



# Peptit Temelli Aşı Üretim Stratejileri

## Peptide Based Vaccine Strategies

Semra AYDIN(iD), Gamze VARAN(iD), Serhat ÜNAL(iD)

Hacettepe Üniversitesi Aşı Enstitüsü, Aşı Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Makale atfı:** Aydın S, Varan G, Ünal S. Peptit temelli aşı üretim stratejileri. FLORA 2022;27(2):189-95.

### ÖZ

Sentetik peptitler proteinlerin bağlama kapasiteleri, proteolitik aktiviteleri, immünojeniteleri gibi özelliklerinin kolaylıkla çalışılabilir olduğu sistemlerdir. Patojenlere ait nükleotid/aminoasit sekans verisini temel alarak belirlenen B ve T hücre epitoplari ile hem hücresel hem de humoral immüniteyi uyarak spesifik koruyucu bağışıklık yanıtı oluşturabilen aşı adaylarının geliştirilmesine olanak sağlarlar. Güvenli, biyoyumlu ve fiyat efektif olmalarına rağmen immünojenite kapasiteleri düşüktür ve enzimatik bozulmaya karşı hassaslardır. Multiepitop yaklaşımı ve uygun bir adjuvan/taşıyıcı sistem ile sentetik peptitlerin immünojenite kapasiteleri artırılarak etkili ve kararlı aşılardan geliştirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Sentetik peptit aşılardan; Multiepitop yaklaşımı

### ABSTRACT

## Peptide Based Vaccine Strategies

Semra AYDIN, Gamze VARAN, Serhat ÜNAL

Department of Vaccine Technology, Hacettepe University Vaccine Institute, Ankara, Türkiye

Synthetic peptides are easy tool to investigate binding capacities, proteolytic activities and immunogenicity properties of proteins. They enable the development of vaccine candidates that can create a specific protective immune response by stimulating both cellular and humoral immunity with the B and T cell epitopes determined based on the nucleotide/amino acid sequence data of the pathogens. Although they are safe, biocompatible, and cost-effective, they have low immunogenicity capacities and are susceptible to enzymatic degradation. Effective and stable vaccines can be developed by increasing the immunogenicity capacities of synthetic peptides with a multiepitope approach and an appropriate adjuvant/carrier system.

**Key Words:** Synthetic peptide vaccine; Multiepitope approach

## GİRİŞ

Aşılama hastalıklara karşı immünolojik bir hafıza oluşturmak amacıyla uygulanan en etkili halk sağlığı koruma yöntemidir. Tüm dünyada her yıl 100 milyondan fazla çocuk geçmişte salgınlara sebep olan ve ölüm dahil birçok ciddi tıbbi durumla ilişkilendirilen hastalıklar için aşılanmaktadır. Küresel olarak uygulanan aşilar arasında kızamık, kabakulak, kızamıkçık, mevsimsel grip virüsü, tetanoz, çocuk felci, Hepatit B, rahim ağzi kanseri, difteri, boğmaca ve diğerleri yer almaktadır. Bu aşiların çoğunlukla mikrobiyal patojenin (virüs, bakteri vb.) inaktif veya zayıflatılmış formlarından oluşan aşilar oldukları ve antijen spesifik bağışıklık yanıtını indükleyerek konakçıyı tekrarlayan infeksiyonlara karşı korudukları görülmektedir. Tüm patojeni içeren geleneksel aşiların güçlü ve uzun süreli immünojenite oluşturma kapasitelerine rağmen, öngörülemeyen yan etki potansiyelleri bu aşiların en önemli dezavantajlarıdır. Patojenin tamamının kullanıldığı bu aşı sistemlerinde, aşı formülasyonu onlarca hatta yüzlerce protein içerebilmektedir. Oysa koruyucu bağışıklık yanıtı az sayıda seçilmiş protein tarafından oluşturulmaktadır. Geriye kalan proteinler ise bağışıklık yanıtı için gerekli olmadıkları gibi alerjik reaksiyonların oluşmasına sebep olabilirler. Bu sebeplerdirki 21. yüzyıl aşı çalışmalarında; hedef patojenin yalnızca antijenik proteinlerini veya epitoplarını temel alan rekombinant DNA teknolojisi, rasyonel aşılama, yapısal biyoloji, konjuge aşilar, yeni nesil teknolojiler, ters aşılama (*revers vaccinology*) ve epitop bazlı aşı tasarımı gibi konular önem kazanmıştır [1-4].

