

**DOSYA/DERLEME**

## AŞI ARAŞTIRMA VE GELİŞTİRME ALANINDA YENİ YAKLAŞIMLAR

Erkan ÖZCENGİZ\*, Gülay ÖZCENGİZ\*\*

### Özet

Edward Jener'in 1796'daki cowpox deneyiminden sonra 19. yüzyılda Louis Pasteur'ün temel prensiplerine dayanan "birinci jenerasyon" aşuların gelişimi, patojenlerin inaktif veya zayıflatılmış canlı formları olarak kullanılmalarını temel almıştır. "İkinci generasyon" altünite aşular ise saflaştırılmış mikrobiyal hücre komponentlerinden yapılmıştır. Bunlar, polisakkarid kimyası, rekombinant DNA teknolojisi ve yeni adjuvantlardan yararlanarak daha saf ve güvenilir olmuşlardır. Bu birinci ve ikinci jenerasyon aşular iki yüz yılı aşkın bir süredir pek çok ölümcül hastalığın kontrol altına alınması veya eradike edilmesinde esas eksenini oluşturmakla birlikte, dayandıkları ampirik dizayn metodları kültürü yapılamayan mikroplara uygulanamamakta, antijenik olarak çok değişken patojenler için genellikle koruyucu aşular yapmakta başarısız kalmakta ve daha da önemlisi yıllara ve hatta onlarca yıla yayılan araştırma süreçleri gerektirdiklerinden özellikle hızla evrimleşen patojenler için yetersiz kalmaktadırlar. 1990'lı yılların sonları genomik çağının başlangıcına ve biyoinformatiğin yükselişine damgasını vurmuş ve sonraki yıllarda "-omics" bilimi ve teknolojileri rasyonel ve hızlı biçimde aşı bilimi alanına entegre olmuştur. Bu, pan-genomik ters aşı biliminin ("reverse vaccinology") doğmasına ve bunun sonucu olarak "üçüncü jenerasyon" aşuların gelişimine neden olmuştur. Diğer yandan, sentetik genomik alanının, yeni antijenlerin yaratılması, protein mühendisliği ve yapısal analizlerin maliyetinin azaltılması yönündeki potansiyeli ile aşı bilimi için parlak bir gelecek sunacağı öngörülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Yeni aşular, ters aşibilimi, immunoproteomik, pan-genomik, üçüncü kuşak aşular

\*Dr., Berk Farma, ODTÜ Teknokent

\*\*Prof. Dr., ODTÜ Biyolojik Bilimler/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

## Novel Approaches on Vaccine Research and Development

### Abstract

The development of "first generation" vaccines was essentially based on the basic principles of Louis Pasteur who refined Edward Jenner's 1796 cowpox experiment in the 19th century and relied on using inactivated pathogens in whole or live attenuated forms. The "second generation" subunit vaccines made up of purified microbial cell components which were greatly benefited from polysaccharide chemistry, recombinant DNA technology as well as advances in the use of novel adjuvants were more refined and much safer. Though these first and second generation vaccines were pivotal in controlling or eradicating many deadly diseases for more than two centuries, their empiric methods of design cannot be applied to microbes that are noncultivable in vitro, often fail to provide widely protective vaccines for antigenically hypervariable pathogens, besides being very slow leading to years or even decades of research, especially to address rapidly evolving pathogens. The late 1990s marked the beginning of the so-called genomics era and the rise of bioinformatics. Since then, "-omics" science and technologies were rationally and rapidly integrated to the field of vaccinology, leading primarily to the birth of pan-genomic reverse vaccinology approach and resulting in "third generation" of vaccines, including the universal ones. Synthetic genomics, on the other hand, offers a future by paving way to the chemical synthesis of genetic material for the creation of novel antigens, reduction in cost for protein engineering and structural analyses.

**Key Words:** Novel vaccines, reverse vaccinology, immunoproteomic, pan-genomic, third generation vaccines

### Giriş ve Kısa Tarihçe

Aşıların gelişimi 200 yılı aşkın süre boyunca hemen aynı temel prensiplerle sürdürülmüş ve geliştirilen aşılar pek çok öldürücü enfeksiyon hastalığına karşı insanlığı korunmayı başarmıştır. Anımsanacak olursa, Edward Jenner'in insan patojeni smallpox virus (çiçek virusu) ile yakın benzerliği olan bovine poxvirus'unu (sığır çiçek virusu) 1796'da ilk kez insana aşı olarak uygulaması ve daha sonra 1885'te Louis Pasteur'un attenuasyonu keşfetmesi ve kuduza karşı canlı attenuue bir aşı geliştirmesi sonucunda, aşı geliştirme çalışmaları için temel prensipler (patojenin izolasyonu-inaktivasyonu veya zayıflatılması-enjeksiyonu) genel olarak belirlenmiş oldu (Moriel, 2009). Günümüzde bilinen tüm aşılar, mevcut şu yaklaşımlardan birisinin kullanımı ile geliştirilmiştir:

- (i) Ölü aşılar (inaktif aşılar),
- (ii) canlı attenuue (zayıflatılmış) aşılar,

(iii) subunit (alt ünite) aşılar; toksoidler, protein-konjuge polisakaritler, rekombinant proteinler ve kapsüler polisakaritler. Hastalık etkeni bakteri veya virusun izole edilmesi, inaktivasyonu (ölü) veya zayıflatılması (canlı) veya mikroorganizmanın toksini ya da başka komponentlerinin aşı olarak uygulanması, 20. yüzyıl boyunca başlıca aşı geliştirme yöntemlerini oluşturmuştur.

### Birinci ve İkinci Kuşak Aşılar

Birinci kuşak aşılar, büyük bilimci L. Pasteur'un temel prensiplerine dayanan inaktif tam mikroorganizma veya attenuue virus veya bakteri aşılarını içermiştir. Bunlar, Bacillus Calmette Guerin (BCG), pertussis (boğmaca), poliomyelitis (çocuk felci), rabies (kuduz) ve smallpox (çiçek) gibi aşılardır. İkinci kuşak aşılar ise, saflaştırılmış mikrobiyal hücre komponentlerini içermekte olup alt ünite aşılar olarak adlandırılmıştır. Bu aşılar, tetanoz, difteri, pneumonia, influenza, hepatitis B gibi hastalıklara karşı kullanılan polisakarit veya protein antijenlerdir.

