulmuş olan F19 formülasyonuna ait sonuçlar Çizelge 3.6’da verilmiş olup yükleme etkinliği %80 in üzerinde ($84,5 \pm 0,007$), partikül boyutu 300 nm’nin altında ($281,6 \pm 4,073$), Polidispersite indeksi (PDI) ise 0,3’ün altında ($0,197 \pm 0,005$) bulunarak hedeflenen sonuçlara ulaşılmıştır.

Model protein ile hazırlanan nanopartiküllerin *in vitro* salım profillerini gözlemek, RBD ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları arasındaki farkın değerlendirilmesini sağlarken *in vivo* salım kinetiğinin öngörülmesinde de yardımcı olmaktadır. Ayrıca hazırlanan formülasyonun kalitesini değerlendirmede de önemli bir parametredir (Jan vd., 2021).

“3.2.1. İn-vitro Antijen Salım Bulguları” bölümünde sunulan sonuçlar değerlendirildiğinde Şekil 3.9’ da görüldüğü gibi nanopartikül formülasyonu “patlama” salımı (burst release) sonrası 8 saat içinde enkapsüle edilmiş BSA’nın yaklaşık % 45’ini 8 saat içinde açığa çıkararak 96 saatte platoya ulaşarak yüklenen BSA’nın ortalama %50’sini salmıştır. Literatür araştırması yapıldığında Jia ve ark., tarafından yapılan çalışmada PCL-PEG-PCL polimeri kullanılarak hazırlanan BSA nanopartiküllerine ait salım profilinde de benzer şekilde patlama salımı sonrası benzer bir sürede platoya ulaşılmıştır (Jia vd., 2008).

Model protein olarak kullanılan BSA’nın üretim sürecinde ve nanopartiküllerden *in vitro* salım sırasında bozulup bozulmadığını gözlemek amacıyla SDS-PAGE çalışması yapılmıştır. SDS-PAGE peptit ve protein yapıdaki maddelerin yapısal analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SDS-PAGE bir elektroforez tekniği olup proteinlerin jel üzerinde molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayarak yapılarının analiz edilmesini sağlamaktadır (Walker, 2002).

“3.2.2. Yapısal Bütünlük Bulguları” bölümünde sunulan sonuçlar değerlendirildiğinde Şekil 3.10’da *in vitro* salım ortamında 8, 24, 48 ve 96 saat tutulan BSA’nın kontrol olarak

kuyucuklara yüklenen saf BSA ile aynı noktada bant vermesi ve markerda molekül ağırlığına denk gelen bölgede olması sebebiyle yapısal bütünlüğünü koruduğu anlaşılmaktadır.

Şekil 3.11’de 8, 24, 48 ve 96 saatlik *in vitro* salım çalışmalarında nanopartiküllerden salınan BSA numunelerine ait bantlar görülmekte olup yine saf BSA ile aynı noktada ve markerda molekül ağırlığına denk gelen bölgede bant vermiş olup ek bir bölgede bant oluşmamıştır. Bu durum hazırlama ve salım süreçleri sırasında BSA’nın kimyasal polimerizasyon, kovalent olmayan agregasyon veya moleküler hidroliz gibi bozunmalara uğramadığını ve stabil kaldığını göstermektedir (Jia vd., 2008).

Model protein ile hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik özellikleri Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. “3.2.2. Morfolojik Değerlendirme Bulguları” bölümünde nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonuna ait sonuçlar verilmiştir. Şekil 3.12’de sunulan TEM görüntüsü incelendiğinde nanopartiküllerin küresel olması, monodispers bir şekilde dağılması ve agregasyon oluşmaması RBD antijeni ile üretime başlamadan önce üretim yöntemi ve formülasyon parametrelerinin doğrulanmasını sağlamıştır.

Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), numunelerin fiziksel özelliklerindeki değişimi ve sıcaklığın zamana karşı değişimini ölçen bir termal analiz yöntemidir (İmamoğlu vd., 2022). Model protein ile hazırlanan final nanopartikül formülasyonunun DSC analizi ile termal özellikleri belirlenerek, enkapsülasyon doğrulanması yapılmıştır. “3.2.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Bulguları” bölümünde sunulan sonuçlar değerlendirildiğinde Şekil 3.13’te literatür ile uyumlu olarak 218,34 °C’de BSA’ya ait belirgin bir ekzotermik pik oluşmuştur (Luppi vd., 2011). PEG-PCL’ye ait termogramda 49,15°C’de ve 59,15°C’de iki endotermik pik görülmektedir. Bu piklerin PEG-PCL’ye ait olduğu yapılan literatür taraması ile doğrulanmıştır (Li vd., 2018). BSA yüklü nanopartikül formülasyonunun (D1) verdiği piklere bakıldığında nanopartikül sistemi içinde BSA’nın tepe noktasının kaybolduğu görülmüştür. Sonuçta BSA’nın nanopartikül içerisine başarılı bir şekilde kapsüllendiği gösterilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* karakterizasyonunda ve kalitesini kanıtlamada en önemli parametrelerden biri de stablitedir. Literatürde “nanopartikül stablitesi”, şekil, boyut, bileşim ve yüzey özellikleri gibi nanoyapı özelliklerinin korunmasını tanımlamaktadır (Phan ve Haes, 2019).

Model protein olan BSA yüklü PEG-PCL nanopartikülleri, kısa süreli fiziksel stabiliteyi gözlemlemek amacıyla ultra saf su içerisinde disperse edildikten sonra 1 ay boyunca +4 °C ve -20°C 'de saklanmıştır. Ayrıca -20 °C'de dondurma işleminden korumak amacıyla formülasyona kriyoprotektan olarak 'trehaloz' eklenerek nanopartiküllerin stabilitesi gözlenmiştir. Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da sunulan stabilite çalışmalarına ait sonuçlar değerlendirildiğinde üç ortamda da 30. günün sonunda kritik parametreler istenen limitlerin içinde kalmıştır.

Çizelge 3.8'de +4 °C'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün sonuçları değerlendirildiğinde partikül büyüklüğünün 200 nm altında kalarak belirgin olarak değişmediği; PDI değerinin yine 0,3 'ten küçük olduğu ve değişmediği görülmüştür. Zeta potansiyel değerinin zamanla arttığı, ancak istenen aralık olan ± 10 mV'den 30. günde dahi büyük olduğu görülmüştür.

Literatürde ± 30 mV'den büyük zeta potansiyele sahip kolloidal dispersiyonların yüksek dayanıklılıkta olduğu; $\pm 0-10$ mV aralığında zeta potansiyele sahip kolloidal dispersiyonların ise dayanıksız olduğu belirtilmekte olup $\pm 10-15$ mV zeta potansiyel değerinin formülasyon stabilitesini sağlamak için yeterli olacağı belirtilmiştir (Bhattacharjee, 2016).

