

# Umut vadeden tedaviler için yeni tasarım: mRNA aşıları

## Dr. Ali Ahmed Azzawri



Lisans eğitimini 2011 yılında Yemen Thamar Üniversitesinde tamamladı. Doktora eğitimini Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında tamamladı. mRNA aşı projesi dahilinde postdoktora çalışmalarına aynı yerde devam etmektedir. Çalışma alanları; gen tedavisi, kanser genetiği ve kanser kök hücreleridir.

## Dr.Öğr.Üye. Ebru Marzioğlu Özdemir



1978 yılında Trabzon'da doğdu. 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldu. Atatürk Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında tamamladığı ihtisasının ardından Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesinde tıbbi genetik bölümünü kurdu. Ardından Konya Eğitim Araştırma Hastanesinde Tıbbi Genetik Uzmanı olarak görev yaptı. Haziran 2020'den beri Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında görev yapmaktadır.

## Doç.Dr. Nadir Koçak



İstanbul Tıp Fakültesinden 1997 yılında mezun oldu. Uzmanlık eğitimini Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında tamamladı. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına yardımcı doçent olarak atandı. Boston ve Umass üniversitelerinde 2011-2012 yılları arasında misafir bilim adamı olarak bulundu. Doçentlik unvanını 2019 yılında aldı. Gen tedavisi, klinik genetik ve kanser genetiği konusunda çalışmaları bulunmaktadır. COVID-19 pandemisi sürecinde TÜBİTAK destekli mRNA aşı geliştirme projesinin yürütücülüğünü yapmaktadır. mRNA aşı çalışmalarına 2020 Haziran ayında başlandı. Bu çalışma Türkiye'de ilk mRNA aşısı çalışması niteliği taşımakta. Şu anda yeni variantlara yoğunlaşmış durumda çalışmalar devam etmekte.

Aşılanma, hastalık önleme ve kontrol stratejilerinde öne çıkan bir yaklaşımdır. mRNA aşıları, kanser dahil tedavisi olmayan birçok hastalık için yeni bir çözüm olabilir. mRNA aşılarının salgınları, patojenleri ve immünoterapiyi kontrol etmek için umut verici bir platform haline geldiği görülmektedir. Yüksek potansiyelleri ve hızlı gelişmeleri nedeniyle mRNA aşıları, klasik aşılarla kıyasla umut verici bir alternatif olarak düşünülebilir. Genel olarak mRNA aşıları, yüksek güvenlik, büyük potens, hızlı geliştirme ve iyileştirme, hızlı üretim ve düşük üretim maliyeti nedeniyle diğer klasik aşı platformlarından ayrılır. Son birkaç yılda, yeni ve alternatif terapötik yaklaşımlar olarak nükleik asitlerin (özellikle mRNA) kullanımı önemli ölçüde artmıştır. Özellikle SARS-CoV-2 enfeksiyonunun

önlenmesi için ITV mRNA aşılarının son uluslararası onayları ve mRNA kanser aşılarının umut verici terapötik sonuçları ile yakın gelecekte mRNA bazlı aşıların klinik araştırmaları içeren çalışmalarının hızlı ilerlemesini öngörüyoruz. Bu derleme, mRNA aşılarına, avantajlarına, sentez yöntemlerine, uygulamalarına ve etki mekanizmalarına genel bir bakış sağlamayı amaçlamaktadır.

Keşfinden günümüze kadar aşılama, dünya çapında birçok hastalığın ve salgının yayılmasını azaltma yeteneğini kanıtlamıştır. Klasik aşılar, vücuda girer girmez patojenle yüzleşmeye hazır antikorlar üretmek ve/veya bağışıklık sistemini uyarmak için geleneksel olarak antijenlerin bölümleri de dahil olmak üzere patojenin küçük boyutlu zayıflatılmış fragmanlarını barındırmıştır (1). Modern aşı metodolojileri, aşı formü-

lasyonunda patojene özgü antijenden ziyade sentetik antijenler üretmeye odaklanır. Birçok insan mRNA aşılarının yeni keşfedildiğine ve COVID-19 pandemisiyle ortaya çıktığına inanıyor. Aslında bu teknoloji üç yıldan çok daha eskiyken, nanopartiküller içinde paketlenmiş mRNA dizilerinin hücrelere ilk başarılı transfeksiyonu 1989'da literatüre geçti (2). 1990'ların başındaki bir çalışmada, mRNA'nın farelerin kaslarına doğrudan enjeksiyonu, enjekte edilen mRNA tarafından kodlanan proteinlerin in vivo ekspresyonu ile sonuçlandı (3). Bu çalışmaların, in vitro olarak üretilen mRNA'nın, canlı hücrelerin dokuları içinde proteinler üretmek için genetik bilgi sağlama yeteneğinin ön kanıtını temsil ettiği ve mRNA aşıları kavramının ortaya çıktığı yerler olduğu kabul edilir (4). Daha sonraki çalışmalar, mRNA aşılarının viral ajanlar dahil



olmak üzere patojenlere karşı hümmoral ve hümmesel bağışıklık tepkilerini indüklediğini göstermiştir. Ayrıca tümör antijenini kodlayan mRNA'nın farelerde tümör hümmelerine karşı benzer bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkardığı gösterilmiştir (5, 6, 7).