**Tablo 1. Günümüzde kullanımda olan birinci ve ikinci kuşak aşılar.**

Aşı	Tip
Anthrax (şarbon)	Subunit
Diphtheria	Subunit
Haemophilus influenzae b	Subunit
Hepatitis A	İnaktif
Hepatitis B	Subunit (rekombinant)
Human Papillomavirus	Subunit
Influenza virus	İnaktif veya canlı
Japanese encephalitis	inaktif
Measles (kızamık)	Canlı
Meningococcus	Subunit
Mumps (kabakulak)	Canlı
Pertussis (boğmaca)	İnaktif veya subunit
Plague (veba)	İnaktif
Pneumococcus	Subunit
Polio (çocukfelci)	Canlı veya inaktif
Rabies (kuduz)	İnaktif
Rotavirus	Canlı
Rubella (kızamıkçık)	Canlı
Smallpox (çiçek)	Canlı
Tetanus	Subunit
Tuberculosis (BCG)	Canlı
Typhoid	Canlı veya subunit
Varicella	Canlı
Yellow fever (sarı ateş)	Canlı
Herpes zoster	Canlı

(measles), kabakulak (mumps), kızamıkçık (rubella), Haemophilus influenzae B gibi hastalıkların artık görünürde olmaması veya morbidite ve mortalite insidansının azalması başarısını göstermiş, yaşam kalite ve beklentisinin yükselmesini sağlamıştır (Moriel, 2009; Bagnoli, 2011).

Tüm bu devasa başarılar karşın, geleneksel aşı geliştirme yaklaşımlarının pek çok önemli hastalığa veya yeni önem kazanan hastalıklara karşı aşı geliştirilmesinde sınırlı kaldığı görülmektedir. Örneğin değişkenlik gösteren viruslar, çok yaygın görülmemekle birlikte kompleks bakteriler ve özellikle tropikal bölgelerin yaygın ölümcül parazitler hastalıklarına karşı aşı geliştirilmesinde yeni yaklaşımlar büyük birer ihtiyaç olarak ortaya çıkmıştır. Human Immunodeficiency virus (HIV) ve Hepatitis C virus (HCV) gibi çok değişken viruslarda (hypervariable viruses) mevcut heterojen yapı, aşı geliştirmede önemli bir engel oluşturmaktadır. Örneğin HIV-1 sekiz alt-tipe (subtype) sahip olup, her alt-tip içinde de yüksek oranda değişkenlik bulunmaktadır (Gao, 1998). Diğer bir patojen olan Influenza virusu için mevcut aşı, her sene yeni bir formülasyon ve aşı tekrarı gerekmektedir. Sıtma (malaria) karşı yoğun araştırmalara karşın henüz üniversal bir aşı geliştirilememiştir. Leishmaniasis, schistosomiasis, amoebiasis gibi pek çok tropikal hastalığa karşı aşı araştırmaları ihmal edilmiştir. Bunlara ilave olarak, son on yıllar itibariyle aşılardan güvenirliliği üzerine titiz bir kamuoyu baskısı oluşması ve bu yönde biyogüvenlik/etik araştırmaların artması, aşılardan kabul edilebilir risk çitasını da oldukça yükseltmiştir (Kennedy, 2011).

Geleneksel aşı yöntemleri ile elde edilen aşılardan bazılarında mikroorganizmaların kültür zorlukları veya ilgili antijenlerin saflaştırılma zorlukları gibi olumsuzluklar, üretimde zaman ve verim kaybına da neden olmaktadır. Üretim yöntemlerinden kaynaklanan aşı reaksiyonları, bazı geleneksel aşılardan yerine yeni kuşak aşılardan gelmesini zorunlu kıldığından, daha yeni aşı yaklaşımları denenmeye başlanmıştır. Örneğin, her yıl yaklaşık 300-400 bin çocuğun ölümüne ve milyonlarca insanın hastalanmasına yol açan boğmaca (pertussis)

Günümüzde uygulamada olan ve tüm dünyada lisanslanan bu birinci ve ikinci kuşak aşılardan Tablo 1'de verilmektedir. Geleneksel yaklaşım olarak adlandırdığımız bu yöntemlerle geliştirilen aşılardan, çiçek hastalığının eradike edilmesinde büyük rol almış, difteri, tetanoz, boğmaca, çocuk felci, kızamık

hastalığına karşı başarı ile uygulanmış geleneksel tam hücre aşılarının ciddi yan etkileri, yeni alt ünite hücresiz aşılarda (ikinci kuşak) geliştirilmesine neden olmuştur. Ancak ikinci kuşak aşılarda yüksek aşılama oranına rağmen birçok ülkede boğmacanın görülmeye devam etmesi, günümüzde daha yeni yaklaşımlarla üçüncü kuşak aşı geliştirilmesi hedefini gündeme getirmiştir. Mikroorganizmaların genellikle kültür veya hücre seri pasajları ile elde edilen zayıflatılmış formlarında, zayıflatma ile ilgili moleküler mekanizmalar bilinmemekte, bu formların geri mutasyonla patojenik formlara dönüşümü tehdit içermektedir. Bununla beraber, günümüzde yeni attenué formlar geliştirmek için moleküler genetik çalışmalarla elde edilmiş ve geri dönüşümü mümkün olmayan pek çok aşı adayları bulunmaktadır. Örneğin yeni ve canlı bir BCG aşısı bu yaklaşımla hazırlanmış ve ön klinik uygulamalarda daha başarılı görülmüştür. BCG (tuberküloz) aşısı attenué bir Mycobacterium formudur ve yeni aşı ise rekBCG30 olarak adlandırılan, rasyonel bir biçimde tasarlanmış rekombinant bir aşıdır. Bu aşının Faz 1 uygulaması tuberkülin negatif gönüllülerde 2004 yılında başlatılmıştır ([www.who.int/vaccine\\_research/diseases/tb](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/tb)).

