



Aşı Teknolojisinde Yeni Bir Dönem: mRNA Temelli Aşı Tasarımı A New Era in Vaccine Technology: mRNA-Based Vaccine Design

Fatih ŞAHİNER¹ [ID], İsmail Selçuk AYGAR² [ID]

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

²Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 10.12.2020. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 12.01.2021.

İletişim [Correspondence]: İsmail Selçuk Aygar; Uzm.Dr., Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-posta: drisa1986@hotmail.com [İsmail Selçuk Aygar; MD, Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey. E-mail: drisa1986@hotmail.com]

Özet

Messenger RNA (mRNA) teknolojisi hem genetik hastalıkların ve kanserlerin tedavisinde (terapötik kanser aşuları) hem de enfeksiyöz hastalıkların yayılımının önlenmesinde gelecek vaat eden yeni nesil bir yaklaşımı temsil eder. mRNA aşı sistemlerinin temel mantığı istenilen bir proteinin viral bir enfeksiyonu taklit ederek vücutta üretilmesini sağlamak ve onun işlevlerinden yararlanmaktır. DNA temelli sistemlerden ve viral vektörlerden farklı olarak üretilmek istenilen proteine ait genetik kodu taşıyan mRNA molekülleri ikinci bir aracı genetik sistem olmaksızın hücrelere doğrudan iletilir ve protein üretimi için gönderilen mesajın sitoplazmaya ulaşması yeterli olduğundan bu moleküller kromozomal yapılarla entegre olma riski taşımazlar. mRNA temelli sistemlerin tasarlanmasındaki temel zorluklar bu moleküllerin hücre içi ve hücre dışı enzimlere çok duyarlı olması, stabilizasyon sorunları, doğal immün sistem tarafından tanınarak ortadan kaldırılması gibi sınırlayıcı özelliklerdir. Tüm bu problemlerin üstesinden gelmek ve başarılı mRNA transfeksiyonu elde etmek adına kapak analogları, modifiye nükleotidler, genetik sekans mühendisliği müdahaleleri, taşıyıcı partiküller ve oda sıcaklığına dayanıklı mRNA sistemlerinin geliştirilmesine yönelik alanlarda son 10 yılda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bir diğer önemli nokta ise mRNA sistemlerinin immünojenitesinin optimize edilmesidir; istenilen adjuvan benzeri etkileri belirli bir derecede korurken, otoimmünite veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olabilecek antijenik uyarılardan kaçınma arasındaki dengeyi sağlamak önemlidir. Bu amaçla özel saflaştırma yöntemlerinin seçimi ve ökaryotik mRNA'lara benzer motiflerin kullanılması gibi yaklaşımlar ve ek adjuvanlarla beraber kullanılan sistemler tasarlanmıştır. Replikasyon olabilen mRNA sistemleri adjuvan özelliği sergileyen çift zincirli RNA (dsRNA) gibi kendi adjuvanlarını üretebilmesi ve daha uzun süreli antijen üretimi ile farklı amaçlara yönelik yeni ve düşük üretim maliyetli tasarım sistemleri olarak denenmektedir. Aynı mRNA molekülü üzerinden birden fazla antijenin veya proteinin hücresel ekspresyonu gibi esnek seçenekler de denenmiştir. Bu makalede mRNA temelli sistemlerin alternatif tasarımlarına değinilmiş ve mRNA aşı teknolojisindeki son gelişmelerin bir özeti sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Optimizasyon, Replikon, Kararlılık, İmmünojenite, RNaz.

Abstract

Messenger RNA (mRNA) technology represents a promising next-generation approach to both the treatment of genetic diseases and cancers (therapeutic cancer vaccines) and the prevention of the spread of infectious diseases. The basic principle of mRNA vaccine systems is to ensure that a desired protein is produced

in the body by mimicking a viral infection and to benefit from its functions. Unlike DNA-based systems and viral vectors, mRNA molecules carrying the genetic code of the desired protein to be produced are directly transmitted to the cells without a second intermediary genetic system, and these molecules do not have the risk of integrating into chromosomal structures, since it is enough for the message sent to reach the cytoplasm for protein production. The main difficulties in designing mRNA-based systems are the limiting features of these molecules, such as being very sensitive to intracellular and extracellular enzymes, stabilization problems, and eliminating them by being recognized by the innate immune system. In order to overcome all these problems and achieve successful mRNA transfection, significant progress has been made in the last 10 years in the fields of cap analogs, modified nucleotides, genetic sequence engineering interventions, carrier particles and the development of room temperature resistant mRNA systems. Another important point is optimizing the immunogenicity of mRNA systems; the balance between avoiding antigenic stimuli that can cause autoimmunity or hypersensitivity reactions and maintaining a certain degree of desired adjuvant-like effects is important. For this purpose, approaches such as the selection of special purification methods and the use of motifs similar to eukaryotic mRNAs and systems used with additional adjuvants have been designed. Self-amplifying mRNA systems are being tested as new and low production cost design systems for different purposes with the ability to produce their own adjuvants, such as double strand RNA (dsRNA) that exhibit adjuvant properties, and with longer antigen production. In this article, alternative designs of mRNA-based systems are discussed and a summary of recent developments in mRNA vaccine technology is presented.

Keywords: Optimization, Replicon, Stability, Immunogenicity, RNase.

