

İnaktif aşı üretimi ve ilgili araştırma süreçleri

Prof. Dr. Aykut Özdarendeli



1969 yılında Ankara'da doğdu. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1991 yılında mezun oldu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Viroloji Anabilim Dalında doktorasını yaptı. Doktora sonrası araştırmacı olarak 1998-2001 yıllarında ABD'de koronavirüslerin replikasyonu ve transkripsiyonu üzerinde çalışmalar yaptı. 2009-2010 yıllarında ABD'de "Vaccine Research Center" davetli araştırmacısı olarak aşı geliştirme konusunda çalışmalarda bulundu. 2015 yılında ülkemizin ilk Aşı Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezi'ni (ERAGEM) Erciyes Üniversitesinde kurdu. 2020 yılında COVID-19 pandemisinin çıkmasıyla birlikte hastalığa karşı aşı geliştirme çalışmalarına başladı. TÜRKOVAC aşısının proje lideri olan Özdarendeli, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelığının yanı sıra Aşı Araştırma, Geliştirme ve Uygulama Merkezinin Direktörüdür.

Aşı amaçlı patojen inaktivasyonuna ilişkin ilk rapor, Daniel Elmer Salmon ve Theobald Smith tarafından güvercinlere bir domuz kolera etkeninin ısıyla inaktif hale getirilerek yapılmasıyla başlamıştır (1). Bu gelişme, inaktive edilmiş patojenlerle bağışıklamanın bulaşıcı hastalıklara karşı koruyucu olduğunun bilim dünyasındaki ilk kanıtıdır. Bu gelişmeyi takip eden 15 yıl içerisinde insanlar için ölümcül olan tifo, kolera ve veba gibi hastalıklara karşı inaktif bakteriyel aşılar geliştirilmiştir. Aynı yıllarda, Pasteur'un tavşan omuriliğinde ürettiği ve kısmi olarak inaktif ettiği kuduz virüsü preparatları ile viral enfeksiyonlara karşı bağışıklamanın da temelleri atılmıştır. Bununla beraber, gerçek anlamda inaktive viral aşılardan büyük ölçeklerde üretilerek aşı olarak kullanılmaları hücre kültürünün keşfiyle başladı. In vitro şartlarda fibroblast hücrelerinde poliovirüsün üretilmesi ve inaktivasyonu ile hazırlanan çocuk felci aşısının üretilmesiyle Enders, Weller ve Robbins 1954 yılında Nobel tıp ödülü aldılar (1).

Genel olarak, tüm inaktive viral aşılardan benzer bir üretim sürecini takip eder. Patojenin büyük miktarlarda üretilerek aşı antijeni hazırlamak için canlı bir sisteme ihtiyaç vardır. Tarihsel olarak aşı üreticileri, primer hücre kültürleri, dölenmiş yumurtalar ve hatta virüs üretimi için canlıları kullanarak aşı antijen üretimi yapmışlardır (2, 3). Günümüzde hücre hatlarının sürekli daha yaygın

kullanım alanı bulması ve azaltılmış üretim maliyetleri, artan aşı güvenliği ile nispeten büyük ölçekte üretim avantajları getirmiştir (3). Özellikle son yıllarda viral aşılardan üretiminde kullanılan devamlı hücre hatlarının farklı teknolojilere sahip biyoreaktörlerde üretilmesiyle standart ve optimize koşullar sağlanmış ve kısa zamanda büyük ölçeklerde üretim imkânı oluşmuştur (1, 3).

Virüs üretimi yapıldıktan sonra, kısmi olarak saflaştırılan ve konsantre edilen virüs kültürü kimyasal yöntemler, fiziksel yöntemler veya ikisinin bir kombinasyonunu ile inaktive edilir. Virüs inaktivasyonu farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler arasında ısı, askorbik asit, etilenimin türevleri, ultraviyole ışınları, hidrojen peroksit ve gama ışınlanması yöntemleri sayılabilir. Bununla birlikte insan viral aşılardan inaktivasyonu için yalnızca kullanılan formaldehit ve -Propiolakton (BPL), yıllardır lisanslı aşılarda kullanılmaktadır. İnaktif aşı üretiminde güvenlik ve etkinlik açısından en önemli basamaklardan birisi virüs inaktivasyon işlemidir. 1955 yılında ABD'de Cutter laboratuvarlarında üretilen çocuk felci aşısının uygun şekilde saflaştırılmaması ve oluşan hücre debriserlerine inaktivan ajan olan formaldehitin etki edememesi sonucunda polio virüsü tam olarak inaktive edilememiştir. Bunun sonucunda aşılanan 40 bin çocukta abortif myelit oluşurken 51 çocuk felç geçirmiş ve 5 çocuk hayatını kaybetmiştir. Bu trajik olay, inaktif aşılardan üretilmesiyle ilgili pro-

sedürlerin daha sıkı kuralları içerisinde yapılmasını sağlamıştır (1, 4).