mRNA kompleksinin doğrudan enjeksiyonu, kodlanmış proteinlerin in vivo ekspresyonunu uyarma kabiliyetini göstermiş olsa da kullanımı kolay bir yol olan in vitro transkripsiyonlu mRNA'nın basit enjeksiyondan sonra in vivo olarak protein immünojenleri üretmesine dayalı teknik, kullanımını engelleyen birçok engelin ortaya çıkması nedeniyle sınırlı kalmıştır. Bu engeller arasında, RNazların bol mevcudiyeti nedeniyle in vivo mRNA'nın kararsızlığı ve ayrıca in vivo iletiminin verimsizliği yer alır (8). Geçtiğimiz yıllarda, teknolojik ilerlemeler ve büyük araştırma yatırımları, mRNA'nın aşı geliştirme ve protein replasman tedavisi alanlarında umut verici bir terapötik yol olmasını sağlamıştır. Teknolojik gelişmeler, mRNA aşılarıyla ilgili engelleri de büyük ölçüde çözebildi.

Bulaşıcı hastalıklara ve bazı kanser türlerine karşı çoklu mRNA aşı platformları şimdiye kadar hem hayvan modellerinde hem insanlarda iyi sonuçlar göstermiştir (9). 2020'nin başlarında COVID-19 salgınının ortaya çıkıp yayılması ve buna neden olan SARS-Cov-2 virüsünün sekansının bilinmesi, mRNA aşısının klinik deneylere ilk giren aşı olması nedeniyle, mRNA aşılarının

hızla geliştirilmesini sağladı. İlk gönüllüler, SARS-CoV-2 virüsünün genetik dizisinin açıklanmasından sonraki 10 hafta içinde aşıyı oldular. BioNTech ve Moderna, mRNA tabanlı COVID-19 aşılarını üretmek için ilk onay alan kuruluşlar oldu.

### 1. mRNA-tabanlı Aşıların Avantajları

mRNA, protein kodlayan DNA bölgelerinin translasyonu sonrası ribozomlar tarafından protein üretimine kadar olan bir ara aşamadır. mRNA sitozole ulaştığında, hümmesel translasyon mekanizması, translasyon sonrası modifikasyonlardan geçen bir protein üretir ve verimli bir şekilde işlev gören bu süreç uygun şekilde katlanmış bir protein ile sonuçlanır. mRNA aşısı, hastalığa neden olan antijenler (viral proteinler veya tümör antijenleri, vb.) üretmek için spesifik olarak yeniden birleştirilen ve daha sonra savaşılacak patojene karşı adaptif bir bağışıklık tepkisi oluşturan genetik materyale dayalı farklı bir aşı türüdür (10). Bu tip aşı, hümmelere istenen proteini nasıl yapacaklarına dair talimatlar vermek için genetik olarak tasarlanmış bir mRNA formu kullanır. Modifiye edilmiş mRNA'nın in vitro sentezi, ilaç dağıtım araçlarında korunmalıdır. Örneğin lipit nanoparçacıklar mRNA'yı korumayı ve hedef hümmelere verilmesini kolaylaştırmayı amaçlamaktadır (11). mRNA'yı alan hümmeler protein parçaları oluşturmaya ve bunları kendi yüzeylerine sunmaya başlar. Bu da antikor oluşumunu uyarılmaktadır.

mRNA kompleksinin doğrudan enjeksiyonu, kodlanmış proteinlerin in vivo ekspresyonunu uyarma kabiliyetini göstermiş olsa da kullanımı kolay bir yol olan in vitro transkripsiyonlu mRNA'nın basit enjeksiyondan sonra in vivo olarak protein immünojenleri üretmesine dayalı teknik, kullanımını engelleyen birçok engelin ortaya çıkması nedeniyle sınırlı kalmıştır.

mRNA aşıları, birçok benzersiz avantaja sahip olduklarından, özellikle aşağıdakilerden dolayı terapötik bir hedef haline gelmiştir:

**- Etkinlik:** mRNA molekülünün çoklu modifikasyonları onu daha kararlı ve yüksek oranda çevrilebilir kılmaktadır. mRNA'nın in vivo etkili ve dengeli difüzyonunu kolaylaştıran dağıtım araçlarına dahil edildiği ve bunun hücrelere hızlı teslimatı ve sonuç olarak bağışıklık sistemini uyaran gerekli proteini (12) üretmek için sitoplazmada ekspresyonu ile sonuçlandığı durumlarda.

