

8 REKOMBİNANT AŞILARIN TASARIMI

Aşılar, diğer bütün tıbbi keşiflerle başarılanlardan daha fazla insanın hayatı kurtarmıştır. Kimi kaynaklar aşılama uygulamalarını MÖ 200'lü yıllara kadar eskiye dayandırsa bile 15. yüzyıldan sonra çiçek hastalığından (variola, smallpox) korumak için sağlıklı kişilerin çiçek virüsü ile bulaştırılması uygulamalarının (variolasyon) başladığı kabul edilir. Türkiye'de öğrendiği şekliyle çiçek virüsü inokulasyonunu Avrupa'da ilk uygulayan Lady Mary Wortley Montagu'dur (1721). Daha sonra 1796'da İngiliz doktor Edward Jenner bir sütçünün elindeki sığır çiçeği (cowpox) lezyonu ile bir çocuğu aşılayarak çiçek virüsüne (smallpox, variola) karşı bağışıklık sağlamıştır. Bu uygulama ilk aşılama uygulaması olarak kabul edilir (<https://www.who.int/news-room/spotlight/history-of-vaccination/>).

Bağışıklık sistem elemanları tarafından yabancı olarak algılanan yapılar **antijen** olarak adlandırılır. Antijenler bağışıklık sistemi tarafından tanınırlar ve **antikor** denilen karşı proteinler oluşturularak nötralize edilirler. Bir antijenin bağışık tepkiyi tetikleme yeteneği **immünojenisite** olarak adlandırılır. Aşılar yüksek hayvanların bağışıklık sistem elemanları tarafından yabancı olarak algılanan antijenik yapılardır. Bir virüs veya bakteri gibi bir patojen antijen olarak algılanabilir. Buna rağmen bağışıklık sistemi bir virüs veya bakteri veya diğer bir patojenin belli bir molekülünün (çoğunlukla protein molekülünün) belli bir bölgesini tanır ve tepki gösterir. Genellikle 10-20 amino asit uzunluğundaki bu yapılar **epitop** (antijenik determinant) olarak adlandırılır. Bir antijenik yapıda çok sayıda epitop mevcut olabilir. Bağışıklık sistemi bu epitopların her biri için farklı antikorlar üretirler. Aşı olarak kullanılacak antijenin veya epitopun immünojenisitesinin yüksek olması daha güçlü bir bağışık tepki oluşmasını sağlar.

Geleneksel aşılar iki tiptir: ölü veya canlı aşılar. Ölü aşılar inaktive edilmiş virüs parçacıkları veya öldürülmüş bakteri hücreleridir. Canlı veya atenüe aşılar ise bazı özel işlemler uygulanarak patojenite yetenekleri yok edilmiş virüsler veya bakterilerdir. Her iki tip aşının geliştirilmesi için uzun, karmaşık ve pahalı üretim, geliştirme ve saflaştırma işlemlerine ihtiyaç duyulur. Rekombinant DNA tekniklerinin uygulanabilir hale gelmesinden sonra aşı üretiminde önemli gelişmeler sağlanmıştır. Bunlardan bazıları şöyle sıralanabilir:

1. Atenüe aşıların elde edilmesinde hedef patojenite genlerinin yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle kontrollü olarak inaktivasyonu.
2. Atenüe edilmiş veya patojenitesi olmayan bakteri ve virüs suşlarına ilave epitopların eklenerek çoklu (polivalent) aşıların elde edilmesi.

3. Bir patojenik polipeptiti kodlayan genin klonlanması ve uygun konak hücrelerde antijenik polipeptitin büyük miktarda üretilmesi (altünite aşılarının üretilmesi).
4. Bir veya daha fazla antijenik polipeptitin kodlanmasından sorumlu genleri taşıyan ve memeli hücrelerinde ekspresyon yapabilen DNA moleküllerinin oluşturulması (DNA aşılarının üretilmesi).
5. Antijenik bir polipeptite ait kodonları içeren ve memeli hücrelerinde translasyonu yapılabilen mRNA moleküllerinin üretilmesi (mRNA aşılarının üretilmesi).

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak aşı üretim yöntemlerinden üçü daha ayrıntılı olarak incelenecektir: Altünite aşılarının üretimi, mRNA aşılarının üretimi ve viral vektör aşılarının üretimi.