Giriş

DNA'daki (deoksiribonükleik asit) bilginin proteine dönüşme sürecinde (santral dogma) haberci (*messenger*) ribonükleik asit (mRNA) molekülleri DNA'dan ribozomlara bilgi taşıyan araçlardır [1]. mRNA molekülünün ve hücre içerisindeki işlevinin ilk tanımlandığı 1961 yılından [2] günümüze gelindiğinde; protein sentezi için gerekli bilgi ribozomlara hücre çekirdeğindeki DNA üzerinden iletilmek yerine; viral enfeksiyonlarda olduğu gibi hücre dışından gönderilebilir hale gelmiştir. Bu gelişmeler sayesinde hücreler belirli bir süre için istenilen proteinleri üretmeye yönlendirilebilmekte ve çeşitli kanserler ve enfeksiyon hastalıkları için terapötik veya koruyucu immün yanıt üretilmesinde birer fabrika gibi kullanılmaktadır [3,4]. mRNA temelli tedavi yaklaşımları ve aşı platformları bilinen diğer yaklaşımların yetersiz kaldığı bazı özel hastalıklar için umut verici stratejiler olarak görülmektedir. mRNA aşılarının sunduğu yüksek etkinlik, düşük erişim maliyetleri ve hızlı ve ölçeklenebilir üretim kapasitesi gibi önemli avantajlar nedeniyle bu sistemler üzerine yürütülen çalışmalar son yıllarda dikkat çekici bir ivme kazanmıştır [5,6]. mRNA temelli tedavi ve aşı sistemleri alanına yapılan doğrudan yatırımların ve desteklerin artması ve bu teknoloji ile ilişkili diğer bilim alanlarındaki teknik ilerlemelerle beraber son on yılda mRNA

aşılı çok sayıda kanser ve enfeksiyöz etken için klinik öncesi ve klinik denemelerle yaygın olarak test edilmeye başlamıştır [5].

Sistemin etkin bir şekilde çalışabilmesi için, hücre içerisine göndereceğimiz habercinin (mRNA'nın) hücre dışındaki ve içindeki yıkıcı enzimlerden (RNazlar) korunup sağlam olarak ribozomlara ulaşması ve ayrıca viral proteinlere ait kodlar içermesine rağmen ökaryotik mRNA'lara benzer motifler eklenerek hücresel alarm sistemleri olan sinyal reseptörlerinden (TLR-toll like reseptörler, RIG-I ve MDA5 gibi) gizlenebilmesi önemlidir. Diğer bir ifade ile tasarlanan mRNA sisteminin büyük bir şehir gibi dizayn edilmiş olan hücredeki yüzlerce mikro fabrikanın çarkları ile uyumlu bir şekilde çalışabilecek şekilde tasarlanması gerekmektedir. mRNA temelli sistemlerin etkinliği ve çerçevesi mRNA molekülünün genomik dizisi değiştirilerek kolayca optimize edilebildiği gibi yeni ortaya çıkan gereksinimlere göre (mutant suşlar gibi) tasarımı modifiye edilebilmektedir [5]. Dahası, mRNA aşılarının üretimi ve saflaştırma süreçleri genel olarak kodlanan antijenlerin farklılığına ve çeşitliliğine rağmen oldukça benzerdir ve bu nedenle yeni mRNA aşılarını geliştirmek için standardize edilme potansiyeli de vardır [5].

Bunun dışında yeni tasarlanan her mRNA sisteminin hem üretilecek proteinlerle ilgili hem de

taşıyıcı sistem olarak kullanılan moleküller gibi aşı içeriğine eklenen diğer maddeler ile ilgili "olası olumsuz etkiler yönünden" değerlendirilmesi de çok önemlidir. Ayrıca, aşı proteininin ne kadar süre ile hangi miktarda üretileceğine yönelik hedeflerin belirlenmesi ve optimize edilmesi, güvenlik ve etkinliğinin tüm boyutları ile detaylı olarak tanımlanması ve klinik deneylerle ortaya konması gerekmektedir. Viral proteinler virüslerin yapısal bütünlüğünün korunması ve enfeksiyöz partiküllerin hücreye girişinden-ayrılmasına kadar replikasyon döngüsünün tüm aşamalarındaki görevleri dışında; enfekte ettikleri hücre, doku ve sistemler üzerinde "immün fonksiyonların blokajı, hücrel görevlerin inhibisyonu, tümör süpressör genlerin işlevlerinin engellenmesi, sitokin fırtınası gibi şiddetli yanıtların tetiklenmesi, hematopoez üzerine olan etkiler (miyelosüpresyon benzeri), tromboza ve otoimmün reaksiyonlara eğilimi artırma" gibi birçok patolojik etkiler ile de ilişkilidirler [7-9]. Bu nedenle hedeflenen aşı proteininin veya aşıda kullanılan diğer yardımcı materyallerin kısa ve uzun dönem istenmeyen etkilerinin incelenmesi de önem arz etmektedir.

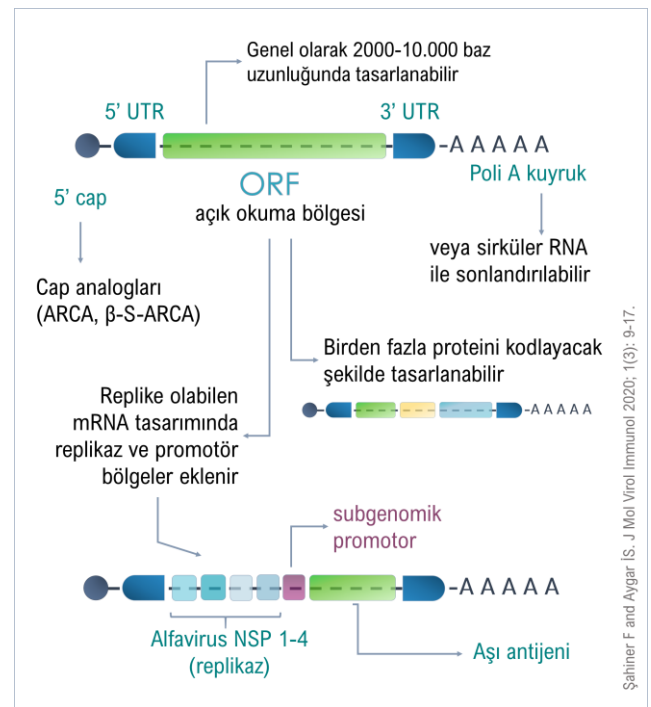
Bu makalede mRNA aşılarının tasarımındaki temel prensipler ve farklı tasarımların getirdiği avantajlar ve riskler ele alınmıştır.