Çizelge 3.9'da -20°C'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün sonuçları değerlendirildiğinde nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün giderek arttığı görülmüş olup söz konusu durumun -20°C'de donan nanopartiküllerin zamanla agregat oluşturmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bhatnagar vd., 2007). PDI değerinde belirgin bir değişim olmamakla birlikte zeta potansiyel değerinin zamanla arttığı, ancak istenen aralık içinde kaldığı görülmüştür.

Nanopartiküler sistemler ve biyolojik materyallerde dondur-çöz ve liyofilizasyon işleminin stabiliteyi olumsuz etkilemesinin önüne geçmek için formülasyonlara kriyoprotektan maddeler ilave edilir. Literatürde en sık kullanılan kriyoprotektan maddelerden biri 'trihalo'z'dur (Fonte vd., 2014). Kriyoprotektanların nanopartiküllerin şekil, boyut ve yapısal bütünlüğünü korumada oldukça etkili oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Almalik vd., 2017).

Çizelge 3.10'da saf su ile disperse edildikten sonra dondurma işleminin proteine zarar vermesini önlemek amacıyla formülasyona kriyoprotektan olarak (%1) trihaloz eklenerek -20°C'de saklanan numunelere ait 0, 1, 15 ve 30. gün sonuçları değerlendirildiğinde formülasyona ilave edilen kriyoprotektanın partiküllerin agregat oluşturmalarının önüne geçtiği ve -20°C'de nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerinin belirgin olarak değişmediği görülmüştür.

Şekil 3.14 ve Şekil 3.15'te sunulan karşılaştırmalı partikül boyutu ve zeta potansiyel grafikleri de incelendiğinde üç farklı koşulda yapılan kısa süreli stabilite çalışması sonunda antijen yüklü nanopartikül sisteminin +4°C'de ve trihaloz ilavesi ile -20°C'de fiziksel olarak stabil kaldığı bulunmuştur.

Model protein ile hazırlanan formülasyonların *in vitro* karakterizasyon sonuçları yorumlanarak bu doğrultuda seçilen final formülasyon ile RBD yüklü nanopartikül üretimi yapılmıştır. Literatüre göre 300 nm'den küçük partikül boyutuna sahip; PDI değeri 0,3'ün altında; zeta potansiyel değeri ise $\pm 10-15$ mV aralığındaki nanopartiküler sistemlerin daha yüksek antikör titreleri oluşturduğu, monodispers dağılım gösterdiği ve stabilite açısından uygun aralıkta olduğu belirtilmektedir (Bhattacharjee, 2016; Danaei vd., 2018; Shah vd., 2014).

Final formülasyonla üretilen RBD yüklü nanopartiküle ait sonuç verileri Çizelge 3.6'da, partikül boyutu ve dağılımına ait grafik Şekil 3.20'de, zeta potansiyeline ait grafik Şekil 3.21'de verilmiş olup yükleme etkinliği %86,4, partikül boyutu 254 nm, Polidispersite indeksi (PDI) 0,197 ve zeta potansiyeli -11,8 mV bulunarak hedeflenen aralıkta sonuçlara ulaşılmıştır.

Literatürde PEG polimeri yüksüz kısım, PCL ise negatif yüklü hidrofobik kısım olarak geçmektedir. Çalışmalarda kullandığımız kopolimerin PEG:PCL oranının 25:75 olması sebebiyle nanopartiküle ait zeta potansiyel değeri negative çıkmaktadır (Li vd., 2009). Literatürde PEG-PCL kopolimerleri genelde yüksüze yakın ya da negatif yükte çıkmaktadır (Hu vd., 2007; Zhang vd., 2004). Bu durumda -10 mV'den büyük zeta potansiyeli elde etmek hedeflenmiş ve hedeflenen aralıkta sonuçlar elde edilmiştir.

İn-vitro salım çalışmaları, farmasötik ürünlerin dozaj formu, salım mekanizması ve salım kinetiğine ilişkin bilgi vererek *in vivo* analizler öncesi *in vitro-in vivo* korelasyon (IVIVC) ilişkisinin kurulmasını sağlamaktadır (D’Souza, 2014).

Tez kapsamında öncelikle model protein ile final formülsayona karar verilip, bu formülasyon ile nanonartiküle ait salım mekanizması ve salım kinetiğine ilişkin bilgi edinilmiş; edinilen sonuçlar ışığında RBD yüklü nanopartikül üretimi yapılmış, tek başına RBD ve polimerik nanopartikül sistemi içine enkapsüle edilmiş RBD’nin salım profilleri arasındaki fark gözlemlenmiştir.

“3.3.2. İn-vitro Antijen Salım Bulguları” bölümünde sunulan sonuçlar değerlendirildiğinde Şekil 3.22 ve Şekil 3.23’te PEG-PCL polimeri kullanılarak hazırlanan S1 formülasyonundan RBD proteininin salımı ile saf RBD’nin *in vitro* salım hızı incelendiğinde polimerik nanopartikül formülasyonunun antijenin açığa çıkış hızını yavaşlattığı görülmüştür. Şekil 3.23’te % kümülatif salım-zaman grafiği incelendiğinde protein çözeltisinin “patlama” salımı (burst release) gösterdiği görülmüştür. Şekil 3.24’te tek başına RBD proteininin 1 saat içinde tamamen salındığı görülürken; Şekil 3.23’te görüldüğü gibi nanopartikül formülasyonları RBD’nin %50’sini 4 saat içinde açığa çıkarmış, salım 96 saate kadar devam etmiştir ve etkin maddenin yaklaşık %68’i salındığında salım platoya ulaşmıştır.

SARS-CoV-2, RBD alt birimi aracılığıyla hücre yüzeyinde bulunan ACE-2 reseptörüne bağlanarak hücrelere giriş yapar (Edwin ve Antony, 2023). Aşı antijenleri ile bağışıklık gelişebilmesi için antijenin lenfatik sisteme giriş yapması gerekmektedir. Lenfatik sisteme giriş makrofajlar veya dentritik hücreler aracılığıyla olmakta olup nanopartiküllerin partikül boyutuna bağlı olarak ortalama 24 saat sürmektedir (Reddy ve ark., 2007).