8.1 Altünite Aşılarının Üretimi

Alt ünite aşılar bir patojene ait proteinlerin tamamını değil bunlardan belli biri ve bir-ikisini taşır. Bir viral patojen için bu, yüksek oranda immünojenik olmalarından dolayı sıklıkla viral örtü proteinleridir. Immünojenisitesi yüksek bu örtü proteinleri saflaştırılır, hızlı ve etkili bir bağışıklık oluşturmak üzere yüksek dozda kullanılır. Altünite aşılar, hiçbir kontamine patojenik organizma bulundurma riski olmaksızın büyük miktarlarda immünojenik proteinlerin üretiliyor olması nedeniyle oldukça popülerdir. Bir viral altünite aşısı üretme basamakları şu şekilde özetlenebilir:

1. Viral DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla parçalanması,
2. Viral örtü proteininin kodlayan geni uygun bir vektöre klonlanması,
3. Doğru bir promotörün sağlanması, doğru okuma çerçevesinin oluşturulması ve ribozom bağlanma bölgelerinin eklenmesi (eğer konak bir prokaryotik hücre ise) ve
4. Viral genin konak hücre içine iletilmesi ve ekspresyonu.

Bazen bir proteini kodlayan genin tamamı değil o protein içindeki epitop bölgesini kodlayan gen parçası klonlanır. Eğer hedef virüs genomu RNA yapısında ise öncelikle genomun bir cDNA kopyasının oluşturulması gerekir.

Çoğu klonlama ve ekspresyon çalışmalarında tercih edilen konak *E. coli* hücreleridir. Fakat *E. coli* hücrelerinde üretilen bazı viral alt ünite aşılarının zayıf bir immünojenisite gösterdiği ve aşılama sonrası yeterli düzeyde koruma sağlamadığı bilinmektedir. Bunun temel nedeni virüsün antijenik proteininin insan hücrelerinde glikolize ediliyor olmasına rağmen bakteri hücrelerinde bir glikolizasyon mekanizması olmaması ve dolayısıyla viral antijenin glikolize edilememesidir. Böyle bir problem alt ünite aşığı kodlayan genin ökaryotik bir konak hücre sisteminde ekspresyonun yapılmasıyla çözülebilir. Hayvan ve bitki doku

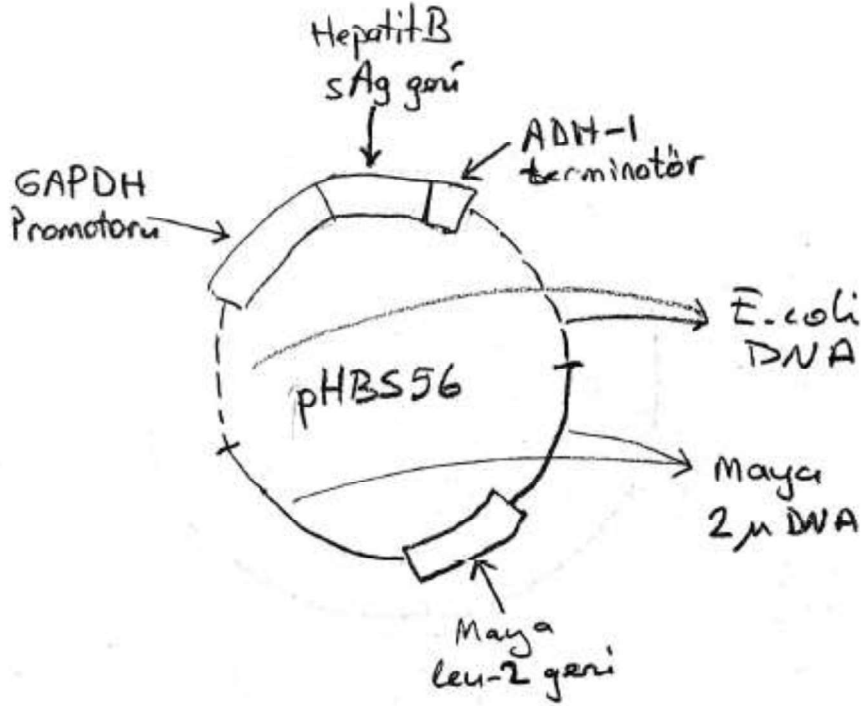
kültürleri ve funguslar konak sistemi olarak kullanıldığında antijen polipeptit glikolize edilmekte ve immünojenitesi artmaktadır. Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) aşısı alt ünite aşısına tipik bir örnektir.

