

Aşı Teknolojisinde Yeni Umudlar: mRNA Aşıları

New Hopes in Vaccine Technology: mRNA Vaccines

Engin YILMAZ (ID)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Emekli Öğretim Üyesi, Ankara.
Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Emeritus, Ankara, Turkey.

Makale Atfı: Yılmaz E. Aşı teknolojisinde yeni umudlar: mRNA aşıları. Mikrobiyol Bul 2021;55(2):265-284.

ÖZ

Geleneksel virüs aşılarının en büyük dezavantajı, geliştirilmesindeki zaman kısıtlılığı ve geniş ölçekli üretimdeki güçlüklerdir. Bu nedenle, daha güçlü ve çok yönlü aşı platformlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. mRNA aşıları; yüksek potansiyeli, hızlı geliştirme kapasitesi, düşük maliyetli üretim ve güvenli uygulama potansiyeli nedeniyle geleneksel aşı yaklaşımlarına ümit verici bir alternatif oluşturmaktadır. Başarılı bir RNA aşısı için mRNA'nın kararlılığı ve translasyonu çok önemlidir. Translasyon sürecinde mRNA saflığını, stabilitesini ve protein verimini belirlemek kritiktir. Bu nedenle, 5' başlık yapısının modifikasyonu, poli (A) kuyruğunun uzatılması, amino asit kodlamayan (UTR) ve kodlayan (ORF) bölgelerdeki nükleotit dizilerinin düzenlenmesi veya modifiye edilmiş nükleotitlerin yapıya dahil edilmesi gibi RNA dizisinin mühendisliği, sentetik mRNA'yı her zamankinden daha fazla çevrilebilir hale getirmiştir. Aşı olarak, replike olmayan ve kendi kendine çoğalan iki mRNA sınıfı kullanılmaktadır. Replike olmayan mRNA, yalnızca ilgili protein antijenlerini kodlarken, kendi kendine çoğalan mRNA, RNA replikasyonu için gereken proteinleri de kodlar. mRNA aşılarının hücrelere transferi ve formülasyonu, antijen ekspresyonunun kinetiğini, protein miktarını ve bağışıklık cevabının gücünü belirlemek için çok önemlidir. Bu başarıyı sağlayabilmek için mRNA aşıları; hücrelere, lipit nanopartiküller, polimerler, peptitler, çıplak mRNA gibi çeşitli formatlarda verilerek etkili transfer materyali geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son teknolojik gelişmeler, in vivo transferde ve translasyondaki düşük verimliliği gidermiş ve bu aşı platformunun çeşitli bulaşıcı hastalıklara ve kanserlere karşı klinik öncesi ve klinik denemelerde yaygınlaşmasını sağlamıştır. Geçtiğimiz on yılda, büyük teknolojik yenilikler mRNA'nın aşı geliştirme ve protein replasman tedavisi alanlarında ümit verici bir terapötik araç haline gelmesini sağlamıştır. Günümüzde, mRNA aşıları tarafından antijenler, nötralize edici antikorlar ve bağışıklık sistemini uyarıcı aktiviteye sahip proteinler kodlanır hale gelmiştir. Pek çok mRNA aşısının pre-klinik ve klinik çalışmalarda etkili olduğu görüldüğü takdirde transfer verimliliği, özgül hücre tiplerine hedefleme ve transfer araçlarının güvenilirliği konularında hala geliştirilmesi gereken noktaları bulunmaktadır. Bu derlemede, gelecekteki gelişim perspektifleri ile mRNA aşılarının optimizasyonu, formülasyonu ve hücrelere transferindeki son gelişmeler ve mevcut zorluklar gözden geçirilmektedir.

Anahtar kelimeler: mRNA; aşılar; mRNA aşıları; ilaç transfer sistemleri.

ABSTRACT

The major disadvantages of traditional virus vaccines are time constraints in development and difficulties in large-scale production. Therefore, there is a need to develop stronger and more versatile vaccine platforms. mRNA vaccines constitute a promising alternative to traditional vaccine approaches

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Engin Yılmaz, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 (312) 438 95 66, **E-posta (E-mail):** eyilmaz@hacettepe.edu.tr

due to their high potential, rapid development capacity, low cost production and safe administration potential. Stability and translation of mRNA are crucial for a successful RNA vaccine. It is critical to determine mRNA purity, stability, and protein yield during the translation process. Therefore, engineering the RNA sequence, such as modification of the 5' cap structure, extension of the poly (A) tail, editing nucleotide sequences in non-coding (UTR) and coding (ORF) regions, or incorporating modified nucleotides into the structure, makes synthetic mRNA more translatable. Two classes of non-replicating and self-amplifying mRNA are used as vaccines. While non-replicating mRNA only encodes protein antigens of interest, self-amplifying mRNA also encodes proteins required for RNA replication. The transfer and formulation of mRNA vaccines to cells is crucial for determining the kinetics of antigen expression, protein amount, and strength of immune response. In order to achieve this success, mRNA vaccines are given to cells in various formats such as lipid nanoparticles, polymers, peptides, and naked mRNA to develop the most effective transfer material. Recent technological advances have eliminated the low efficiency in in vivo transfer and translation and have made this vaccine platform widespread in pre-clinical and clinical trials against various infectious diseases and cancers. Over the past decade, major technological innovations have made mRNA a promising therapeutic tool in the fields of vaccine development and protein replacement therapy. Nowadays, antigens, neutralizing antibodies and proteins with immunostimulating activity have become coded by mRNA vaccines. Although many mRNA vaccines appear to be effective in preclinical and clinical studies, there are still some issues to be improved in terms of transfer efficiency, targeting to specific cell types, and the reliability of transfer devices. In this review, the latest developments and current challenges in the optimization, formulation and transfer of mRNA vaccines to cells with future development perspectives have been reviewed.

Keywords: mRNA; vaccines; mRNA vaccine; drug delivery systems.

Giriş

Aşılama, hastalıkların önlenmesi ve kontrolüne yönelik en başarılı tıbbi yaklaşımdır. Aşıların başarılı bir şekilde geliştirilmesi ve kullanılması, binlerce hayatı kurtarmış ve büyük ekonomik kayıpları önlemiştir. Yaygın aşı kullanımının bir sonucu olarak, çiçek virüsü tamamen ortadan kaldırılmış ve dünya çapında çocuk felci, kızamık ve diğer çocukluk hastalıklarının insidansı büyük ölçüde azalmıştır¹. Canlı, zayıflatılmış ve inaktive edilmiş patojenler ve protein alt birimleri gibi geleneksel aşı yaklaşımları, çeşitli tehlikeli hastalıklara karşı kalıcı koruma sağlamaktadır². Bu başarıya rağmen, çeşitli bulaşıcı patojenlere, özellikle de kazanılmış bağışıklık yanıtından kurtulabilenlere karşı, aşı geliştirmenin önünde büyük engeller halen devam etmektedir. Geleneksel virüs aşılarının en büyük dezavantajı, hızlı geliştirilmesi zorunluluğu ve geniş ölçekli yaygın hale getirilebilmesindeki zorluktur. Geleneksel aşı yaklaşımlarının, kanser gibi bulaşıcı olmayan hastalıklar için uygulanması da zordur. Bu nedenle, daha güçlü ve çok yönlü aşı platformlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Nükleik asit temelli aşılar; DNA (plazmitler) ve RNA (mRNA) aşıları, özellikle hücre uyarımı için canlı organizma temeline dayalı aşıları taklit eden ancak daha güvenli ve etkili biyomoleküllerin yolunu açan aşılardır³. Bu teknoloji, profilaksiden bulaşıcı hastalıklara, kanser, otoimmün hastalık ve aşırı duyarlılık için geliştirilen terapötlere kadar uzanan çok çeşitli endikasyon ve hastalıklara karşı yeni aşıların geliştirilmesi için umut verici bir potansiyel sergilemektedir. mRNA temelli aşıların, güvenlik, etkinlik, hem B hem de T hücre yanıtını uyarabilme ve özgüllük açısından geleneksel aşılarla ve DNA temelli aşılarla göre önemli avantajları bulunmaktadır³.

1990 yılında farelerde ekzojen bir proteini ifade etmek için in vitro transkripsiyonlu (IVT) mRNA'nın ilk kullanımından bu yana, bu alanda çok yol kat edilmiş ve mRNA'nın çeşitli özellikleri nedeniyle, geleceğin aşısı olma potansiyeli çok artmıştır⁴. mRNA aşısının avantajları şu şekilde sıralanabilir:

i) Bir mRNA aşısının geliştirme süreci, geleneksel aşılardan çok daha hızlıdır. 2020'de şiddetli akut solunum sendromu Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) salgınında viral genom dizisinin ortaya çıkarılmasından sonraki on hafta içinde, bir mRNA aşısı, faz I klinik deneme-deki ilk gönüllülere uygulanmıştır⁵.