**- Güvenlik:** Plazmit DNA ve viral vektörlerin aksine, mRNA aşıları bulaşıcı olmayan ve genomla birleştirilemeyen yapılar olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni basitçe virüs gibi patojenik organizmayı, inaktive edilmiş veya canlı-zayıflatılmış, hatta parçalarını bile içermemesi, dolayısıyla bulaşıcı olmamasıdır. Ayrıca bu aşılar, DNA'nın bulunduğu hücre çekirdeğine girmez, sadece sitoplazmaya ulaşır. Bu nedenle, konağın genomuna entegre olma ve insersiyon veya splicing mutasyonlarına neden olma riski yoktur, dolayısıyla hücrenin genleri üzerindeki etkilerinden korkulmaz. Ayrıca, mRNA aşıları geçici olarak aktiftir ve kısa bir yarı ömre sahiptir. mRNA aşısının içerdiği nükleik asit yapıları, virüse benzer bir proteinin oluşmasından sonra kolaylıkla elimine edilir (13, 14).

**- Hızlı ve ucuz üretim:** mRNA aşılarının üretimi, esas olarak in vitro transkripsiyon reaksiyonlarının yüksek verimliliği nedeniyle nispeten basit, ucuz, ölçeklenebilir ve değiştirilebilirdir. Hızlı üretim aynı zamanda aday aşıların ila-

ve bir avantajdır çünkü mRNA yapısı, patojenin genetik sekansı ve hedeflenecek antijenlerin bilgisine dayalı olarak oluşturulabilmektedir (15).

## 2. mRNA Aşılarının Yapımı

Aşıdaki mRNA, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında doğal olarak oluşan olgun ve işlenmiş mRNA moleküllerine tam olarak benzeyecek şekilde tasarlanmıştır. Bir mRNA aşısı üretmek için önce gerekli mRNA dizisini içeren DNA şablonunun transkripsiyonu yapılmalı ve ardından aşığı son haliyle ortaya çıkarmak için mRNA molekülüne birçok temel element eklenmelidir.

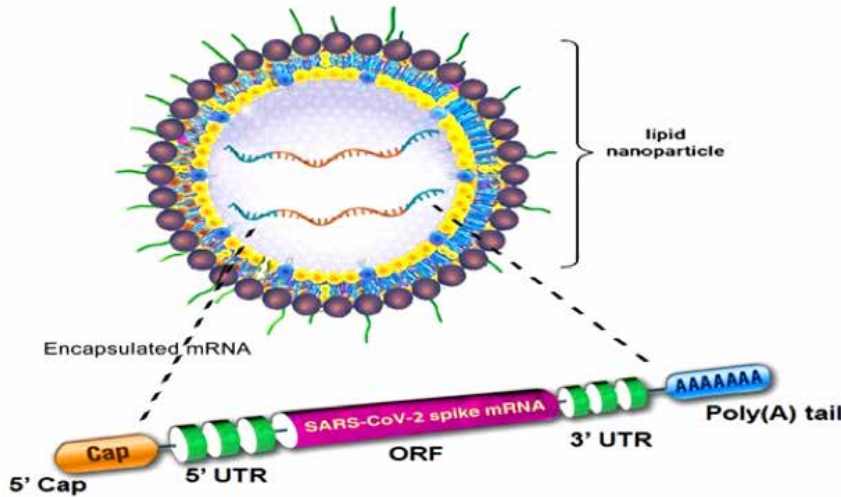
Aşıdaki mRNA molekülü 5' çevrilmemiş bölge (UTR), 3' UTR, başlatma kodonu, açık okuma çerçevesi (ORF), durdurma kodonu ve bir poli (A) dizisi içerir (16, 17). Daha sonra hücrelere verilmesini kolaylaştırmak için mRNA molekülü, iletim araçları olarak kullanılan lipid veya polimer bazlı nanopartiküller içine yerleştirilerek kompleks haline getirilir. Hangi iletim sisteminin terapötik olarak en verimli olduğunu anlamak için çalışmalar devam etmektedir (bkz. şekil 1).