mRNA Aşı Platformları

Aşı platformu olarak iki ana RNA türü üzerinde çalışılmaktadır. Bunlardan biri replike olmayan mRNA (*non-replicating*) sistemleri, diğeri ise virüslerden türetilen (*virally derived*) genlerin yardımı ile amplifiye olabilen mRNA sistemleridir. Geleneksel mRNA temelli aşılar ilgili antijeni kodlayan gen bölgesi ile beraber bu bölgeyi çevreleyen 5' ve 3' uçlarında kodlanmayan bölgeleri (UTR, *untranslated region*) içerirken, amplifiye olabilen RNA'lar sadece ilgili antijeni değil, aynı zamanda hücre içi RNA amplifikasyonu ve yüksek miktarda protein ekspresyonunu mümkün kılan bir viral replikasyon mekanizmasını da kodlarlar [3]. Alternatif olarak tek bir mRNA ipliği içinde çok sayıda antijenik epitopu bağlayabilen tandem yapılar da tasarlanmıştır (Şekil 1) [4,10].

Terapötik kullanım için uygun bir IVT (*in-vitro transcribed*) mRNA "T7, T3 veya bir Sp6 faj RNA polimerazı" kullanılarak doğrusal bir DNA

şablonundan (*linear DNA template*) üretilir. Son ürün, ilgili proteini kodlayan bir gen bölgesini (açık okuma çerçevesi, *open reading frame*, ORF), bu bölgeyi çevreleyen UTR kanatları, bir 5' başlık (5' cap; örneğin 7-metil guanozin) ve bir poli-A kuyruğu içerecek şekilde tasarlanır (Şekil 1). Böylece üretilen IVT mRNA, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında doğal olarak meydana gelen işlenmiş (*fully processed*) mRNA moleküllerine benzeyecek şekilde hücreye sunulmuş olur [3]. UTR bölgeleri mRNA'nın farmakolojisinde önemli roller oynar ve mRNA stabilitesini, translasyon verimliliğini ve immünojenisiteyi modüle etmek için ayrı ayrı optimize edilebilirler [4].



Şekil 1. mRNA aşı sistemlerinin tasarımında yer alan ana bileşenler (bu sistemler nükleozit-modifiye mRNA tasarımı veya sekans mühendisliği ile geliştirilebilmekte veya bu sisteme kişiye özel kanser aşılarında olduğu gibi çok sayıda antijenik epitop eklenebilmektedir).

SAM platformları

Hücre içerisinde çoğalabilen (yani replike olabilen) mRNA sistemleri SAM (*self-amplifying mRNA*) platformları veya replikonlar olarak adlandırılır. Bunlar çoğunlukla alfaviruslardan türetilir ve ilgili aşı antijenine ait ORF bölgesi ile beraber viral replikazı kodlayan ikinci bir ORF bölgesi ve bir promotör gen bölgesi içerirler (Şekil 1). Bu ikinci ORF bölgesi mRNA'nın hücre içi

amplifikasyonunu yönlendirir ve böylece tasarlanan aşı sisteminin antijen ekspresyon kapasitesi önemli ölçüde artırılmış olur [4]. Johanning ve ark. [11], tarafından 1995'te geliştirilen Sindbis virus temelli bir SAM aşı sisteminin, amplifiye olmayan mRNA'ya kıyasla protein ekspresyon seviyelerinde on kat daha fazla artışa neden olduğu ve ayrıca bu sistemde protein ekspresyonunun çok daha uzun süre (2 günden 10 güne kadar) korunduğu gösterilmiştir.

Bir çalışmada RSV füzyon proteinini (F), influenza virus hemaglutinin (HA) proteinini veya kene kaynaklı ensefalit virusu (*Tick-borne encephalitis virus*, TBEV) pre-membran ve zarf (prM-E) proteinlerini kodlayan üç farklı SAM aşısı modeli tasarlanmış ve bu yeni aşı modelleriyle farelerde olumlu sonuçlar alınmıştır [12]. Bahsedilen çalışmada, biri ilgili antijeni ve diğeri alfa viral replikazı kodlayan iki açık okuma çerçevesinden oluşan bir çıplak mRNA sistemi tasarlanmıştır (rekombinan Semliki Forest virus, rSFV). Bu sistemde yukarıda da değinildiği gibi replikaz enzimi "antijen kodlayan mRNA'yı transfekte konakçı hücre içinde çoğaltma" işlevi görmektedir. Bu replikasyon süreci iki farklı yolla immün yanıtı güçlü bir şekilde uyarmaktadır. Birincisi in-vivo antijen üretiminin daha yüksek olmasının bir sonucu olarak, geleneksel mRNA aşılması için gerekenden daha düşük RNA dozları ile etkili immün yanıt indüksiyonu gerçekleştirilir. İkinci olarak, viral enfeksiyonu taklit eden replikasyon süreci ile bağışıklık sistemi için doğal bir adjuvan olarak çalışabilen çift sarmallı RNA ara ürünleri sentezlenmekte ve immün yanıt daha güçlü bir şekilde uyandırılmaktadır.