Yüksek bir güvenli aşı üretiminde virüs inaktivasyonu analizleri büyük önem taşımaktadır. Virüsün inaktivasyon kinetiği tamamen anlaşılmalı ve inaktivasyonun tam gerçekleştiği farklı metotlarla doğrulanmalıdır. İnaktivasyon kinetiği her bir patojen ve inaktivasyon metoduna göre farklılık göstermektedir. Bu nedenle, inaktive edilmiş aşı bulunda inaktivasyonun tekrarlanabilir olduğunu kesinlikle gösterilmelidir. Her bir aşı bulunda veya proses içi ara ürünlerde inaktivasyon testleri genellikle in vitro hücre kültürü bazlı çalışmalarla yapılabileceği gibi bu in vivo olarak da yapılabilir. In vitro kültürlerde virüsün varlığı veya yokluğu şu şekilde tespit edilebilir: litik virüsler için hücre kültüründe sitopatik etkinin (CPE) gözlenmesi şeklinde yapılırken litik olmayan virüsler için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), antijen belirlenmesinde kullanılan immunofloresans (IFA) yöntemi yanında ikinci bir adım olarak aşı materyalinin uygun bir deney hayvanlarına verilmesini takiben hastalık semptomlarının takip edilmesidir. Başarılı bir inaktivasyon, canlı virüs aktivitesinin tamamen inhibe edilmesi yanında inaktive edilmiş virüsün antijen kalitesinin korunmasıyla sağlanır (5).

İnaktivasyon işleminden sonra viral bulunun kontaminantlarını uzaklaştırmak için saflaştırma işlemleri yapılır. Aşağı yönde işleme (downstream



Aşı amaçlı patojen inaktivasyonuna ilişkin ilk rapor, Daniel Elmer Salmon ve Theobald Smith tarafından güvercinlere bir domuz kolera etkeninin ısıyla inaktif hale getirilerek yapılmasıyla başlamıştır. Bu gelişme, inaktive edilmiş patojenlerle bağışıklamanın bulaşıcı hastalıklara karşı koruyucu olduğunun bilim dünyasındaki ilk kanıtıdır. Bu gelişmeyi takip eden 15 yıl içerisinde insanlar için ölümcül olan tifo, kolera ve veba gibi hastalıklara karşı inaktif bakteriyel aşular geliştirilmiştir. Aynı yıllarda, Pasteur'ün tavşan omuriliğinde ürettiği ve kısmi olarak inaktif ettiği kuduz virüsü preparatları ile viral enfeksiyonlara karşı bağışıklamanın da temelleri atılmıştır.

process), konakçı hücrelerden veya kültür ortamından kaynaklanan kontaminantları ortadan kaldırmayı amaçlar. Kontaminantlar immünojenik ve biyolojik tepkilere neden olabileceğinden, düzenleyici yönergelere uygun miktarlarda kontaminantların uzaklaştırılması gerekir. Virüsün iyonize pH değeri, yüzey hidrofobikliği, bir zarfın varlığı veya yokluğu, virüs parçacıklarının çapı ve kararsızlığı saflaştırmada kullanılacak yöntemlerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Virüsler; proteinler, peptitler, glikoproteinler gibi biyomoleküllerle karşılaştırıldığında oldukça büyüktür. Proteinler tipik olarak 0.005 ile 0.08 106 Da büyüklüğe sahip iken virüsler genellikle 5x106 Da daha büyük ve 1000 nm'ye kadar bir boyuta sahip olabilir. Viral boyuta dayalı saflaştırma stratejileri yoğunluk gradiyent ultrasantrifüj, ultrafiltrasyon, iki fazlı çöktürme (iki fazlı presipitasyon) ve boyut dışlama kromatografisi (SEC) olarak sayılabilir. Sezyum klorür (CsCl) veya sükröz gradiyentleri kullanan yüksek hızlı hazırlayıcı santrifüjleme (ultrasantrifüjleme), geleneksel olarak birçok viral işlemi işlemek için kullanılmıştır. Genel olarak, gradiyent santrifüjleme kararsız viral partiküller için bile fiziksel olarak uygundur; ancak, emek yoğun, zaman alıcı ve ölçek büyütme