5'Cap, poli(A) kuyruğu, çevrilmemiş bölgeler (UTR'ler) ve açık okuma çerçevesi (ORF) gibi IVT mRNA'nın yapısal özellikleri çok önemlidir ve sitozoldeki IVT mRNA stabilitesini, translasyon verimliliğini ve mRNA aşılarının ekspresyon seviyelerini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, IVT mRNA aşılarının translasyon etkinliğini geliştirmek ve aşının başarısını etkileyen doğuştan gelen bağışıklığın üstesinden gelmek

için izlenen birçok strateji vardır. Bu iyileştirme stratejileri, IVT mRNA aşılarının bileşenlerinin yapılarını sentezleme mekanizmalarına odaklanır ve bunlar aşağıdaki gibidir:

### 2.1 mRNA aşısı 5'Cap modifikasyonu:

5'-cap, temel mRNA süreçlerinde yer alan proteinler için bir etkileşim platformu sağlar. Ökaryotlardaki doğal mRNA, transkripsiyon işlemi sırasında mRNA'ya 5' - 5' - trifosfat köprüsü (ppp) ile (18) bağlanan 7 metilguanozin (m7G) başlığı içerir. IVT mRNA'ları doğal mRNA ile aynı olmak zorunda olduğundan, verimli translasyonu teşvik etmek için ilk nükleotide 5'-5' trifosfat köprüsü aracılığıyla eklenen bir m7G başlığı eklenir. Bu 5' m7G cap veya m7Gppp yapısı Cap 0 olarak bilinir. Üretilen IVT mRNA aşılarının çoğu 5' ucunda m7GpppNm cap içerir, bu 5' Cap ribozomları tanımak ve translasyonu aktive etmek için gereklidir (eIF4E). IVT mRNA Cap'leme için kullanılan iki yaygın yöntem vardır: İlk yöntem post-transkripsiyonel modifikasyondur, 5'Cap genellikle aşı virüsü Cap'leme enzimine (VCE) dayalı olarak ilk IVT mRNA oluşumundan sonra enzimatik olarak sentezlenir ve uygun yönlendirme ile ortak endojen başlık (m7G) için yaklaşık %100 verimlilik sağlanabilir. İkinci yöntemde ise Cap'leme ve transkripsiyonun aynı anda birlikte gerçekleştirildiği in vitro transkripsiyon işlemi sırasında sentetik bir Cap analogu eklenir. Ters birleşmeyi engellemek için anti-ters cap analogları (ARCA'lar) kullanılabilir, ARCA, m7G yakınında, özellikle C3 konumunda metillenir, ARCA, IVT mRNA'nın yarı ömrünü artırır ve protein ekspresyon süresini uzatır. Cap-0 mRNA'lar, PRR'ler (örn. IFIT ve RIG-1) tarafından tanınarak translasyon baskısına neden olabilir. Bu nedenle, ortak transkripsiyonel CleanCap™ teknolojisi aracılığıyla enzimatik olarak da eklenebilen doğal Cap-1 yapısının kullanılması tercih edilebilir. 5'-Cap sentezi için modern stratejiler, IVT mRNA'yı hızlı bozulmadan korumak, koruyucu bir yapı görevi görmek gibi birçok özel görevi yerine getirmek için onu geliştirmeyi amaçlar. eksonükleazlardan ve ökaryotik başlatma faktörü (eIF) 4E'ye bağlanarak mRNA translasyonunu başlatır. Ayrıca enzimatik hidrolizi önlemek için çalışır ve doğuştan gelen bağışıklık sensörlerinin mRNA'yı tanımalarını engeller.



Şekil 1: SARS-CoV-2 spike proteinini kodlayan in vitro mRNA aşısının yapısı ve yaygın olarak kullanılan modifikasyon stratejileri



## 2.2 IVT mRNA çevrilmemiş bölgelerin (UTR'ler) optimizasyonu:

3'-UTR ve 5'-UTR dizileri, mRNA stabilitesi, hücre altı lokalizasyonun düzenlenmesi ve artan çeviri verimliliği için optimize edilmelidir. UTR'ler, RNA bağlayıcı proteinlerle etkileşime girerek mRNA bozunma hızını ve çeviri verimliliğini etkiler. UTR bölgeleri işlevlerini yerine getirebilmesi için izlenmesi gereken bir dizi adım vardır:

-5' UTR'deki başlangıç kodonları (AUG) ve (CUG), ORF bölgesinin translasyonunu engeller, bu nedenle tasarım dışı bırakılmalıdır.

-IVT mRNA translasyonu için daha uygun olduklarından kısa 5' UTR dizilerinin kullanılması tavsiye edilir.

-oldukça kararlı ikincil yapılar, ribozom alımını ve kodonların tanınmasını önleyebilir, bu nedenle bunlar da tasarım dışı bırakılmalıdır (20).

Bahsedilenleri kolaylaştırmak için 5'UTR dizilerine göre mRNA translasyonunun etkinliğini tahmin etmek için biyoinformatik araçlar kullanılmalıdır. AU ve GU ile zenginleştirilmiş sekanslar,  $\alpha$ -globin ve  $\beta$ -globin elementleri, IVT mRNA molekülünün 3' UTR'sine eklenir, böylece translasyon verimliliği ve stabilitesi artar. Ayrıca, 3' UTR dizilerinin iki kez (21) ardışık olarak eklenmesi, transkripsiyon verimliliğini artırabilir.