Aşı formülasyonlarında adjuvan olarak nanopartiküler sistemlerin kullanılmasındaki nedenlerin en önemlilerinden biri antijenin lenfatik sisteme ulaşana kadar vücutta stabil kalmasını sağlamaktır. Tez kapsamında RBD proteini nanopartiküler sistem içerisine enkapsüle edilerek RBD proteinini lenfatik sisteme ulaşana kadar vücuttaki degradasyon gibi negatif etmenlerden korumak; ancak bu sürede yavaşça salınmasını sağlayarak dentritik hücrelere ve makrofajlara ulaştığında serbest RBD’nin hücre yüzeyindeki ACE-2 reseptörlerine bağlanmasını sağlamak hedeflenmiştir. Çalışmalar sonucunda 24 saatte RBD’nin %50’sinden fazlası salınmış, böylelikle lenfatik sisteme ulaşma süresinde NP’lere yüklenen RBD’nin yarısı serbest hale gelmiştir. Bu sayede başlangıçta hücrelere giriş yapan

RBD ile hızlı bir bağışıklık, 24 saat sonunda nanopartiküllerden salınan RBD ile de uzun süreli bağışıklık sağlanması hedeflenmiştir.

İn vitro salım çalışmalarından elde edilen verilerle yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda RBD ve BSA yüklü nanopartiküllerde salım grafiklerinin r^2 değerinin 1'e en yakın olduğu model olan Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum sağladığı görülmüştür. Literatürde PEG-PCL polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin salım kinetiğinin en çok Korsmeyer-Peppas'a uyum sağladığı gözlenmiştir (Ramazani vd., 2018; Wadhwa vd., 2021). Korsmeyer-Peppas modeline göre yapılan kinetik hesaplama sonucunda n değeri 0,113 olarak bulunmuştur. Bu değer 0,45'ten küçük olduğu için salım difüzyonla gerçekleşmektedir.

İn vitro salım çalışması bulguları doğrultusunda nanopartiküllerden RBD proteininin salımının ortalama 96 saatte platoya ulaştığı görülmüştür. Literatür verileri doğrultusunda lenfatik sisteme ulaşana kadar salınan antijenin vücutta stabil kalıp kalmadığını ve salım boyunca antijenin stabilitesini gözlemek amacıyla 24 ve 96 saatlik *in vitro* salım çalışmalarında nanopartiküllerden salınan RBD numuneleri ile saf RBD numunelerinin yapısal bütünlüğü SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılmıştır.

“3.3.3. Yapısal Bütünlük Bulguları” bölümünde sunulan sonuçlar değerlendirildiğinde Şekil 3.25'te *in vitro* salım ortamında 24 ve 96 saat tutulan RBD kontrol olarak kuyucuklara yüklenen saf RBD ile aynı noktada bant vermiş; ayrıca hem saf RBD hem de salım numuneleri kaynak olarak kullanılan RBD'nin literatür verileri ile uyumlu olarak 25 kDa'a denk gelen bölgede bant vermiştir (Kalyoncu vd., 2023). Sonuçta formülasyon sürecinin RBD'nin yapısında bozunmaya sebebiyet vermediği ve aşı enjeksiyonu sonrası 96 saate kadar salınan RBD'nin vücut koşullarında bozunmadığı ve stabil kaldığı tespit edilmiştir.

RBD yüklü nanopartiküllerin hücre canlılığına etkisini gözlemek amacıyla L929 fare fibroblast hücrelerinde yürütülen MTT analizine ait bulgular “3.4.1 Hücre Canlılığına Dair Bulgular” bölümünde sunulmuştur.

Şekil 3.26'da belirli konsantrasyonlarda (50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml) RBD ile yapılan MTT analizine ait 24. saat ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir. RBD proteini tek başına uygulandığında incelenen tüm konsantrasyonlarda

L929 hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki göstermemiştir. Her iki inkübasyon süresi içinde de sitotoksositeye rastlanmamıştır.

Şekil 3.27’de belirli konsantrasyonlarda (10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 1000 µg/ml) PEG-PCL polimeri ile yapılan MTT analizine ait 24. saat ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir. Polimer tek başına uygulandığında hiçbir konsantrasyonun incelenen zaman aralıklarında L929 hücreleri üzerinde toksik bir etkiye neden olmadığı görülmüştür. Sonuçlar literatür verilerini doğrular nitelikte olup PEG-PCL polimerinin L929 hücrelerinde güvenli olduğu söylenebilir (Alami-Milani vd., 2019; Luo vd., 2016).

Şekil 3.28 ve Şekil 3.29’da belirli konsantrasyonlarda (100 µg/ml, 200 µg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml) RBD yüklü nanopartiküller; aynı şekilde hazırlanan boş nanopartiküller ile yapılan MTT analizine ait 24. saat ve 72. saat hücre canlılığı sonuçları gösterilmektedir.

RBD-NP formülasyonlarının farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerindeki etkinlikleri incelendiğinde 100 µg/ml, 200 µg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde canlılık oranları %90 ve üzerinde olduğu görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlara bakıldığında 24 saatin sonunda hücre canlılık seviyesi % 80’in altına inmiştir ancak 72 saatlik inkübasyonun ardından bu konsantrasyonlardaki hücre canlılık değerlerinin yine %80’in üstünde olduğu görülmektedir. Ayrıca ISO 10993-5’e (2009) göre, *in vitro* sitotoksiste testinde güvenli olarak kabul edilebilir minimum hücre yaşayabilirliği sınırı %70 olup hiçbir konsantrasyonda canlılık bu seviyeye düşmemiştir. Sonuç olarak PEG-PCL polimeri kullanılarak hazırlanan RBD yüklü nanopartikül formülasyonunun güvenilirliği *in vitro* hücre canlılığı çalışmaları ile kanıtlanmıştır.

RBD yüklü nanopartiküllerin *in vitro* aktivitesi Nitrik oksit (NO) tayini ile gözlemlenmiştir. Nitrik oksit tayini ile antijenin *in vitro* ortamda immünostimulan etkinlik oluşturup oluşturmadığı belirlenebilmektedir. SARS-CoV-2 aşısı çalışmalarında *in vitro* analizlerde tercih edilen bir yöntemdir (Uehara vd., 2015; Vijayanand vd., 2023).

Şekil 3.30’da sunulan sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grupları ile kıyaslandığında Boş NP formülasyonu ve PEG-PCL polimeri uygulanan grupta makrofajlardan salgılanan nitrik oksit miktarında kayda değer artış olmadığı görülmüştür.