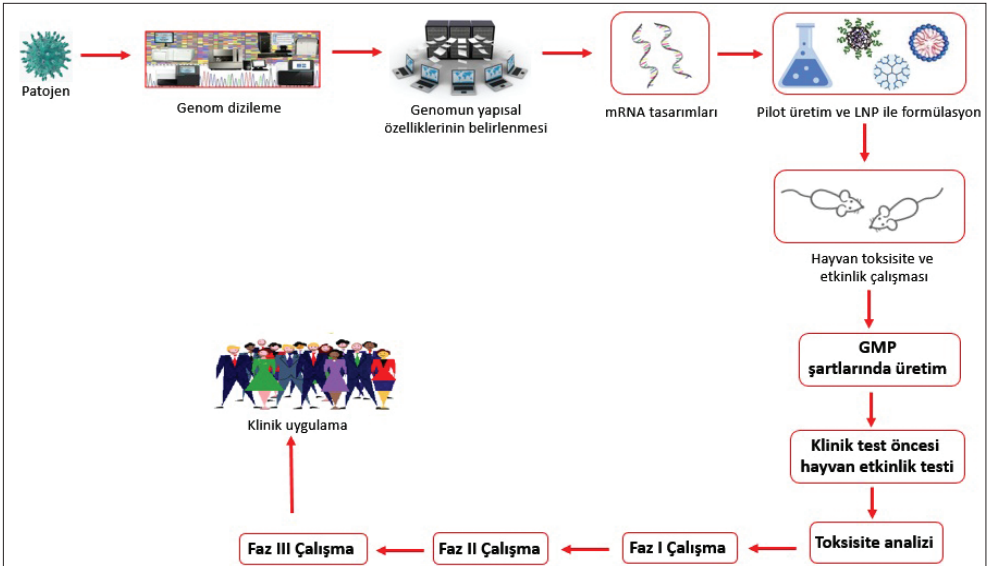
ii) İn vitro transkripsiyon reaksiyonunun yürütülmesi kolaydır, yüksek verime sahiptir ve ölçeklendirilebilir⁶. Gelişmiş endüstriyel kurulum, kilograma kadar ölçeklerde mRNA üretebilir (Şekil 1).

iii) mRNA aşısı, antijen proteinlerinin hücre içi sentezini sağlayarak, bazı antijenler için zorlayıcı olan protein saflaştırma ve uzun vadeli stabilizasyon ihtiyacını ortadan kaldırır⁶.

iv) RNA, ribonükleazlara (RNaz'lar) karşı uygun şekilde korunursa, proteinlere kıyasla bozulmaya daha az eğilimli olduğundan, mRNA'nın taşınması ve depolanması, protein temelli aşılardan daha kolay olabilir⁷.

v) mRNA bulaşıcı ve genoma entegre olmayan bir platform olduğundan, potansiyel enfeksiyon riski veya insersiyonel mutajenez riski yoktur. İn vivo yarılanma ömrü kısadır ve mRNA normal hücrel süreçler tarafından yıkılır⁷.

mRNA aşısı, bu avantajları nedeniyle hızlı bulaşıcı hastalık salgınlarına yanıt olarak zamanında üretilmesi ve uygulanabilmesi potansiyeline sahiptir.



Şekil 1. mRNA aşılama geliştirme süreci.

Geçtiğimiz on yılda, büyük teknolojik yenilikler ve araştırma yatırımları, mRNA'nın aşı geliştirme ve protein replasman tedavisi alanlarında umut verici bir terapötik araç haline gelmesini sağlamıştır. Günümüzde, mRNA aşıları tarafından üç ana protein türü kodlanır hale gelmiştir: antijenler, nötralize edici antikorlar ve bağışıklık sistemini uyarıcı aktiviteye sahip proteinler⁸.

Bu derlemede, mRNA üretimi, kalitesi, mRNA formatı ve formülasyon yöntemlerini tartışıp, uygulama yolları özetlenmiş ve mRNA aşılarının zorlukları ve gelecekteki gelişimi gözden geçirilmiştir.

mRNA Dizi Mühendisliği ve Potansiyel Verimlilik

Başarılı bir RNA aşısı için mRNA'nın kararlılığı ve translasyonu çok önemlidir. Translasyon sürecinde mRNA saflığını, stabilitesini ve protein verimini belirlemek kritiktir. Bu nedenle, RNA dizi mühendisliği, sentetik mRNA'yı her zamankinden daha fazla çevrilebilir hale getirmiştir⁹.

Aşı olarak iki mRNA sınıfı, yani replike olmayan (1000-5000 nükleotit) ve kendi kendine çoğalan mRNA (8000-12000 nükleotit) yaygın olarak kullanılmaktadır. Replike olmayan mRNA, yalnızca ilgili protein antijenlerini kodlarken, kendi kendine çoğalan mRNA, RNA replikasyonunu mümkün kılan proteinleri de kodlamaktadır¹⁰. Kendi kendine çoğalan mRNA'ya dayanan aşılar, bir RNA virüsünün (örneğin; alfavirüs, flavivirüs veya pikornavirüs) yapısal olmayan (nsp) replikasyon mekanizmasını da içermektedir^{10,11} (Şekil 2A).

Fonksiyonel sentetik mRNA, bir rekombinant RNA polimeraz (T7, T3 veya SP6) kullanılarak, bir plazmit DNA (pDNA) kalıbından *in vitro* transkripsiyon ile sentezlenmektedir. Bu nedenle, pDNA'nın hazırlanması, mRNA'nın üretiminde ilk adımdır. Sırasıyla başlangıç ve bitiş kodonları ile işaretlenen ilgili proteini kodlayan olgun mRNA'nın açık okuma çerçevesi ("open reading frame: ORF"), proteine çevrilmeyen (UTR) bölgelerle çevrelenmiştir ve ideal olarak bir 5' başlık ("Cap") ve bir poli (A) kuyruğu içermektedir¹¹.

Hem doğal hem de IVT mRNA'nın farmakodinamik aktivitesi, sitozolde gerçekleşir. IVT mRNA sitozole verildiğinde, farmakolojisi, endojen mRNA'nın stabilitesini ve translasyonunu düzenleyen aynı karmaşık hücresel mekanizmalar tarafından yönetilir. Tasarlanmış IVT mRNA, endojen mRNA'yı o kadar yakından andırır ki, hücresel translasyon makinesi (ribozomlar), post-translasyonel modifikasyonlara uğrayabilen ve sonunda olgun protein ürünü ile sonuçlanan bir proteini sentezlemek için sorunsuz bir şekilde çalışmalıdır. Sitozolde ekzojen mRNA'nın biyoyararlanımını etkileyen iki ana faktör vardır: *i*) RNaz aracılı hızlı degradasyon ve *ii*) proteoglikan kaplı hücre membranının negatif yükleri ile negatif yüklü mRNA molekülleri arasındaki elektrostatik itme nedeniyle plazma membranı boyunca pasif difüzyon¹².

mRNA'nın hızlı yıkımını önlemek, kararlılığını artırmak ve translasyon verimliliğini yükseltmek için dizi mühendisliği stratejileri uygulanmaktadır. Bu kapsamdaki dizi mühendisliği stratejileri; 5' başlık yapısının modifikasyonu, poli (A) kuyruğunun uzatılması,

UTR'lerin ve ORF'deki nükleotit dizilerinin mühendisliği ve/veya modifiye edilmiş nükleotitlerin yapıya dahil edilmesini içermektedir.

5' Başlık Analogları: Ökaryotik ve viral genomlardan gelen mRNA'lar, mRNA dizisinin 5' ucunda bir 7-metilguanosa (m7G) başlığına (m7GpppN yapısı) sahiptir. Bu m7G in vitro transkripsiyon sırasında bir 5', 5'-trifosfat köprüsü (ppp) ile mRNA'nın ilk nükleotidine bağlanır ve mRNA'yı ekzonükleazlar tarafından yıkılmaktan korur. mRNA 5' başlığı ökaryotik başlama faktörü eIF4E'nin, mRNA'nın başlığına bağlanmasını ve onun ribozoma yüklenmesini sağlar, ayrıca doğal bağışıklık sensörlerinin mRNA'yı tanımasını önlemede rol oynar¹³.

İn vitro mRNA sentezi sırasında 5' başlık yapınının için iki yaygın yaklaşım vardır. Birincisi, transkripsiyon sırasında reaksiyona dinükleotit m7G (5')-ppp-(5')G gibi bir uç analogu dahil edilebilir. Başlık analogu GTP'den fazlaysa, transkripsiyon GTP yerine başlık analogu ile başlar ve başlıklı mRNA oluşturur. İkincisi, mRNA'nın 5' ucunun kapatılması, transkripsiyondan sonra ineklerdeki çiçek hastalığı virüsünden rekombinant olarak üretilen kapama enzimleri ile ikinci bir reaksiyon ile gerçekleşir¹³.