Geleneksel plazmid veya rekombinan viral aşı vektörleri ile bağışıklamaya benzer şekilde, rSFV RNA aşılması da in-vivo antijen ekspresyonu ile sonuçlanır, ancak rSFV RNA aşısı biyogüvenlik açısından üstün özelliklere sahiptir. RNA'nın hem replikasyonu hem de amplifikasyonu transfekte hücrelerin sitoplazmasında meydana geldiği için DNA aşılması için teorik problemler olan vektör dizilerinin genomik entegrasyonu ve hücre transformasyonu risklerinden kaçınılmış olur. Alfa viral replikon hücreler için sitolitik ve bu nedenle rSFV RNA aşısı yapısı gereği geçici bir süre etkinlik gösterir ve bu da geleneksel plazmid DNA aşılama stratejilerine kıyasla ek bir güvenlik seviyesi daha

sağlar [12]. Viral vektörlerle kıyaslandığında ise rSFV RNA aşı yaklaşımının en belirgin farkı; viral yapısal bileşenlerin yokluğudur. Viral yapısal proteinler genel olarak yüksek oranda immünojenik olduğundan, bu durum güçlendirici immünizasyon gereken durumlarda aşı etkinliğinde düşüşe neden olabilir. Böylece, rSFV RNA aşısı viral vektör temelli sistemlerden farklı olarak aynı temel RNA omurgasının aynı aşı alıcısında diğer bulaşıcı ajanlara karşı sonraki aşılmalarda kullanılmasına da izin verir. Ayrıca, rSFV RNA stratejisi ile aşılanmış bir alıcıda virion üretimi olmadığından vektörün patojenite kazanması gibi olası riskler önlenmiş olur [12].

Etkili mRNA aşısının büyük çoğunluğu bir çeşit dağıtım (*delivery*) sistemi kullanır, ancak son zamanlarda, bir dağıtım sistemi olmaksızın güçlü etkinlik gösteren yeni aşı modelleri tasarlanmıştır [13,14]. Transreplikon veya splitzikon olarak da adlandırılan bu sistemler tek bir mRNA'da iki ORF içeren SAM aşılardan farklı olarak iki ayrı mRNA içerirler (*bipartite vector system*) ve daha yüksek etkinlik gösterirler. Bu mRNA'lardan biri alfavirus replikazını, diğeri ise ilgili antijeni kodlar. Sistemin en önemli avantajı düşük doz aşı kullanılarak elde edilen yüksek etkinliktir. Bu aşılarda çok düşük bir aşı dozu (50 ng) ile ek bir taşıyıcı sistem kullanılmadan verildiğinde bile farelerde koruyucu bağışıklık tepkilerini indüklemiştir [13]. Düşük doz kullanılması ise aşı üretiminin maliyetini önemli derecede düşürdüğü için ilgi çekicidir [15]. Taşıyıcı bir sistemin olmaması ise maliyeti daha da düşürür, üretimi basitleştirir ve aşı liyofilizasyonu ve ortam sıcaklığında saklanabilme olasılığını artırır.

Modifiye mRNA Aşısı

Son on yılda yapılan çalışmalar, mRNA'nın immünoestimülantör profilinin ve farmakolojik özelliklerinin IVT mRNA'nın saflaştırılması veya modifiye edilmiş nükleozitlerin (psödo üridin Ψ ve 5 metilsitidin-5mC gibi) eklenmesinin yanı sıra mRNA'nın çeşitli taşıyıcı moleküller ile kompleks haline getirilmesiyle şekillendirilebileceğini göstermiştir [3]. mRNA'nın farmakolojik yönlerini iyileştirmede bir dizi farklı teknoloji kullanılır [3]:

1. Sentetik başlık analogları ve kapatma enzimleri: mRNA'yı stabilize eder ve ökaryotik

translasyon başlatma faktörü 4E'ye (EIF4E) bağlanarak protein translasyonunu artırır.

- cap 0 [7mG(5')ppp(5')N,pN2p]
- cap 1 [7mG(5')ppp(5')NImpNp]
- cap 2 [7mG(5')-ppp(5')NImpN2mp]
- mCap [m7G(5')ppp(5')G]
- ARCA [3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G]
- Fosforotioat cap; β -S-ARCA (D1-D2)
- CleanCap

2. 5' UTR ve 3'-UTR'deki düzenleyici bölgeler: Kodlama dizisini çevreleyen UTR elemanları, mRNA'nın stabilitesini ve translasyonunu derinden etkiler. Viral veya ökaryotik genlerden türetilen bu düzenleyici diziler terapötik mRNA'nın yarı ömrünü ve ekspresyonu önemli ölçüde artırır.

3. Poli-A kuyruk: mRNA'yı stabilize eder ve protein translasyonunu artırır.

4. Modifiye nükleozitler: Doğuştan var olan (*innate*) bağışıklık aktivasyonunu azaltırken, translasyon verimliliğini artırır.

5. Seperasyon ve-veya saflaştırma teknikleri: RNaz III uygulaması ve hızlı protein sıvı kromatografisi (Fast Protein Liquid Chromatography, FPLC) gibi özel yöntemlerle yapılan saflaştırma işlemi mRNA moleküllerinin doğal bağışıklık tarafından yabancı moleküller olarak tanınması riskini azaltır ve böylece translasyon verimliliği artırılmış olur.

6. Sekans ve-veya kodon optimizasyonu: Translasyon etkinliğini artırmada kullanılabilir. Örneğin, G:C içeriğinin zenginleştirilmesi, in-vitro olarak kararlı durumda bulunan mRNA seviyelerini ve in-vivo protein ekspresyonunu artırır.

7. Translasyon başlatma faktörlerinin ve diğer yöntemlerin birlikte kullanılması: Translasyonu ve immünojenisiteyi değiştirir.