Tek başına RBD proteinine maruz kalan gruplarda nitrik oksit seviyesinin yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Bu grupta NO seviyesi 24 saatin sonunda yaklaşık 2,5 kat ve 72 saatin sonunda ise yaklaşık 3 kat artış göstermiştir. RBD yüklü nanopartiküle ait sonuçlar incelendiğinde 72 saatin sonunda serbest haldeki RBD proteini içeren grup ile benzer sonuçlar gösterdiği görülmüştür. 24 saatlik süre içerisinde RBD-NP'lere ait NO sonuçları serbest RBD proteinine göre daha düşük olmasına rağmen, 72 saatin sonunda benzer düzeyde immünoestimulan etki olduğu görülmüştür. Bu durum nanopartiküler sistem içine enkapsüle halde olan RBD'nin zamanla salınarak serbest RBD'ye göre daha uzun süreli immünoestimulan etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak RBD-NP'lerin non-toksik konsantrasyonlarının J774 makrofaj hücreleri üzerinde kayda değer bir düzeyde immünoestimulan aktivite gösterdikleri ve uzun süreli bağışıklık için fayda sağlayacağı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmaları kapsamında, SARS-CoV-2'nin sebep olduğu COVID-19 salgınına karşı aşı geliştirme sürecine eczacılık teknolojisi bakış açısıyla yaklaşılarak, PEG-PCL polimerik nanopartikül sistemi içine virüsün hücre girişinde en etkili alt birimi olan RBD proteini enkapsüle edilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışma bulgularına ait sonuç ve öneriler şu şekilde özetlenebilir:

- S/Y/S çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PEG-PCL polimerik nanopartikülleri üretilmiş ve antijenlerin APC'ler tarafından alımını sağlayacak ölçüde partikül boyutu ve dağılımı (partikül boyutu < 300 nm, PDI < 0,3) elde edilmiştir.
- Model protein olarak kullanılan BSA ile yapılan çalışmalar sonucunda nanopartiküllerden beklenen salım kinetiğinde antijen salındığı; morfolojik olarak incelendiğinde partiküllerin küresel olduğu, monodispers şekilde dağıldığı ve agregasyon oluşmadığı; termal olarak incelendiğinde ise BSA'nın NP formülasyonu içine tamamen enkapsüle edildiği doğrulanmıştır.
- Yapılan kısa süreli stabilite çalışmaları sonucunda nanopartiküllerin +4 °C ve -20 °C'de 30 gün boyunca fiziksel olarak stabil kaldığı gösterilmiştir.
- RBD yüklü NP'ler ile yapılan miktar tayini analizleri ile RBD'nin polimerik nanopartikül içine yüksek oranda (>%80) enkapsüle edildiği gösterilmiş ve *in vitro* salım çalışmaları ile istenen salım kineği ve istenen sürede uzatılmış salım elde edilmiştir.
- SDS-PAGE çalışmaları ile nanopartikül üretim prosesinin RBD'nin yapısında herhangi bir bozunmaya neden olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca 24 ve 96 saatlik *in vitro* salım numunelerinin yapısal bütünlüğünü koruması, uygulama sonrası lenfatik sisteme ulaşmaya kadar RBD'nin stabilitesini koruyacağını düşündürmektedir.

- L929 hücre hattı kullanılarak yapılan MTT analizi ile RBD proteini ve PEG-PCL kopolimerinin farklı konsantrasyonlardaki % hücre canlılığı tayin edilerek ideal polimer-antijen konsantrasyonunu belirlemek hedeflenmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonunda RBD proteini ve PEG-PCL kopolimeri uygulanan tüm konsantrasyonlar %80'in üzerinde canlılık gözlenmiştir. PEG-PCL polimeri kullanılarak hazırlanan RBD yüklü nanopartikül ile yapılan MTT analizi sonucunda ise artan konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma gözlenmiş ancak 72 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek konsantrasyonda dahi hücre canlılığı %80 in altına düşmemiş ve formülasyonunun in vitro koşullarda güvenilirliği kanıtlanmıştır.
- J774 fare makrofaj hücre hattı kullanılarak RBD yüklü nanopartiküllerin *in vitro* aktivitesini gözlemek amacıyla NO tayini yapılmıştır. NO seviyesi makrofajlardaki immün yanıt ile doğru orantılı olup RBD-NP'lerde 24. saat ve 72. saat NO seviyelerine bakıldığında immün yanıtın giderek arttığı görülmüştür. Bu durum nanopartiküler sistem içine enkapsüle halde olan RBD'nin zamanla salınarak serbest RBD'ye göre daha uzun süreli immünostimulan etki oluşturabileceğini doğrulamaktadır. Ayrıca 72 saatlik inkübasyon sonunda RBD-NP ve serbest RBD NO seviyesinin benzer düzeyde sonuç vermesi, RBD'nin NP'lere yüksek verimle enkapsüle edildiğini ve NP'lerden RBD salımının yüksek düzeyde olduğunu doğrulamaktadır.

Tez kapsamında yapılan *in vitro* karakterizasyon çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen veriler tez çalışmasının hedeflenen başarıya ulaştığını göstermektedir. Bu bulgular, geleneksel aşılar alternatif olarak, subunit protein nanoaşı sistemlerinin COVID-19 gibi gelecekte de olması muhtemel viral salgınlarda etkili bir taşıyıcı sistem olabileceğini göstermektedir. Ancak söz konusu nanoaşı sisteminin etkililik ve güvenilirliğini kanıtlamak için RBD proteini ile hazırlanan formülasyonların uzun süreli stabilite çalışmalarının yapılarak biyolojik aktivitesinin stabilite süresince kontrol edilmesi; ayrıca hücre kültürü çalışmaları doğrultusunda uygun hayvan modelinde *in vivo* etkinliğin test edilmesi gerekmektedir. Söz konusu çalışmaların ilerleyen sürede yapılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- ABBAS, A., LICHTMAN, A., & PILLAI, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*. Elsevier Health Sciences.
- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., & PILLAI, S. (2019). *Basic immunology e-book: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
- AGUILAR, J., & RODRIGUEZ, E. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25(19), 3752-3762.
- ALAMI-MILANI, M., ZAKERI-MILANI, P., VALIZADEH, H., SATTARI, S., SALATIN, S., & JELVEHGARI, M. (2019). Evaluation of anti-inflammatory impact of dexamethasone-loaded PCL-PEG-PCL micelles on endotoxin-induced uveitis in rabbits. *Pharmaceutical development and technology*, 24(6), 680-688.
- ALMALIK, A., ALRADWAN, I., KALAM, M. A., & ALSHAMSAN, A. (2017). Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(6), 861-867.
- APOSTOLICO, J. D. S., LUNARDELLI, V. A. S., COIRADA, F. C., BOSCARDIN, S. B., & ROSA, D. S. (2016). Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *Journal of immunology research*, 2016.
- ASTUTI, I. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 407-412.
- BACHMANN, M. F., & JENNINGS, G. T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 10(11), 787-796.
- BELLINI, C., & HORVATI, K. (2020). Recent advances in the development of protein-and peptide-based subunit vaccines against tuberculosis. *Cells*, 9(12), 2673.
- BESTLE, D., HEINDL, M. R., LIMBURG, H., PILGRAM, O., MOULTON, H., STEIN, D. A., HARDES, K., EICKMANN, M., DOLNIK, O., & ROHDE, C. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life science alliance*, 3(9).
- BEYAZOVA, U., & AKTAŞ, F. (2007). ÇOCUKLUK ÇAĞI AŞILAMALARI VE ERİŞKİN BAĞIŞIKLAMASI CHILDHOOD VACCINATION AND ADULT IMMUNITATION. *Gazi Medical Journal*, 18(2).
- BEYERSTEDT, S., CASARO, E. B., & RANGEL, É. B. (2021). COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 40, 905-919.