İn vitro transkripsiyon sırasında mRNA'nın 5' ucunun kapatılması en yaygın olarak uygulanan kapatma yöntemidir. Bu reaksiyon sırasında mRNA üç farklı başlıktan birini cap-0: [m7G (5') pppN₁pN₂p], cap-1: [m7G (5') pppN₁mpNp] ve cap-2: [m7G (5') pppN₁mpN₂mp] içerebilir, ancak normal başlık analogunun mRNA dizisine ters olarak bağlanabilme riski bulunmaktadır. Bu durumda, mRNA izomerleri oluşur ve mRNA'nın translasyon verimliliği düşer¹³.

5' başlığın ters birleşmesini önlemek için, anti-ters başlık analogları (ARCA) geliştirilmiştir. ARCA, transkripsiyon sırasında metil gruplarının hidrosil grupları ile doğru yerde reaksiyona girmesini sağlamak için modifiye edilmiştir. Normal başlık analogu ile karşılaştırıldığında, ARCA başlıklı mRNA daha yüksek bir translasyon verimliliğine sahiptir. ARCA başlıklı mRNA, normal başlık analogu ile kapatılan mRNA ile karşılaştırıldığında tavşan retikülosit lizatında iki kattan fazla verimlilikle protein oluşturduğu ve ARCA ile başlıklı mRNA'nın hücre kültürlerinde daha uzun bir yarı ömre sahip olduğu gösterilmiştir. ARCA'ların, ökaryotik başlatma faktörü 4E'ye bağlanmasını artırmak için fosfonat, imidodifosfat, fosforotioat, fosforoselenoat ve boranofosfat ile modifiye edilme çalışmaları devam etmektedir. Fosforotioat ile modifiye edilmiş ARCA'lar, normal ARCA ile karşılaştırıldığında kültür hücrelerinde hem translasyon verimliliğinin daha fazla arttığı hem de mRNA'ların yarı ömrünün uzadığı gözlenmiştir¹⁴.

Poli (A) Kuyruğu: mRNA translasyonunda ve stabilitesinde önemli bir rol oynayan Poli (A) kuyruğu, translasyon verimliliğini düzenlemek için 5'm7G başlık dizileriyle sinerjik olarak çalışmaktadır. Ökaryotik translasyon başlatma faktörleri, eIF4E, eIF4G ve eIF4A, 5'm7G başlığına bağlanarak bir kompleks oluşturur. mRNA'nın poli A kuyruğuna bağlanan poliadenosil bağlanma proteini (PABP), bir mRNP (haberci ribonükleoprotein) ile kompleks oluşturarak ökaryotik translasyon başlatma faktörü eIF4G'nin N-terminali

ile etkileşime girer¹⁵. PABP'lerin poli (A) kuyruğuna ve başlığa bağlanarak mRNA'yı daireselleştirmek için yeterince uzun bir poli (A) kuyruğu gereklidir. Poli (A) kuyruk uzunluğunun arttırılmasının polizom oluşumunun etkinliğini arttırdığı ve sonuç olarak protein ekspresyon seviyelerini etkilediği gözlenmiştir. Kültüre edilmiş hücrelere transfekte edilmiş mRNA'nın translasyonu, poli (A) kuyruğundaki adenin sayısı 54 nükleotitten 98 nükleotide kadar arttırıldığında, protein sentezinin de arttığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada, mRNA'nın poli (A) kuyruk uzunluğunun kademeli olarak 120 baza kadar artmasının, protein ekspresyon düzeyini orantılı olarak arttırdığı, 120 bazın üzerindeki artışların ise, protein ekspresyonunu daha fazla arttırmadığı gösterilmiştir¹⁶.

5' ve 3' Çevrilmemiş Bölgeler: mRNA'daki 5' ve 3' UTR'lerin, gen ekspresyonu için, önemli olduğu bilinmektedir. UTR'ler, mRNA'nın çekirdekten sitoplazmaya transferinde, translasyon etkinliğinin düzenlenmesinde, mRNA'nın hücre içi lokalizasyonunun düzenlenmesinde ve mRNA stabilitesinde önemlidir¹⁷. İlk mRNA çalışmaları, beta-globin geninin 5' ve 3' UTR bölgeleri mRNA yapısına dahil edilmiş ve fare NIH 3T3 fibroblast hücre hattında mRNA'nın stabilizasyonuna ve translasyon verimliliğinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir¹⁸. Ayrıca 5' UTR bölgesine GCC-(A/G)-CCAUGG dizisinin eklenmesi ile translasyonun daha doğru bir şekilde başlamasını sağladığı gösterilmiştir¹⁸.

Tütün Etch virüsünün 5' UTR bölgesi, farelerde eritropoietini ifade eden mRNA'ya takıldığında, farklı memeli hücre tiplerinde mRNA'nın translasyonunu arttırmıştır¹⁹. Ayrıca, insan ısı şok proteini hsp 70'in 5' UTR bölgesi, memeli hücrelerinde mRNA'nın translasyonunu arttırmış ve mRNA aşılarında başarılı olabileceği görülmüştür. Globin olmayan genlerden gelen UTR'ler ile, mRNA'nın terapötik değerinin araştırılması için çalışmalar hala devam etmektedir²⁰.

Bazı durumlarda, mRNA'nın 3' UTR bölgesine adenilat-üridilat bakımından zengin nükleotitlerin eklenmesi mRNA yıkımını hızlandırmakta, böylece protein ekspresyonunun süresinin kısaltılması sağlanabilmektedir²¹.

İn vitro kopyalanmış mRNA'ya, bir ribozomal giriş bölgesi "internal ribosome entry site (IRES)"nin dahil edilmesi, terapötik proteinlerin ekspresyonunu arttırmak için alternatif ve/veya tamamlayıcı bir araç olabilir²². Örneğin; fibroblastlarda, pluripotent kök hücreleri yeniden programlamak için kullanılan dört transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'lara "encephalomyocarditis virüs (EMCV) IRES", eklendiğinde, EMCV IRES'in, başlığı olmayan mRNA'ların bile protein ekspresyonunu yönlendirmek için başarılı olduğu görülmüştür. Bu tür IRES içeren, kapaksız mRNA ile transfekte edilmiş dendritik hücreler ile yapılan aşılanmanın, fareleri melanom hücre metastazından koruduğu görülmüştür²².

Açık Okuma Çerçevesi (ORF): Kodon kullanımının da protein translasyonu üzerinde bir etkisi vardır. Nadir kodonları, sitozolda bol miktarda bulunan aynı kökenli tRNA'ya sahip sık kullanılan eş anlamlı kodonlarla değiştirmek, mRNA'dan protein üretimini arttırmak için yaygın bir uygulama olmasına rağmen bunun güvenilirliği sorgulanmaktadır^{23,24}. G:C içeriğinin zenginleştirilmesi, protein ekspresyonunun artmasını sağlayan başka bir

dizi optimizasyonudur²³. mRNA yapısına modifiye edilmiş nükleositlerin (N¹ veya N⁶ metiladenozin, 5-metilsitidin, 5-metil-üridin, 2-thio-üridin, 5-metilhidroksi-üridin, pseudo-üridin, N¹-metilpseudo-üridin) dahil edilmesi mRNA kararlılığını arttırmasının yanısıra, mRNA'nın ikincil yapısını etkilemesi de mümkündür²⁴.

mRNA'nın Saflaştırılması: Bir ilaç maddesi olarak kullanılabilmesi için mRNA'nın, çeşitli nükleotitler, oligodeoksinükleotitler, transkripsiyonun başlangıcındaki başarısız döngüden oluşan kısa transkriptler ve protein içeren kompleksten temizlenmesi gerekmektedir. mRNA'yı boyuta göre ayıran tek bir kromatografik adım, hem daha kısa hem de daha uzun transkriptleri çıkarıp saf tek bir mRNA ürünü verebilir. mRNA için bir GMP üretim sürecinde böyle bir kromatografik saflaştırmanın uygulanması, in vivo protein ekspresyonu açısından mRNA moleküllerinin aktivitesini birkaç kat arttırmaktadır²⁵. Gelişen teknoloji ile birlikte, Baiersdofer ve arkadaşları²⁶ bir polisakkarit olan selüloz absorpsiyonu ile mRNA transkriptlerinin temizlenmesinin HPLC kadar işe yaradığını göstermişlerdir.

mRNA Aşılarının Hücreye Transferi ve Formülasyonu

mRNA aşılarının hücreye transferi ve formülasyonu, antijen ekspresyonunun kinetiğini ve büyüklüğünü, ayrıca bağışıklık yanıtının gücünü belirlemek için çok önemlidir. mRNA'nın sitozole etkili transferi hala bir engel oluşturmaya devam etmektedir. mRNA'nın büyük moleküler ağırlığı (10⁵-10⁶ Da) ve yüksek negatif yük yoğunluğu, mRNA'nın hücrel membranlardan geçirgenliğini bozmaktadır. Bir transfer sistemi olmadığında, mRNA'nın absorpsiyonu son derece düşüktür^{9,27}.

mRNA transferini iyileştirmek için mikro-enjeksiyonlar, gen tabancası, protamin ile yoğunlaştırma, RNA adjuvanları, lipitler ve/veya polimerlerden oluşan nanopartiküller içine kapsüllenmesi gibi transfer araçları geliştirilmiştir²⁸ (Tablo I). mRNA'nın in vivo transfeksiyonunu güçlendirmek için etkin taşıyıcılara ihtiyaç duyulmasına rağmen, birçok in vivo çalışmada çıplak mRNA uygulanmıştır^{28,29}.