İnsan vücudunda aşı yoluyla bağışıklık sağlayabilmek için, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin patojenin istilasını tanıyabilmesi, anlayabilmesini gerektirir. Antijen sunan hücrelerin (APCs) pattern tanıma reseptörleri [pattern recognition receptors (PRRs)] aracılığı ile tehlike sinyallerini tanınması, stimülatör moleküllerin ve sitokinlerin salınmalarının sağlanması gereklidir. PRRs tehlike ilişkili moleküler paternleri (DAMPs) ya da moleküler patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) tanıyarak işlev görürler. PAMPs orjin mikroorganizmanın flagella, lipopolisakkaritler (LPS), hücre duvarı proteinleri, tek zincirli RNA (ssRNA), endozomal RNA reseptörleri ya da çift-zincirli RNA (dsRNA), DNA gibi çeşitli molekülleri olabilir [3,5].

Genetik, biyoloji, kimya gibi bilim dallarında gelişen teknolojiler ile gen/protein ekspresyon seviyesinin belirlenmesi, DNA/RNA sekans analizleri, mikroRNAs ve çeşitli metabolik yollar hakkında veri elde edilebilmektedir. Patojenin genetik/antijenik çeşitliliği düşünüldüğünde, patojen ve konakçı arasındaki ilişkinin açığa çıkarılmasını sağlayan genomik yaklaşımlar, sekans analizleri vb teknolojiler oldukça karmaşık olan aşı geliştirme süreçlerinde epitop temelli aşı dizaynına yön göstermektedir [6-8]. Sentetik peptit temelli aşı geliştirme çalışmaları temel olarak; immünolojik olarak aktif peptit fragmentlerinin (epitopların) belirlenmesi, formülasyonu ve taşıyıcı ile konjugasyonu, in vitro-in vivo analizler ile güvenlik ve etkililik (spesifik koruyucu antikor yanıtlarının gösterilmesi) özelliklerinin kanıtlanması alt basamaklarını kapsayan araştırma geliştirme aşaması, üretim-bitmiş ürün kontrolleri, aday aşının prelinik-klinik araştırma basamakları olarak sınıflandırılabilir [9]. Bu derleme çalışmasında sentetik peptit aşilarında Ar-Ge aşamasına odaklanılacaktır.

### Antijenik Epitopların Belirlenmesi ve Kimyasal Sentezi

Klinik olarak etkili sentetik peptit aşısı üretilebilmenin en önemli yönü optimal hedef antijeni belirleyebilmektir. Bu amaçla, patojenlere ait nükleotit/aminoasit sekans verisinin elde edilebilmesi ve potansiyel olarak antijenik proteinleri kodlayan gen bölgelerinin *in silico* olarak belirlenebilmesi bu aşı yaklaşımının temelini oluşturmaktadır. Motif temelli sistemler, QSAR (hesaplanabilir yapı-aktivite ilişki analizi/*quantitative structure-activity relationship analysis*), *structure based*, Hidden Markov models (HMMs) vb. modern bilgisayar yazılım teknolojileri, immünolojik özelliklere sahip antijenik proteinlerin belirlenmesine, konakçı ile ilişki tahminlerinin yapılmasına ve uzun süreli immünete hedefleyen aşı geliştirme süreçlerine olanak sağlamaktadır [10,11]. Epitoplar patojen organizmanın yüzeyinde bulunan, konakçı antikorları tarafından tespit edilebilen ve bağışıklıkta önemli rolleri olan antijenik belirteçlerdir. Epitop haritalama yöntemi; koruyucu bağışıklık yanıtının süresi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu bilinen B ve T hücre yanıtlarını temel alarak, *in silico* tahminler ile antijenik epitopların belirlenmesine ve muhtemel yeni aşiların geliştirilmesine katkıda bulunur [12,13]. Bağışıklığın temelini oluşturan antijen/antikor iliş-

kisi yani bağlanma B hücre epitoplari aracılığı ile sağlanır. B hücre epitoplari antijenik proteinin spesifik yüzey bölgesinde bulunurlar, kısa linear ve üç boyutlu konformasyonel epitoplari olmak üzere iki farklı tipi bulunabilir. Aşı çalışmalarında daha yaygın kullanılan linear B hücre epitoplariının tahmini için Preditope, People Bepitope ve BcePred gibi çeşitli yazılımlar kullanılmaktadır<sup>[14-17]</sup>.