için pratik değildir. Bazı virüsler, polietilen glikol (PEG), amonyum sülfat veya kalsiyum fosfat gibi için kimyasallarla çöktürülerek daha sonra düşük hızdaki santrifüjle belirli saflıkta aşı antijeni alınımında kullanılmaktadır. Bununla beraber saflaştırma işlemi yeterli olmadığı takdirde ikinci bir metod ile saflaştırma yapılmaktadır. Ayrıca, hücrel bileşenlerden viral partiküllerin ayrılmasında; PEG, dekstran veya polivinil alkol içeren sulu iki fazlı ayırma sistemleri başarıyla kullanılmaktadır. Membran bazlı teğetsel akış filtrasyon (TFF) teknikleri, özellikle ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon yöntemleriyle saflaştırma için aşağı akış sürecinde uygulanabilir yöntemlerdir. Özellikle içi boş fiber çapraz akışlı membranların açık akış yolu virüs parçacıklarının ve kaymaya duyarlı proteinlerin nazikçe işlenmesini destekler, bu nedenle virüsün yapısal bütünlüğüne zarar vermez (1, 5, 6).

Ölçek büyütme için uygun saflaştırma protokolleri genellikle kromatografi yöntemlerine dayanan prosedürleri içerir. Virüs partiküllerinin katı fazlara adsorpsiyonu uygun ve pratik bir saflaştırma sağlar. Adsorpsiyona bağlı kromatografik yöntemlerin yüksek akış hızlarında yapılabilmesi, kararsız virüslerin biyolojik aktivitesine zarar verme-



Tarihsel olarak aşı üreticileri, primer hücre kültürleri, dölleniş yumurtalar ve hatta virüs üretimi için canlıları kullanarak aşı antijen üretimi yapmışlardır. Günümüzde hücre hatlarının sürekli daha yaygın kullanım alanı bulması ve azaltılmış üretim maliyetleri, artan aşı güvenliği ile nispeten büyük ölçekte üretim avantajları getirmiştir. Özellikle son yıllarda viral aşuların üretiminde kullanılan devamlı hücre hatlarının farklı teknolojilere sahip biyoreaktörlerde üretilmesiyle standart ve optimize koşullar sağlanmış ve kısa zamanda büyük ölçeklerde üretim imkânı oluşmuştur.

den saflaştırılması, ölçek büyütmenin kolay olması ve işletme maliyetlerinin nispeten ucuz olması gibi avantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte, uygun kromatografik yöntemlerin virüsün fiziksel ve kimyasal yüzey özellikleri dikkate alınarak yapılması gerekmektedir. Sık kullanılan kromatografik yöntemlerden bir diğeri afinite kromatografisidir. İki molekül arasındaki spesifik ve geri dönüşümlü bağlanma üzerine kurulmuş bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir. Günümüzde, viral partiküllerin saflaştırılmasında birden fazla kromatografik yöntemin kombinasyonu sıklıkla kullanılmaktadır (5, 6).

İnaktif aşı üretiminde proseslerinde hücre üretiminden virüs kültürasyonuna, viral bulkin konsantrasyonundan saflaştırma işlemlerine kadar olan bütün süreçlerde kalite-kontrol testlerinin yapılması gerekmektedir. Aşı üretimi sırasında ve sonrasında; virüs inaktivasyon kinetiği ve inaktivasyonun tam olarak gerçekleştiğinin ortaya konması, potens, safsızlık, sterilite, stabilite ve hücresel DNA miktarı vb. rutin kontrol testleri yapılmaktadır (5, 6).

İnaktif aşular immun yanıtı tek başlarına yeterince uyarmadığı için formülasyonlarında adjuvant bulunmaktadır. İnaktif

aşulara en çok kullanılan alüminyum hidroksit adjuvandır. Lisanslı insan aşularında şu anda kullanılan adjuvanlar arasında alüminyum tuzları, su içinde yağ emülsiyonları (MF59, AS03 ve AF03), virozomlar ve AS04 (alüminyum tuzu ile monofosforil lipid A preparasyonu (MPL)) bulunmaktadır. Ayrıca, bazı inaktif aşulara daha uzun raf ömrü sağlanması için koruyucu maddeler (thiomersal, magnezyum klorid) aşı formülasyonunda bulunmaktadır. Formülasyonu yapılan inaktif aşuların steril şartlarda flakon ya da şırınga dolumu gerçekleştirilir (5, 6, 7).