## 2.3 ORF'nin kodon optimizasyonu:

Olgun mRNA'nın ORF'si, başlatma ve durdurma kodonları tarafından işaretlenen ilgili spesifik aktif proteinleri kodlar. ORF kodon optimizasyonu, artan çeviri verimliliğine, mRNA yoğunluğuna ve protein katlanmasına katkıda bulunur. ORF optimizasyonu için en önemli yöntemlerden biri, guanin ve sitozin G+C oranını kontrol etmektir ve böylece protein ekspresyonunu kontrol eden üridin miktarı ayarlanabilir. Kodondaki yüksek guanin ve sitozin içeriği, düşük C+G kodonuna kıyasla translasyonu yüz kat artırır (22). Ancak bazen mRNA'nın ikincil yapısında sorunlara neden olur. Bazı durumlarda, proteinler daha yeterli katlanma elde etmek için gecikmiş translasyon talep eder, bu da yaygın olmayan dizilerin kullanılmasını gerektirir (23). Saç tokası halkaları ve oldukça kararlı ikincil yapılar da ORF kodon dizilerine eklenmemelidir. Protein üretim hızı ve ribozom bağlanma süresi, öncelikle IVT mRNA dizisi kodon optimizasyonuna bağlı olabilir.

## 2.4 Poli (A) kuyruk modifikasyonu:

Poli (A) dizisi, mRNA'nın enzimatik stabilitesini kontrol ettiği ve RNA eksonükleazlarının etkisini yavaşlatarak bozulmasını geciktirdiği için mRNA'nın uzun ömürlülüğünde kritik bir rol oynar. Ayrıca çeviri verimliliğini artırmada önemli bir role sahiptir. Poli(A) kuyruğunun uygun uzunluğunun belirlenmesi, mRNA uygulamaları için ideal uzunluğun 100 nt olduğu bulunan IVT mRNA için çok önemlidir.

5'Cap, poli(A) kuyruğu, çevrilmemiş bölgeler (UTR'ler) ve açık okuma çerçevesi (ORF) gibi IVT mRNA'nın yapısal özellikleri çok önemlidir ve sitozoldeki IVT mRNA stabilitesini, translasyon verimliliğini ve mRNA aşılarının ekspresyon seviyelerini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, IVT mRNA aşılarının translasyon etkinliğini geliştirmek ve aşının başarısını etkileyen doğuştan gelen bağışıklığın üstesinden gelmek için izlenen birçok strateji vardır.

Çalışmalar, IVT mRNA'nın poli (A) kuyruk uzunluğunda 120 nükleotide kademe bir artışın protein seviyesini iyileştirdiğini ifade etmektedir (24). Oysa poli (A) kuyruğunun 12'den daha az olması veya daha da kısaltılması mRNA bozulmasına neden olur.

Poli (A) kuyruğu bu nedenle eIF4G ve eIF4E çeviri başlatma faktörleri, yeterli uzunluktaki poli (A) kuyruğu ve 5'cap mRNA sirküle etmek için gereklidir (25). 5'm7Gcap diğer faktörlerle sinerjistik olarak hareket ederek çeviri verimliliğini düzenler (26).

Poli(A)kuyrukları, DNA şablonundaki poli(A) kuyruğunu kodlayarak veya rekombinant poli(A) polimeraz ile transkripsiyondan sonra IVT mRNA uzantısıyla IVT mRNA molekülüne eklenebilir. Nükleozid modifiyeli mRNA, IVT mRNA aşılarının geliştirilmesi için de önemlidir. Doğal üridin ve sitidinin alternatif nükleotidler (örn., 5mC veya  $\Psi$ ) ile ikame edilmesiyle mRNA dizisinin stabilitesi için faydalı olduğu durumlarda, translasyon etkinliği, IVT mRNA aşılarının iletilirliğini artırır ve ayrıca doğuştan gelen immün aktivasyondan gelebilecek zararlar azaltılabilir (27, 28).