Yukarıda söz edildiği üzere, deneysel olarak tanımlanmış antijenleri temel alan ikinci kuşak aşılarda daha da geliştirilmesini hedefleyen rekombinant DNA teknolojilerinin genelde iki ana teması olmuştur:

(i) enfeksiyöz ajanın ya da kanser hücrelerinin bir ya da birden fazla immünojenik proteini ya da proteinlerini kodlayan genler klonlanır ve bu genler en uygun biçimde ifade edilebileceği düşünülen bir konakçı organizmaya (bakteri, maya, böcek ya da memeli hücreleri) aktarılır. Bu hücrelerce bol miktarda sentezlenen antijenler modern teknikler kullanılarak yüksek saflıkta elde edilip aşı formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılır.

(ii) Moleküler mühendislik teknolojisi, aşı suşlarının ya da bakteri toksinlerinin rasyonel bir biçimde zayıflatılmasında/detoksifiye edilmesinde kullanılır.

Bu tür moleküler yaklaşımlar, geleneksel olanlara göre çok daha rafine olmakla birlikte yine de zaman alıcıdır, genellikle pahalıdır, gayet iyi antikor yanıtı vermekle birlikte T-hücre aktivasyonu yönünden özellikle hücre içi patojenlere karşı yetersiz kalabileceğinden adjuvant seçimi özellikle önemlidir ve daha da önemlisi serotipleri çok fazla olan patojenler için (meningococcus B gibi) universal aşılarda geliştirilmesine pek uygun değildir (**Bambini, 2009**; <http://www.twinside.org.sg/title/twr127c.htm>).

Geleneksel aşı geliştirme yöntemleri Hepatitis C, Papilloma virus tip 16, 18 ve Mycobacterium leprae gibi in vitro kültürü yapılamayan bazı mikroorganizmalara karşı aşı geliştirmede uygulanamamıştır. Bu yaklaşım, yine Staphylococcus aureus gibi fırsatçı patojenlere karşı da başarılı olamamıştır (**Bagnoli, 2011**).

#### - Omik bilim ve teknolojiler, "reverse" aşı bilimi ve üçüncü kuşak aşılarda

Şubat 2012 itibarıyla, dünyanın çeşitli merkezlerinde sürdürülen genom projelerinin toplam sayısı 14,000'e ulaşmış olup bunlardan 3000'den fazlası tamamlanmış projelerdir (<http://www.genomesonline.org/gold.cgi>). Serbest yaşayabilen bir organizmaya ait ilk genomu temsilen Haemophilus influenzae'ya ait mikrobiyal genom dizilerinin çözülerek rapor edildiği (**Fleischmann, 1995**) 90'lı yılların ortalarından bu yana sürdürülmekte olan, binlerce farklı organizmaya ait genom projeleri tarafından üretilen ve inanılmaz boyutlara varan bilgi birikimi ve buna paralel biçimde biyoinformatik alanındaki gelişmeler, -omik bilim ve teknolojilerin aşı bilimine rasyonel bir biçimde entegre olmasını sağlamış ve aşı araştırma ve geliştirilmesinde tamamen yeni bir çağın başlamasına neden olarak üçüncü kuşak aşılara öncülük etmiştir. Günümüzde önemli insan patojenlerinin neredeyse her biri için, farklı suşları temsilen birden fazla genom sekansı mevcuttur. İlgili genomik terim, kavram ve bunların beraberinde getirdiği aşı yaklaşımları Tablo 2'de özetlenmektedir.

Tablo 2. Yeni kuşak aşılarda ilgili terminolojiler, kavramlar ve açıklamalar.