Çıplak mRNA'nın Transferi: En basit uygulama stratejisi, çıplak mRNA'nın kas içi enjeksiyonudur. Bu durum, taşıyıcı molekülleri ortadan kaldırır ve maliyetin ve potansiyel risklerin azalmasına katkıda bulunur. Çıplak mRNA temelli aşıların deri içi yoluyla uygulanmasının bir başka avantajı da, hem hücrel hem de humoral bağışıklık yanıtı uyarmasıdır. mRNA, hem ciltte yerleşik dendritik hücreler (DC), hem de immün olmayan hücreler tarafından eksprese edilmektedir²⁹.

Çıplak mRNA'nın çoğunun hücrelere kaveola/lipit raft yoluyla girdiği görülmüştür. Bu da büyük olasılıkla kaveolada yoğunlaştığı ve negatif yüklü makromolekülleri tanıyan ve alımını kolaylaştırdığı bilinen bir çöpçü reseptör(lerin) aracılığı ile gerçekleşmektedir³⁰. Bununla birlikte çıplak mRNA, hücreye girerken zorluklarla karşılaşır, plazmada kısa bir yarı ömrü ve ribonükleaz tarafından hemen yıkılma riskleri vardır.

mRNA'nın Fiziksel Transferi: İn vivo mRNA transferinin etkinliğini arttırmak için çeşitli fiziksel yöntemler de denenmiştir. Bir çalışmada, altın parçacıkları ile paketlenen

Tablo 1. mRNA Aşılarında Denenen Transfer Sistemleri

Çıplak mRNA'nın direkt enjeksiyonu

Fiziksel transfer sistemleri

Elektroporasyon

Gen tabancası

Sonoporasyon

Mikro iğneler

Peptit temelli transfer sistemleri

Protamin

Hücreye penetre olan peptitler (CCP)

Lipit temelli transfer sistemleri

Lipitnanopartiküller (LNP)

DOTAP/DOPE

DOPE/Kolesterol

DOTMA/DOPE

DOTMA/Kolesterol

Polimer temelli transfer sistemleri

PBAE

PBAE/lipit-PEG

PSA

PEI-PEG

DEAE-Dekstran

Lipit-Polimer hibrit transfer sistemleri

PBAE+Lipit+PEG

CLAN (PEG-PLGA, BHEM-Kolesterol)

DOTAP: Dioleoil-3-trimetilamonyum propan, DOPE: dioleoilfosfatidiletanolamin, DOTMA: N- [1- (2,3-dioleoiloksi) propil] -N, N, N trimetilamonyum klorür, PBAE: poli (β -amino ester), PEG: polietilen glikol, PSA: polietilenimin-stearik asit, PEI: polietilenimin,

DEAE: Dietilaminoetil, PLGA: Poli (laktik-ko-glikolik asit), CLAN: Katyonik lipid destekli nanopartiküller, BHEM-kolesterol: N-bis (2-hidroksietil) -N-metil-N- (2-kolesterol oksikarbonil aminoetil) amonyum bromür.

mRNA'nın bir gen tabancası kullanılarak dokulara transfer edilebileceği gösterilmiştir. Gen tabancasının fare modellerinde etkili bir RNA transferi ve aşılama yöntemi olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, büyük hayvanlarda veya insanlarda etkin olduğuna dair bir veri mevcut değildir³¹.

İn vivo elektroporasyon ve sonoporasyon gibi yöntemler de mRNA alımını artırmak için kullanılmıştır, ancak bir çalışmada elektroporasyon, replike olmayan mRNA temelli bir aşının değil, yalnızca kendi kendine çoğalabilen mRNA'nın immünojenitesini arttırmıştır³². Fiziksel yöntemler, artan hücre ölümü ve hedef hücrelere veya dokulara sınırlı erişim nedeniyle in vivo mRNA transferinde gerekli etkinliği sağlayamadığından kullanımı sınırlı kalmıştır.

İdeal olarak, mRNA'yı hücreye taşıyan molekülün, RNA'yı ribonükleaz tarafından potansiyel sindirime karşı korumalı ve hedef hücreye etkili bir transfer sağlamalı, RNA'nın, transfer molekülünden kolayca ayrılmasını ve mRNA'nın endozomdan salınmasını sağlamalıdır. Optimal bir uygulama aracı için önemli diğer unsurlar, hem toksisite oluşturmamalı hem de bağışıklık sistemini yeterince uyarabilmelidir. Bu nedenle araştırmacılar, son zamanlarda güçlü ve çok yönlü uygulama araçları olarak, lipit veya polimer temelli nanopartiküller geliştirmeye yönelmişlerdir.

Lipit Temelli Transfer (Lipitler, Lipit Benzeri Bileşikler ve Lipit Türevleri): Lipitler veya lipit benzeri bileşikler (lipidoidler), lipit türevi nanopartikülleri (LNP) oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır⁹. Lipozomlar veya lipit nanopartiküller genellikle dört bileşenden oluşur: yaklaşık 100 nm'lik parçacıklar halinde kendi kendine birleşebilen ve mRNA'nın sitoplazmada endozomal salınmasına izin veren iyonize edilebilir bir katyonik lipit; formülasyonların yarı ömrünü artıran lipit bağlı polietilen glikol (PEG); stabilize edici bir ajan olan kolesterol ve lipit çift katmanlı yapıyı destekleyen doğal olarak oluşan fosfolipitler³³. LNP'ler ile mRNA'nın transferine dayalı çeşitli klinik deneyler devam etmektedir. Örneğin iki influenza mRNA aşısı (NCT03076385 ve NCT03345043), LNP'ler ile sağlıklı yetişkinlere üç hafta arayla iki kez kas içi enjeksiyon ile verildiğinde, aşığı alanlarda humoral bağışıklık yanıtının uyarıldığı ve aşının güvenlik profilinin, inaktif influenza virüs aşılara göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. Yakın tarihli bir başka faz I klinik çalışmasında (NCT04064905), Zika virüsüne karşı hazırlanan bir mRNA aşısının, LNP ile kas içi enjeksiyonundan sonra güvenliği, tolerabilitesi ve immünojenitesinde artış bildirilmiştir³⁴.

Birçok araştırmacı, DOTMA (1,2-di-O-oktadesenil-3-trimetilamonyum propan), 9Z,12Z (N, N-Dimetil-2,3-bis-oktadeka-9,12) gibi katyonik veya iyonize olabilen lipit malzemeleri, DLinDMA ([dieniloksi] propan-1-amin) ve TT3 (N1, N3, N5-tris [3- (didodesilamino)] propil) benzen-1,3,5-trikarboksamid) gibi lipitleri kullanarak daha etkili transfer molekülleri geliştirmeye çalışmaktadır³⁵.

Polimer Temelli Transfer: Bazı çalışmaların pre-klinik modellerinde, mRNA aşısı uygulaması için polietilenimin (PEI) gibi polimerler kullanılmış ama güvenlik profilindeki eksiklikler nedeniyle bu moleküller, klinik aşamaya ulaşamamıştır³⁶.

Haabeth ve arkadaşları³⁶, T hücrelerini verimli bir şekilde hedefleyen ve farelerde yerleşik tümörlerin temizlenmesine neden olan, yük değiştiren salınabilir taşıyıcılar ("charge-altering releasable transporters CART") adı verilen yeni lipit içeren polimerler geliştirmiştir.