Translasyon ve mRNA kararlılığının optimizasyonu

5' cap yapıları, ökaryotik mRNA'larda yaygın olarak bulunur (cap1 tüm ökaryotik mRNA'larda ve cap2 bazı ökaryotik mRNA'larda) ve post-transkripsiyonel işleme süreci, translasyonun başlatılması ve mRNA stabilitesi için gereklidir [16]. Bu mekanizma koronavirüsler gibi bazı virüslerde de bulunur ve viral RNA stabilitesinin korunması ve verimli protein translasyonu için

önemlidir. Örneğin SARS-CoV-2, cap1 başlık yapısını oluşturmak için nsp16 (2'-O-MTaz) ile karakterize edilen S-adenozil-L-metionin bağımlı metiltransferaz enzimini kodlamaktadır [17]. mRNA'dan verimli protein üretimi için aşı tasarımlarında da bir 5' kapak yapısı yer almalıdır [3]. Üretilen mRNA'ya 5' kapakların çeşitli versiyonları eklenebilir; bu amaçla transkripsiyon reaksiyonu sırasında veya sonrasında bir "Vaccinia virus" kapama enzimi ile kapak ekleme işlemi gerçekleştirilebilir, ya da sentetik bir kapak veya anti-ters başlık-kapak analoglarının (Anti-Reverse Cap Analog, ARCA) eklenmesi tercih edilebilir [3]. ARCA modifikasyonları, ribozomlara verimli bir şekilde bağlanabilen ve neredeyse tam mRNA fraksiyonlarının elde edilmesine imkan veren uygun başlık oryantasyonu sağlayabilmektedir [4]. Fosforotioat başlık analogları gibi diğer başlık modifikasyonları, ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E'ye (eIF4E) yönelik afiniteyi daha da geliştirebilir ve RNA kapak açma kompleksine karşı direnci artırabilir [4]. Cap1 (2'O methylated cap) ve mCap sistemleri birinci nesil, ARCA sistemi ise ikinci nesil başlık sistemleri olarak sınıflandırılır. Bir üçüncü nesil başlık analogu ise CleanCap sistemidir. İlk nesil protokoller ya enzimatik kapatma işlemi (ki bu durumda mRNA üretimine ilave reaksiyon bileşenleri ve saflaştırma adımlarının eklenmesi gerekir) ya da cap0 ile ko-transkripsiyonel kapatma stratejisini (bu durumda da IVT mRNA preparasyonu sırasında elde edilen ürün çift sarmallı ds-RNA kontaminantı içerdiğinden dolayı doğuştan immün sistem aktive olur) kullanıyordu [15]. CleanCap sistemi ise IVT sırasında spesifik bir transkripsiyon başlangıç sekansına doğal bir 5' cap1 yapısı ekleyen bir ko-transkripsiyonel kapak oluşturma stratejisidir [18].

Translasyon kapasitesini ve stabilitesini artırmak için mRNA dizisine modifiye nükleotidlerin dahil edilmesi yanında, etkinliği gösterilmiş farklı yaklaşımlar da bulunmaktadır. Bunun bir örneği de "dizi mühendisliği" ile işlenen mRNA (*sequence-engineered mRNA*) sistemleridir [15]. Bu yaklaşımda, GC içeriği zenginleştirilerek veya doğal uzun ömürlü mRNA moleküllerinin UTR'leri seçilerek, mRNA'nın ORF ve UTR'lerinde sekans optimizasyonları ile mRNA ekspresyonu güçlü bir şekilde artırılmaktadır [4]. mRNA'nın 5'

ve 3' UTR bölgelerinin, translasyon oranını ve mRNA'nın yarı ömrünü önemli ölçüde etkileyebileceği göz önüne alındığında, UTR'lerin optimizasyonu mRNA aşı tasarımının önemli bir basamağı olmuştur [15]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, IVT mRNA üzerinden protein ekspresyonunu önemli ölçüde artıran yeni UTR'leri tanımlamak için hücre kültürü tabanlı sistematik bir seçim süreci kullanılmıştır [19]. Bu çalışmada insan β -globin 3' UTR kullanılmasına kıyasla, ilişkili transkriptten yaklaşık üç kat daha yüksek protein üretimini indükleyebilecek birkaç farklı 3' UTR dizisi tanımlanmıştır.

Poli-A kuyruğu mRNA translasyonunda ve stabilitesinde önemli düzenleyici rolü olan diğer bir sistemdir. Poli-A kuyruk ya mRNA sentezi sırasında doğrudan DNA şablonundan üretilir ya da poli-A polimeraz kullanılarak sonradan eklenir [3]. İkinci bahsedilen yaklaşımda; transkripsiyon işleminden hemen sonra, transkriptin 3' ucu, bir 3' hidroksili serbest bırakmak için bölünür ve daha sonra poli-A polimeraz, RNA'ya bir adenin nükleotid zinciri ekler. Poliadenilasyon adı verilen bu işlem ile mRNA molekülüne genellikle 100 ila 250 baz uzunluğunda olabilen bir poli-A kuyruğu eklenir. mRNA'nın poli-A kuyruğunun uzaması ile ekspresyon süresi arasında korelasyon olduğu gösterildiği gibi [20], 3' UTR'de yapılan spesifik modifikasyonlarla poli-A kuyruğunun de-adenilasyon ile yıkımının azaltılabildiği de gösterilmiştir [21]. Poli-A kuyruk yerine, ayrıca ekzonükleaz aracılı bozunmaya karşı direnç sağlayan dairesel RNA'ların oluşturulması gibi daha farklı yaklaşımlar da önerilmiştir [4].

Hüresel mRNA nükleotidlerinde doğal olarak meydana gelen post-translasyonel modifikasyon işlemlerinin "endojen mRNA'nın immün tespitini önlediği ve böylece hücrelerin bu mRNA'yı patolojik veya istilacı mRNA'dan ayırt edebildiği" bilgisi mRNA aşı tasarımları için yeni fırsatlar sunmuştur [4]. Modifiye edilmiş nükleozitlerin eklendiği ve "nükleozitle modifiye edilmiş mRNA" olarak adlandırılan mRNA transkriptleri, günümüzde azaltılmış immünostimülatör aktivite ve dolayısıyla geliştirilmiş bir güvenlik profili ile üretilmektedir. Ek olarak, modifiye edilmiş nükleozitler, tip I interferonlar (IFN) tarafından indüklenen antiviral yanıtı kaçırdıkları için bu yaklaşım arttırılmış stabilite ve translasyon

kapasitesi olan mRNA aşularının tasarımını mümkün kılmıştır [4]. Örneğin, üridinin psödouridin ile değiştirilmesinin RNaz L tarafından mRNA yıkılmasını (*cleavage*) düzenleyen 2'-5'-oligoadenilat sentetazın aktivitesini azalttığı gösterilmiştir [4].

