

BÖLÜM 5

RNA AŞI TEKNOLOJİLERİNDEKİ GÜNCEL GELİŞMELER

Zülfinaz Betül ÇELİK¹
Caner GÜNAYDIN²

GİRİŞ

Bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde RNA-tabanlı aşılar, geleneksel aşı geliştirme yöntemlerine önemli bir alternatif olarak umut verici potansiyele sahiptir (1). Yeni ve etkin aşılarla olan gereksinim yakın zamanda ortaya çıkan ve hala devam eden COVID-19 pandemisi ile daha belirgin hale gelmiştir. RNA aşıları, çeşitli patojenlere karşı güçlü ve koruyucu bağışıklık yanıtı oluşturur, böylece canlı ve inaktif virüs aşılarına, altınite aşılarına ve diğer nükleik asit tabanlı aşılarla göre daha avantajlıdır. Ayrıca RNA, bulaşıcı olmayan, genoma entegre olmayan, normal hücresel süreçlerde hızlıca yıkılan ve sadece geçici olarak aktif olan bir moleküldür. Bunun yanı sıra, RNA molekülleri hem bağışıklık yanıtı oluşturmak hem de bağışıklık yanıtını güçlendirmek için tekrarlı olarak uygulanabilir özelliktedir (2).

RNA'nın önemli özelliklerinden biri de hızlı ve düşük maliyetli üretilebilen, hücre ve hayvan materyali içermeyen ve üretim miktarı kontrol edilebilen bir molekül olmasıdır (2). Ancak, *in vivo* sistemlerde mRNA aşılarında etkinliğin düşük olması ve RNA molekülünün kararsızlığı gibi konular da endişe oluşturmaktadır. Bu sorunları çözmek için yapılan son gelişmelerle, mRNA translasyonunun ve stabilitesinin optimizasyonunda, immünojenitenin modülasyonunda ve aşının hücrelere verilme sistemlerinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Böylece, bulaşıcı hastalıklara ve farklı kanser tiplerine karşı aşı geliştirilmesine katkı sağlanmış olup, hem hayvan modellerinde hem de klinik denemelerde ümit verici sonuçlar gözlenmiştir (3).

RNA AŞILARINA GENEL BAKIŞ

Ökaryotik ve viral genomlardan gelen olgun mRNA'larda, mRNA'nın olgunlaşma aşamasında 5' ucuna eklenmiş olan bir 7-metilguanosin (m7G, m7GpppN yapı-

1 Dr. Öğr. Üyesi, Samsun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., zbcelik25@gmail.com

2 Dr. Öğr. Üyesi, Samsun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji AD., gunaydincnr@gmail.com

5') başlığı bulunmaktadır. Bu 5'-cap yapısı mRNA'nın ekzonükleazlar tarafından degradesyondan korunmasını sağlar. Ayrıca, 5'-cap yapısı ökaryotik translasyon başlama faktörü eIF4E'nin mRNA'ya bağlanmasını ve onun ribozoma yüklenmesini sağlar. Bunun yanı sıra, 5'-cap yapısı doğal bağışıklık sensörlerinin mRNA'yı tanımasını önlemede de rol oynamaktadır. mRNA'nın olgunlaşma basamağındaki diğer bir modifikasyonla transkriptin 3'-ucuna eklenmiş olan Poli (A) kuyruğu ise translasyonda ve mRNA'nın kararlılığında önemli bir rol oynar. mRNA transkriptinin önemli bileşenlerinden olan 5' ve 3' translasyona uğramayan bölgeler (5'-ve 3'-UTR'ler) de gen ekspresyonu için oldukça önemlidir. UTR'ler, mRNA'nın çekirdekte sitoplazmaya taşınmasında, translasyon etkinliğinin düzenlenmesinde, mRNA'nın hücre içi lokalizasyonunun düzenlenmesinde ve mRNA kararlılığında önemli rol oynamaktadır (4).