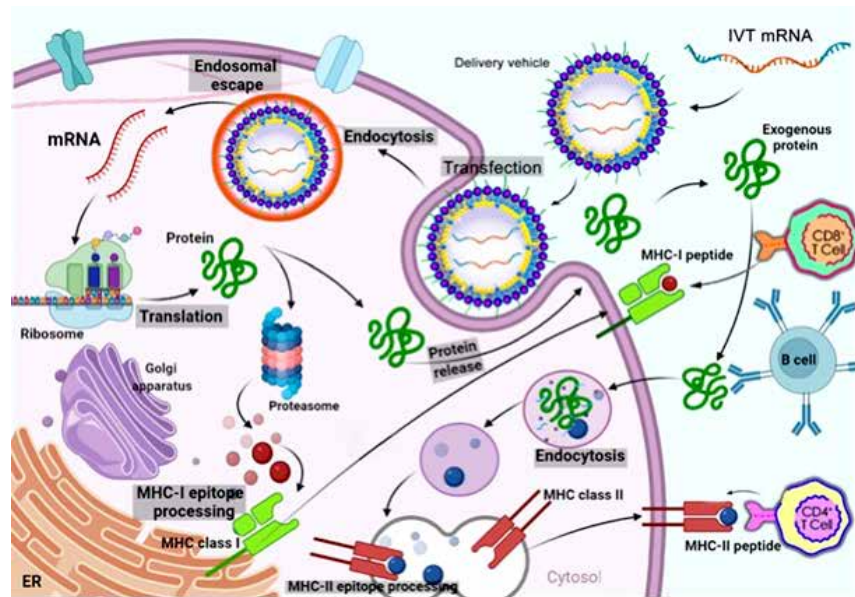
Ayrıca mRNA üretirken dikkate alınması gereken önemli noktalar da vardır, örneğin, yanlış başlatma sinyalinden kaynaklanan kısa RNA'lar ve kendi kendini tamamlayan 3' uzantı tarafından üretilen dsRNA gibi çoklu kirlenicilerden IVT mRNA'nın saflaştırılması gerekir. Bu saflaştırma, protein üretimini 10-1000 kat artırır. Her biri IVT mRNA'nın hedef hücrelere penetrasyonunu etkilediğinden, IVT mRNA aşısının yüksek moleküler ağırlıklarından ve yüksek negatif yüklerinden de kaçınılmalıdır. Dağıtım sistemleri, mRNA moleküllerinin bozulmadan korunmasını sağlamalı ve IVT mRNA aşısının hedef hücreler tarafından absorpsiyonunu kolaylaştırmalıdır. Bu nedenle, IVT-mRNA aşısının hedef hücrelere dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi, özellikle mRNA absorpsiyonunun bir dağıtım sistemi olmadan çok zayıf olduğu ve bunun üzerinde mRNA'nın yarı ömrünün 7 saati geçemeyeceği bilindiği için çok önemlidir. mRNA doğası gereği kararsız bir moleküldür ve ayrıca ekzonükleazlar ve endonükleazlar tarafından bozulmaya karşı oldukça hassastır (29).

### 3. mRNA Aşılarının Etki Mekanizması

mRNA aşısının nasıl çalıştığına fizyolojisinin anlaşılmasını basitleştirmek için etki mekanizmasını aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz: Bir mRNA aşısı tasarlandıktan ve bir bağışıklık tepkisini ortaya çıkaran antijenik belirleyicileri ifade eden genomik bölge üretildikten sonra, aşı lipozomal nanopartikül içinde paketlenir ve uygulanır. Örneğin SARS-CoV-2 virüsünün kullanılan antijenik determinanti Spike protein üzerinde bulunur. Bu nedenle spike proteinden sorumlu dizileri içeren genetik böl-

ge sentezlenmeli ve diğer elementler de proteine eklenmelidir. Elde edilen mRNA molekülü ve daha sonra lipid nanopartikülleri ile kaplanmaktadır. Aşı doğrudan vücuda enjekte edildiğinde, hücresel fagositoz yoluyla bağışıklık hücreleri tarafından alınmaktadır. Aşı hücreye girdikten sonra mRNA'yı çevreleyen lipid zar bozulur ve translasyon işlemini tamamlamak için mRNA'nın ribozomda sitoplazmik translokasyonu meydana gelmektedir. Yani ribozomda uygulanan mRNA, yüzey yapısal proteinine (spike protein) çevrilmekte, daha sonra yüzey proteini hücrenin sitoplazmasına salınmaktadır. Ardından proteinleri parçalamak için çalışan proteazom, proteini epitop adı verilen parçalara ayırmaktadır. Epitoplar, TAP ile endoplazmik retikulumda MHC moleküllerine yüklenmektedir. Ardından, N-glikanlarda değişiklikler yapan golgi aygıtının rolü başlamaktadır. Epitoplarla MHC-I bağlanması sonrasında

Gelecekteki araştırmaların amacı, farklı mRNA aşı platformları tarafından uyarılan bağışıklık yollarını karşılaştırmak ve aydınlatmak, mekanizmalarını daha da netleştirmek, bu mekanizmalara dayalı mevcut terapötik yaklaşımların etkinliğini artırmak ve diğer hastalıkları ve yeni patojenite faktörlerini hedef alan yeni deneyler başlatmak olabilir.