8.1.1 Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) alt ünite aşısının üretim stratejisi

Hepatit B virüsü, yaklaşık 3200 baz büyüklüğünde kısmen tek zincirli halkasal bir DNA genomuna sahip Hepadnaviride familyasına dahil edilen bir virüstür. İnsanlarda hepatit b (serum hepatiti) denilen karaciğer harabatına neden olan bir enfeksiyona neden olur. Bu gün için dünyada 296 milyon insanı enfekte ettiği, bu enfeksiyonlardan az bir kısmının kronikleşerek siroz ve karaciğer kanseri ile sonuçlandığı ve yılda 820 bin insanın enfeksiyonun sonucu olarak öldüğü bilinmektedir (CDC verileri, Temmuz 2022).

Bir alt ünite aşısı üretilmeden önce Hepatit B virüs enfeksiyonuna karşı risk grubunda yer alan insanları korumak üzere enfekte olmuş insanların kan plazmasından saflaştırılan yüzey antijen (S antijen) partikülleri aşı olarak kullanılmıştır. Plazmadan elde edilen bu aşı immünojenitesi yüksek olan iyi bir aşı idi. Fakat bazı dezavantajları da vardı. Bunlardan biri aşı saflaştırmak üzere Hepatit B taşıyıcı bireylerden yeterli miktarda plazma sağlanamaması, dolayısıyla yeterli miktarda aşı elde edilememesidir. Diğer bir dezavantaj ise plazmadan antijenin saflaştırılmasında karmaşık işlemlerin uygulanması zorunluluğu ve saflaştırılan aşının plazma sağlayan bireyden gelen tam olarak inaktive olmamış diğer enfeksiyon ajanları taşıma riskidir. Son olarak da yoğun kontroller sonucunda bir risk taşımadığı gösterilmiş olsa bile HIV bulaşma korkusu nedeniyle aşuya ilgi gösterilmemesidir.

Bu olumsuzluklardan etkilenmeyecek bir aşı üretmek için maya (*Saccharomyces cerevisiae*) hücrelerinde Hepatit B yüzey antijeninin bir alt ünite aşısı olarak üretilmesi stratejisi geliştirilmiştir (Valenzuela ve ark., 1982). Hepatit B genomu tarafından kodlanan proteinlerden biri yüzey antijenidir (S antijeni, HBsAg). Öncelikle viral genomun bu antijeni kodlayan bölgesi (*sAg* geni) kesilerek klonlanmıştır. Daha sonra *sAg* geni daha iyileştirilmek üzere yeniden klonlanmıştır (Hilleman 1987). Elde edilen rekombinat vektör (pHBS56-GAP347/33), promotor ve terminatör dizileriyle beraber *sAg* genini, *E. coli* ve maya DNA bölgelerini içerir (Şekil 8.1). *sAg* gen bölgesi Hepatit B virüsünün S antijen proteininin 226 amino asitlik kısmını kapsamaktadır. Bu genin yukarısına maya transkripsiyon elemanlarının tanıyabildiği GAPDH promotörü ve aşağısına da ADH-1 transkripsiyon terminatör dizileri eklenmiştir. Böylece bu gen maya hücresine transfer edildiğinde ekspresyonu gerçekleştirilebilir hale getirilmiştir.