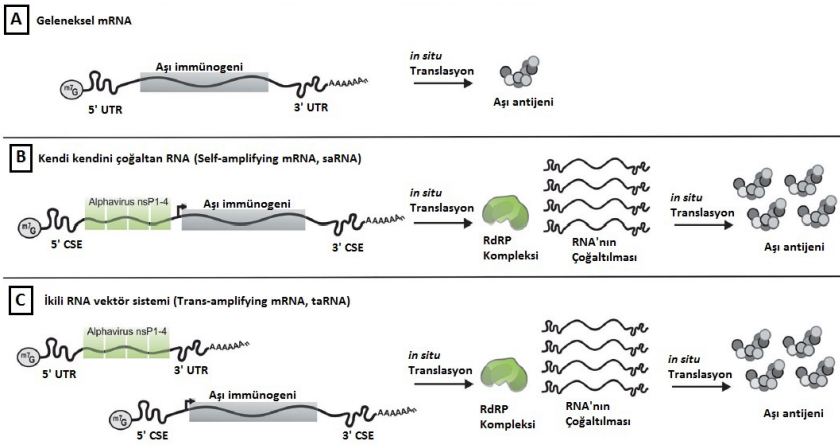
mRNA aşılı da olgun bir mRNA'nın özelliklerine sahip olacak şekilde, bir 5' başlık (cap) (m7G) bölgesi, bir poli (A) kuyruğu, 5' ve 3' translasyona uğramayan bölgeler (5'UTR ve 3'UTR) ve açık okuma çerçevesinden oluşmaktadır. mRNA aşılı hücrelerdeki translasyon mekanizmalarını kullanarak ilgili aşı antijenini üretir ve böylece bağışıklık yanıtı oluştururlar. mRNA aşılı temel olarak geleneksel mRNA aşılı (replik olmayan RNA, non-replicating mRNA, nrRNA) ve kendi kendini çoğaltan (self-amplifying, saRNA) mRNA aşılı olarak iki sınıfa ayrılabilir (Şekil 1) (4).

Geleneksel mRNA (nrRNA) aşılı yalnızca ilgili aşı antijeni dizisini kodlar ve yapısal olarak konak hücrenin mRNA'larına benzerdir, yani doğal olgun mRNA'nın sentetik bir analogudur. Kendi kendini çoğaltan (saRNA) RNA aşılındaki sistemde ise mRNA molekülleri kendi kendini çoğaltmasına imkan sağlayacak şekilde modifiye edilmiştir (5).

mRNA aşı teknolojileri yaklaşık otuz yıldır var olmasına karşın, yalnızca SARS-CoV-2 hastalığı için mRNA aşılılarının kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Ancak çeşitli faz aşamalarında olan çok sayıda mRNA aşı çalışması da diğer viral enfeksiyonlar için devam etmektedir. SARS-CoV-2 hastalığı için onaylanan ilk mRNA aşılı BTN162b2 (Pfizer-BioNTech), diğeri ise mRNA-1273 (Moderna)'dır. Her iki aşı da faz I/II/III çalışmalarını tamamlamış ve kullanım onayı almıştır. Bunun yanı sıra, faz III aşamasındaki ARCoV (Walvax Biotechnology) ve prelinik aşamadaki CV2nCoV/CVn (CureVac) diğeri denemeleri devam eden SARS-CoV-2 aşılıdır (6).

Onaylanan ilk mRNA aşılı BTN162b2 (Pfizer-BioNTech) lipit nanopartikülünde formüle edilmiştir ve mRNA'da üridin yerine 1-metil 3' pseudoüridin olacak şekilde nükleozid modifikasyonu yapılarak elde edilmiş replike olmayan mRNA

ile geliştirilmiştir. Lipit nanopartikülleri içindeki mRNA'yı degradasyondan korur ve kas içine enjeksiyonuyla konak hücrelere iletilebilmesine olanak sağlar. Bu mRNA molekülü hücreye girdiğinde, virüsün konak hücreye tutunmasını ve hücre içine girmesini sağlayan SARS-CoV-2 spike proteinine translasyonu gerçekleştirir. Bu sayede konakta SARS-CoV-2 spike proteinine karşı nötralize edici antikorlar oluşur ve spike proteinine spesifik T hücre yanıtı (CD4⁺ ve CD8⁺) oluşumu indüklenir. BTN162b2'nin 21 günlük aralıkla 30µg'lık 2 doz halinde uygulanması ile COVID-19'a karşı %95 koruma sağladığı bildirilmiştir. Hatırlatma dozu olarak uygulanan 3. doz ile de bağışıklığın yanıtının güçlendirildiği bildirilmiştir (7).



Şekil 1. Geleneksel, kendi kendini çoğaltan (saRNA) ve ikili RNA vektör sistemi (taRNA) ile aşı tasarlanması. Tüm transkriptler için 5' cap (m7G) ve poli (A) kuyruğu ortaktır. A) Geleneksel mRNA'lar aşı immünogeni ile 5' UTR ve 3' UTR bölgelerini kodlar. Aşı antijeni replike olmayan bir transkriptten üretilir. B) Kendi kendini çoğaltan mRNA (saRNA) 5' ve 3' CSE (korunmuş dizi elementleri) dizilerini, subgenomik bir promotör olan ve yapısal olmayan proteinleri kodlayan nsP1-4 genlerini ve aşı immünogenini kodlar. *In situ* translasyonu takiben nsP1-4 proteinleri bir RNA-bağımlı RNA Polimeraz (RdRP) kompleksi oluşturur. Bu RdRP kompleksi CSE dizilerini tanıyarak aşı antijenini kodlayan transkriptleri çoğaltır. Bunun sonucunda da hücredeki aşı antijenini miktarı artmış olur. C) Trans-amplifiye edici mRNA'lar (taRNA) saRNA'lara benzer şekilde antijen miktarını artırmak için iki farklı transkript kullanır. 5' ve 3' UTR'lerle çevrili ve nsP1-4 genlerini kodlayan geleneksel bir mRNA, viral CSE dizilerini, subgenomik promotörü ve aşı immünogenini kodlayan ayrı bir transkriptle birlikte hücreye verilir. Geleneksel mRNA'nın *in situ* translasyonu ile RdRP kompleksi oluşur. Bu kompleks aşı antijeninin çoğaltılması için aşığı kodlayan transkripti amplifiye eder (8). (UTR, translasyona uğramayan bölge).