- BHATNAGAR, B. S., BOGNER, R. H., & PIKAL, M. J. (2007). Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharmaceutical development and technology*, 12(5), 505-523.
- BHATTACHARJEE, S. (2016). DLS and zeta potential–what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
- BISHT, H., ROBERTS, A., VOGEL, L., BUKREYEV, A., COLLINS, P. L., MURPHY, B. R., SUBBARAO, K., & MOSS, B. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6641-6646.
- BOZKIR, A., & AYÇİÇEK, S. (2021). Güncel Bakış Açısı ile Aşı Teknolojisi. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi (MİSED)*, 47-48, 17-33.
- BOZKIR, A., & AYÇİÇEK, S. (2022). Aşı Üretim Süreçlerinde Kalite Denetimi. *Sağlık Düşüncesi ve Tıp Kültürü Dergisi (SD)*, 61, 52-55.
- CHEN, W.-H., STRYCH, U., HOTEZ, P. J., & BOTTAZZI, M. E. (2020). The SARS-CoV-2 vaccine pipeline: an overview. *Current tropical medicine reports*, 7(2), 61-64.
- CHUNG, J. Y., THONE, M. N., & KWON, Y. J. (2021). COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Advanced drug delivery reviews*, 170, 1-25.
- COLEMAN, C. M., LIU, Y. V., MU, H., TAYLOR, J. K., MASSARE, M., FLYER, D. C., GLENN, G. M., SMITH, G. E., & FRIEMAN, M. B. (2014). Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 32(26), 3169-3174.
- ÇOBAN, S., ONGUN MEHMET, S., & BOZKIR, A. (2022). Evaluation of Biodegradable Microparticles for Mucosal Vaccination Against Diphtheria Toxoid: Nasal Efficacy Studies in Guinea Pigs.
- ÇOMOĞLU, T. (2010). An overview of polymeric particulate drug delivery system formulations. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39(4), 343-368.
- D'SOUZA, S. (2014). A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1-12.
- DAI, S., WANG, H., & DENG, F. (2018). Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Journal of Immunological Sciences*, 2(2).
- DANAEI, M., DEGHANKHOLD, M., ATAEI, S., HASANZADEH DAVARANI, F., JAVANMARD, R., DOKHANI, A., KHORASANI, S., & MOZAFARI, M. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- DANHIER, F., ANSORENA, E., SILVA, J. M., COCO, R., LE BRETON, A., & PRÉAT, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505-522.

- DERMAN, S., MUSTAFAEVA, Z. A., ABAMOR, E. S., BAGIROVA, M., & ALLAHVERDIYEV, A. (2015). Preparation, characterization and immunological evaluation: canine parvovirus synthetic peptide loaded PLGA nanoparticles. *Journal of biomedical science*, 22, 1-12.
- DIAZ-ARÉVALO, D., & ZENG, M. (2020). Nanoparticle-based vaccines: opportunities and limitations. In *Nanopharmaceuticals* (pp. 135-150). Elsevier.
- DOBRZAŃSKI, L., HUDECKI, A., CHLADEK, G., KRÓL, W., & MERTAS, A. (2015). Biodegradable and antimicrobial polycaprolactone nanofibers with and without silver precipitates. *Archives of Materials Science and Engineering*, 76(1), 5-26.
- EDELMAN, R. (2000). An overview of adjuvant use. *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols*, 1-27.
- EDWIN, H. V., & ANTONY, C. S. (2023). An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. *Heliyon*.
- FONTE, P., SOARES, S., SOUSA, F., COSTA, A., SEABRA, V., REIS, S., & SARMENTO, B. (2014). Stability study perspective of the effect of freeze-drying using cryoprotectants on the structure of insulin loaded into PLGA nanoparticles. *Biomacromolecules*, 15(10), 3753-3765.
- GHAEMI, A., ASL, P. R., ZARGARAN, H., AHMADI, D., HASHIMI, A. A., ABDOLALIPOUR, E., BATHAEIAN, S., & MIRI, S. M. (2022). Recombinant COVID-19 vaccine based on recombinant RBD/Nucleoprotein and saponin adjuvant induces long-lasting neutralizing antibodies and cellular immunity. *Frontiers in Immunology*, 13.
- GONG, Y., QIN, S., DAI, L., & TIAN, Z. (2021). The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 396.
- GOTO, N., & AKAMA, K. (1982). Histopathological studies of reactions in mice injected with aluminum- adsorbed tetanus toxoid. *Microbiology and immunology*, 26(12), 1121-1132.
- GROSSEN, P., WITZIGMANN, D., SIEBER, S., & HUWYLER, J. (2017). PEG-PCL-based nanomedicines: A biodegradable drug delivery system and its application. *Journal of Controlled Release*, 260, 46-60.
- GUPTA, R. K., & SIBER, G. R. (1995). Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13(14), 1263-1276.
- GUPTA, T., & GUPTA, S. K. (2020). Potential adjuvants for the development of a SARS-CoV-2 vaccine based on experimental results from similar coronaviruses. *International immunopharmacology*, 86, 106717.
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. (2009). In (Sixth Edition ed.).
- HARRIS, J. M., MARTIN, N. E., & MODI, M. (2001). Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clinical pharmacokinetics*, 40, 539-551.