B hücre aracılı hümmoral immünite infeksiyonlara karşı koruma sağlasa da T hücrelerinin doğrudan patojenin kendisinin veya infekte olmuş konakçı hücrelerin temizlenmesini sağlayarak, infeksiyonların yayılmasını önledikleri bilinmektedir. T hücre reseptörleri (TCR), APCs üzerinde yer alan temel histokompabilite kompleksleri olan MHC I ve MHC II üzerindeki peptitlere bağlanarak T hücrelerinin epitop özgüllüğünü oluştururlar<sup>[18]</sup>. Patojene ait tüm eksozom sekansını temel alan NeoPredPipe, MuPeXI, pVAC-Seq, ve CloudNeo veri algoritmalar, antijen türevli peptitlerin immünojenite kabiliyetleri tahmin ederek, T hücreleri tarafından tanınabilen epitoplariın araştırılmasında kullanılır<sup>[19-21]</sup>. CD4<sup>+</sup> ve CD8<sup>+</sup> T hücre epitoplariının belirlenebilmesinin yanında, peptit uzunluğu da önemli bir faktördür. Uzun aşı peptitleri herhangi bir ek prosese ihtiyaç duymaksızın somatik hücrelerin HLA I moleküllerine ve APCs direkt olarak bağlanabilir ve böylece T hücrelerinin indüksiyonunu sağlayabilir<sup>[22,23]</sup>.

### Formülasyonu ve Taşıyıcı ile Konjugasyonu

Peptit temelli aşılarında bağışıklık tepkisini uyararak için adjuvan eklenmesi zorunludur. Temel olarak, immün yanıtın uyarılabilmesi için vücuda giren patojenin (antijen), antijenik epitoplariının açığa çıkarılması ve immün sistem hücrelerine sunulması gerekmektedir. Ancak, aşıda kullanılan peptit epitoplariı tek başlarına immün sistemi uyararak için yeterli değildir. Çünkü aşı üretiminde peptit saflaştırma aşamasında immün sistemi uyararak patojen ilişkili moleküler paternler (PAMP) kaybedilir veya peptitler tamamen sentetik yollarla üretildikleri için yapılarında PAMP'lar bulunmaz. Bu nedenle peptit temelli aşı geliştirilirken, formülasyona güçlü adjuvanların dahil edilmesi gerekmektedir<sup>[24]</sup>. Bunun yanı sıra aşı formülasyonunda kullanılan antijen epitoplariının boyutları çok küçük olduğu için organizmada bulunan ve katlanmış

proteinlere kıyasla enzimatik degradasyona karşı çok hassastırlar. Bu nedenle taşıyıcı sisteme de sıklıkla ihtiyaç duyulmaktadır<sup>[25]</sup>.

Aşılar için yeni adjuvanlar geliştirmeye yönelik kapsamlı araştırmalara rağmen, lisanslı aşılarında kullanım için yalnızca birkaç adjuvan onaylanmıştır. Peptit temelli aşı tasarımı için uygun bir adjuvan seçimi indüklenmesi gereken bağışıklık tipine göre yapılır.

Peptit temelli aşılarında en sık kullanılan adjuvan alüminyum tuzları (alum)dır. Beşeri aşılarında kullanım için lisanslı olan alum, hidroksit veya fosfat formunda kullanılabilirler. Antijenin alum ile birlikte verilmesinin ardından enjeksiyon bölgesinde makrofajlarca zengin bir granülom oluşur. Antijen bu granülom içinden uzun sürede ve yavaş salınır. Bu sayede uzun süreli antijenik etki oluşur. Son yıllarda alum yerine alüminyum hidroksit nanopartikülleri de peptit temelli aşıların formülasyonunda kullanılmaktadır. Alüminyum hidroksit nanopartikülleri, ticari olarak istenilen boyutta temin edilebilmesi, enjeksiyon bölgesinde iritasyonda azalma, sterilizasyon kolaylığı gibi üstünlükleri nedeniyle tercih edilmektedir<sup>[26]</sup>.