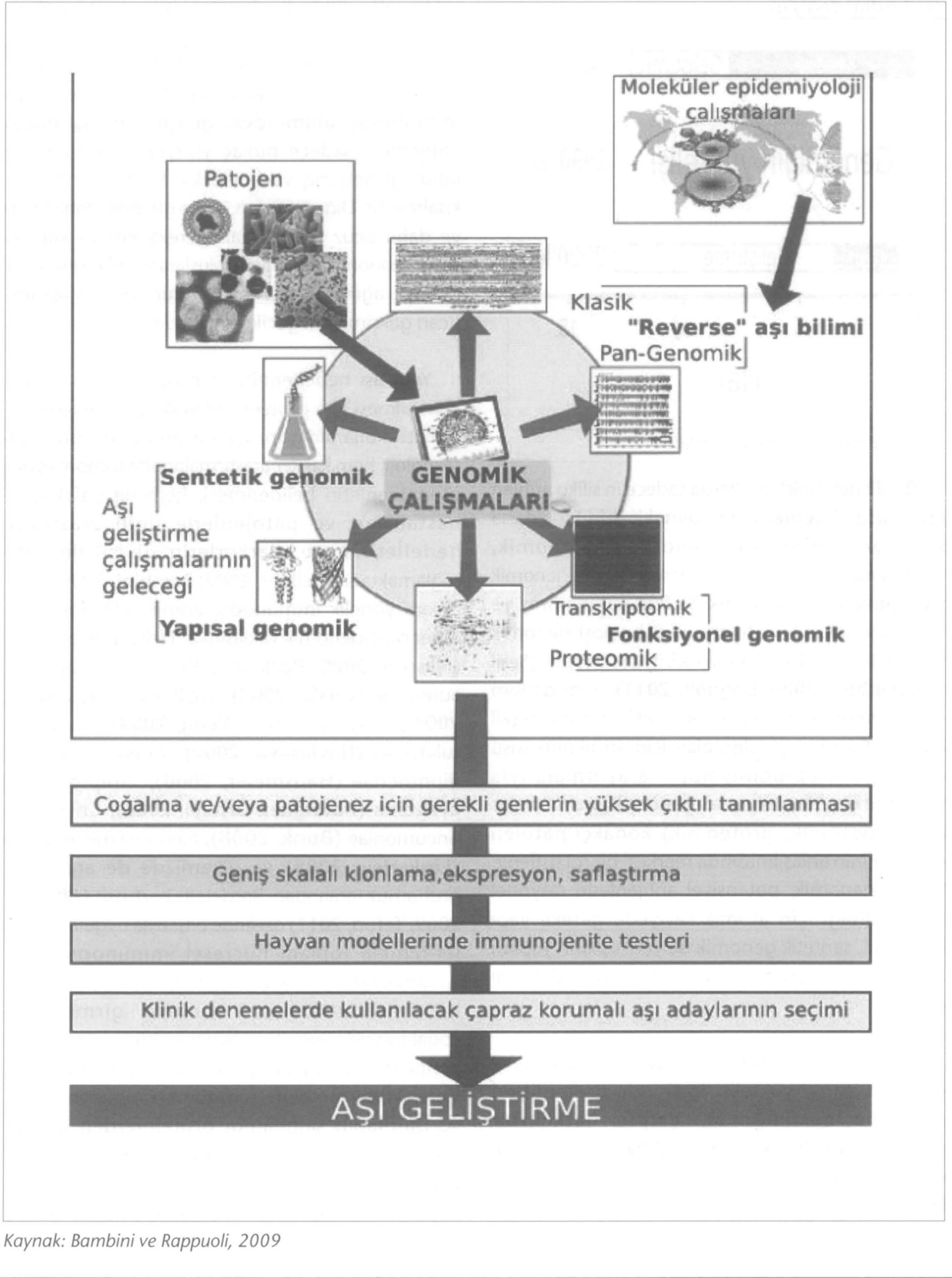
Terminoloji/Kavram	Açıklama
Genomik	Bir organizmanın sahip olduğu tüm genetik materyalin ve gen setlerinin tamamının (genomun) yüksek çıktılı biçimde çalışılması
Yapısal genomik	Bir genomdaki tüm yapısal motiflerin ve protein yapılarının yüksek çıktılı biçimde belirlenmesine yönelik çalışmalar
Transkriptomik	Bir organizmada ifade edilen tüm genlerin mRNA (transkript) seviyesinde yüksek çıktılı biçimde belirlenmesi; transkriptom araştırmaları
Proteomik	Bir hücrenin belli bir zaman ve mekanda ürettiği proteinlerin (proteomun), protein-protein ve protein-küçük molekül etkileşimlerinin yüksek çıktılı biçimde araştırılması
Fonksiyonel genomik	Mutasyon, transkriptom ve proteom analizleri ile genomun fonksiyonel ve dinamik unsurlarının yüksek çıktılı biçimde belirlenmesi
Karşılaştırmalı genomik	Farklı organizmalara ait genomların karşılaştırılmasıyla gen fonksiyonu, filojeni ve evrim sürecine ait bilgiler üretilmesi
Biyoinformatik	Yüksek çıktılı -omik bilim ve teknolojilerden elde edilen kütleli bilgilerin in siliko analizi, işlenmesi ve saklanmasında kullanılan kompütasyonel teknolojilerin tamamı
Sentetik genomik	Kompütasyonel teknikler ve DNA'nın kimyasal sentezinin bileşimi ile yeni gen kümelerinin, kromozomların ve hatta tüm genomun tasarımı ve oluşturulması
İmmünoproteomik (İmmünomik)	Bir patojenin sahip olduğu ve insan ya da hayvan konakçısının immün sistemi tarafından farkedilip tanınan antijenlerin tamamı
Sürafazom	Bir mikroorganizmanın dış yüzeyinde ifade edilen proteinlerin tümü
Sekretom	Bir mikroorganizmanın hücre dışına salgıladığı proteinlerin tümü
Antijenomik	İnsan/hayvan immün sistem reaksiyonları temelinde aşı adaylarının seçimi
Vaksinomik	Kişiyeye özgü aşılarda oluşturulabilmesi amacıyla insan immün yanıtları arasındaki farklılıkların araştırılmasını içeren aşı bilim alanı
Pan-genomik	Projesi bitmiş çoklu genomların analizi; böylelikle aynı türün tüm farklı suşlarına karşı etkili universal aşılarda tasarlanması In siliko antijen öngörüsü
In siliko antijen öngörüsü	Biyoinformatik araçlar kullanılarak aşı adayları antijenlerle ilgili öngörülerde bulunması
"Reverse" aşı bilimi	Aşı adaylarının, in siliko (patojeni kültüre almaksızın ve koruyucu etkinlikleri bakımından test edilmeksizin) seçilmesi

Bunlar içerisinde merkezde yer alan "reverse" aşılı bilimi (RV) prensipleri ve uygulamaları, Novartis Aşılı'nın (Siena, İtalya) Aşılı Araştırma Global Başkanı Dr. Rino Rappuoli tarafından geliştirilmiştir (**Tivedi, 2006**). RV'nin ilk geliştirildiği dönemdeki kapsamını biraz daha açıklamak yararlı olur. Bu yaklaşım, çeşitli biyoinformatik araçların kullanılmasıyla, genomdaki belirli DNA dizi motiflerinden yola çıkılarak belirli bir patojen için (i) dış zara ve hücre membranına hedeflenen proteinlerin ve (ii) konakçı yapılarını tanıyan ve onlarla etkileşen proteinlerin belirlenmesini içermiştir. Bekleneceği üzere, bunlardan ilki, sinyal peptidlerde, lipoproteinlerde ve transmembran proteinlerde korunmuş amino asit motiflerini hedeflemektedir. Bu yolla patojenin laboratuvar kültürlerini hazırlamak ve taşıdığı antijenleri biyokimyasal ve serolojik yöntemlerle tanımlamak gibi zor ve zaman alıcı basamaklar gerekmediği gibi, in vitro veya in vivo ne miktarda ifade edilip edilmediğinden, yani deneysel olarak yakalanıp yakalanamayacağından bağımsız bir biçimde, açıklanmış ve yorumlanmış herhangi bir patojen genomunda mevcut tüm protein antijenler ve hatta daha önce varlığı hiç bilinmeyen antijenler eşit oranda temsil edilirler. Bunun da ötesinde, gen/protein yapı benzerlikleri esas alındığından veri tabanında mevcut bilgiler diğer patojenlerde antijen tahmininde kullanılma potansiyeline sahiptir.