- HAVASI, A., VISAN, S., CAINAP, C., CAINAP, S. S., MIHAILA, A. A., & POP, L.-A. (2022). Influenza A, Influenza B, and SARS-CoV-2 similarities and differences—a focus on diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 13, 908525.
- HOGENESCH, H. (2013). Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 3, 406.
- HU, Y., XIE, J., TONG, Y. W., & WANG, C.-H. (2007). Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells. *Journal of Controlled Release*, 118(1), 7-17.
- İMAMOĞLU, S., DEVRİM GÖKBERK, B., ERYILMAZ, M., & BOZKIR, A. (2022). Effect of surfactant types and concentrations on levofloxacin-loaded PLGA microparticles for pulmonary delivery--An in vitro study. *Journal of Research in Pharmacy*, 26(5).
- JACKSON, C. B., FARZAN, M., CHEN, B., & CHOE, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 3-20.
- JAN, N., MADNI, A., RAHIM, M. A., KHAN, N. U., JAMSHAD, T., KHAN, A., JABAR, A., KHAN, S., & SHAH, H. (2021). In vitro anti-leukemic assessment and sustained release behaviour of cytarabine loaded biodegradable polymer based nanoparticles. *Life sciences*, 267, 118971.
- JIA, W. J., GU, Y. C., GOU, M. L., DAI, M., LI, X. Y., KAN, B., YANG, J. L., SONG, Q. F., WEI, Y. Q., & QIAN, Z. Y. (2008). Preparation of biodegradable polycaprolactone/poly (ethylene glycol)/polycaprolactone (PCEC) nanoparticles. *Drug delivery*, 15(7), 409-416.
- KALYONCU, S., YILMAZ, S., KUYUCU, A. Z., SAYILI, D., MERT, O., SOYTURK, H., GULLU, S., AKINTURK, H., CITAK, E., & ARSLAN, M. (2023). Process development for an effective COVID-19 vaccine candidate harboring recombinant SARS-CoV-2 delta plus receptor binding domain produced by *Pichia pastoris*. *Scientific reports*, 13(1), 5224.
- KAWAI, T., & AKIRA, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-384.
- KING, A. M., LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J., & CARSTENS, E. B. (2011). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9). Elsevier.
- KLEANTHOUS, H., SILVERMAN, J. M., MAKAR, K. W., YOON, I.-K., JACKSON, N., & VAUGHN, D. W. (2021). Scientific rationale for developing potent RBD-based vaccines targeting COVID-19. *npj Vaccines*, 6(1), 128.
- KNIGHTS, A. J., NUBER, N., THOMSON, C. W., DE LA ROSA, O., JÄGER, E., TIERCY, J.-M., VAN DEN BROEK, M., PASCOLO, S., KNUTH, A., & ZIPPELIUS, A. (2009). Modified tumour antigen-encoding mRNA facilitates the analysis of naturally occurring and vaccine-induced CD4 and CD8 T cells in cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy*, 58, 325-338.
- KOÇ, R. Ç., TOKYAY, B. K., YOLALAN, G., ŞEREFOĞLU, B., BALABAN, B. G., TANYERİ, Y., & İSLAMBAY, S. SARS-CoV-2'ye Karşı Geliştirilen Aşılar ve Üretim Metotları. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 4(2), 14-32.

- KOWALZIK, F., SCHREINER, D., JENSEN, C., TESCHNER, D., GEHRING, S., & ZEPP, F. (2021). mRNA-based vaccines. *Vaccines*, 9(4), 390.
- KUMAR, P., KUMAR, A., GARG, N., & GIRI, R. (2023). An insight into SARS-CoV-2 membrane protein interaction with spike, envelope, and nucleocapsid proteins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(3), 1062-1071.
- KÜÇÜKTÜRKMEN, B., ÖZ, U. C., & BOZKIR, A. (2022). Preparation and in vitro characterization of solid lipid microparticles for protein delivery. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(3), 872-882.
- LAN, J., GE, J., YU, J., SHAN, S., ZHOU, H., FAN, S., ZHANG, Q., SHI, X., WANG, Q., & ZHANG, L. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215-220.
- LETCHFORD, K., & BURT, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 65(3), 259-269.
- LEUNG, D. T. M., CHI HANG, T. F., CHUN HUNG, M., SHEUNG CHAN, P. K., CHEUNG, J. L. K., NIU, H., TAM, J. S. L., & LIM, P. L. (2004). Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *The Journal of infectious diseases*, 190(2), 379-386.
- LI, H. Y., ZHANG, B., CHAN, P. S., WENG, J., TSANG, C. K., & LEE, W. Y. T. (2018). Convergent synthesis and characterization of fatty acid-conjugated poly (ethylene glycol)-block-poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles for improved drug delivery to the brain. *European Polymer Journal*, 98, 394-401.
- LI, J., MACDONALD, J., & VON STETTEN, F. (2020). Correction: review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst*, 145(5), 1950-1960.
- LI, R., LI, X., XIE, L., DING, D., HU, Y., QIAN, X., YU, L., DING, Y., JIANG, X., & LIU, B. (2009). Preparation and evaluation of PEG-PCL nanoparticles for local tetradrine delivery. *International journal of pharmaceuticals*, 379(1), 158-166.
- LIM, B., & LEE, K. (2015). Stability of the osmoregulated promoter-derived proP mRNA is posttranscriptionally regulated by RNase III in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 197(7), 1297-1305.
- LUO, Z., JIN, L., XU, L., ZHANG, Z. L., YU, J., SHI, S., LI, X., & CHEN, H. (2016). Thermosensitive PEG-PCL-PEG (PECE) hydrogel as an in situ gelling system for ocular drug delivery of diclofenac sodium. *Drug delivery*, 23(1), 63-68.
- LUPPI, B., BIGUCCI, F., CORACE, G., DELUCCA, A., CERCHIARA, T., SORRENTI, M., CATENACCI, L., DI PIETRA, A. M., & ZECCHI, V. (2011). Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(4), 559-565.