Peptit temelli aşı formülasyonlarında kullanılan bir başka adjuvan türü olan emülsiyonlar, su içinde yağ (y/s) ve yağ içinde su (s/y) olmak üzere temelde iki çeşittir. MF59, beşeri aşılarında kullanımı onaylı yaklaşık 160 nm partikül büyüklüğüne sahip y/s emülsiyonudur. Bileşimi bir terpenoid kolesterol öncüsü olan skualen, yüzey aktif madde sorbitan trioleat (Span 85) ve polioksi etilen sorbiton mono-oleat'tan (Tween 80) oluşur<sup>[27]</sup>. Bir başka y/s tipi emülsiyon yapıdaki adjuvan ise yapısında alfa tokoferol (E vitamini) bulunan AS03'tür. Yapısında bulunan E vitamininin sahip olduğu immünmodülasyon etkisi sayesinde peptit temelli aşılar için oldukça ümit verici adjuvan sistemlerdir<sup>[28]</sup>. Yağ içinde su emülsiyon adjuvanlar ise daha uzun süreli antijen salımı sağladıkları için enjeksiyon bölgesinde depo etkisi sağlamak amacıyla sıklıkla tercih edilirler. Bunlara en iyi bilinen örnek Freund's adjuvanıdır. CFA (Complete Freund's adjuvant) ve IFA (Incomplete Freund's adjuvant) olmak üzere iki çeşittir. Her iki türü de yağ fazı olarak mineral yağ (Marcol 52) ve sürfaktan olarak da disnhidromannitol monooleat (Arlacel A) içerir. İki formülasyon arasındaki fark

ise CFA'nın ek olarak inaktive edilmiş *Mycobacterium tuberculosis* içermesidir.<sup>[29]</sup>

Adjuvanların yanı sıra biyobozunur, biyoyumlu, toksik olmayan ve mümkünse mukoadezif taşıyıcı sistemler, peptit temelli aşılarda etkinliğini ve güvenliğini artırmak için sıklıkla araştırılmaktadır. Aşılar taşıyıcı sistemlerin kullanılmasının en temel iki nedeni vardır. Bunlardan birincisi peptit epitoplara enzimatik degradesyondan ve fizyolojik ortamdan koruma ikincisi ise hem peptit antijenlerini hem de adjuvanları immün sistem hücrelerine eş zamanlı olarak sunmaktır. Peptit antijenlerinin immünojenitesi zayıf olduğundan taşıyıcı sistemlerinin kullanılması, peptit antijenlerine karşı bağışıklık tepkisini güçlendirmede oldukça önemlidir. Ayrıca ISCOM (*Immunostimulatory complex*) gibi bazı taşıyıcı sistemlerin kendilerinin adjuvan özelliğine sahip olmasından dolayı harici bir adjuvan kullanımına gerek kalmadan immün sistemi uyarabilmeleri özellikleri nedeniyle de dikkat çekmektedirler. ISCOM; antijen, kolesterol, fosfolipit ve saponin içeren yaklaşık 40 nm partikül büyüklüğüne sahip kafes benzeri nanoyapılardır. Hem hücre hem de hücre dışı bağışıklığı indükler. Yapısal olarak ISCOM'a benzeyen ancak antijen içermeyen ISCOMATRIX™ ise sadece hücre dışı bağışıklığı indüklemektedir. Her iki formülasyon da antijen için taşıyıcı sistem olmanın yanı sıra bileşiminde bulunan saponin sayesinde güçlü birer adjuvandır.<sup>[30]</sup> Etkili bir adjuvan olan saponin aynı zamanda hemolize de neden olduğu için beşeri aşı formülasyonlarında kullanımı sınırlanmıştır. Ancak ISCOM ve ISCOMATRIX, yapılarında bulunan saponinin toksisitesini önemli ölçüde azaltmışlardır ve yeni aşı formülasyonları için ideal bir taşıyıcı adaydırlar.<sup>[31]</sup>

### Spesifik Koruyucu Antikor Yanıtı

Sentetik peptitlerin, konakçının kromozom yapısına entegre olmamaları, ucuz, kolay üretilebilmeleri, kimyasal olarak stabil olmaları ve advers reaksiyonlara sebep olmaksızın T ve B hücre epitoplara ile hastalığa özgü koruyucu immün yanıtı uyartabilme kabiliyetleri ile aşı geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar.<sup>[32]</sup> Güvenli ve etkili aşı geliştirebilmek için karakterize edilen epitoplara nötralizan antikor ve hücre dışı immünojeniteyi teşvik edebilmesi gerekmektedir. Sentetik peptit aşıları oldukça güvenli, biyoyumlu olmalarına ve üretim maliyetleri diğer aşılar ile karşılaştırıl-