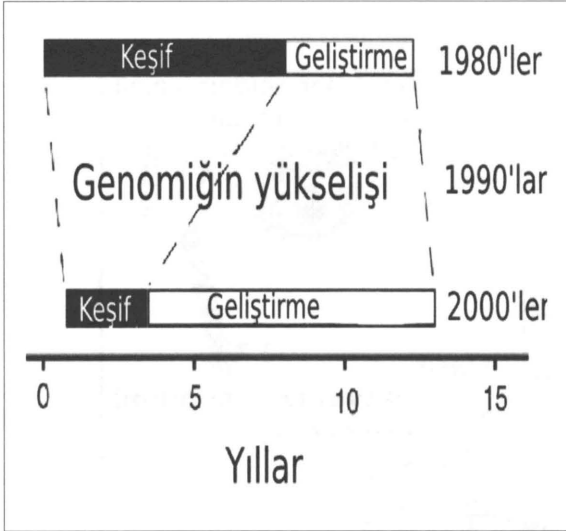
İmmunodominant antijenlerdeki değişkenlik, patojenlerin immün yanıtta kaçmak üzere kullandıkları genel bir mekanizmadır. Bunun en tipik örneği, her yıl yeni ve farklı bir aşının üretimini zorunlu kılan İnfluenza virusu yüzey proteinleridir. Spektrumun diğer ucundaki sorun ise, patojende korunan, ancak yeterince bağımsızlık sağlamayan antijenlerle ilgili olup, serogrup B meningokoklar (Men B) bunun en tipik örneğini oluşturmaktadır. Meningokokal meningitis ve sepsis etkeni olan *Neisseria meningitidis* beş büyük patojenik serogruba (Men A, B, C, Y ve W135) sahip, gram negatif, kapsüllü bir bakteridir. Bunlardan A/C/Y/W135 serogruplarına ait polisakarit-konjuge kombine aşılılar günümüzde uygulamada yer almaktadır ve adolesan ve risk altındaki personele

uygulanması ABD'de 2010'da onaylanmıştır (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6003a3.htm>). Afrika dışında kalan ülkelerde, global meningokokal menenjit vakalarının %50'sine neden olan Men B serogrubuna ait kapsüller polisakarit yapı, hem insanlarda mevcut bir glikoprotein olan polisialik asite benzerliği nedeniyle otoimmüniteyi uyurabileceği için, hem de ve çok zayıf bir immunojen olması nedeniyle bu serotipe karşı diğer serotiplerde olduğu gibi bir konjuge aşılı geliştirilememiştir. Yine aynı organizmanın bol miktarda içerdiği PorA yüzey proteini ise, antijenik değişkenlik göstermesi nedeniyle bir diğer zorluğu temsil etmekte ve bu iki komponenti içerecek hiçbir kompleks aşının teknik fizibilitesi olmayacaktı (**Rappuoli, 2011**). Tek bir suş ile hazırlanmış bir aşılı sadece A.B.D.'de dolaşan Men B suşlarının ancak %27'sine karşı etkili olabilecek, tüm patojen suşların %80'ini kapsayabilecek çok komponentli bir aşılı ise en az 20 ayrı Men B aşılı suşunu gerektirecekti. Buna karşılık in silico bir yaklaşımla, ve RV nin de ilk örneği olarak, üçüncü kuşak Men B aşılı 2000 başlarında geliştirilmeye başlanmıştır. Bu aşının geliştirilme sürecini kısaca özetlersek; MenB yüzey proteinlerini belirlemek amacıyla organizmanın genom sekansının (**Tettelin, 2000**) biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Geniş çapraz etkili bir aşılı geliştirilebilmesi için genomda, kuvvetli bir seçici baskıya uğramamış antijenlerin bulunması hedeflenmiştir. Çok fazla miktarda üretilmeyen ve fazla immünodominant olmayan antijenlerin farklı suşlarda daha fazla korunmuş olmaları beklenmiştir. Organizmanın sahip olduğu toplam 2,158 gen içerisinde 28'inin bu özelliklere sahip koruyucu antijenler kodladığı başarıyla gösterilmiştir (**Pizza, 2000**). Bunların *E. coli*'de klonlanmasıyla elde edilen rekombinant proteinlerle immunize edilen fare serumlarının bakterisidal aktivitesi test edilerek sonuçta serogrup B suşlarında beş adet yüksek oranda korunmuş antijen belirlenmiştir. Bunlardan üçünün yanısıra PorA P.1.4 tipi PorA üreten bir suşun dış zar vesiküllerinden oluşan yeni Meningokok B aşılı şu anda Faz III klinik deneme aşamasında olup, bu aşılı için 2010 yılında European Medicines Agency (EMA)'e onay başvurusu yapılmış bulunmaktadır.

Şekil 1. Omik alanlar ve bu alanların yeni aşıların keşfedilmesini sağlayan Ar-Ge faaliyet ve süreçlerine etkileri



**Şekil 2. Aşı keşif ve geliştirme süreçlerinin geçmişi ve genomik çağın yükseldiği 2000'li yıllar içerisinde gösterdiği değişim**



Kaynak: *Bambini ve Rappuoli, 2009*

RV, ilk geliştirildiği yıllarda sadece in siliko antijen öngörüsünü temel almış olmakla birlikte, daha sonraları fonksiyonel genomik, proteomik, immünomik ve karşılaştırmalı genomik/pan-genomik yaklaşımlardan da büyük ölçüde yararlanmış ve üçüncü kuşak aşuların tasarımında bu post-genomik bilim ve teknolojilerin katkısı çok büyük olmuştur (Şekil 1) (Bambini, 2009; Bagnoli, 2011). Tam genom dizilimleri klasik ve pan-genomik RV için temel teşkil eder. Patojenin aşı çalışmaları için en uygun suşu moleküler epidemiyoloji araştırmalarıyla belirlenirken, fonksiyonel genomik araştırmalar (transkriptomik, proteomik) konakçı-patojen etkileşiminin anlaşılmasında merkezi bir rol üstlenir. Yapısal genomik, potansiyel antijenlerin rasyonel mühendisliği için atomik seviyede gerekli yapı bilgilerini, sentetik genomik ise yeni aşuların yapımı için sentetik genom tasarımları oluşturulmasını önerir.