Chahal ve arkadaşları lipite bağlı polietilen glikol (PEG) ve antijen kodlayan, kendi kendine çoğalan bir mRNA ile formüle edilmiş dendrimerler olarak adlandırılan dallı poliamin temelli yeni bir polimer geliştirmişlerdir. Dendrimer-RNA nanopartikülleri ile tek doz kas içi immünizasyon, antijene özgü CD8 + T hücresi ve farelerde Zika, Ebola ve influenza virüslerine ve *Toxoplasma gondii*'ye karşı nötralize edici antikor yanıtının gelişmesini sağlamıştır³⁷.

Polimerlerin yapısı ile biyolojik tepkileri (örneğin; transfeksiyon ve toksisite) arasındaki korelasyonun zayıf olması nedeniyle, çeşitli polimer temelli transfer sistemlerinin tasarımı

rasyonel yaklaşımlardan çok deneyselliğe dayanmaktadır. Bu nedenle, polimer temelli transfer sistemleri, lipit temelli transfer sistemleri kadar gelişmiş değildir.

Peptit Temelli Transfer: Hücreye nüfuz eden peptitler ("Cell-penetrating peptides; CPPs"), mRNA aşıları için nadiren kullanılır ancak bu alanda son zamanlarda bazı ilerlemeler kaydedilmiştir. Udhayakumar ve arkadaşları³⁸ mRNA'yı membranları parçalayabilen ve bunlara nüfuz edebilen partiküller halinde yoğunlaştırmak için amfipatik Arg-Ala-Leu-Ala motiflerini içeren CPP'ler geliştirmiş ve fareleri CPP-kompleksli mRNA ile immünize ettikten sonra güçlü sitolitik T hücresi yanıtı oluştuğunu göstermişlerdir. Bu platformun güçlü antikör tepkilerini veya patojenik enfeksiyonlardan korumayı uyarıp uymayacağını araştırmak gelecekteki çalışmalar için önemli olacaktır³⁹.

Yeni geliştirilen bir katyonik peptit olan protaminin, mRNA'yı, RNazlar tarafından yıkılmaya karşı koruduğu gösterilmiştir; bununla birlikte tek başına protamin-kompleksli mRNA, muhtemelen protamin ve mRNA arasındaki aşırı sıkı bir ilişki nedeniyle, bir kanser aşısı modelinde sınırlı protein ekspresyonu ve etkinliği göstermiştir⁴⁰. Bu sorun, protaminle formüle edilmiş RNA'nın bir ifade vektörü olarak değil, yalnızca bir bağışıklık aktivatörü olarak çalışmasıdır. Daha sonraki çalışmalar protaminle yoğunlaştırılmış mRNA'nın güçlü bir tehlike sinyali oluştuğu ve çeşitli hücreler tarafından TNF α ve IFN α salgılanmasına yol açtığı gösterilmiştir. Son zamanlarda, protamin kompleksli RNA üzerine yapılan araştırmalar, çıplak ve protaminle formüle edilmiş mRNA'yı birleştiren basitleştirilmiş bir aşı yaklaşımıyla sonuçlanmıştır. Ortaya çıkan mRNA aşısı, birbirini tamamlayan iki bileşenden oluşmaktadır: Antijen kaynağı çıplak mRNA tarafından yönetilirken, protamin kompleksleri güçlü bir immünostimülasyon sinyali oluşturmaktadır⁴¹.

Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküller: Lipit-polimer hibrit nanopartikül (LPN)'ler, in vitro siRNA'ların hücrelere etkili bir şekilde transferinde daha başarılı oldukları gösterilmiştir⁴². Buradan yola çıkarak araştırmacılar, PEG-Lipit C14-2000 ile formüle edilmiş LPN'lerin, mRNA'yı başarılı bir şekilde hücrelere transfer ettiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar, siRNA ve mRNA'nın LPN'lerin yeni bir nükleik asit transfer sistemi olduğunu göstermektedir⁴³.

mRNA Aşılarının Bağışıklık Yanıt Oluşturma Mekanizması

Ekzogen mRNA, çeşitli hücre yüzeyi, endozomal ve sitozolik doğal immün reseptörler tarafından tanındığı için doğal olarak immünostimülatördür. Hücre içinde iki RNA sensörü tanımlanmıştır: endozomal toll benzeri reseptör (TLR)'ler ve "retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RIG-I)" benzeri reseptör aileleri^{44,45} (Şekil 2B). TLR'ler, dendritik hücreler, makrofajlar ve monositler gibi hücrelerin endozomal bölümünde lokalize olan TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9'dur. TLR3, 45 baz çiftinden daha uzun çift zincirli RNA'yı (dsRNA) ve ikincil yapılar oluşturan veya viral replikasyon ile oluşan tek sarmallı RNA'yı (ssRNA) tanır⁴⁶. TLR7 ve TLR8, poli-üridinler, guanozinler ve/veya üridinler bakımından zengin RNA'lar tarafından aktive edilir. TLR7 hem dsRNA'yı hem de ssRNA'yı bağlayabilirken, TLR8 yalnızca ssRNA'yı tanır^{44,47}. TLR7 aktivasyonu antijen sunumunu artırabilir, sitokin salgılanmasını teşvik edebilir ve B hücre yanıtını uyarır⁴⁷.

Bir "pattern recognition receptor (PRR)" reseptörü olarak işlev gören ikinci aile, RIG-I, "melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)" ve "probable ATP-dependent helicase (LGP2)" reseptörleri, 5' trifosfat içeren ssRNA ve dsRNA'yı tanımakta ve IFN üretimini uyarmaktadır⁴⁸. Bazen, PRR sensörleri tarafından tanınan dsRNA'lar, IFN'nin indüksiyonu için bir adjuvan olarak işlev görebilmektedir⁴⁹.

mRNA aşılı, TLR'ler 3, 7 ve 8, RIG-I ve MDA5 aracılığıyla doğal bağışıklığı uyarabilmektedir. Doğal bağışıklık sistemi tarafından algılanan mRNA, işgalci moleküllerin ortadan kaldırılmasında iki ucu keskin bir kılıç gibidir. Eksojen mRNA, tip I IFN'leri ve güçlü enflamatuvar sitokinleri uyarabilir, bu da T ve B immün yanıtlarını tetikler; bu durum, antijen ekspresyonunu olumsuz etkileyebilir^{50,51} (Şekil 2C). TLR7 aktivasyonu, kemokinlerin artmasına yol açar ve DC'ler ve makrofajlar gibi doğal bağışıklık hücrelerini enjeksiyon bölgesine yönlendirir⁵¹. Diğer yandan, PRR'lerin aktivasyonuna bağlı olarak mRNA'dan yeterince antijen üretilmeden, antijen ekspresyonunun erken sonlandırılması gerçekleştirilebilir. mRNA'nın pseudo-üridin ile modifiye edilmesi ve HPLC ile saflaştırılması, doğuştan gelen immün aktivasyonu azaltabilir, antijen stabilitesini ve ekspresyonunu arttırabilir^{24,25}.

Dendritik hücre olgunlaşması, mRNA temelli aşılarda etkinliği için çok önemlidir. Genel olarak TLR7, insanlarda plazmasitoid dendritik hücre (pDC)'lerde ve B hücrelerinde ifade edilir. TLR8 ise, geleneksel dendritik hücrelerde (cDC'ler), monositlerde ve makrofajlarda ifade edildi. cDC'ler, normal insan dermisindeki DC popülasyonunu oluşturur, plazmasitoid DC'ler ise deride bulunur⁵². Farklı DC alt kümelerindeki TLR7 ve TLR8 konumları ve DC'lerin farklı organlardaki konumları, immün yanıt ile mRNA aşılmasının uygulama yolu ve formülasyonu arasındaki ilişkiyi göstermektedir. mRNA translasyonuna ve bağışıklık aktivasyonuna yol açan olaylar dizisinin daha iyi aydınlatılması, mRNA aşılmasının, tip I IFN uyarımının dengeli oluşmasına yardımcı olacak ve aşı sonucunu olumlu yönde etkileyecektir.