Protein translasyonu üzerinde etkisi olduğu gösterilen diğer bir yaklaşım ise kodon optimizasyonudur. Nadir aminoasit kodonlarının, sitozolde bol miktarda bulunan ve aynı kökenli tRNA'ya sahip sık kullanılan eş anlamlı kodonlarla değiştirilmesi işlemi mRNA'dan protein üretimini artırmak için başvurulan yaygın bir uygulamadır, ancak bu modelin yararlılığı açık değildir [3]. Protein ekspresyonu, kodon bileşiminin değiştirilmesiyle veya modifiye edilmiş nükleozitlerin katılmasıyla pozitif olarak modüle edilebilmesine rağmen, bu sekans mühendisliği biçiminin; mRNA ikincil yapısını, translasyon kinetiğini ve doğruluğunu ve eşzamanlı protein katlanmasını ve alternatif okuma çerçevelerinde bulunan kriptik T hücresi epitoplarının ifadesini etkileyebilmesi de mümkündür. Tüm bu faktörler bağışıklık tepkisinin büyüklük veya özgünlüğünü etkileme potansiyeli taşıyan değişikliklere neden olabilirler [3].

Yakın zamanda, mRNA ve eIF4E proteinleri ile önceden birleştirilmiş sentetik poliamin komplekslerinin verilmesinin, tek başına mRNA verilmesine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek ekspresyon verimliliği sunduğu gösterilmiştir [22].

İmmünojenisite Modülasyonu

Ekzojen mRNA, hücre yüzeylerinde, endozomlarda ve sitozolde bulunan doğuştan (*innate*) immün sistem reseptörleri tarafından tanındığı için doğal bir immünostimülatördür. Terapötik uygulamaya bağlı olarak, mRNA'nın bu özelliği yararlı veya zararlı olabilir. Potansiyel olarak aşılama için avantajlıdır, çünkü bazı durumlarda dendritik hücre (DH) olgunlaşması için adjuvan etkisi sağlayabilir ve böylece güçlü T ve B hücre immün yanıtları ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, paradoksal olarak mRNA'nın doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından algılanması durumunda, immün yanıt olumsuz olarak etkileneceği gibi ve antijen ekspresyonunu da inhibe olabilir [3].

Enzimatik olarak sentezlenmiş mRNA preparatları, IVT reaksiyonunun anormal ürünleri olarak çift sarmallı RNA (dsRNA) kontaminantları içerirler [3]. Viral genomların ve replikasyon ara ürünlerinin bir benzeri olarak, dsRNA, hücresele patern tanıma reseptörleri tarafından algılanan güçlü (*potent*) bir patojenle ilişkili moleküler motiftir (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) [3]. Faj polimerazları tarafından in-vitro olarak transkribe edilen RNA'ların; abortif başlatma olayları tarafından üretilen kısa RNA'lar ve tamamlayıcı 3' uzatma işlevi tarafından üretilen dsRNA'lar da dahil olmak üzere birden fazla kontaminan molekül içerdiği iyi bilinmektedir [23]. Şöyle ki IVT mRNA, viral ve DNA temelli yapıların olumsuz etkileri olmadan şifrelenmiş proteini geçici olarak eksprese etmek için büyük terapötik potansiyele sahiptir [23]. Bununla birlikte, mRNA tasarımında memeli hücrelerinde bulunan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin RNA sensörleri de dikkate alınmalıdır. Modifiye edilmiş nükleozitlerin eklenmesi ile hem doğal immün sistemin aktivasyonu azaltılır hem de mRNA'nın translasyonunu artırılır, ancak tip I IFN ve proinflatuar sitokinlerin rezidüel indüksiyonu devam eder. Kromatografi yöntemleri ile çift sarmallı RNA da dahil olmak üzere kontaminan maddeler uzaklaştırılabilmekte ve böylece IFN'ları ve inflamatuvar sitokinleri indüklemeyen ve primer hücrelerde 10 ila 1000 daha fazla translasyon verimliliğine sahip mRNA'lar üretilmektedir [23]. Modifiye edilmemiş mRNA'lar, saflaştırmanın ardından önemli ölçüde daha iyi translasyon yeteneğinde olsalar da yine de yüksek seviyeli sitokin salgılanmasına neden oldular. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile saflaştırılmış nükleozit modifiye mRNA'ların ex-vivo kök hücre üretiminden in-vivo gen terapisine kadar değişen uygulamalar için güçlü vektörler oldukları öne sürülmüştür [23]. Ancak bazı çalışmalarda farklı bulgular sunulmuştur [3].

Bazı mRNA aşı formatlarında aşı potensini arttırmak için aşı içeriğine ek bir adjuvan dahil edilerek mRNA'nın immünostimülatör özellikleri güçlendirilmeye çalışılmıştır. Bu moleküller, mRNA'nın içsel immünojenisitesinden veya immün modülatör proteinleri kodlama kabiliyetinden yararlanan yeni yaklaşımların yanı sıra, geleneksel adjuvanları da kapsar. Replike

olabilen mRNA aşılarda kullanılan MF59 (Novartis) ve immün aktivatör özelliğe sahip üç farklı proteini (CD70, CD40L ve TLR4) kodlayan TriMix bu sistemlere örnek olarak verilebilir [3]. mRNA taşıyıcı partikülün tipinin ve mRNA-taşıyıcı kompleksinin boyutunun da mRNA iletimi ile indüklenen sitokin profilini modüle ettiği gösterilmiştir. Örneğin, RNAActive (CureVac AG) aşı platformu, adjuvan aktivite sağlamak için taşıyıcısına bağlıdır, bu durumda antijen "çıplak, modifiye edilmemiş, sekans optimizasyonlu" bir mRNA'dan ifade edilirken, adjuvan aktivitesi "TLR7 sinyali yoluyla etki gösteren protamin (polikationik bir peptit) ile komplekslenmiş bir şekilde verilen RNA" tarafından sağlanır [3].