Şekil 2: LNP yüklü IVT mRNA aşısının etki mekanizmasının şematik gösterimi

T-hücresi reseptörleri tarafından tanınmak üzere hücrelerin yüzeyinde sunulmakta ve bu da antijene özgü CD8+ T hücreleri tepkilerinin indüklenmesine yol açmaktadır. Böylece bağışıklık tepkisi, salgılanan sitokinlere dayalı olarak ilerlemektedir. Ayrıca epitoplar, MHC-II ye yüklenmekte ve antijene özgü CD4 + T hücre yanıtları indüklenmesi sağlanmaktadır (bkz. Şekil 2).

mRNA aşılarda doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini indüklemekte ve Toll- benzeri reseptörler: TLR3, TLR7 ve TLR8 gibi çeşitli hücresel yollar ve ayrıca PKR, RIG-I, OAS ve MDA5 dahil olmak üzere çeşitli sitoplazmik proteinler yoluyla aktive edilmektedir (30,32, 32).

Sonuçta bağışıklık oluşmakta ve virüs vücuda girdiğinde, bağışıklık hafıza hücreleri Spike proteinini tanımakta ve virüsün Spike proteinine yapışan ve aşının oluşturduğu antikorların salgılanmasıyla biten bir seri olay tetiklenmektedir. Spike protein, virüsün hedef hücrelere girmesinin anahtarıdır ve devre dışı bırakılırsa virüs insan vücudunun hücrelerine giremez. Böylece diğer hücreler uyarılmış, virüsün vücudun hücrelerine yapışması ve içine girmesi engellenmiştir.

#### 4. Sonuç

ITV mRNA aşılarının altında yatan temel kavram, gerekli antijeni mRNA dizisinde kodlamak ve elde edilen transkripti, antijen ekspresyonuna ve antijene özgü immün yanıtın uyarılmasına izin veren güvenli ve uygun dağıtım mekanizmaları aracılığıyla hedef hücrelerin sitoplazmasına aktarmaktır. Bilinen bir protein hedefi olan herhangi bir patojen için mRNA aşılarının üretilebildiği aşı platformları esastır. Hem klinik çalışmalar hem klinik öncesi deneyler, mRNA aşılarının güvenli, güçlü ve uzun süreli bağışıklık tepkileri ürettiğini göstermiştir. mRNA aşıları, hayvan modellerinde bulaşıcı hastalık hedeflerine karşı güçlü bir bağışıklık kazanmıştır. HIV, influenza, zika, kuduz virüsü ve diğerlerine karşı daha fazla çalışmada etkinliği gösterilmiştir. Ayrıca pulmonoloji ve diğer hastalıklar gibi diğer alanlarda umut verici sonuçlar vardır (9).

İn vitro sentetik mRNA'ya dayalı aşılarda ve tedaviler sürekli olarak geliştirilmektedir ve hedeflenen mRNA iletimi,

karmaşık farmakolojisi ve mRNA'nın hücrelere girişini kolaylaştırmak için yeni alternatifler bulma gibi çözülmemiş engelleri ele almak için devam eden çabalar vardır. Gelecekteki araştırmaların amacı, farklı mRNA aşı platformları tarafından uyarılan bağışıklık yollarını karşılaştırmak ve aydınlatmak, mekanizmalarını daha da netleştirmek, bu mekanizmalara dayalı mevcut terapötik yaklaşımların etkinliğini artırmak ve diğer hastalıkları ve yeni patojenite faktörlerini hedef alan yeni deneyler başlatmak olabilir.

#### Kaynaklar

- 1) Rabinovich NR, McInnes P, Klein DL, Hall BF. Vaccine Technologies: View to the Future. *Science*. 1994;265:1401–4.
- 2) Malone R, Felgner P, Verma IM (August 1989). "Cationic Liposome-mediated RNA Transfection". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (16): 6077–81.
- 3) Wolff J., Malone R., Williams P., Chong W., Acsadi G, et al. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in vivo. *Science*. 1990;247:1465–1468. doi: 10.1126/science.1690918.
- 4) Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magné R, Gornard E, et al. (July 1993). "Induction of Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes in vivo by Liposome-entrapped mRNA". *European Journal of Immunology*. 23 (7): 1719–22.
- 5) Conry R, LoBuglio A, Wright M, Sumerel L, Pike M, et al. (April 1995). "Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector". *Cancer Research*. 55(7): 1397–400.
- 6) Kallen K, Theß A (January 2014). "A Development that may Evolve into a Revolution in Medicine: mRNA as the Basis for Novel, Nucleotide-based Vaccines and Drugs". *Therapeutic Advances in Vaccines*. 2 (1): 10–31. doi:10.1177/2051013613508729.
- 7) Pascolo S (August 2004). "Messenger RNA-based Vaccines". *Expert Opinion on Biological Therapy*. 4 (8): 1285–94.
- 8) Karikó K., Buckstein M., Ni H., Weissman D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity*. 2005;23:165–175. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
- 9) Norbert p; Michael J.; Frederick W.; Weissman D, (April 2018). "mRNA Vaccines — a New Era in Vaccinology". *Nature Reviews Drug Discovery*. volume 17, pages261–279 (2018).
- 10) Garde D; Saltzman J (November 10, 2020). "The Story of mRNA: How a Once-dismissed Idea Became a Leading Technology in the Covid Vaccine Race". *STAT*. Archived from the Original on November 10, 2020.
- 11) Verbeke R; Lentacker I; De Smedt; Dewitte H. (October 2019). "Three Decades of Messenger RNA Vaccine Development". *Nano Today*. 28: 100766. doi:10.1016/j.nantod.2019.100766.
- 12) Thess A., Grund S., Mui B., Hope M., Baumhof P. et al. Sequence-engineered mRNA without Chemical Nucleoside Modifications Enables an Effective Protein Therapy in Large Animals. *Mol. Ther.* 23, 1456–1464 (2015).
- 13) Naik R., Peden K. Regulatory Considerations on the Development of mRNA Vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2020:1–19. doi: 10.1007/82\_2020\_220.