Mevcut Zorluklar ve Çözüm Yolları

Pek çok mRNA aşısının pre-klinik ve klinik çalışmalarda etkili olduğu görülse de, hala geliştirilmesi gereken noktaları bulunmaktadır. Bu zorlukları şöyle sıralayabiliriz:

i). Transfer verimliliği; transfer işlemi sırasında, RNA yüklü taşıyıcıların büyük bir kısmı endozom veya lizozomda tutulur veya ekzositoz yoluyla hücrelerden geri çıkarılır, bu durum sitozole ulaşan etkili RNA miktarını azaltır^{53,54}. Endozomal salınımı artıran ve nanopartiküllerin ekzositozunu azaltan gelecekteki gelişmeler muhtemelen transfer verimliliğini arttıracaktır.

ii). İn vivo olarak özgül hücre tiplerinin hedeflenmesi; mevcut uygulama teknolojileri genellikle mRNA aşılarda, enjeksiyon bölgesinde birçok farklı hücre tipine iletir ve bu hücrelerin çoğu bağışıklık uyarımına çok az katkıda bulunur⁵⁵. Dendritik hücreler, makrofajlar, B hücreleri ve T hücreleri gibi belirli hücre türlerine yönelik aktif in vivo hedefleme, bağışıklama etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir.

iii). Transfer araçlarının güvenilirliği; katyonik lipitler ve polimerler gibi transfer materyalleri, gelişmiş membran füzyonu, endozomun bozulması veya hücre stresleri ile ilişkili

olabilecek diğer mekanizmaları uyararak potansiyel sitotoksisteye yol açabilir⁵⁶. Sitotoksisteyi azaltmak için biyolojik olarak parçalanabilen malzemeler kullanmak ve katyonik yükleri maskeleyerek gibi bazı yaklaşımlar araştırılmış olsa da, hala geniş bir terapötik indekse sahip uygulama sistemleri geliştirilmelidir.

iv). İnsana uygulanabilirliği; klinik öncesi hayvan çalışmalarında gözlemlenen etkili bağışıklama, insanlara uygulanabilir veya uygulanmayabilir. Farelerde ve diğer hayvanlarda yeterli bağışıklık yanıtını uyarması için gerekli mRNA dozu, insanlarla doğrudan ilişkili olmayabilir. İnsan ve diğer hayvan türleri arasındaki bağışıklık sistemlerindeki farklılıklar, farklı bağışıklık yanıtına yol açabilir⁵⁷. Bu nedenle, insanlarda mRNA aşılarının etkinliği değerlendirilmek için klinik araştırmalar büyük önem taşımaktadır.

v). Transfer sürecinin moleküler mekanizmaları daha fazla araştırılması gerekmektedir⁵⁸. Teslim biçimleri, taşıyıcı malzemeler ve uygulama yollarından bağımsız olarak, hücre alım, sitozolik salınım, lizozomal degradasyon ve mRNA aşılarının ekzositotik geri dönüşümünden sorumlu faktörler ve yollarla ilgili bilgilerimiz sınırlıdır. Bu biyolojik süreçlerin daha detaylı bir şekilde anlaşılması, mRNA aşıları ile daha etkili immünizasyona yol açacak şekilde transfer materyallerinin ve uygulama stratejilerinin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır.

vi). mRNA'ların farmasötik formülasyon çalışmaları hala tüm hızıyla devam etmektedir. mRNA aşılarının kolay uygulanabilir olması için stabil, soğutulmuş veya oda sıcaklığında formülasyonların geliştirilmesi gerekmektedir. Erken faz çalışmaları için çoğu ürün dondurulmuş olarak saklansa da (-70°C), aşı dağıtımı için daha uygun olan yüksek sıcaklıklarda stabil olan formülasyonları geliştirme çabaları devam etmektedir⁵⁹.

Yasal Düzenlemeler ve Patent Durumu

mRNA aşı ürünleri için "Food and Drug Administration (FDA) (Gıda ve İlaç İdaresi)" veya "European Medicines Agency (EMA) (Avrupa İlaç Ajansı)"de özel bir kılavuz yoktur. mRNA temelli terapötikler, gen tedavisi olarak kategorize edilmektedir. Bununla birlikte, DNA'nın tersine, mRNA'nın konakçı genomuna entegre olmamasından dolayı, katı gen tedavisi düzenlemelerinin gevşetilmesine dair görüşler sıklıkla dile getirilmektedir. Bununla birlikte, ABD'de hala katı gen tedavisi kuralları geçerliken, Avrupa'da, rekombinant bir nükleik asit içeren veya bunlardan oluşan ürün, insanlarda kullanılan veya insanlara uygulanan herhangi bir aktif farmasötik bileşen, ileri tedavi tıbbi yönetmeliğinin (Direktif 2009/120/EC) kapsamına girmektedir^{60,61}. mRNA aşıları, genetik immünojenler kategorisine girdiğinden, DNA aşıları ve gen tedavisi vektörleri için tanımlanan kılavuz ilkelerin çoğu, mRNA'nın özelliklerini yansıtmak için bazı uyarlamalarla mRNA'ya uygulanabilir⁶².

2005 yılında Karikó ve Weissman, bağışıklık sistemini tetiklemeden uygulanabilen, mRNA aşılarının geliştirilmesinin temeli olarak görülen küçük ölçüde değiştirilmiş bir mRNA versiyonunun bir keşif olduğunu bildiren bir makale yayımlamıştır⁶³. Bu keşiften sonra her iki araştırmacı tarafından 10 patent başvurusu yapılmıştır. Bu patentlerin tümü genel olarak RNA hazırlıklarına ve kullanımlarına yönelik olup, çoğu ABD hükümeti tarafından finan-

se edildiği için, Bayh-Dole hükümleri gereği, Pennsylvania Üniversitesinde bu patentlerde ortak hakka sahip olmuştur. Özellikle US8.278.036B2 nolu patent mRNA teknoloji ile ilgili geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır ve Amerika Birleşik Devletleri'nin yanı sıra, Türkiye'nin de yer aldığı yaklaşık 18 ülkede ikiz başvuruda bulunulmuştur. Pennsylvania Üniversitesi, belirli mRNA patentlerini ve uygulamalarını, 20 Aralık 2016'da CellScript ve ona bağlı bir kuruluşu olan mRNA RiboTherapeutics için lisanslanmıştır. CellScript, 26 Haziran 2017'de Moderna ile ve 14 Temmuz 2017'de BioNTech ile dünya çapında münhasır olmayan alt lisans antlaşması yapmıştır⁶⁴. Biyoteknoloji firmalarının bu antlaşmaları, mRNA aşısının yakın gelecekte aşı sektöründe önemli bir platform olacağına göstergesidir.

mRNA Aşılarının Güvenirliliği

Aşılar sağlıklı kişilere uygulandığından güvenlik gerekliliği son derece katıdır. mRNA için üretim süreci, virüslerle kontaminasyon, toksik kimyasallar veya hücre kültürleri gerektirmediğinden diğer aşı platformlarıyla ilişkili ortak riskleri çok az taşımaktadır. Aşılanmış kişilerde, teorik enfeksiyon riskleri veya vektörün konakçı hücre DNA'sına entegrasyonu mRNA için bir endişe oluşturmamaktadır.

mRNA aşıları için, gelecekteki pre-klinik ve klinik çalışmalarda değerlendirilmesi muhtemel potansiyel güvenlik endişeleri arasında lokal ve sistemik enflamasyon, eksprese edilmiş immünojenin biyolojik dağılımı ve kalıcılığı, oto-reaktif antikorların uyarılması ve modifiye nükleotitlerin ve transfer sistemi bileşenlerinin potansiyel toksik etkileri yer almaktadır. Bunlar içerisinde en çok endişe duyulan nokta, bazı mRNA temelli aşı platformlarının, potansiyel olarak otoimmünite ile bağlantılı olan güçlü tip I interferon yanıtını uyarabileceğidir⁶⁵. Bu nedenle, mRNA aşılamaından önce otoimmün reaksiyon riski yüksek olan bireylerin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir.

Diğer bir potansiyel sorun, hücre dışı çıplak RNA'nın, sıkıca paketlenmiş endotel hücrelerinin geçirgenliğini arttırdığından dolayı ödem oluşumuna katkıda bulunabileceğidir⁶⁶. Bu nedenle, farklı mRNA aşıları ve transfer sistemleri, insanlarda uygulamaya geçmeden önce büyük ölçekli hasta ve sağlıklı popülasyonlarında test edildiğinden, güvenliğin sürekliliği olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Klinik Denemeler: Hayvan ve İnsan Çalışmaları

mRNA aşılarının, kanserlerde profilaktik ve terapötik uygulamaları ile karşılaştırıldığında, bulaşıcı hastalık için mRNA aşılarının klinik deneyleri hala erken dönemdedir (Tablo II). Artan klinik öncesi ve klinik sonuçlar, mRNA ile tedavinin, bulaşıcı hastalıkları önlemek ve tümörleri tedavi etmek için yararlı olacağını ve mRNA aşılarının hayvan modellerinde ve insanlarda güvenli olduğunu ve tolere edildiğini göstermektedir⁶⁷.