dıklarında ucuz olmalarına rağmen immünojenite kapasiteleri düşüktür ve enzimatik bozulmaya karşı hassaslardır. İmmünojenitelerini etkileyen faktörler arasında peptit uzunluğu önemli bir faktördür. 15 mer uzunluğundaki kısa sentetik peptitlerin, daha uzun 30-35 mer civarındaki sentetik peptitlere göre bu kapasitelerinin daha az olduğu görülmektedir.<sup>[33,34]</sup> Dolayısıyla sentetik epitoplara uzunluğu ile immünojenite arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur. Kısa peptitler minimal Tc epitoplara ilerirler ve APC lerde herhangi bir işleme gerek olmaksızın doğrudan MHC moleküllerine bağlanırken, Tc epitoplara içeren uzun peptitler ise MHC I moleküllerine sunulmadan önce APC lerde proteozomal bir süreçten geçerler. İnsan papilloma virüsü, ovalbümin veya adenovirüs gibi çeşitli antijenlerle yapılan çalışmalar ile minimal Tc epitoplara içeren kısa peptitler ile Tc epitoplara içeren daha uzun peptitler karşılaştırıldığında, uzun olan hücre dışı immünojeniteyi uyarma açısından daha etkili oldukları görülmüştür.<sup>[35,36]</sup> Multiepitop stratejisi sentetik peptit aşılarında immünojeniteyi artırmak amacıyla kullanılan diğer bir stratejidir. Farklı protein altbirimlerine ait CD8<sup>+</sup> T hücre epitoplara, CD4<sup>+</sup> epitopu ve B hücre epitopu içeren Hepatit C aşı adayının Balb/c farelerde spesifik HCV IgG1 ve IgG2a antikorlarının oluşumunu sağladığı ve IFN-Gama seviyesini artırdığı ve uzun süreli immün yanıt oluşturduğu görülmüştür.<sup>[37]</sup> Patojenlerin farklı protein alt ünitelerine ait Tc epitoplara da içeren multiepitop aşı adaylarının daha etkili oldukları çeşitli araştırmalar ile gösterilmiştir.<sup>[38,39]</sup> Klinik araştırma aşamasına ulaşan çalışmalar 'sentetik peptit aşıları' başlığı ile araştırıldığında çeşitli hastalıklar için geliştirilen 25 farklı aşı çalışmasının yer aldığı görülmektedir. (<https://www.clinicaltrials.gov/>). Bu araştırmalardan 14 tanesinin Faz 1 aşamasında, 10 tanesinin Faz 2 aşamasında bir tanesinin ise Faz 3 klinik araştırma safhasında olduğu görülmektedir (Tablo 1).

Sonuç olarak, sentetik peptitler hem hücre dışı hem de hücre dışı immünojeniteyi hedef alabilen, uygun bir adjuvan veya taşıyıcı sistem (emülsiyon, lipid, nanopartikül) ile geliştirilecek immünojenite kabiliyetleri ile güvenli, biyoyumlu, fiyat etkin, etkili ve uzun süreli bağışıklık sağlama muhtemel yeni aşıların geliştirilmesine katkı sağlayabilecek aşı sistemleridirler.

**Tablo 1. Klinik araştırma aşamasındaki sentetik peptit aşılı**

| Hastalık  | Klinik Faz  | Clinical Trials.gov Kodu |
|---|-------------|--------------------------|
| Kolorektal kanser   | Erken Faz 1 | NCT00091286              |
| SARS-CoV-2 enfeksiyonu  | Faz 1       | NCT05113862              |
| Denge Virüs   | Faz 1       | NCT04935801              |
| Falciparum sıtma  | Faz 1       | NCT00400101              |
| Sıtma, Vivax  | Faz 1       | NCT01081847              |
| Meme kanseri  | Faz 1       | NCT00304096              |
| Yumurtalık, Melanom, Renal ve 19 hastalık daha                          | Faz 1       | NCT00423254              |
| HIV enfeksiyonları  | Faz 1       | NCT00002428              |
| HIV enfeksiyonları  | Faz 1       | NCT00001060              |
| HIV enfeksiyonları  | Faz 1       | NCT00000775              |
| Üçlü negatif meme kanseri, meme neoplazmaları                           | Faz 1       | NCT02427581              |
| Sıtma   | Faz 1       | NCT01949909              |
| Edinilmiş immün yetmezlik sendromu, HIV enfeksiyonu                     | Faz 1       | NCT00001386              |
| Melanom (Deri)  | Faz 1       | NCT00003224              |
| Göz içi melanom, Melanom (Deri)   | Faz 1-2     | NCT00089219              |
| Sıtma   | Faz 2       | NCT00652275              |
| Yumurtalık kanseri  | Faz 2       | NCT00844506              |
| Kronik miyeloid lösemi, minimal kalıntı hastalık                        | Faz 2       | NCT00267085              |
| Fallop tüpü kanseri, yumurtalık kanseri, primer periton boşluğu kanseri | Faz 2       | NCT00373217              |
| Lösemi  | Faz 2       | NCT00428077              |
| Melanom   | Faz 2       | NCT00928902              |
| Melanom   | Faz 2       | NCT00938223              |
| Melanom (Deri)  | Faz 2       | NCT00089193              |
| Göz içi melanom, Melanom (Deri)   | Faz 2       | NCT00089206              |
| Melanom (Deri)  | Faz 3       | NCT02993315              |