Aşı keşif ve geliştirme süreçlerinin geçmişi ve genomik çağın yükselişi içerisinde gösterdikleri değişime bakıldığında, çarpıcı farklılıklar gözlenmektedir (Bambini, 2009). Şekil 2'de görüleceği üzere, aşı teknolojisinin "aşı adayının keşfi" ve "ilgili aşının geliştirilmesi" olmak üzere iki aşaması mevcuttur; sürecin tamamı ise hem

geçmişte, hem de günümüzde en az 15 yıllık Ar-Ge çalışmaları gerektirmektedir. Geleneksel aşı keşif yaklaşımları, 80'li yıllarda çok zaman almakta, yıllara ve hatta on yıllara yayılmaktaydı. Bundan sadece 10-15 yıl sonrasında, genom dizilerine ulaşımındaki kolaylık, yüksek çıktılı post-genomik teknolojiler ve immünoloji bilimindeki gelişmeler, aşı adayı antijenlere sadece birkaç yıl içerisinde ulaşmak rahatlığı getirmiş ve böylelikle keşif sürecini çok kısaltmıştır. Diğer yandan, daha güvenli, daha etkin ve daha ucuz aşulara olan gereksinim ve küresel sosyoekonomik nedenlerle uluslararası platformlarda giderek ağırlaşan düzenleyici kurallar, bu aşuların ticari gelişimlerini geciktirmektedir.

Yeni aşı hedeflerinin ve biyomarkörlerin tarif edilebilmesi için proteom teknolojisinin seroloji ile birlikte kullanılmasını içeren immünoproteomik teknoloji, hem kanser araştırmalarında tümöre özgül otoantijenlerin belirlenmesi, hem de enfeksiyon hastalıkları ve patojenlerle ilgili araştırma hedeflerinin ve markörlerin geliştirilmesini sağlamaktadır (Seliger, 2002; Bambini, 2009). Yeni aşulara yönelik immünoproteomik teknolojiler ve diğer post-genomik yaklaşımlar *Helicobacter pylori* (Nilsson, 2000; Backert, 2005), *Staphylococcus aureus* (Vytvytska, 2002), *Bacillus anthracis* (Ariel, 2003), *Shigella flexneri* (Peng, 2004), *Francisella tularensis* (Havlasova, 2002), *Corynebacterium diphtheriae* (Hansmeier, 2006), *Streptococcus pyogenes* (Rodríguez-Ortega, 2006), *Chlamydia pneumoniae* (Bunk, 2008), *Neisseria meningitidis* (LinksHsu, 2008) ve ülkemizde de araştırma grubumuz tarafından *Bordetella pertussis* (Altındiş, 2009; Tefon, 2011) özelinde başarıyla uygulanmıştır. Jel-temelli toplam hücresel immünoproteom çalışmalarının yanısıra, patojen bakterilerin konakçı hücreye tutunması, hücreye girmesi ve çoğalmasında önemli rol oynayan hücre membranı, periplasmik ve dış membran proteinlerinin analizini içeren yüzey proteom (sürafazom) komponentlerinin ve patojenin salgıladığı proteinlerden oluşan sekretom komponentlerinin tamamının jelden-bağımsız proteomik tekniklerle tanımlanması da büyük önem taşımaktadır (Walters, 2010; Tefon, 2011).



### Polivalent rekombinant aşılar

Önemli bir tehdit ajanı olan Dengue virus ile ilgili aşı geliştirme örneği, Faz III aşamasında dikkat çekmektedir. Aşısı ve tedavisi bulunmayan bir hastalık olarak bilinen Dang hastalığı, Asya-Pasifik ve Latin Amerika ülkeleri başta olmak üzere yüzden fazla ülke ve üç milyardan fazla insanı tehdit etmektedir. Çeşitli sivrisinekler aracılığı ile bulaşan virusun dört farklı serotipi vardır. Günümüzde büyük ümit veren canlı bir aşı, Dengue virus serotiplerine ait iki protein geninin Yellow fever 17D aşı suşuna (YFV 17D) klonlanması ile elde edilmiştir. Bu dörtlü Dengue aşısının, genetik ve fenotipik stabilite, in vitro ve in vivo immunojenite ön klinik testlerinden sonra WHO kriterlerine uygun bir biçimde klinik çalışmaları devam etmektedir. Endemik bölgelerde, mevcut araştırma Faz III aşamasına ulaşmıştır (**Guirakho, 2000; Guy, 2011**).

### Yapısal aşı bilimi ve rasyonel antijen tasarımı

Yeni aşılar için araştırma ve geliştirme çalışmaları, patojenlerin koruyucu olmayan ve istenmeyen immün reaktif komponentlerinin sayısını düşürmüş, immünizasyonun güvenliğini ve aşılanan bireylerin toleransını arttırmıştır. Yine de, birkaç istisnai aşı araştırması dışında, modern ve lisanslı aşılardan hemen tamamında antijenlerin doğal yapıları korunmaktadır. Oysa günümüzde biyokimya ve biyofizik alanlarındaki gelişmeler, antijenlerin yüksek çözünürlükte yapı analizlerini, antijenlerin nötralize edici antikörlerle etkileştiği elektrostatik yüzeyleri ve bu yüzeyleri oluşturan protein mimarisini aydınlatmakta, genetik mühendisliğine yol göstererek antijenlerin optimize edilmesini sağlamak potansiyelindedir (**Dormitzer, 2008**). Bu yaklaşım, sadece sınırlı sayıda koruyucu antijene sahip olan viruslar için özellikle önemlidir. Rasyonel antijen tasarımı ve protein modifikasyonunu içeren ve robotikler eşliğinde in vitro immünojen performansı taramalarını gerektiren yüksek çıktılı bu yaklaşımın rasyonel adjuvant tasarımı ile birlikte kullanımı, daha dayanıklı, daha güvenilir, patojenin daha geniş bir spektrumuna karşı koruma sağlayan, daha pratik ve daha etkin biçimde üretilebilir yeni jenerasyon aşılardan geliştirilmesi için önemlidir.