- LURIE, N., SAVILLE, M., HATCHETT, R., & HALTON, J. (2020). Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed. *New England journal of medicine*, 382(21), 1969-1973.
- MACHHI, J., SHAHJIN, F., DAS, S., PATEL, M., ABDELMOATY, M. M., COHEN, J. D., SINGH, P. A., BALDI, A., BAJWA, N., & KUMAR, R. (2021). Nanocarrier vaccines for SARS-CoV-2. *Advanced drug delivery reviews*, 171, 215-239.
- MAGHSOUDI, A., SHOJAOSADATI, S. A., & VASHEGHANI FARAHANI, E. (2008). 5-Fluorouracil-loaded BSA nanoparticles: formulation optimization and in vitro release study. *Aaps Pharmscitech*, 9, 1092-1096.
- MALLICK, R., & DUTTARROY, A. K. (2022). Origin and structural biology of novel coronavirus (SARS-CoV-2). In *Coronavirus Therapeutics–Volume I: Basic Science and Therapy Development* (pp. 1-13). Springer.
- MARCIANI, D. J. (2003). Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug discovery today*, 8(20), 934-943.
- MCBRIDE, R., VAN ZYL, M., & FIELDING, B. C. (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, 6(8), 2991-3018.
- MEDHI, R., SRINOI, P., NGO, N., TRAN, H.-V., & LEE, T. R. (2020). Nanoparticle-based strategies to combat COVID-19. *ACS Applied Nano Materials*, 3(9), 8557-8580.
- MEDZHITOV, R., & JANEWAY JR, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, 9(1), 4-9.
- MILLA, P., DOSIO, F., & CATTEL, L. (2012). PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current drug metabolism*, 13(1), 105-119.
- MOHAMMED, R. N., TAMJIDIFAR, R., RAHMAN, H. S., ADILI, A., GHOREISHIZADEH, S., SAEEDI, H., THANGAVELU, L., SHOMALI, N., ASLAMINABAD, R., & MAROFI, F. (2022). A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19). *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 1-10.
- MUKHERJEE, S., BHATTACHARYYA, D., & BHUNIA, A. (2020). Host-membrane interacting interface of the SARS coronavirus envelope protein: Immense functional potential of C-terminal domain. *Biophysical chemistry*, 266, 106452.
- MURALIDAR, S., AMBI, S. V., SEKARAN, S., & KRISHNAN, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85-100.
- MUTHU, M. S., LEONG, D. T., MEI, L., & FENG, S.-S. (2014). Nanotheranostics– application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics*, 4(6), 660.
- NEUMAN, B. W., KISS, G., KUNDING, A. H., BHELLA, D., BAKSH, M. F., CONNELLY, S., DROESE, B., KLAUS, J. P., MAKINO, S., & SAWICKI, S. G. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of structural biology*, 174(1), 11-22.

- NOAD, R., & ROY, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in microbiology*, 11(9), 438-444.
- O'HAGAN, D. T., & VALIANTE, N. M. (2003). Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(9), 727-735.
- ORAVCZOVÁ, V., GARAIOVÁ, Z., & HIANIK, T. (2021). Nanoparticles and Nanomotors Modified by Nucleic Acids Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 47(2), 344-366.
- PANDEY, A., & YADAV, S. (2022). Essentials of COVID-19 and treatment approaches. In *Data Science for COVID-19* (pp. 397-422). Elsevier.
- PANDEY, S. C., PANDE, V., SATI, D., UPRETI, S., & SAMANT, M. (2020). Vaccination strategies to combat novel corona virus SARS-CoV-2. *Life sciences*, 256, 117956.
- PARVEEN, S., & SAHOO, S. K. (2008). Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *Journal of drug targeting*, 16(2), 108-123.
- PASARE, C., & MEDZHITOV, R. (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Mechanisms of lymphocyte activation and immune regulation X: innate immunity*, 11-18.
- PEPINI, T., PULICHINO, A.-M., CARSILLO, T., CARLSON, A. L., SARI-SARRAF, F., RAMSAUER, K., DEBASITIS, J. C., MARUGGI, G., OTTEN, G. R., & GEALL, A. J. (2017). Induction of an IFN-mediated antiviral response by a self-amplifying RNA vaccine: implications for vaccine design. *The journal of immunology*, 198(10), 4012-4024.
- PETROVSKY, N. (2015). Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug safety*, 38(11), 1059-1074.
- PHAN, H. T., & HAES, A. J. (2019). What does nanoparticle stability mean? *The Journal of Physical Chemistry C*, 123(27), 16495-16507.
- PLITNICK, L. M. (2013). Global regulatory guidelines for vaccines. In *Nonclinical development of novel biologics, biosimilars, vaccines and specialty biologics* (pp. 225-241). Elsevier.
- PRABHU, R. H., PATRAVALE, V. B., & JOSHI, M. D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International journal of nanomedicine*, 10, 1001.
- RAMAZANI, A., KERAMATI, M., MALVANDI, H., DANAFAR, H., & KHEIRI MANJILI, H. (2018). Preparation and in vivo evaluation of anti-plasmodial properties of artemisinin-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticles. *Pharmaceutical development and technology*, 23(9), 911-920.
- REED, S. G., ORR, M. T., & FOX, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature medicine*, 19(12), 1597-1608.
- ROCK, K. L., HEARN, A., CHEN, C.-J., & SHI, Y. (2005). Natural endogenous adjuvants. Springer seminars in immunopathology,

- ROLDÃO, A., MELLADO, M. C. M., CASTILHO, L. R., CARRONDO, M. J., & ALVES, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert review of vaccines*, 9(10), 1149-1176.
- SAREI, F., DOUNIGHI, N. M., ZOLFAGHARIAN, H., KHAKI, P., & BIDHENDI, S. M. (2013). Alginate nanoparticles as a promising adjuvant and vaccine delivery system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(4), 442.
- SCHOEMAN, D., & FIELDING, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*, 16(1), 1-22.
- SHAH, R. R., O'HAGAN, D. T., AMIJI, M. M., & BRITO, L. A. (2014). The impact of size on particulate vaccine adjuvants. *Nanomedicine*, 9(17), 2671-2681.
- SHANG, J., WAN, Y., LUO, C., YE, G., GENG, Q., AUERBACH, A., & LI, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11727-11734.
- SHANMUGARAJ, B., KHORATTANAKULCHAI, N., & PHOOLCHAROEN, W. (2022). SARS-CoV-2 vaccines: current trends and prospects of developing plant-derived vaccines. In *Biomedical innovations to combat COVID-19* (pp. 213-229). Elsevier.
- SHI, Y., WANG, G., CAI, X.-P., DENG, J.-W., ZHENG, L., ZHU, H.-H., ZHENG, M., YANG, B., & CHEN, Z. (2020). An overview of COVID-19. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 21(5), 343.
- SHIN, M. D., SHUKLA, S., CHUNG, Y. H., BEISS, V., CHAN, S. K., ORTEGA-RIVERA, O. A., WIRTH, D. M., CHEN, A., SACK, M., & POKORSKI, J. K. (2020). COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. *Nature nanotechnology*, 15(8), 646-655.
- SILVEIRA, M. M., MOREIRA, G. M. S. G., & MENDONÇA, M. (2021). DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. *Life sciences*, 267, 118919.
- SINGH, M., & O'HAGAN, D. T. (2002). Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research*, 19, 715-728.
- SINGH, S., KUMAR, R., & AGRAWAL, B. (2019). Adenoviral vector-based vaccines and gene therapies: Current status and future prospects. *Adenoviruses*, 4, 53-91.
- SINHA, V., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., & TREHAN, A. (2004). Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 278(1), 1-23.
- SMITH, P. E., KROHN, R. I., HERMANSON, G., MALLIA, A., GARTNER, F., PROVENZANO, M., FUJIMOTO, E., GOEKE, N., OLSON, B., & KLENK, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- TAI, W., HE, L., ZHANG, X., PU, J., VORONIN, D., JIANG, S., ZHOU, Y., & DU, L. (2020). Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus:

implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cellular & molecular immunology*, 17(6), 613-620.