14) Kauffman K., Webber M., Anderson D. Materials for non-viral Intracellular Delivery of Messenger RNA Therapeutics. *J. Control. Release* 240, 227–234 (2016).

15) Hinz T., Kallen K., Britten C.M., Flamion B., Granzer U. et al. The European Regulatory Environment of RNA-based Vaccines. In: Kramps T., Elbers K., editors. *RNA Vaccines: Methods and Protocols*. Springer; New York, NY, USA: 2017. pp. 203–222. *Methods in Molecular Biology*.

16) Conry R, LoBuglio F, Wright M, Sumerel L, Pike M, Johanning F, Benjamin R, Lu D, Curiel DT, Chara. et al. Characterization of a Messenger RNA Polynucleotide Vaccine Vector. *Cancer Res*. 1995;55:1397–400.

17) Yang W, Ziqi Z, Jingwen L, Xuejiao H, Yuquan W. et al. mRNA Vaccine: A Potential Therapeutic Strategy. *Mol Cancer* 20, 33 (2021). doi.org/10.1186/s12943-021-01311-z.

18) Li Y., Kiledjian M. Regulation of mRNA Decapping. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2010;1:253–265. doi: 10.1002/wrna.15.

19) Zimmermann O., Homann J., Bangert A., Müller A., Hristov G., et al. Successful use of mRNA-Nucleofection for Overexpression of Interleukin-10 in Murine Monocytes/macrophages for Anti-inflammatory Therapy in a Murine Model of Autoimmune Myocarditis. *J. Am. Heart Association*. 2012 doi: 10.1161/JAHA.112.003293.

20) Leppek K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA Structures in Eukaryotic Translation Regulation and how to Find Them. (2018). *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:158–174.

21) Lei M, Yu Z, Leaf H. mRNA Vaccine for Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer* 2021, 20 (1) doi. org/10.1186/s12943-021-01335-5.

22) Kudla G, Lipinski L, Caffin F, Helwak A, Zyllicz M. High Guanine and Cytosine Content Increases mRNA Levels in Mammalian Cells. (2006). *PLoS Biol* 4:e180.

23) Kimchi-Sarfaty C, Oh J, Kim I., et al.: A 'Silent' Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. (2007). *Science* 315, 525–528.

24) Kormann M., Hasenpusch G., Aneja M., Nica G., Flemmer A., et al. Expression of Therapeutic Proteins after Delivery of Chemically Modified mRNA in Mice. *Nat. Biotechnol.* 2011;29:154–157. doi: 10.1038/nbt.1733.

25) Anderson B., Muramatsu H., Nallagatla S., Bevilacqua P., Sansing L., et al. Incorporation of Pseudouridine into mRNA Enhances Translation by Diminishing PKR Activation. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:5884–5892. doi: 10.1093/nar/gkq347.

26) Goss D., Kleiman F. Poly(A) Binding Proteins: Are They All Created Equal? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2013;4:167–179. doi: 10.1002/wrna.1151.

27) Pardi N, Weissman D. Nucleoside Modified mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Methods Mol Biol*. 2017;1499:109–21.

28) Arango D, Sturgill D, Alhusaini N, Dillman A, Sweet TJ, et al. Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency. *Cell*. 2018;175(7):1872–+.

29) Houseley J., Tollervey D. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*. 2009;136:763–776. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.019.

30) Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-based Vaccines. *Pharmaceutics*. 2020;12(2):102. doi:10.3390/pharmaceutics12020102

31) Jan D, Daniel R, Nadja S, Ugur S, Özlem Tet al. 2021. mRNA Therapeutics in Cancer Immunotherapy. *Molecular Cancer* 20:1.

32) Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. (2014), "mRNA-based Therapeutics – Developing a New Class of Drugs", *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13 (10): 759–780, doi:10.1038/nrd4278.