saRNA aşılama stratejisi tek sarmallı pozitif polariteli (+) bir RNA molekülü içerir ve alfavirüs benzeri bir sistemle tasarlanır. (5). Alfavirüsler, flavivirüsler, kızamık virüsleri ve rabdovirüsler gibi tek sarmallı RNA virüsleri, konak hücrelerde kendi

kendine RNA amplifikasyon kapasitesinin yüksek olması ile karakterizedir. Bu özellikleri de onları aşı geliştirme için ilgi çekici araçlar haline getirmektedir. Özellikle alfavirüsler ve flavivirüsler rekombinant partiküller olarak, RNA replikonunu taşıyan DNA/RNA plazmid vektörleri şeklinde veya RNA replikon molekülleri şeklinde hücrelere verilebilir. Kendi kendini amplifiye eden RNA viral vektörleri yüksek viral ve tümör antijeni ekspresyon seviyeleri için kullanılmıştır ve hayvan modellerinde güçlü hücrel ve humoral bağışıklık yanıtı oluşturdukları gözlenmiştir. Aşılama ile ölümcül dozlardaki viral patojenlere ve tümör hücrelerine karşı koruma sağlanmıştır. Kendi kendini çoğaltan RNA viral vektörlerinin klinik öncesi ve klinik uygulamalarda aşı geliştirilmesinde etkin olduğu, RNA replikonları sayesinde konak hücrede önemli derecede az miktarlarda bile çok güçlü immün yanıt oluşturmaları ile kanıtlanmıştır. (3).

mRNA Aşılarının Dezavantajları

Kanserde ve viral hastalıklarda mRNA aşılarının birçok avantajı olmasına rağmen, bu aşılar için çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Şu an için, mRNA aşılarındaki en önemli konulardan biri güvenlidir. Son yıllarda, aşırı mRNA immünojenitesi, kararsızlığı ve etkinliğinin az olması gibi dezavantajlarla karşılaşmış ve bunların üstesinden gelmek için sekans optimizasyonu ve farklı mRNA türlerinin geliştirilmesi gibi yaklaşımlar uygulanmaya başlanmıştır.

mRNA aşıları için, gelecekteki çalışmalarda potansiyel güvenlik endişeleri arasında lokal ve sistemik inflamasyon, aşı immünojeninin biyolojik dağılımı ve kalıcılığı, oto-reaktif antikorların uyarılması ve transfer sistemi bileşenlerinin potansiyel toksik etkileri yer almaktadır. Bunlar içerisinde en çok endişe duyulan nokta, bazı mRNA aşı platformlarının, potansiyel olarak otoimmünite ile bağlantılı olan güçlü tip I interferon yanıtını uyarabileceğidir. *In vitro* transkribe edilmiş RNA, konak hücreler tarafından RNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR), Toll-like reseptörler (TLR) ve 2'-5'-oligoadenilat sentetaz (OAS) gibi bir dizi patern tanıma reseptörü tarafından tanınır (7,8). Bu da lokal inflamasyona yol açabilir. Bu nedenle, mRNA aşılmasından önce otoimmün reaksiyon riski yüksek olan bireylerin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir.

RNA aşılarının dezavantajları söz konusu olduğunda, ilk akla gelen sorunlardan biri de RNase degradasyonuna açık olmalarıdır. Ancak, serumdaki mRNA'nın kararsızlığı, aşının bireye uygulama yöntemlerinin değiştirilmesiyle ve uygun kimyasal modifikasyonlarla engellenebilir. RNA aşılarıyla ilgili diğer hassas nokta ise mRNA'nın yapısı gereği, aşıların saklanması ve dağıtımında (BioNTech için -70°C, Moderna için -20°C) soğuk zincir gerektirmesidir (7). Bu durum bazı ülkelerin aşığı ulaşımını zorlaştırabilmektedir.