Bununla beraber, hayvan modelleri ve insan çalışmaları arasındaki tutarsızlıklar zaman içerisinde yanıtlanması beklenen bir dizi önemli soruyu beraberinde getirmektedir:

mRNA aşıları veya bunların adjuvanları, diğer hayvanlara göre insanlarda farklı şekilde algılanıyor veya translasyonu değişiyor mu? İnsanlarda, hayvan modellere kıyasla güçlü

Tablo II. Klinik Çalışmaları Devam Eden mRNA Aşı Örnekleri

mRNA	Hastalık/ Mikroorganizma	Çalışma Fazı	Klinik Çalışma No
MiHA-mRNA	Hematolojik malignansiler	Faz I/II	NCT02528682
WT1-mRNA	Akut miyeloid lösemi AML	Faz II	NCT01686334
hCMV ppb5-LAMP-mRNA	Glioblastoma	Faz II	NCT03927222
TAA-mRNA	Prostat kanseri	Faz I/II	NCT01197625
W-ova1-mRNA	Yumurtalık kanseri	Faz I/II	NCT04163094
mRNA-4157	Cilt kanseri	Faz II	NCT03897881
mRNA-1893	Zika virüs	Faz I/II	NCT03382405
mRNA-1653	Parainfluenza virüs	Faz I	NCT04144348
mRNA-1944	Chikungunya virüs	Faz I	NCT03829384
CV7202	Kuduz virüsü	Faz I	NCT03713086
Gag-Ag-mRNA	HIV 1	Faz I/II	NCT02413645
mRNA-1647	Sitomegalovirüs	Faz I	NCT03382405
BNT162b2	SARS-CoV-2	Faz I/II/III tamamlandı	NCT04368728
mRNA-1273	SARS-CoV-2	Faz I/II/III tamamlandı	NCT04283461

antikor tepkileri için farklı biyolojik gereksinimler var mı? Örneğin, daha önce influenza virüsüne maruz kalmış insanlarda önceden var olan bağışıklık, bir mRNA-LNP aşısının immünojenitesini etkiler mi? Araştırmacılar bir yandan bu sorulara yanıt ararken bir yandan da bir yıldır devam eden COVID-19 pandemisi için aşı çalışmalarını hızlandırmışlardır. COVID-19 pandemisi için şu anda 251 aşı çalışması devam etmektedir. Bunlardan 181'i ön klinik aşamasında, 70'i ise klinik fazda veya klinik fazı tamamlamış olan aşılardır. Klinik fazdaki 70 aday aşının %10 (7)'u mRNA, %33 (n= 23)'ü protein, %16 (n= 11)'sı viral vektör, %14 (n= 10)'ü DNA, %14 (n= 10)'ü inaktif virüs aşısı olup geri kalanı viral partikül veya benzeri aşılardır⁶⁸.

Klinik faz çalışmalarını tamamlayan yeni teknoloji mRNA aşılarından ikisi (Pfizer-BioNTech ve Moderna) şu anda dünyanın birçok ülkesinde uygulanmaya başlamıştır. Pfizer-BioNTech mRNA aşısının geliştirme ve test sürecinde ismi BNT162b2, uluslararası ismi Tozinameran ve marka adı Cominary olarak belirlenmiştir. BNT162b2 mRNA dizisi 4.284 nükleotit uzunluğunda olup SARS-CoV-2'nin spike proteinini kodlamaktadır. 5'UTR bölgesi insan alfa globin geninden türetilmiş olup, 30 nükleotitik bir poli (A) kuyruğuna sahiptir. mRNA üridin yerine 1-metil 3' pseudo-üridin içermektedir. Bir LNP ile formüle edilerek kas içine verilmektedir. Bu aşının Faz III çalışması, 43532 gönüllüde 14 gün ara ile iki doz olarak denenmiş ve etkinliği %95 olarak belirlenmiştir⁶⁹. Moderna firmasının mRNA-1273 olarak adlandırılan mRNA aşısı, SARS-CoV-2'nin S(2P) spike glikoproteinini kodlamaktadır. 5' ucunda özel CAP₁ yapısı ve üridin yerine N₁-metil pseudo-üridin içermektedir. LNP ile formüle edilen bu mRNA aşısı da 14 gün ara ile iki doz uygulanmakta-

dır. Faz III çalışması 30000 gönüllüde tamamlanan mRNA1273 mRNA aşısının etkinliği %94.5 olarak belirlenmiştir⁷⁰.

14 Aralık 2020-22 Şubat 2021 tarihleri arasında dünya üzerinde 212.15 milyon kişi (%2.68) aşılanmış olup bunun büyük bir kısmını mRNA aşısı oluşturmaktadır. İlk verilere göre iki mRNA aşısı da ciddi semptomların ve ölümlerin önlenmesinde %100 etkili oldukları, ayrıca bu süreçte belirlenen yeni SARS-CoV-2 varyantlarında da (B.1.1.7: İngiltere, B.1.351: Güney Afrika ve P.1: Brezilya) etkili oldukları belirlenmiştir⁷¹.

Sonuçlar ve Gelecekteki Beklentiler

Geçtiğimiz birkaç yıl, mRNA aşıları alanında kritik öneme sahip gelişmeler yaşanmış, birçok klinik öncesi ve klinik uygulama bu yeni aşı profilinin uygulanabilirliğine dair somut kanıtlar sunmuştur.

mRNA aşılarındaki ilk çalışmaların çoğu kanser uygulamalarına odaklanırken, son zamanlardaki bir çok çalışma, mRNA'nın influenza virüs, Ebola virüs, Zika virüs, *Streptococcus* ve *T.gondii* türleri dahil olmak üzere çok çeşitli bulaşıcı patojenlere ve son olarak SARS-CoV-2'ye karşı koruma gücünü ve çok yönlülüğünü göstermiştir.

Hem kanser hem de bulaşıcı hastalık mRNA aşıları için insan denemelerinden elde edilen veriler cesaret vericidir, ancak etkinliği arttırmak ve aşı uygulamasından sonra olumsuz olayların en aza indirilmesi için bu formülasyonları rasyonel bir şekilde manipüle etmek, transfer materyallerinde daha fazla iyileştirme ve çeşitli mRNA aşı tiplerinin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

Yeni üretim yöntemleri ve farklı nanomateryal transfer malzemeleri, yeni nesil mRNA aşılarının hızlı, ucuz ve seri üretimini kolaylaştıracaktır.

Son on yılda birçok biyoteknoloji firması, mRNA aşılarını geliştirmek ve ticarileştirmek için çok uluslu kamu ve özel ortaklık antlaşmaları ile yatırımlarını güçlendirmektedir. Bu umut vaat eden mRNA aşı platformlarının gelişmesine ve kaynakların ekonomik kullanımını sağlayacaktır.

Bu nedenle, mRNA aşılarının geleceği son derece parlaktır ve biyoteknoloji şirketleri ve diğer kurumlar tarafından sağlanan klinik veriler ve kaynaklar mRNA temelli terapötiklere yönelik temel araştırmaları büyük ölçüde artıracak ve güçlendirecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Younger DS, Younger AP, Guttmacher S. Childhood vaccination: implications for global and domestic public health. *Neurol Clin* 2016; 34(4): 1035-47.
2. Plotkin SA. Vaccines: the fourth century. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(12): 1709-19.

3. Scheiblhofer S, Thalhamer J, Weiss R. DNA and mRNA vaccination against allergies. *Pediatr Allergy Immunol* 2018; 29(7): 679-88.
4. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247(4949 Pt 1): 1465-8.
5. Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed. *New Engl J Med* 2020; 382(21): 1969-73.
6. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol* 2020; 65: 14-20.
7. Pascolo S. Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol Med* 2006; 127: 23-40.
8. Kormann MSD, Hasenpusch G, Aneja MK, Nica G, Flemmer AW, Herber-Jonat S, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol* 2011; 29(2): 154-7.
9. Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol. Ther* 2019; 27(4): 710-28.
10. Beissert T, Perkovic M, Vogel A, Erbar S, Walzer KC, Hempel T, et al. A trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. *Mol Ther* 2020; 28(1): 119-28.
11. Kenneth Lundstrom Self-Replicating RNA Viruses for RNA Therapeutics. *Molecules* 2018; 23(12): 3310-5.
12. Schlake T, Thess A, Thran M, Jordan I. mRNA as novel technology for passive immunotherapy. *Cell Mol. Life Sci* 2019; 76(2): 301-28.
13. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(16): 7511-26.
14. Kocmik I, Pieczyk K, Rudzinska M, Niedzwiecka A, Darzynkiewicz Z, Grzela R. et.al. Modified ARCA analogs providing enhanced translational properties of capped mRNAs. *Cell Cycle* 2018; 17(13): 1624-36.
15. Goss DJ, Kleiman FE. Poly (A) binding proteins: Are they all created equal? *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013; 4(2): 167-79.
16. Elango N, Elango S, Shivshankar P, Katz MS. Optimized transfection of mRNA transcribed from ad(A/T)100 tail-containing vector. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(3): 958-66.
17. Trepotec Z, Aneja MK, Geiger J, Hasenpusch G, Plank C, Rudolph C: Maximizing the translational yield of mRNA therapeutics by minimizing 5'-UTRs. *Tissue Eng* 2019; 25(1-2): 69-79.
18. Adibzadeh S, Fardaei M, Takhshid MA, Miri MR, Rafiei Dehbidi G, Farhadi A, et al. Enhancing stability of destabilized green fluorescent protein using chimeric mrna containing human beta-globin 5' and 3' untranslated regions. *Avicenna J Med Biotechnol* 2019; 11(1): 112-7.
19. Gallie DR, Tanguay RL, Leathers V. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* 1995; 165(2): 233-8.
20. Vivinus S, Baulande S, van Zanten M, Campbell F, Topley P, Ellis JH, et al. An element within the 5' untranslated region of human Hsp70 mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. *Eur J Biochem* 2001; 268(7): 1908-17.
21. Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, Miller RL, Cheng CJ, Subramanian RR, et al. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. *RNA Biol* 2018; 15(6): 756-62.
22. Licursi M, Christian SL, Pongnopparat T, Hirasawa K. In vitro and in vivo comparison of viral and cellular internal ribosome entry sites for bicistronic vector expression. *Gene Therapy* 2011; 18(6): 631-6.
23. Kudla G, Lipinski L, Caffin F, Helwak A, Zyllicz M. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells. *PLoS Biol* 2006; 4(6): e180.
24. Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T. N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *J Control Release* 2015; 217: 337-44.
25. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein encoding mRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(21): e142.

26. Baidersdorfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, Kariko K: A facile method for the removal of dsRNA contaminant from in vitro-transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 15: 26-35.
27. Guan S, Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther* 2017; 24(3): 133-43.
28. Golombek S, Pilz M, Steinle H, Kochba E, Levin Y, Lunter D, et al. Intradermal delivery of synthetic mRNA using hollow microneedles for efficient and rapid production of exogenous proteins in skin. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2018; 1: 382-92.
29. Selmi A, Vascotto F, Kautz-Neu K, Tureci O, Sahin U, von Stebut E, et al. Uptake of synthetic naked RNA by skin-resident dendritic cells via macropinocytosis allows antigen expression and induction of T-cell responses in mice. *Cancer Immunol* 2016; 65(9): 1075-83.
30. Lorenz C, Fotin-Mlecsek M, Roth G, Becker C, Dam TC, Verdurmen WPR, et al. Protein expression from exogenous mRNA: uptake by receptor-mediated endocytosis and trafficking via the lysosomal pathway. *RNA Biol* 2011; 8(4): 627-36.
31. Villemejane J, Mir LM. Physical methods of nucleic acid transfer: General concepts and applications. *Br J. Pharmacol* 2009; 157(2): 207-19.
32. Ryu YC, Kim DI, Kim SH, Wang H, Hwang BH. Synergistic transdermal delivery of biomacromolecules using sonophoresis after microneedle treatment. *Biotechnol. Bioprocess Eng* 2018; 23: 286-92.
33. Reichmuth A. M, Oberli M. A, Jeklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Ther Deliv* 2016; 7(5): 319-34.
34. Zeng C, Zhang C, Walker PG, Dong Y. Formulation and delivery technologies for mRNA vaccines. *Curr Microbiol Immun* 2020.
35. Billingsley MM, Singh N, Ravikumar P, Zhang R, June CH, Mitchell MJ. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering. *Nano Lett* 2020; 20: 1578-89.
36. Haabeth OAW, Blake TR, McKinlay CJ, Waymouth RM, Wender PA, Levy R. mRNA vaccination with charge-altering releasable transporters elicits human T cell responses and cures established tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2018; 115(39): E9153-E9161.
37. Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, McPartlan JS, Tsosie JK, Tilley LD, et al. Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H₁N₁ influenza, and *Toxoplasma gondii* challenges with a single dose. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113(29): E4133.
38. Udhayakumar VK, De Beuckelaer A, McCaffrey J, McCrudden CM, Kirschman JL, Vanover D, et al. Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide. *Adv Healthc Mater* 2017; (6)13: 160-70.
39. Kang Z, Meng Q, Liu K. Peptide-based gene delivery vectors. *J Mater Chem* 2019; 7(11): 1824-41.
40. Jarzebska NT, Lauchli S, Iselin C, Lars E French LE, Pal J, Guenova E, et al. Functional differences between protamine preparations for the transfection of mRNA. *Drug Delivery* 2020; 27: 1231-5.
41. Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot J-P, Geginat J, Radsak M, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine econdensed mRNA. *Eur J Immunol* 2005; 35(5): 1557-66.
42. Jansen MAA, Klausen LH, Thanki K, Lyngso J, Skov Pedersen J, Franzyk H, et al. Lipidoid-polymer hybrid nanoparticles loaded with TNF siRNA suppress inflammation after intra-articular administration in a murine experimental arthritis model. *Eur J Pharm Biopharm* 2019; 142: 38-48.
43. Zhao W, Zhang C, Li B, Zhang X, Luo X, Zeng C, et al. Lipid polymer hybrid nanomaterials for mRNA delivery. *Cell Mol Bioeng* 2018; 11: 397-406.
44. Hua Z, Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol* 2013; 10(2): 103-6.
45. Kato H, Oh SW, Fujita T. RIG-I-like receptors and Type I interferonopathies. *J Interferon Cytokine Res* 2017; 37(5): 207-13.
46. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of doublestranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-8.

47. Ablasser, Poeck H, Anz D, Berger M, Schlee M, Kim S, et al. Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J Immunol* 2009; 182(11): 6824-833.
48. Schlee M. Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology* 2013; 218(11): 1322-35.
49. Liu G, Park HS, Pyo HM, Liu Q, Zhou Y. Influenza A virus panhandle structure is directly involved in RIG-I activation and interferon induction. *J Virol* 2015; 89(11): 6067-79.
50. Tatematsu M, Funami K, Seya T, Matsumoto M. Extracellular RNA sensing by pattern recognition receptors. *J Innate Immun* 2018; 10(5-6): 1-9.
51. Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, Bulychov A, Brito LA, Hassett KJ, et al. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther* 2017; 25(6): 1316-27.
52. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol* 2009; 129(2): 302-8.
53. Sayers EJ, Peel SE, Schantz A, England RM, Beano M, Bates SM, et al. Endocytic profiling of cancer cell models reveals critical factors influencing LNP-mediated mRNA delivery and protein expression. *Mol Ther* 2019; 27(11): 1950-62.
54. Islam MA, Reesor EK, Xu Y, Zope HR, Zetter BR, Shi J. Biomaterials for mRNA delivery. *Biomater Sci* 2015; 3(12): 1519-33.
55. Veiga N, Goldsmith M, Granot Y, Rosenblum D, Dammes N, Kedmi R, et al. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4493-6.
56. Xue HY, Liu S, Wong HL. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. *Nanomed* 2014; 9(2): 295-312.
57. Zschaler J, Schlorke D, Arnhold J. Differences in innate immune response between man and mouse. *Crit Rev Immunol* 2014; 34(5): 433-54.
58. Siewert C, Haas H, Nawroth T, Ziller A, Nogueira SS, Schroer MA et al. Investigation of charge ratio variation in mRNA - DEAE-dextran polyplex delivery systems. *Biomaterials* 2019; 192: 612-20.
59. Jones KL, Drane D, Gowans EJ. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* 2007; 43(5): 675-81.
60. Iglesias-Lopez C, Agusti A, Obach M, Vallano A. Regulatory Framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Europe and United States. *Front Pharmacol* 2019; 10: 921.
61. European Medicines Agency. Commission Directive 2009/120/EC. European Commission. Available from: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol1/dir_2009_120/dir_2009_120_en.pdf (2009).
62. U.S. Food & Drug Administration. Guidance for Industry: Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications. U.S. Food & Drug Administration. Available from: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/ucm091968.pdf> (2007).
63. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman E. Suppression of RNA recognition by toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 2005; 23(2): 165-75.
64. Abinader LG. Foundational mRNA patents are subject to the Bayh-Dole Act provisions. Posted on November 30, 2020.
65. Pepini T, Pulichino AM, Carsillo T, Carlson AL, Sari-Sarraf F, Ramsauer K, et al. Induction of an IFN-mediated antiviral response by a self-amplifying RNA vaccine: implications for vaccine design. *J Immunol* 2017; 198(10): 4012-24.
66. Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, et al. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 2007; 110(7): 2457-65.
67. Lundstrom K. Latest development on RNA-based drugs and vaccines. *Future Sci* 2018; 4: FSO300.

68. World Health Organization (WHO). Draft Landscape And Tracker Of COVID-19 Candidate Vaccines. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
69. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383: 2603-15.
70. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021; 384(5): 403-16.
71. Our World in Data. COVID Vaccinations. Available from: <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.