- TIBONI, M., CASETTARI, L., & ILLUM, L. (2021). Nasal vaccination against SARS-CoV-2: Synergistic or alternative to intramuscular vaccines? *International journal of pharmaceutics*, 603, 120686.
- TOPAL, G. R., KÜÇÜKTÜRKMEN, B., ÖZ, U. C., ÖZKAN, E., BAKAR-ATES, F., & BOZKIR, A. (2023). Investigation on formulation parameters of donepezil HCl loaded solid lipid nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59, e22330.
- TORRES, J., WANG, J., PARTHASARATHY, K., & LIU, D. X. (2005). The transmembrane oligomers of coronavirus protein E. *Biophysical journal*, 88(2), 1283-1290.
- TRACKER, C. V. (2023). *Approved Vaccines*. Retrieved COVID19 VACCINE TRACKER from <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/#vaccine-list>
- TSAI, T. F. (2013). Flud®-MF59®-adjuvanted influenza vaccine in older adults. *Infection & chemotherapy*, 45(2), 159-174.
- UEHARA, E. U., SHIDA, B. D. S., & DE BRITO, C. A. (2015). Role of nitric oxide in immune responses against viruses: beyond microbicidal activity. *Inflammation Research*, 64, 845-852.
- VAN RIEL, D., & DE WIT, E. (2020). Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature materials*, 19(8), 810-812.
- VEMULA, S. V., & MITTAL, S. K. (2010). Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert opinion on biological therapy*, 10(10), 1469-1487.
- VIJAYANAND, S., PATIL, S., MENON, I., BRAZ GOMES, K., KALE, A., BAGWE, P., UDDIN, M. N., ZUGHAIER, S. M., & D'SOUZA, M. J. (2023). An Adjuvanted Inactivated SARS-CoV-2 Microparticulate Vaccine Delivered Using Microneedles Induces a Robust Immune Response in Vaccinated Mice. *Pharmaceutics*, 15(3), 895.
- WADHWA, G., KRISHNA, K. V., DUBEY, S. K., & TALIYAN, R. (2021). Development and validation of RP-HPLC method for quantification of repaglinide in mPEG-PCL polymeric nanoparticles: QbD-driven optimization, force degradation study, and assessment of in vitro release mathematic modeling. *Microchemical Journal*, 168, 106491.
- WALKER, J. M. (2002). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *The protein protocols handbook*, 61-67.
- WALKER, J. M. (2009). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, 11-15.
- WANG, F., KREAM, R. M., & STEFANO, G. B. (2020). An evidence based perspective on mRNA-SARS-CoV-2 vaccine development. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e924700-924701.

- WANG, J., YIN, X.-G., WEN, Y., LU, J., ZHANG, R.-Y., ZHOU, S.-H., LIAO, C.-M., WEI, H.-W., & GUO, J. (2022). MPLA-adjuvanted liposomes encapsulating S-trimer or RBD or S1, but not S-ECD, elicit robust neutralization against SARS-CoV-2 and variants of concern. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(4), 3563-3574.
- WEINGARTL, H., CZUB, M., CZUB, S., NEUFELD, J., MARSZAL, P., GREN, J., SMITH, G., JONES, S., PROULX, R., & DESCHAMBAULT, Y. (2004). Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *Journal of virology*, 78(22), 12672-12676.
- WHO. (2021). *The different types of COVID-19 vaccines*. Retrieved 25.02.2023 from <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>
- WHO. (2023a). *COVID-19 vaccine tracker and landscape*. Retrieved 18.01.2023 from <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- WHO. (2023b). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. World Health Organization. Retrieved 18.01.2023 from <https://covid19.who.int/>
- XIA, S., LIU, M., WANG, C., XU, W., LAN, Q., FENG, S., QI, F., BAO, L., DU, L., & LIU, S. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell research*, 30(4), 343-355.
- YADAV, D. K., YADAV, N., & KHURANA, S. M. P. (2020). Vaccines: present status and applications. In *Animal biotechnology* (pp. 523-542). Elsevier.
- YANG, D. (2021). Application of nanotechnology in the COVID-19 pandemic. *International journal of nanomedicine*, 16, 623.
- YANG, Z.-Y., KONG, W.-P., HUANG, Y., ROBERTS, A., MURPHY, B. R., SUBBARAO, K., & NABEL, G. J. (2004). A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*, 428(6982), 561-564.
- YOUSSEF, F. S., EL-BANNA, H. A., ELZORBA, H. Y., & GALAL, A. M. (2019). Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *International journal of veterinary science and medicine*, 7(1), 78-93.
- YUAN, M., WU, N. C., ZHU, X., LEE, C.-C. D., SO, R. T., LV, H., MOK, C. K., & WILSON, I. A. (2020). A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*, 368(6491), 630-633.
- YURDAKÖK, K., & İNCE, T. (2008). Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51(4), 225.
- ZENG, W., LIU, G., MA, H., ZHAO, D., YANG, Y., LIU, M., MOHAMMED, A., ZHAO, C., YANG, Y., & XIE, J. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 527(3), 618-623.

- ZHANG, J., XIAO, T., CAI, Y., & CHEN, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current opinion in virology*, 50, 173-182.
- ZHANG, J., ZENG, H., GU, J., LI, H., ZHENG, L., & ZOU, Q. (2020). Progress and prospects on vaccine development against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 8(2), 153.
- ZHANG, L., HU, Y., JIANG, X., YANG, C., LU, W., & YANG, Y. H. (2004). Camptothecin derivative-loaded poly (caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly (caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *Journal of Controlled Release*, 96(1), 135-148.
- ZHANG, N., CHANNAPPANAVAR, R., MA, C., WANG, L., TANG, J., GARRON, T., TAO, X., TASNEEM, S., LU, L., & TSENG, C.-T. K. (2016). Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cellular & molecular immunology*, 13(2), 180-190.
- ZHU, M., WANG, R., & NIE, G. (2014). Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(9), 2761-2774.
- ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W., LI, X., YANG, B., SONG, J., ZHAO, X., HUANG, B., SHI, W., & LU, R. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*.