KENDİ KENDİNE ÇOĞALAN RNA (SELF-AMPLIFYING, SARN) AŞILARI

Genel Özellikleri

Kendi kendine çoğalan RNA (saRNA) virüslerinin ortak özelliği, bir kapsit ve zarf protein yapısı içinde bulunan tek sarmallı RNA (ssRNA) genomuna sahip olmalarıdır (9). Alfavirüsler ve flavivirüsler pozitif polariteli bir ssRNA genomuna sahiptir, ancak kızamık virüsleri (measles viruse, MV) ve rabdovirüslerde negatif polariteli ssRNA genomu bulunur. Her iki durumda da saRNA virüslerinin RNA genomu, nükleik asidin çekirdeğe gitmesine gerek kalmaksızın doğrudan sitoplazmada işlev yapabilir. Pozitif polarite durumunda, translyasyon gelen ssRNA genomundan doğrudan başlatılabilirken (10), negatif sens RNA molekülleri için pozitif iplikli bir RNA kalıbının oluşturulması gerekmektedir (11). Tüm saRNA virüsleri, başlangıçta yapısal olmayan genlerini eksprese ederek RNA replikasyon kompleksinin (RNA replikon) oluşumunu sağlar, böylece enfekte olan konak hücrelerde aşırı seviyede RNA replikasyonu gerçekleşir (10). Bu özellikleri sayesinde, güçlü subgenomik promotörlerle birlikte tek bir RNA molekülünden 200.000 kopya RNA'nın yapıldığı ve nihayetinde viral proteinlerin aşırı ekspresyonunun sağlandığı ileri sürülmüştür. Böylece, memeli ve diğer hücre hatlarında, primer kültürlerde ve *in vivo* olarak saRNA virüsleri ekspresyon vektörleri tasarlanmasında önemli araçlar haline gelmiştir (12).

saRNA aşıları tasarlanırken, alfavirüsün genomik RNA'sındaki yapısal olmayan proteinleri kodlayan genler korunurken, subgenomik promotörün kontrolünde olan yapısal genlerin yerine ilgili aşının antijeni yerleştirilir. Yapısal olmayan proteinler otoproteolitik olarak olgunlaşır ve kendi RNA kalıbını replike etme özelliğine sahip olan multi-enzim replikaz kompleksi ile birleşir. Bu replikaz, RNA-bağımlı bir RNA polimeraz (RdRP) olarak davranır ve saRNA'yı *cis* olarak (yani aynı RNA üzerindeki iki genin birlikte hareket etmesiyle) çoğaltır. Bunun sonucunda, aşılanan konağın hücrelerinde çok yüksek vektör kopya sayısı ve böylece yüksek aşı antijeni seviyeleri elde edilir. Böylece, nrRNA'dan daha düşük dozdaki saRNA seviyeleri aynı düzeyde immün yanıt oluşturmak için yeterli olabilir (2).

saRNA aşı çalışmaları

Karakteristik özellikleri ve avantajları sayesinde, kendi kendine çoğalan RNA virüs vektörleri hem bulaşıcı hastalıklar için hem de farklı kanser tipleri için aşı geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, bakteriyel ve parazit enfeksiyonlarına karşı bağışıklama için de saRNA viral vektörleri de uygulanmıştır (3). EBOV

(Ebola virus), LASV (Lassa virus), HIV (Human immunodeficiency virus) ve influenza gibi viral enfeksiyonlar açısından bakıldığında, hayvan modellerinde letal dozlardaki patojenik virüslere karşı saRNA viral vektörleri ile çok güçlü bağışıklık yanıtı indüklenebilmiştir. Ayrıca, sağlıklı gönüllülerde yapılan bir klinik faz I denemesinde, HIV-1'e karşı orta düzeyde antikor oluşturabildikleri gözlenmiştir (13). Halen devam etmekte olan COVID-19 pandemisi de, viral hastalıkların önemine bir kez daha dikkat çekmiştir ve yeni aşuların geliştirilmesi çalışmalarına hız kazandırmıştır (14).

Kanser aşuları kapsamında, çeşitli kanser endikasyonları için çok sayıda hayvan modelinde yapılan çalışmalarda tümör gerilemesi olduğu ve hayatta kalma süresinin uzadığı gösterilmiştir. Bu kapsamda yürütülen klinik çalışmaların çoğu faz I çalışmalarından oluşmaktadır ve esas odak noktası güvenlik ve toleranstır. Buna rağmen, VEE-CEA (Venezuelan equine encephalitis virus - carcinoembryonic antigen) ile aşılanan pankreas kanseri hastalarında hayatta kalma süresi uzatılmış (15), MV-CEA (Measles Virus-carcinoembryonic antigen) ile aşılanan over kanseri hastalarında hastalık kontrol altına alınmış (16) ve MV-NIS (Measles virus encoding thyroidal sodium iodide symporter) ile aşılanan refrakter multipl miyelomlu bir hastada tam remisyon sağlanmıştır (17).