mRNA molekülünün yapısı değiştirilerek, doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini tetikleme gücü daha da geliştirilebilir, ancak bu işlem translasyon kapasitesinin düşmesine neden olabilmektedir [4]. CureVac AG şirketi, mRNA'nın bir fosforotioat omurgası ile stabilize edilmesi veya kationik protein protamin ile presipitasyonu sonrasında, antijen ekspresyonunun azaldığını, ancak daha güçlü immün uyarıcı kapasitelerin elde edilebildiğini göstermiştir [24,25]. Bu keşif, ya "protamin kompleksli mRNA moleküllerinin peptit ve protein bazlı aşılarda için tek başlarına bir immün adjuvan olarak işlev görmesi için" (yani RNAadjuvant) veya aşının immünojenisitesini arttırmak için "protamin-mRNA kompleksli moleküllerle birleştirilmiş antijen kodlayan mRNA'dan oluşan iki bileşenli bir mRNA platformunda" (RNAActive) geliştirilmesini teşvik etmiştir [4]. Bu veriler birlikte ele alındığında, aşılama için mRNA formülasyonlarının tasarımı bir paradigma ile sonuçlanmaktadır. Bir strateji, güçlü bir adjuvan etkisi elde etmek için tamamen optimize edilmiş mRNA'yı kullanmayı içerirken, diğeri yüksek translasyon kapasitesine sahip 'modifiye' mRNA molekülleri ile çalışmayı ve dolayısıyla antijen biyo-yararlanımını iyileştirmeyi içermektedir. Aşılama amaçlarıyla ilgili olarak, mRNA'nın translasyon kapasitesini destekleyen ve güçlendiren modifikasyonların, mRNA molekülleri ile bir veya birden fazla virüse özgü patern tanıma reseptörü arasındaki etkileşimin kısmen veya tamamen azalmasını içerdiği dikkate alınmalıdır [4]. Aşı tasarımlarında öncelik, genellikle antijen üretimini geliştirme fikri ile mRNA'nın translasyon

kapasitesine verilir. Buna rağmen, mRNA'nın bu self-adjuvan etkisinin gücü, inflamasyon reaksiyonları ve otoimmün olaylar dahil olmak üzere her bir aşı tasarımı için kendine özgü advers reaksiyon risklerine karşı tartılmalıdır [4] Yeterli, ancak güvenli immünojenite elde etmek için mRNA aşularının transkripsiyon kapasitesi ve adjuvantitesi arasında optimal bir dengeyi bulmak belki de bu sistemin en önemli temel zorluğudur [4].

Türkiye'de Tasarlanan mRNA Aşuları

Bu yeni teknoloji Kırım-Kongo Kanamalı Ateş Virüsü (KKKAV) aşı çalışmalarında ülkemizde de kullanılmış ve klinik öncesi çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir [26]. İlgili çalışmada aşı adayı olarak virüsün Ank-2 suşunun optimize edilmemiş küçük (S) segmentini eksprese eden yeni bir çıplak konvansiyonel mRNA tasarımı denenmiştir. Araştırmacılar önceki çalışmalarında [27], KKKAV Ank-2 suşunun S segmentinin "pCDNA3.1 myc/His A" vektörüne (Invitrogen, ABD) eklenmesiyle oluşturulan pCD-N1 vektörünü virüsün, S segmentinin PCR amplifikasyonu için kullanmış ve daha sonra elde ettikleri "amplifiye S segmenti" ürünlerini mRNA aşı tasarımı için doğrusal çift sarmallı bir DNA şablonu olarak kullanmışlardır [27]. Son olarak, ticari bir in vitro transkripsiyon kiti ile nükleokapsit proteinini eksprese eden aşı üretimini gerçekleştirmişlerdir. mRNA aşı tasarımlarının ana hatları şu şekildedir: 5' ucunda ARCA kapak analogu; 5' ucunda optimize edilmiş bir UTR gen bölgesi; S segmenti; 3' UTR gen bölgesi (α -globin); 3' poli-A kuyruk (50-100 adenin nükleotidi). Araştırmacılar

ürettikleri mRNA'nın nihai boyutunu saptamak için elde ettikleri ürünü agaroz-formaldehit jelde yürütüp, son yapıdaki poli-A kuyruğunun varlığını jelde de kontrol etmişlerdir. Araştırmacılar transfeksiyon sonrası 3. günde indirekt immünofloresan testi ile BHK21-C13 hücrelerinde in-vitro ekspresyonu doğrulamış ve daha sonra da ürettikleri aşığı fareler üzerinde test etmişlerdir.

Konya Selçuk Üniversitesi bünyesinde Türkiye'nin ilk mRNA temelli SARS-CoV-2 aşısını tasarlayan diğer bir araştırma grubu ise geliştirdikleri bu aşığı klinik öncesi test aşamasına kadar getirdiler [28]. Araştırma ekibi özellikle oda ısısı koşullarında stabilitesini koruyan ve soğuk zincir gereksinimi olmayan bir aşı formatı geliştirmeyi hedeflediklerini ifade etmişlerdir [29].

Sonuç

Özetle, ideal bir mRNA aşısının kolay üretilebilir bir tasarım şablonu olması ve maliyeti yükselten ek enzim kullanımı ve ek saflaştırma basamaklarına gereksinimi minimize edilmiş olması olmalıdır. Pandemi gibi acil durumlara yanıt verebilmek için ölçeklenebilir ve düşük maliyetli üretime uygun olması ayrıca önemlidir. Aşının stabilitesi dağıtım koşullarından en az derecede etkilenmeli ve immünojenitesi optimize edilmiş olması olmalıdır. Aşı içeriğinde bulunan veya aşıya eklenen maddelerin üretiminde kullanılan bileşikler yüksek kaliteli ve kolay erişilebilir olmalıdır. Hedef aşı proteini veya proteinlerinin ekspresyon düzeyi, süresi ve olası olumsuz etkileri belirli bir uygulamaya göre uyarlanmış ve ayrıca kısa ve uzun dönemde risk oluşturabilecek durumlar açıkça tanımlanmış olmalıdır.