### Peptid Aşılar

Aşı geliştirme çalışmalarında önemli bir diğer yaklaşım da, değişik T- ve B-hücre epitoplarnı temsil eden peptid aşılardan geliştirilmesini içermiştir. Polivalent epitoplarn, özellikle bir virusun çoklu suşlarına karşı korunmayı sağlayabilir. Epitop analizleri ile elde edilen bilgiler, bir proteinin sadece az sayıdaki bölgelerini aşı olarak kullanabilme olanağını verir ve bu yaklaşımın pek çok avantajı olacağı beklenmektedir: (i) Peptid aşılardan, potansiyel olarak enfeksiyon riski olan zayıflatılmış aşılardan çok daha güvenilir bir alternatif teşkil ederler, (ii) üretimleri ekonomik olacaktır, (iii) yan etki bakımından daha güvenilir olup otoimmün yanıtta daha az neden olurlar. Ön klinik çalışmaların gösterdiği üzere, epitop peptid aşılardan etkinliğinde, uygulama yolu, dozu ve adjuvant tipi kilit bir rol oynamaktadır. Özellikle viruslar için çoklu spesifik T-hücre yanıtına odaklı peptid epitop aşılardan, çok değişken viruslar için önem kazanmaktadır. HIV, HCV, SARS ve influenza virusları ve malaria etkeni, polivalent epitop aşı geliştirme yaklaşımlarının öne çıktığı başlıca patojenlerdir. Bu amaçla geliştirilmiş olan çok sayıda biyoinformatik programı, epitop peptitlerin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (**Sirskyj, 2011**). Adı geçen patojenlerden influenza, daha özel bir durum arz etmektedir. Mevcut influenza aşılardan yetersizliği bilindiğinden, tüm influenza serotiplerine karşı geniş spektrumlu ve uzun süreli bağışık yanıt sağlayan yeni aşılardan geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Kendi toplumları için gereksinim duydukları aşılardan bizzat üretme politikasına sahip gelişmekte olan ülkelerde, Dünya Sağlık Örgütü'nün desteğinin yanı sıra, influenza aşı üretim kapasitelerinin artırılması ve geliştirilmesi çabaları da sürmektedir. Bu yönde yeni antijen üretim metodları, yeni aşı uygulama yolları, korunan virus antijenlerine dayalı aşı yaklaşımları geliştirmek üzerine yoğun bir biçimde çalışılmaktadır (**WHO- Wellcome Trust Conference Report, 2010; Hendriks, 2011**). Bunlar; yeni zayıflatma çalışmaları, rekombinant baculovirus sistemleri ve virus benzeri partiküllerin (virus-like particles, VLPs) üretimi, influenza için vaccinia ve adenovirus vektörleri ile rekombinant canlı zayıflatılmış vektör aşılardan geliştirilmesi, transdermal ve intranasal

nanoemüsiyonlar gibi alternatif uygulama araştırmalarını içermektedir.

### HIV aşıları

Çok değişken viruslara örnek teşkil eden HIV virüsü için aşı geliştirmede yaşanan güçlüklerin pek çok faktöre bağlı olduğu gözlenmektedir. Bu faktörlerin en önemlileri arasında virüsün gösterdiği yüksek genetik değişkenlik, zarf proteinlerinin özellikleri ve immün tanıma ve nötralizasyondan kurtulması sayılabilir. Antikor nötralizasyonundan kurtulmaya ilave olarak, HIV bir çok mekanizmayla hücresele yanıtta kurtulma yeteneğine de sahip bulunmaktadır. HIV-infekte kişilerin hemen hepsi antikor yanıtı oluştururlar, ancak bu antikorlardan çok azı gerçekten virüsü nötrale edebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bu nötrale edici antikorların tanımlanması ve bunu uyaran immünojenlerin aşı dizaynında kullanılması başlıca hedefler arasında bulunmaktadır (Cafaro, 2009). HIV'e karşı, 1987'den bu yana çeşitli subunit, DNA, canlı vektör rekombinant aşılar ve çeşitli aşı kombinasyonları geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bunlardan bazıları maymun modellerinde değişik seviyelerde koruyucu etkinlik göstermiş, ancak Faz III uygulamasına bunlardan sadece birkaçı devam edebilmiştir. Bunlardan RV144 olarak bilinen uygulamanın (rekombinant canarypox vektör + gp120B/E-alum) Tayland'da %31 koruma sağladığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmalar, çeşitli vektör aşılarıyla subunit aşıların ardışık uygulanması veya uygulama takvimlerinin geliştirilmesine ışık tutacaktır (Girard, 2011).

### Sonuç

Günümüzde özellikle moleküler biyoloji ve genetik alanında görülen hızlı ve büyük ilerlemeler ve mikroorganizmaların patojenite ve immünojenitelerinden sorumlu yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesinde elde edilen bulgular, aşı üretim süreci ve mevcut aşılarıyla ilgili karşılaşılan çeşitli olumsuzluklara çözüm getirerek aşı biliminde çok önemli gelişmeler sağlamıştır. Dünya aşı araştırma ve geliştirme bilim topluluğunun

günümüzde bir rönesansı yaratmakta olduğunu söyleyebiliriz. 1980'lerden bu yana büyük gelişmeler gösteren rekombinant DNA teknolojisi, hem daha etkin ve güvenilir yeni alt ünite aşıların geliştirilmesini sağlamış, hem de -omik bilim ve teknolojilerine öncülük etmiştir. -Omik'lere dayanan ilk uygulamalar, 2000'li yılların başında reverse vaccinology (ters aşı bilimi) teriminin bilim dünyasına önerilmesi ve aşı geliştirilmesinde oldukça zor bir patojen olan serogrup B meningokoklar özelinde başarısını kanıtlamasıyla başlamıştır. Hemen ardından, yeni aşıların dizaynı için transkriptomik, proteomik, immünojenomik gibi post-genomik teknolojilerle aşı biliminin entegrasyonunun yanısıra biyokimya ve biyofizik alanlarındaki gelişmelerin antijenlerin modifiye edilebildiği tasarımlara izin vermesi ve peptid aşıları da öne çıkaran diğer yaklaşımlar büyük ümitler yaratmıştır. Tüm bu alanlar, "üçüncü kuşak" yeni aşıları insanlığa kazandırmaya hızla hizmet edecektir. Bir ülkenin kalkınmasının en önemli ölçütlerinden birisi, kendi gereksimi olan aşıları üretme becerisidir. Bu noktada çok üzücü olan, ekonomik büyüme rakamlarının sıklıkla söz edildiği ülkemizde hiçbir aşı Ar-Ge ve üretim politikasının bulunmaması ve mevcut dışa bağımlılıktır.

### KAYNAKLAR

Altındış, E., Tefon, B.E, Yıldırım, V. Özcengiz, E., Becher, D., Hecker, M., Özcengiz, G. (2009). Immunoproteomic analysis of Bordetella pertussis and identification of new immunogenic proteins. Vaccine. 27: 542-548.

Ariel N., Zvi A., Makarava K.S., Chitlaru T., Elhanany E., Velan B. ve ark. (2003). Genome-based bioinformatic selection of chromosomal Bacillus anthracis putative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface-associated antigens. Infect. Immun.71: 4563-4579.