mRNA aşuları, kanser tedavisi için uygun olan MHC I aracılı CD8+ T hücre yanıtlarını etkin bir şekilde indükler. Ancak, tümör-immün kaçış mekanizmaları, kanser aşularının etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerdendir. Kanser aşularına direnç, tümör immün kontrolünü destekleyen sinyal yollarındaki mutasyonlar, tümör antijen ekspresyonunun azalması yada hiç olmaması veya HLA ekspresyonunun kaybı gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır (18). Tüm bu faktörler tümör hücrelerinin T hücreleri tarafından tanınmasına engel olabilir.

Tümör hücreleri arasındaki immünojenisite farklılıkları nedeniyle, güçlü immünojenisiteye sahip olan tümör hücreleri etkili bir anti-tümör-bağışıklık yanıtı uyarır ve vücut tarafından elimine edilir. Nispeten daha zayıf immünojenikliğe sahip tümör hücreleri ise bağışıklık sisteminden kaçabilir ve bu olaya immün seleksiyon adı verilir. Ayrıca, tümör hücreleri yüzeylerindeki HLA ekspresyonunu azaltarak da T hücrelerinden kaçabilirler. mRNA aşularının çeşitli avantajları olmasına rağmen, bu aşular RNA molekülünün kararsızlığı, doğuştan gelen immünojenisitesi ve aşının canlıya verildikten sonra dağılımının etkinliğinin düşük olması nedeniyle bazı dezavantajlara da sahiptir (18). Aşı çalışmalarında, bu dezavantajların önüne geçmek ve aşının etkinliğini ve güvenliğini artırmak için çok yönlü yaklaşımlar geliştirilmektedir.

Avantajları

saRNA viral vektörlerin esas ilgi çekici özelliği, mRNA'nın doğrudan sitoplazmada hızlı ve etkin şekilde amplifikasyonu ve RNA replikonlarına, rekombinant virüs partiküllerine (VLP) ve DNA/RNA vektörlerine dayanan çeşitli vektör sistemleriyle hücreye girişinin sağlanabilmesindeki esnekliğidir. Kendi kendine çoğalan RNA virüslerinin etkinliği, farelerde sentetik mRNA'larla (80 µg) aşılama ile kıyaslandığında, influenza virüsüne karşı RNA replikonlarının 64-kat daha az VEE RNA (1.25 µg) ile koruma sağlaması ile doğrulanmıştır (19). Benzer şekilde, geleneksel DNA plazmitleriyle kıyaslandığında SIN-HSV-1-gB (Sindbis virus- Herpes simplex virus 1) DNA replikonu 100- ile 1000-kat arasında daha düşük dozda letal dozdaki virüslere karşı antikor oluşturarak koruma sağlamıştır (20). Servikal kanserde yapılan bir çalışmada ise geleneksel DNA-tabanlı aşılama ile tümör büyümesi engellenememiştir, ancak 200-kat daha düşük dozdaki SFV-HPV E6/7 ile aşılama sonucunda farelerin %85'inde tam tümör regresyonu sağlanmıştır (21).

Kendi kendine çoğalan RNA'lar ile kombinasyonla edilen yeni metotların kemirgenlerde ve büyük hayvan modellerinde hem hücresele hem de humoral immün yanıtları indüklemedeki etkinliği ve böylece replike olmayan RNA'lara üstünlüğü pek çok çalışma ile gösterilmiştir. saRNA'ların replike olmayan RNA'lara karşı bu üstünlüğü, saRNA'lar ile transfeksiyonun normal bir viral enfeksiyonu pek çok yönden taklit etmesinden ve önemli toksisiteye neden olmadan immün yanıtları güçlendirici etki göstermesinden kaynaklanmaktadır (3). saRNA'ların önemli avantajlarından biri de çeşitliliğe olanak sağlamasıdır. Yalnızca ilgili antijeni kodlayan sekansın değiştirilmesiyle hızlı bir şekilde ve üretim şeklini etkilemeden yeni aşılar üretilebilir. Üretimdeki bu hız ve basitlik, Zika virüsü, Ebola virüsü veya en yakın zamanda ortaya çıkan SARS-CoV-2 gibi küresel endişeye neden olan virüslere karşı yeterli dozda ve hızlı aşı tasarlanmasına ve üretimine imkan vermektedir.