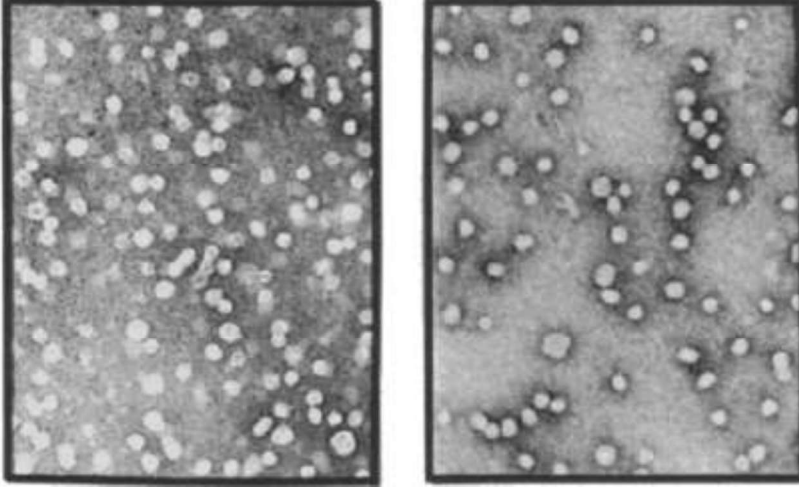


Şekil 8.1: Hepatit B S antijeni polipeptidinin alt ünite aşısı olarak maya hücrelerinde üretilmesi amacıyla oluşturulmuş rekombinant vektörün şematik görünümü. GAPDH promotoru güçlü transkripsiyon sinyali veren bir promotor dizisi, ADH-1 terminatörü de transkripsiyon sonlandırma sinyali veren bir dizidir.

Rekombinant plazmitin *E. coli* kökenli DNA bölgesinde *E. coli* hücreleri içinde replikasyonunun gerçekleşmesini sağlayacak *E. coli* replikasyon orijini ve ampisilin direnç geni yer alır. Bu kısım rekombinant vektörün *E. coli* konak hücrelerinde çoğaltılabilmesini sağlamaktadır. Rekombinat vektörün maya kökenli DNA bölgesinde ise maya hücrelerinde replikasyonlarını yapabilmeleri için maya 2 μ plazmitinin replikasyon orijini ve genetik belirteç olarak *leu-2* geni yer almaktadır. Bu rekombinant vektör, *leu-2* mutasyonu taşıyan maya hücrelerine transfekte edildiğinde bir yandan replikasyonla sayısı artırılırken diğer yandan her bir kopya üzerindeki *sAg* geninin büyük ölçekte ekspresyonu gerçekleştirilir.

Daha sonra bu hücrelerde üretilmiş olan S antijenlerinin kromatografik yöntemlerle saflaştırması gerçekleştirilir. Maya hücrelerinden bu yöntemle saflaştırılan S antijenleri 226 amino asit uzunluğundadır ve glikolize edilmişlerdir. Yoğun moleküller arası disülfid bağlarının yardımıyla polimerler oluştururlar, bu polimerler konak hücre tarafından sağlanan fosfolipit ve diğer lipitlere tutunur ve partiküller oluştururlar. Yapılan elektron mikroskopisi çalışmaları maya hücrelerinde oluşan S antijen partikülleriyle insan plazmasındakilerin benzer olduğunu göstermiştir (Şekil 8.2). Partikül halindeki ve serbest glikolize edilmiş S antijenleri karşılaştırıldığında partikül şeklindeki immünojenitenin 1000 kat daha fazla olduğu

belirlenmiştir. Aşılama sonrası yapılan karşılaştırmalarda rekombinant alt ünite S antijenlerinin koruyuculuğu ile insan plazmasından elde edilen S antijenlerinin koruyuculuk düzeyinin aynı olduğu belirlenmiştir. Böylece Hepatit B S antijeni alt ünite aşısı maya hücrelerinde yeterli miktarda, daha hızlı, daha güvenli ve daha ucuz bir şekilde elde edilmiştir.



Şekil 8.2: Saflaştırılmış Hepatit B yüzey antijen partiküllerinin elektron mikrografi (130000x). Sol panel insan kan plazmasından sağ panel ise maya hücrelerinden saflaştırılmış S proteini partiküllerini göstermektedir.

Alt ünite aşıları muhtemelen gittikçe daha yaygınlaşacaktır. Bunun farklı nedenleri vardır. i) Aşı ile diğer bir hastalık ajanının bulaşması olasılığı olmadığı için normal attenüe ve ölü aşılardan daha güvenlidir. ii) Yine klonlanmış genetik materyal olarak sürekli hazır olduğu için yeniden üretilmeleri daha kolaydır. iii) Ayrıca daha geleneksel yöntemlerle üretilenlere göre rekombinant aşılar genellikle daha hızlı hazırlanabilir. iv) Son olarak rekombinant aşılar geleneksel yöntemlerle üretilen aşılardan çok daha az pahalıdır.

8.2 Genetik Aşılar (Nükleik Asit Aşılar)

Rekombinant ve geleneksel aşılar enfeksiyon hastalıkların karşı savaşta son derece başarılı olmasına rağmen bazı durumlarda üretilmesi zordur. Bununla beraber kavramsal olarak aşı üretimi için yeni yaklaşımlar mümkündür, genetik aşılar olarak da bilinen **DNA aşıları ve RNA aşıları**.