Günümüzde, hem formaldehit hem β -Propiolakton ile inaktive edilerek hazırlanmış yedi lisanslı viral aşı vardır. Poliovirüs (PV), Hepatitis A (HAV), Japon Ensefalit Virüsü (JEV) ve kene ile bulaşan Ensefalit Virüsü (TBEV) formaldehit ile inaktive edilerek hazırlanan inaktif viral aşılardır. Kuduz ve grip virüsü aşuları β -Propiolakton ile inaktive edilerek hazırlanmış viral inaktif aşılardandır. Ayrıca, COVID-19'a karşı lisanslanmış inaktif aşuların inaktivasyonunda β -Propiolakton kullanılmaktadır (8, 9, 10, 11).

Viral ajanlara karşı inaktif aşı geliştirilmesi oldukça uzun araştırma süreç-

lerini gerektirmektedir. İnaktif aşılardan geliştirilmesinde en önemli basamaklardan birisi virüsün izole edilmesidir. Genel olarak, virüs izolasyonu hücre kültürlerinde yapılmaktadır. Virüsün hücre kültürüne adaptasyonu, üreme kinetiği ve titresi belirlenmelidir. Ayrıca izole edilen virüsün gen dizilimi ortaya çıkarılarak genetik karakterizasyonun yapılması önem taşır. Bir diğer önemli aşama çeşitli yöntemlerle yapılan virüsün inaktivasyon işlemidir. İnaktivasyon kinetiğinin ortaya konulması ve sonuçların tekrar edilebilir olması gerekmektedir. Hücre kültürüne uyarlanarak karakterizasyonu yapılan virüsün ana tohum bankaları ve çalışma bankaları oluşturulur ve kayıt altına alınır. Aynı şekilde virüsün üretileceği hücre hattının kalite kontrol ve karakterizasyon çalışmaları sonrasında ana tohum bankaları ve çalışma bankaları oluşturulur (1, 5).

Yukarıda geniş bir şekilde açıklanan inaktif aşı hazırlama prosedürleri laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilerek klinik öncesi çalışmalara geçilir. Aşı adayının immün yanıtı uyarıp uyarmadığı ve koruyucu etkinliğinin ortaya konulması için virüse duyarlı deney hayvanlarında yapılan aşılama yapılır. Belirli periyotlarla aşılanmış olan deney hayvanlarından kan serumu, periferik kan mononükleer hücreler, salgısal örnekler ve dalak hücreleri gibi örnekler alınarak aşı adayının immunojenitesi belirlenir. Aşı adayının koruyuculuğunun ortaya konması için son aşılama genellikle 2-3 hafta sonra virüs ile challenge yapılarak hastalık belirtileri, ağırlık kaybı, vücut ısısında değişimler, sağ kalım oranı gibi parametreler incelenerek aşı adayının koruyuculuğu belirlenir. Ayrıca, aşı adayının tercihen primatlarda da etkinliği, belirli dozlarda verildiğinde toksik etkilerinin belirlenmesi çalışmaları İyi Laboratuvar Uygulamalar yönetmeliğine uygun şekilde yapılır (1, 5, 6, 12).

Klinik öncesi çalışmalar başarıyla sonuçlandırıldığı durumlarda, klinik faz çalışmalarına (Faz 1-3) geçilir. Klinik çalışmalar öncesinde, laboratuvar ölçeğinde üretilen aşı antijeninin büyük ölçüde üretimini yapılması ve standardizasyonun sağlanmasıyla aşı adayının yüksek miktarlarda üretilebilme kapasitesi ve fizibilitesi ortaya konulur. Klinik çalışmalar için üretilen aşı antijeni İyi Üretim Uygulamaları yönetmeliğine uygun şartlarda gerçek-

leştirilmelidir. Gerçek zamanlı stabilite çalışmaları yapılarak aşı adayının raf ömrü belirlenir. Ayrıca gerek üretim esnasında gerekse de üretim sonrasında (son ürün) otoritelerce belirlenen kalite kontrol testlerinin yapılması zorunludur.

Klinik faz çalışmaları sağlıklı gönüllülerde ve İyi Klinik Uygulamalar yönetmeliğine göre yapılır. Klinik faz 1 çalışmalarında en önemli parametre aşı adayının güvenli olması ve aşıya bağlı ciddi yan etkilerin olmamasıdır. Faz 2 ve faz 3 çalışmalarında yüzlerce ve binlerce sağlıklı gönüllüde aşı adayının güvenliği ve etkinliği belirlenir. Klinik faz çalışmaları başarıyla tamamlanan aşı adayları Faz 4 aşamasında aşının ruhsatlandırılması ve seri üretiminin yapılmasıyla yaygın kullanıma geçer (5, 6).