Backert S., Kwok T., Schmid M., Selbach M., Moese S., Peek R. ve ark. (2005). Subproteomes of soluble and structure-bound Helicobacter pylori proteins analyzed by two dimensional gel

electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 5:1331-1345.

**Bagnoli F., Baudner B., Mishra R.P.N., Bartolini E., Fiaschi L., Mariotti P. ve ark.** (2011). Designing the next generation of vaccines for global public health. *Omics J. Integ. Biol.* 15: 545-566.

**Bambini S. ve Rappuoli R.** (2009). The use of genomics in microbial vaccine development *Drug Discov. Today*. 14: 252-260.

**Bunk S., Susnea I., Rupp J., Summersgill J.T., Maass M., Stegmann W., ve ark.** (2008). Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections. *J. Immunol.* 180: 5490-5498.

**Cafaro A., Macchia I., Maggiorella M.T., Titti F., Ensoli B.** (2009) Innovative approaches to develop prophylactic and therapeutic vaccines against HIV/AIDS. In *Pharmaceutical Biotechnology* (Chapter 14, pp.189-242), Guzman C.A. and Feuerstein G.Z. (Eds.), Landes Bioscience and Springer Bioscience, 2009.

**Conference Report**, (2010). Report of the Fourth Meeting on 'Influenza vaccines that induce broad spectrum and long-lasting immune response'(World Health Organization and Wellcome Trust, London, United Kingdom, 9-10 November 2009). *Vaccine*, 28: 3875-3882.

**Dormitzer P.R., Ulmer J.B., Rappuoli R.** (2008). Structure-based antigen design: a strategy for next generation vaccines. *Trends Biotechnol.* 26: 659-667.

**Fleischmann R.D., MD Adams, M.D., White, O, Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. ve ark.** (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 269: 496-512.

**Gao F., Robertson D.L., Carruthers C.D., Li Y.,**

**Bailes E., Kostrikis L.G. ve ark.** (1998). An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype 1 represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G and I). *J Virol.* 72: 10234-10241.

**Girard M.P., Osmanov S., Assossou O.M., Kieny M.P.** (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. *Vaccine*. 29: 6191-6218.

**Guirakhoo F., Weltzin R., Chambers T.J., Zhang Z.X., Soike K., Ratterree M. Ve ark.** (2000). Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J. Virol.* 74: 5477-5485.

**Guy B., Barrere B., Malinowski C., Saville M., Teysou R., Lang J.** (2011). From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 29: 7229-7241.

**Hansmeier N., Chao T., Kalinowski J., Pühler A., Tauch A.** (2006). Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *Proteomics*. 6: 2465-2476.

**Havlasova J., Hernychova L., Halada P., Pellantova V., Krejsek J., Stulík J. ve ark.** (2002). Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics*. 2: 857-867.

**Hendriks J., Holleman M., Boer O., Jong P., Luytjes W.** (2011). An international technology platform for influenza vaccines. *Vaccine*. 29S: A8-A11.

**Kennedy R.B., Poland G.A.** (2011). The top five "game changers" in vaccinology: Toward rational and directed vaccine development. *Omics J. Integ. Biol.* 15: 533- 537

**LinksHsu C.A., Lin W.R., Li J.C., Liu Y.L., Tseng Y.T., Chang C.M. ve ark.** (2008). Immunoproteomic

identification of the hypothetical protein NMB1468 as a novel lipoprotein ubiquitous in *Neisseria meningitidis* with vaccine potential. *Proteomics*. 8: 2115-2125.

**Moriel, D.G., Scarselli M., Serino L., Mora M., Rappuoli R.**, (2009) Masignani V. Genome-Based Vaccine Development: A Short Cut for the Future. *Pharmaceutical Biotechnology* (Chapter 8, pp. 81-88). Guzman C.A. and Feuerstein G. Z. (Eds), 2009.

**Nilsson C.L., Larsson T., Gustafsson E., Karlsson K., Davidson P.** (2000). Identification of protein vaccine candidates from *Helicobacter pylori* using a preparative twodimensional electrophoretic procedure and mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72: 2148-2153.

**Peng X., Ye X., Wang S.** (2004). Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies. *Vaccine*. 21-22: 2750-2756.

**Pizza M., Scarlato V., Masignani V., Giuliani M.M., Arico B., Comanducci M., Jennings G.T., Baldi L., Bartolini E., Capecchi B., Galeotti C.L., Luzzi E., Manetti R., Marchetti E., Mora M., Nuti S., Ratti G. ve ark.** (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 287: 1816-1820.

**Rappuoli R.** (2011). The challenge of developing universal vaccines. *F1000 Medicine Reports*. 3:16.

**Rodríguez-Ortega M.J., Norais N., Bensi G., Liberatori S., Capo S., Mora M.ve ark.** (2006). Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A

*Streptococcus* surface proteome. *Nat. Biotechnol.* 24:191-197.

**Seliger B, Kellner R.** (2002). Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics*. 2:1641-1651.

**Sirskyj D., Mitoma F.D., Golshani A., Kumar A., Azizi A.** (2011). Innovative bioinformatic approaches for developing peptide-based vaccines against hypervariable viruses. *Immunol. Cell Biol.* 89:81-89.

**Tefon, B.E., Kühnel, S., Özcengiz, E., Becher, D., Hecker, M., Özcengiz, G.** (2011). A comprehensive analysis of *Bordetella pertussis* surface proteome and identification of new immunogenic proteins. *Vaccine*. 29: 358.

**Tettelin H., Saunders N.J., Heidelberg J., Jeffries A.C., Nelson K.E., Eisen J.A., Ketchum K.A., Hood D.W., Peden J.F. ve ark.** (2000). Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serotype B strain MC58. *Science*, 287:1809-1815.

**Trivedi B.** (2006). Profile of Rino Rappuoli. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 10831-10833.

**Vytvytska O., Nagy E., Bluggel M., Meyer H.E., Kurzbauer R., Huber L.A. ve ark.** (2002). Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics*. 2: 580-590.

**Walters M.S., Mobley H.L.T.** (2010). Bacterial proteomics and identification of potential vaccine targets. *Expert Rev. Proteomics*. 7: 181-184.