DNA aşıları bireyi aşılama için doğrudan patojenin genomunu kullanır. Patojenin genomunun tanımlanmış bir bölgesi veya immünojenik proteinleri kodlayan belli genler kullanılır. Hedef genler plazmit veya viral bir vektöre klonlanarak bireylere enjekte edilir. Enjeksiyon sonrasında insan veya diğer bir hayvan hücresine ulaşan DNA ya yıkılır ya da

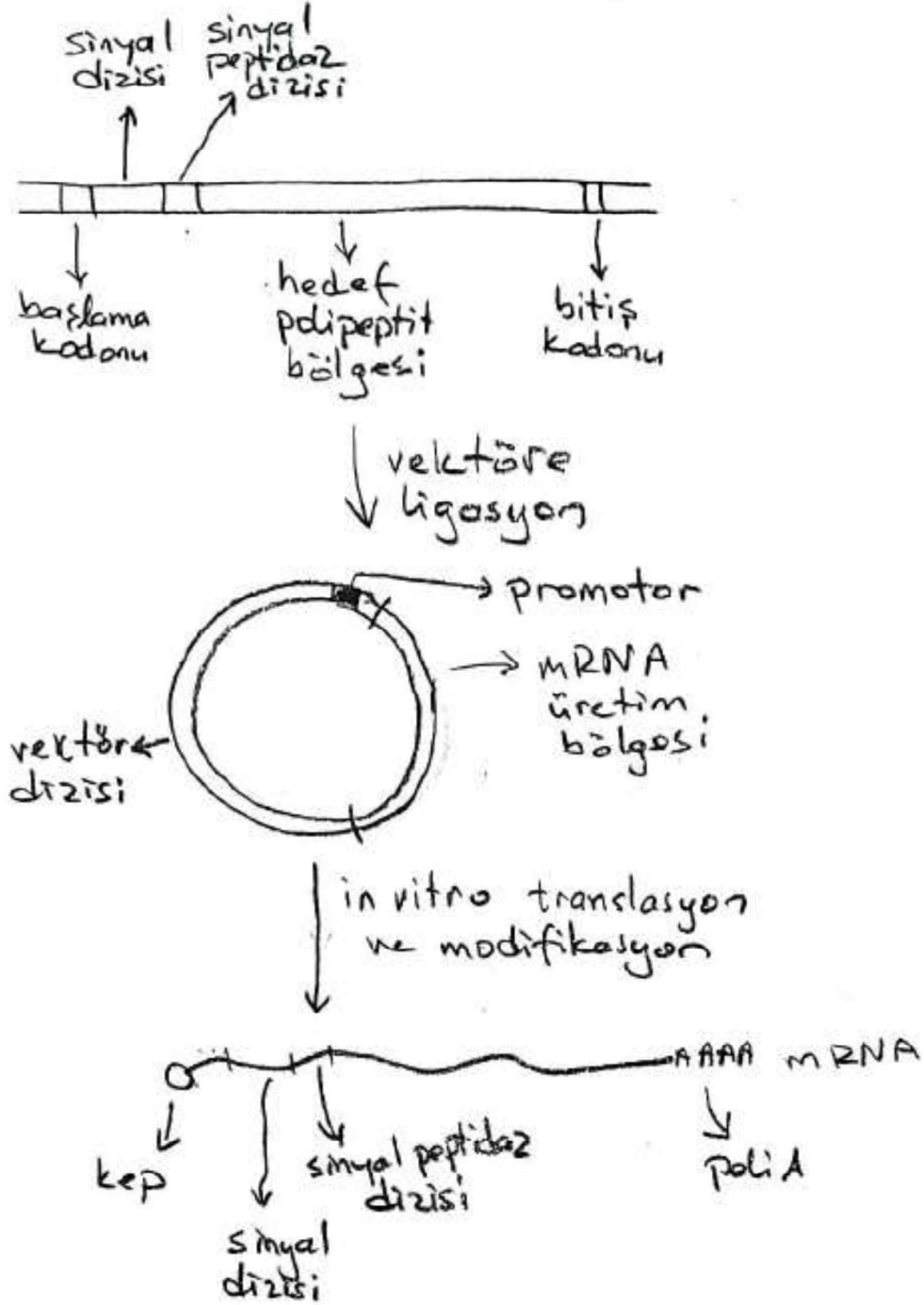
taşıdığı genlerin transkripsiyonu ve translasyonu (ekspresyonu) gerçekleşir. Eğer ekspresyon gerçekleşirse ve üretilen protein immünojenik ise birey patojene karşı etkili bir şekilde aşılabilir. Böylece aşı DNA'sı tarafından kodlanan proteine karşı bağışık tepki oluşacaktır. DNA (ve RNA) molekülünün kendisi immünojenik değildir. DNA aşıları güvenli ve ucuz olmaları bakımından avantajlıdır.