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazarlar sorumludur.

Finansal destek: Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Şahiner M, Yurdakul ES, Şahiner F. The 150-Year History of Scientific Discoveries as Milestones in the Development Process of Molecular Biology Techniques. J Mol Virol Immunol 2020; 1(1); 43-56. [Crossref]
2. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J Mol Biol 1961; 3: 318-56. [Crossref]
3. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. Nat Rev Drug Discov 2018; 17(4): 261-79. [Crossref]

4. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. Three decades of messenger RNA vaccine development. Nano Today 2019; 28: 100766. [Crossref]
5. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. mRNA Vaccine Era-Mechanisms, Drug Platform and Clinical Prospection. Int J Mol Sci 2020; 21(18): 6582. [Crossref]
6. Hekele A, Bertholet S, Archer J, Gibson DG, Palladino G, Brito LA, et al. Rapidly produced SAM(®) vaccine against H7N9 influenza is immunogenic in mice. Emerg Microbes Infect 2013; 2(8): e52. [Crossref]

- 7.** ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland. Host-virus interactions. Available at: <https://viralzone.expasy.org/886> [Accessed April 18, 2020].
- 8.** Zhang Y, Zeng X, Jiao Y, Li Z, Liu Q, Ye J, et al. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19. *Thromb Res* 2020; 193: 110-15. [[Crossref](#)]
- 9.** Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brüggen MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy* 2020; 75(7): 1564-81. [[Crossref](#)]
- 10.** Magini D, Giovani C, Mangiavacchi S, Maccari S, Cecchi R, Ulmer JB, et al. Self-Amplifying mRNA Vaccines Expressing Multiple Conserved Influenza Antigens Confer Protection against Homologous and Heterosubtypic Viral Challenge. *PLoS One* 2016; 11(8): e0161193. [[Crossref](#)]
- 11.** Johanning FW, Conry RM, LoBuglio AF, Wright M, Sumerel LA, Pike MJ, et al. A Sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(9): 1495-501. [[Crossref](#)]
- 12.** Fleeton MN, Chen M, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Murphy M, et al. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *J Infect Dis* 2001; 183(9): 1395-8. [[Crossref](#)]
- 13.** 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. [[Crossref](#)]
- 14.** Blakney AK, McKay PF, Shattock RJ. Structural Components for Amplification of Positive and Negative Strand VEEV Splits. *Front Mol Biosci* 2018; 5: 71. [[Crossref](#)]
- 15.** Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol* 2020; 65: 14-20. [[Crossref](#)]
- 16.** Moya-Ramírez I, Bouton C, Kontoravdi C, Polizzi K. High resolution biosensor to test the capping level and integrity of mRNAs. *Nucleic Acids Res* 2020; 48(22): e129. [[Crossref](#)]
- 17.** Sk MF, Jonniya NA, Roy R, Poddar S, Kar P. Computational Investigation of Structural Dynamics of SARS-CoV-2 Methyltransferase-Stimulatory Factor Heterodimer nsp16/nsp10 Bound to the Cofactor SAM. *Front Mol Biosci* 2020; 7: 590165. [[Crossref](#)]
- 18.** Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, Henderson JM, Hendel A, Shore S, et al. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 12: 530-42. [[Crossref](#)]
- 19.** Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, et al. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol Ther* 2019; 27(4): 824-36. [[Crossref](#)]
- 20.** Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 2006; 108(13): 4009-17. [[Crossref](#)]
- 21.** Chen YH, Collier J. A Universal Code for mRNA Stability? *Trends Genet* 2016; 32(11): 687-8. [[Crossref](#)]
- 22.** Li J, Wang W, He Y, Li Y, Yan EZ, Zhang K, et al. Structurally Programmed Assembly of Translation Initiation Nanoplex for Superior mRNA Delivery. *ACS Nano* 2017; 11(3): 2531-44. [[Crossref](#)]
- 23.** 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. [[Crossref](#)]
- 24.** Scheel B, Braedel S, Probst J, Carralot JP, Wagner H, Schild H, et al. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* 2004; 34(2): 537-47. [[Crossref](#)]
- 25.** Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol* 2005; 35(5): 1557-66. [[Crossref](#)]
- 26.** Aligholipour Farzani T, Földes K, Ergünay K, Gurdal H, Bastug A, Ozkul A. Immunological Analysis of a CCHFV mRNA Vaccine Candidate in Mouse Models. *Vaccines (Basel)* 2019; 7(3): 115. [[Crossref](#)]
- 27.** Aligholipour Farzani T, Földes K, Hanifehnezhad A, Yener Ilce B, Bilge Dagalp S, Amirzadeh Khiabani N, et al. Bovine Herpesvirus Type 4 (BoHV-4) Vector Delivering Nucleocapsid Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Induces Comparable Protective Immunity against Lethal Challenge in IFN α / β / γ R $^{-/-}$ Mice Models. *Viruses* 2019; 11(3): 237. [[Crossref](#)]
- 28.** World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> [Accessed December 28, 2020].
- 29.** Anadolu Ajansı, Ankara, Türkiye. Selçuk Üniversitesi'nde geliştirilen Türkiye'nin ilk mRNA aşısının yazın kullanıma sunulması planlanıyor. Available at: <https://www.aa.com.tr/tr/koronavirus/selcuk-universitesinde-gelistirilen-turkiyenin-ilk-mrna-asisinin-yazin-kullanima-sunulmasi-planlaniyor/2105643> [Accessed December 28, 2020].