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

### KAYNAKLAR

1. Cable J, Srikantiah P, Crowe JE, Pulendran B, Hill A, Ginsberg A, et al. Vaccine innovations for emerging infectious diseases-A symposium report. *Ann N Y Acad Sci* 2020;1462:14-26. <https://doi.org/10.1111/nyas.14235>
2. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M, Understanding modern-day vaccines: What you need to know, *Ann Med* 2018;50:110-20. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>
3. O'Neill CL, Shrimali PC, Clapacs ZP, Files MA, Rudra JS. Peptide-based supramolecular vaccine systems. *Acta Biomater* 2021;133:153-67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.003>
4. Global Vaccine Action Plan 2011-2020; World Health Organization, Available from: [https://www.who.int/immunization/global\\_vaccine\\_action\\_plan/GVAP\\_doc\\_2011\\_2020/en/](https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/); (Accessed date: 14/01/22).
5. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012;249(1):158-75. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x>
6. Slifka MK, Amanna I. How advances in immunology provide insight into improving vaccine efficacy. *Vaccine* 2014;32(25):2948-57. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.078>
7. Rappuoli R, Aderem AA. vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature* 2020;2011:463-69. <https://doi.org/10.1038/nature10124>
8. Paladino A, Marchetti F, Rinaldi S, Colombo G. Protein design: From computer models to artificial intelligence. *Wiley Interdiscip Rev: Comput Mol Sci* 2017;7:e1318. <https://doi.org/10.1002/wcms.1318>