TRANS-AMPLİFİYE EDİCİ RNA (TRANS-AMPLIFYING, TARNA) AŞILARI

Genel özellikleri

Beissert ve ark. (2) ilk defa alfaviral saRNA'dan köken alan ve taRNA (trans-amplifying RNA) olarak adlandırılan yeni bir ikili vektör sistemini ortaya koymuştur. Bu yeni aşı sisteminin profilaktik aşı olarak oldukça güçlü bir etkinliği olduğu gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen en önemli bulgulardan biri, taRNA sistemi tarafından antijen ekspresyonunun trans olarak replikaz aktivitesini kodlayan

ko-transfekte RNA'nın doğasına bağlı olduğunun keşfedilmesidir. Replikaz enzimi, RNA'ları trans olarak yani farklı RNA'lar üstünde bulunan iki genin birlikte hareket etmesiyle çoğaltma özelliğine de sahiptir ve transreplikon (TR) olarak da adlandırılır. Transreplikonlar saRNA'ların replikazlarının delesyonuyla elde edilirler. Replikaz aktivitesi, ko-transfekte edilen bir RNA üzerinde kodlanır ve sitoplazmada transreplikonlar ile difüzyon kontrollü olarak etkileşime girer. Replikaz-transreplikon etkileşiminin spesifikliğı ise transreplikonların ana saRNA'dan kalan 5' ve 3' terminal bölgelerindeki korunmuş dizi elemanları ile sağlanır.

Transreplikon ve replikaz aktivitesini iki vektör üzerinde olacak şekilde ayıran taRNA sistemleri, tipik olarak alfaviral RNA replikasyonunun mekanizmalarını ve yapısal gereksinimlerini araştırmak için kullanılır. Ancak, bulaşıcı hastalık aşılırları geliştirilmesi kapsamında sistematik olarak ilk defa Beissert ve ark. (2) tarafından araştırılmıştır. Farmakolojik olarak optimize edilmiş bir nrRNA molekülü kullanılarak replikaz aktivitesi sisteme eklendiğinde güçlü immün yanıt ve aşı antijeni ekspresyonu sağlanmıştır. Çalışmalarının sonucunda, farelerde influenza hemaglutinin antijenini (HA) kodlayan transreplikon-RNA'nın nanogramlık dozlarda kullanılarak nrRNA ile kodlanan replikaz ile birleştirilmesiyle influenza'ya karşı güçlü koruyucu immün yanıt oluştuğunu göstermişlerdir. Daha önceki RNA-tabanlı influenza aşı çalışmalarında ya kendi kendini çoğaltan (saRNA) ya da replike olmayan RNA (non-replicating mRNA, nrRNA) teknolojileri kullanılmıştır (22). Ancak Beissert ve ark. (2) ilk kez bu çalışmalarıyla aşı olarak taRNA sistemini kullanmışlardır ve taRNA ikili vektör sisteminin koruyucu bağışıklık için doz veriminin çok yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Farelerde bu taRNA sistemiyle, influenza hemaglutinin antijenini (HA) kodlayan RNA'nın 50 ng gibi düşük dozlarda bile nötralize edici antikor üretebildiğı ve canlı virüslere karşı çok güçlü bir koruyucu immün yanıt oluşturduğu gözlenmiştir.

Avantajları

Aşı antijeni ve replikaz bileşenlerinin ayrılarak bağımsız vektörler üzerinden kodlanması pek çok yönden avantajlı olarak görülmektedir. Birincisi, ayrı vektör sisteminin güvenlik avantajının olmasıdır. Pseudotip alfavirüslerin replikatif yeterliliğı ve patojenitesi bilinmemektedir. Örneğin; veziküler stomatit virüsünün ve kuduz virüsünün glikoproteinleri prensip olarak saRNA'yı paketleyebilir (23,24). Verilen herhangi bir glikoproteinin membranlı partikül oluşturma ve saRNA'yı paketleme kapasitesinin eksik olduğunun güçlü bir kanıtı olmaksızın bu sistemlerin profilaktik antiviral aşı geliştirilmesinde ve translasyonunda kullanımının güvenlik riskleri göz önünde bulundurulmalıdır. Alman sağlık otoriteleri, ilgili

spesifik glikoprotein saRNA paketleme ve transferinde yetersiz olduğu kesin olarak kanıtlanmadığı sürece saRNA ile transfekte edilen hücrelerin biyogüvenlik seviyesini 2 olarak sınıflandırmaktadır.