2020 yılında başlayan COVID-19 pandemisi bütün dünyada ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. COVID-19 pandemi sürecinde aşılardan ne kadar stratejik bir konu olduğu bir kez daha anlaşılmıştır. Ülkemizde COVID-19'a karşı geliştirilen inaktif viral aşı (TÜRKOVAC) faz 3 aşamasındadır (11).

Diğer aşı platformlarında olduğu gibi viral inaktif aşı geliştirilmesi de farklı disiplinlerin bir arada çalışmasını gerektiren süreçleri kapsamaktadır. Viral inaktif aşı adaylarının geliştirilme süreçlerinde doktoralarını viroloji biliminde yapmış ehliyetli uzman araştırmacılar büyük öneme sahiptir. Ayrıca, "aşı bilimi" alanında uzmanlaşmış immunologlar, moleküler biyologlar, farmakologlar, kimyagerler, hücre kültür sistemleri alanında uzmanlaşmış araştırmacılar ve biyomühendis gibi uzmanların bir araya gelmesi ve multidisipliner çalışmaların yapılması hayati öneme sahiptir. Aşı bilimi konusunda yetişmiş insan gücü yanında aşı Ar-Ge çalışmalarının yapılacağı alt yapının sağlanması gerekmektedir. Aşı bilimi Ar-Ge çalışmaları uzun soluklu ve yüksek teknoloji gerektiren laboratuvarlarda yapılan çalışmalardır ve bu bağlamda altyapı yatırımlarının yapılması önem arz etmektedir. Aşı bilimi konusunda çalışan üniversiteler, enstitüler, kamu kuruluşları ve özel sektör arasındaki iş birliklerinin artırılması ve aşı ekosisteminin oluşturulmasıyla gelecekte ortaya çıkabilecek yeni pandemiler ve salgınlara karşı stratejik bir silah olan aşılardan kısa sürede geliştirilmesi ve üretilmesi mümkün olacaktır.

Kaynaklar

- 1) Sanders, B., Koldijk, M., Schuitemaker, H. *Inactivated Viral Vaccines*. In: Nunnally, Turula, V., Sitrin, R. (eds) *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015; 45-80.
- 2) Hess, R.D., Weber, F., Watson, K., et al. *Regulatory, Biosafety and Safety Challenges for Novel Cells as Substrates for Human Vaccines*. *Vaccine*, 2012; 30(17):2715-2727.
- 3) Barrett, P.N., Mundt, W., Kistner, O., et al. *Vero Cell Platform in Vaccine Production: Moving Towards Cell Culture-Based Viral Vaccines*. *Expert Rev Vaccines*, 2015; 8(5):607-618.
- 4) Brown, F. *Review of Accidents Caused by Incomplete Inactivation of Viruses*. *Dev Biol Stand*, 1996; (81):103-107.
- 5) Pollard, A.J., Bijker, E.M. *A Guide to Vaccinology: From Basic Principles to New Developments*. *Nat. Rev. Immunol*, 2021; (21): 83-100.
- 6) Delrue, R., Verzele, D., Madder, A., et al. *Inactivated Virus Vaccines from Chemistry to Prophylaxis: Merits, Risks and Challenges*. *Expert Review of Vaccines*, 2012; (11): 695-719.
- 7) He, P., Zou, Y., Hu, Z. *Advances in Aluminum Hydroxide-Based Adjuvant Research and its Mechanism*. *Hum. Vaccin. Immunother*, 2015; (11): 477-488.
- 8) Vidor, E., Fritzell, B., Plotkin, S. *Clinical Development of a New Inactivated Hepatitis A Vaccine*. *Infection*, (6):447-458.
- 9) Verdijk, P., Rots, N.Y., Bakker, W.A. *Clinical Development of a Novel Inactivated Poliomyelitis Vaccine Based on Attenuated Sabin Poliovirus Strains*. *Expert Rev Vaccines*, 2011; (5):635-644.
- 10) Verma, R., Khanna, P., Chawla, S. *Influenza Vaccine: An Effective Preventive Vaccine for Developing Countries*. *Hum. Vaccin. Immunother*, 2012; (5):675-678.
- 11) Pavel, S.T.I., Yetiskin, H., Uygut, M.A. et al. *Development of a New Inactivated Vaccine against SARS CoV-2*. *Vaccines*, 2021; (9):1266.
- 12) Gerdtts, V., Wilson, H.L., Meurens, F., et al. *Large Animal Models for Vaccine Development and Testing*. *ILAR J.*, 2015; (56) 53-62.