9. Moisa AA, Kolesanova EF. Synthetic peptide vaccines. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2010;4(4):321-32. <https://doi.org/10.1134/S1990750810040025>
10. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J Biomed Inform* 2015;53:405-14. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
11. Sherman AC, Mehta A, Dickert NW, Anderson EJ, Rouphael N. The future of flu: A review of the human challenge model and systems biology for advancement of influenza vaccinology. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:107. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00107>
12. Pyclik M, Gorska S, Brzozowska E, Dobrut A, Ciekot J, Gamin A, Brzychczy-Włoch M. Epitope mapping of streptococcus agalactiae elongation factor tu protein recognized by human sera. *Front Microbiol* 2018;9:125. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00125>
13. Araújo CL, Alves J, Nogueira W, Pereira LC, Gomide AC, Ramos R, et al. Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. *Gene* 2019;702:36-45. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.03.049>
14. Davies MN, Flower DR. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. *Drug Discov Today* 2007;12:389-95. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.03.010>
15. Odorico M, Pellequer JL. BEPITOPE: Predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. *J Mol Recognit* 2003;16:20-2. <https://doi.org/10.1002/jmr.602>
16. Alix AJ. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine* 1999;18:311-4. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00329-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00329-1)
17. Saha S, Raghava GP. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins* 2006;65:40-8. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>
18. Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-based vaccines: Current progress and future challenges. *Chem Rev* 2020;120(6):3210-29. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472>
19. Schenck RO, Lakatos E, Gatenbee C, Graham TA, Anderson ARA. NeoPredPipe: high-throughput neoantigen prediction and recognition potential pipeline. *BMC Bioinformatics* 2019;20:264.
20. Bjerregaard AM, Nielsen M, Hadrup SR, Szallasi Z, Eklund AC. MuPeXI: Prediction of neo-epitopes from tumor sequencing data. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66:1123-30. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2001-3>
21. Bais P, Namburi S, Gatti DM, Zhang X, Chuang J. H. Cloud-Neo: A cloud pipeline for identifying patient-specific tumor neoantigens. *Bioinformatics* 2017;33:3110-2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx375>
22. Bijker MS, van den Eeden SJF, Franken KL, Melief CJM, Offringa R, van der Burg SH. CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *Immunol* 2007;179:5033-40.
23. Nelde A, Rammensee HG, Walz JS. The Peptide Vaccine of the Future. *Mol Cell Proteomics* 2021;20:100022. <https://doi.org/10.1074/mcp.R120.002309>
24. Azmi F, Fuaad AHA, Skwarczynski M, Toth I. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2014;10:778-96. <https://doi.org/10.4161/hv.27332>
25. Di Natale C, La Manna S, De Benedictis I, Brandi P, Marasco D. Perspectives in peptide-based vaccination strategies for syndrome coronavirus 2 pandemic. *Front Pharmacol* 2020;11:578382. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.578382>
26. Raponi A, Brewer JM, Garside P, Laera D. Nanoalum adjuvanted vaccines: Small details make a big difference. *Semin Immunol* 2021;56:101544. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2021.101544>
27. O'Hagan DT. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(5):699-710. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.5.699>
28. Cohet C, van der Most R, Bauchau V, Bekkat-Berkani R, Doherty TM, Schuind A, et al. Safety of AS03-adjuvanted influenza vaccines: A review of the evidence. *Vaccine* 2019;37(23):3006-21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.048>
29. Colavecchia SB, Jolly A, Fernández B, Fontanals AM, Fernández E, Mundo SL. Effect of lipoarabinomannan from *Mycobacterium avium* subsp *avium* in Freund's incomplete adjuvant on the immune response of cattle. *Braz J Med Biol Res* 2012;45(2):139-46. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500012>
30. Sun HX, Xie Y, Ye YP. ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine* 2009;27(33):4388-401. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.05.032>
31. de Groot C, Müller-Goymann CC. saponin interactions with model membrane systems - langmuir monolayer studies, hemolysis and formation of ISCOMs. *Planta Med* 2016;82(18):1496-512. <https://doi.org/10.1055/s-0042-118387>
32. Curtidor H, Reyes C, Bermúdez A, Vanegas M, Varela Y, Patarroyo ME. Conserved binding regions provide the clue for peptide-based vaccine development: A chemical perspective. *Molecules* 2017;22(12):2199. <https://doi.org/10.3390/molecules22122199>
33. Holenya P, Lange PJ, Reimer U, Woltersdorf W, Panterodt T, Glas M, et al. Peptide microarray-based analysis of antibody responses to SARS-CoV-2 identifies unique epitopes with potential for diagnostic test development. *Eur J Immunol* 2021;51(7):1839-49. <https://doi.org/10.1002/eji.202049101>

34. Zhang BZ, Hu YF, Chen LL, Yau T, Tong YG, Hu JC, et al. Mining of epitopes on spike protein of SARS-CoV-2 from COVID-19 patients. *Cell Res* 2020;(8):702-4. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0366-x>
35. Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH. CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. *J Immunol* 2007;179:5033-40.
36. Ghaffari-Nazari H, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR, Tahaghoghi Hajghorbani S, Masoumi E, Jalali SA. Improving multi-epitope long peptide vaccine potency by using a strategy that enhances CD4+ T help in BALB/c Mice. *PLoS One* 2015;10:e0142563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142563>
37. Pishraft Sabet L, Taheri T, Memarnejadian A, Azad TM, Asgari F, Rahimnia R, et al. Immunogenicity of multi-epitope DNA and peptide vaccine candidates based on core, E2, NS3 and NSSB HCV Epitopes in BALB/c Mice. *Hepat Mon* 2014;14:e22215. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.22215>
38. Bae J, Smith R, Daley J, Mimura N, Tai YT, Anderson KC, et al. Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: A potential therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Clin Cancer Res* 2012;18(17):4850-60. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2776>
39. Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, Mutoh S, Okabe N, Yaginuma H, et al. Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer. *J Transl Med* 2013;11:97. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-97>

#### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Semra AYDIN

Hacettepe Üniversitesi, Aşı Enstitüsü,

Aşı Teknolojisi Anabilim Dalı,

Ankara-Türkiye

E-posta: semra.aydin@hacettepe.edu.tr