taRNA aşısı sistemlerinin ikinci avantajı; antijen üretiminin ve replikaz aktivitesinin iki farklı vektöre ayrılmış olmasının her iki bileşenin bağımsız olarak optimize edilebilmesine olanak sağlamasıdır. Bu sayede çeşitlilik ve etkinlik açısından avantajlıdır. Örneğin; replikasyonun etkinliği için gerekli tüm yapısal elementleri içeren transreplikonun 5' ucu replikazın N-terminalindeki aminoasit dizilerini korumaya gerek kalmadan modifiye edilebilir. Ayrıca, saRNA replikonu nükleozid modifikasyonlarını tölere edemezken, nrRNA translasyonunda bu mümkündür. Hatta nükleozid modifikasyonu yapılmış nrRNA'lar geleneksel nrRNA'lara göre daha güçlü immün yanıt oluşturmaktadır (25,26). taRNA sisteminde replikazı kodlayan nrRNA, hücresel doğal bağışıklık reseptörlerinin aktivasyonunu azaltmak ve translasyonun devamlılığını sağlamak için nükleozidle modifiye edilebilir (27). taRNA ikili vektör sistemi genellikle alfaviral vektörler için uygundur ve sitotoksik olmayan replikazlardan yapılan taRNA'lar özellikle önemli olabilir.

taRNA aşısı sistemlerinin üçüncü avantajı ise; üretiminin kolay olması ve zaman ve maliyet açısından verimli olmasıdır. Transreplikonların doz etkinliğinin artırılması bu avantajlara katkı sağlayabilir, böylece aynı miktarda elde edilecek aşılar daha fazla birey için yeterli olabilir. Bunun yanı sıra, yüksek verim ve iyi saflıktaki uzun RNA moleküllerinin büyük ölçekli üretimi kısa RNA'ların üretiminden daha zordur. Antijen kodlayan bir saRNA 7.5 kb'lık bir yapı ve antijen geni ile 7.3 kb'lık bir vektörden oluşmaktadır. Ancak taRNA sistemi immünolojik olarak ilişkili 1.5 kb'lık bölge ve antijen geni ile 7.8 kb uzunluğunda nrRNA-REPL'den oluşmaktadır. Aşının *in vivo* bağışıklık yanıtı özelliğini kaybetmeden üretim sürecinin basitleştirilmesi için *in vitro* şapka takılması (capping) işleminin yapılmaması ve transreplikonun poli (A) kuyruklarının kısaltılması gibi işlemler de yapılabilir. Ayrıca, taRNA ikili vektör sistemi ile influenza gibi mevsimsel bir aşı için değişmez bir bileşen olan nrRNA-REPL büyük ölçekte önceden üretilip depolanabilir ve talep üzerine yalnızca değişken olan ve doz etkinliği fazla olan antijen kodlayan RNA üretilerek aşı süreçleri hızlandırılabilir (2).

Replike Olan mRNA Aşılarının Dezavantajları

Pseudotip alfavirüslerin patojenitesi ve replikatif yeterliliği bilinmemektedir. Ayrıca, saRNA'ların sürekli, yüksek seviyeli amplifikasyon ve ekspresyonunun uzun vadedeki etkileri hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra, RdRP kompleksinin immünojenisitesi hakkında da çok az bilgi mevcuttur.

Replike olan mRNA aşuları ile ilgili klinik verilerin sınırlı olması, aşının vücuda verilme şeklinin dokuya spesifik olmaması ve hatırlatma/güçlendirici (boost) doz uygulaması gerektirebilmesi dezavantajları olarak göz önünde bulundurulmalıdır. saRNA'ların kanser aşularındaki uygulamaları ise henüz prelinik aşamadır ve klinik uygulamalarla daha fazla araştırılma yapılması gerekmektedir. Kanser mRNA aşularını çoğunlukla replike olmayan mRNA aşuları oluşturmaktadır.

SONUÇ

mRNA aşı teknolojisi uzun yıllardır var olsa da, COVID-19 pandemisinin ortaya çıkmasıyla birlikte bir mRNA aşısı ilk kez klinik denemelere girmiş, faz çalışmalarını tamamlamış ve Aralık 2020'de kullanım onayı almıştır. Bu aşının geliştirilmesi ve ilk denemeleri SARS-CoV-2'nin genetik dizisinin açıklanmasından 10 hafta sonra gibi çok kısa bir süre içinde gerçekleşmiştir. Bu nedenle, mRNA aşı teknolojilerinin avantajı mevcut pandemi krizinin çözümünde anahtar olarak düşünülmektedir.

Kendi kendine çoğalabilen RNA aşuları (saRNA) ve şimdi de iki parçalı RNA vektör sistemine dayanan (taRNA) aşuları *in vivo* antijen üretiminde amplifikasyon ve dayanıklılık sağlaması, güçlü bağışıklık yanıtı oluşturabilmesi ve daha düşük dozlarda etkin olabilmesi, böylece büyük miktarlarda üretim taleplerini karşılayabilmesi gibi özellikleriyle umut vericidir. Sonuç olarak, iki parçalı vektör sistemlerinin güvenlik profili, daha basit üretim süreci ve evrensel olarak uygulanabilirliği göz önüne alındığında, taRNA aşı sistemleri daha geniş çapta araştırılmaya değer olarak görülmektedir.

KAYNAKÇA

1. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature reviews Drug discovery*. 2018;17(4): 261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243.
2. Beissert T, Perkovic M, Vogel A, et al. trans-amplifying RNA vaccine strategy for induction of potent protective immunity. *Molecular Therapy*. 2020;28(1): 119-128. doi:10.1016/j.ymt.2019.09.009.
3. Lundstrom, K. Self-amplifying RNA viruses as RNA vaccines. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(14): 5130. doi: 10.3390/ijms21145130.
4. Kramps T, Elbers K. Introduction to RNA vaccines. *RNA Vaccines*. 2017; 1-11. doi: 10.1007/978-1-4939-6481-9_1.
5. Geall AJ, Mandl CW, Ulmer JB. RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines. *In Seminars in immunology* (Vol. 25, No. 2). Academic Press; 2013. p. 152-159. doi: 10.1016/j.smim.2013.05.001.
6. Wei J, Hui AM. The Development of mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Recent Updates. *Infection and Drug Resistance*. 2021;14: 5271. doi:10.2147/IDR.S341694.
7. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: first approval. *Drugs*. 2021;81(4): 495-501. doi: 10.1007/s40265-021-01480-7.

8. Bloom K, van den Berg F, Arbuthnot P. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. *Gene therapy*. 2021;28(3): 117-129. doi: 10.1038/s41434-020-00204-y.
9. Lundstrom K. Self-amplifying RNA virus vectors: clinical applications in cancer drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019;6(10): 1027-1029. doi: 10.1080/17425247.2019.1653851.
10. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*. 1994;58(3): 491-562. doi: 10.1128/mr.58.3.491-562.1994.
11. Banerjee AK. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiological reviews*. 1987;51(1): 66-87. doi: 10.1128/mr.51.1.66-87.1987.
12. Lundstrom K. RNA viruses as tools in gene therapy and vaccine development. *Genes*. 2019;10(3): 189. doi: 10.3390/genes10030189.
13. Wecker M, Gilbert P, Russell N, et al. Phase I safety and immunogenicity evaluations of an alphavirus replicon HIV-1 subtype C gag vaccine in healthy HIV-1-uninfected adults. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2012;19(10): 1651-1660. doi: 10.1128/CVI.00258-12.
14. Lundstrom K. Coronavirus pandemic—therapy and vaccines. *Biomedicines*. 2020;8(5): 109. doi: 10.3390/biomedicines8050109.
15. Morse MA, Hobeika AC, Osada T, et al. An alphavirus vector overcomes the presence of neutralizing antibodies and elevated numbers of Tregs to induce immune responses in humans with advanced cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(9): 3234-3241. doi: 10.1172/JCI42672.
16. Russell SJ, Federspiel MJ, Peng KW, et al. Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *In Mayo Clinic proceedings*. Elsevier (Vol. 89, No. 7); 2014. p. 926-933. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.04.003.
17. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, et al. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer research*. 2010;70(3): 875-882. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2762.
18. Liu J, Fu M, Wang M, et al. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. *Journal of Hematology & Oncology*. 2022;15(1):1-26. doi: 10.1186/s13045-022-01247-x.
19. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, et al. Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Molecular Therapy*. 2018;26(2): 446-455. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.11.017.
20. Hariharan MJ, Driver DA, Townsend K, et al. DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector. *Journal of virology*. 1998;72(2): 950-958. doi: 10.1128/JVI.72.2.950-958.1998.
21. van de Wall S, Ljungberg K, Ip PP, et al. Potent therapeutic efficacy of an alphavirus replicon DNA vaccine expressing human papilloma virus E6 and E7 antigens. *Oncoimmunology*. 2018;7(10): e1487913. doi: 10.1080/2162402X.2018.1487913.
22. Scorza FB, Pardi N. New kids on the block: RNA-based influenza virus vaccines. *Vaccines*. 2018;6(2): 20. doi: 10.3390/vaccines6020020.
23. Rolls MM, Webster P, Balba NH, et al. Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell*. 1994;79(3): 497-506. doi: 10.1016/0092-8674(94)90258-5.
24. Jia F, Miao H, Zhu X, et al. Pseudo-typed Semliki Forest virus delivers EGFP into neurons. *Journal of neurovirology*. 2017;23(2): 205-215. doi: 10.1007/s13365-016-0486-8.
25. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*. 2017;168(6): 1114-1125. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.017.
26. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*. 2017;543(7644): 248-251. doi: 10.1038/nature21428.
27. Pepini T, Pulichino AM, Carsillo T, et al. Induction of an IFN-mediated antiviral response by a self-amplifying RNA vaccine: implications for vaccine design. *The journal of immunology*. 2017;198(10): 4012-4024. doi: 10.4049/jimmunol.1601877.