8.2.1 mRNA aşıları

mRNA aşıları immünojenik bir polipeptidin üretilerek aşı olarak bireylere uygulanması yerine doğrudan hedef immünojenik polipeptidi kodlayan mRNA molekülünün uygulanması esasına dayalı bir aşı tipidir. Böyle bir aşı elde etmek için hedef polipeptit bölgesini kodlayan DNA molekülü bir plazmit veya diğer tip bir vektöre klonlanır, gerekli manipülasyonlar yapılır ve sonra bu rekombinant DNA bölgesinden in vitro'da mRNA üretilir. In vitro mRNA üretimine geçmeden önce klonlanmış DNA üzerinde gerekli modifikasyonların yapılması gerekir. Sözelimi polipeptit ribozomlarda sentezlendikten sonra endoplazmik retikulum, golgi kompleksine ve hücre zarına transferini sağlayacak sinyal ve transit dizilerinin; bu dizilerin olgunlaşma sonrasında uzaklaştırılması için gerekli peptidaz tanıma dizilerinin eklenmesi gibi (Şekil 8.3).

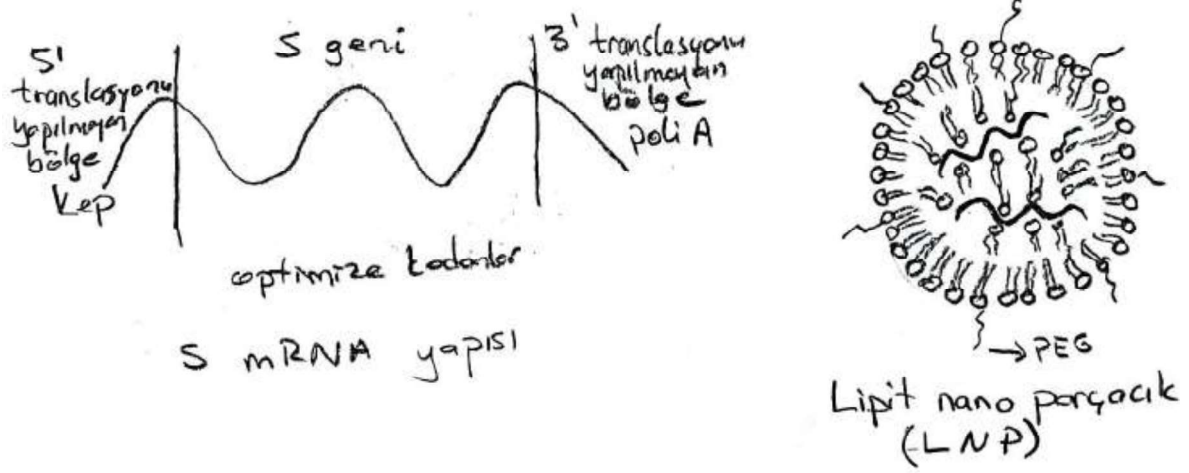
Bu gün için SARS Cov-2 virüsüne karşı geliştirilen iki mRNA aşısı yaygın olarak kullanılmaktadır: BNT162b2 (Comirnaty, BioNTech-Pfizer) ve mRNA-1273 (COVID-19 Vaccine Moderna, Moderna). Her iki aşının da üretilmesi için kullanılan teknoloji çok benzerdir. Virüsün tam büyüklükteki S proteininin optimum olarak ekspresyonunun yapılabilmesi için kodonlar optimize edilmiştir. Ayrıca protein yapısına özgün sinyal dizisi eklenmiştir. Bu üretilen mRNA molekülleri füzyon öncesinde ve sonrasında konformasyonel değişiklikleri engellemek için iki adet mutasyon içerir.

mRNA aşısı üretim süreci, RNA polimerazın bağlanabileceği bir promotor da içeren bir plazmit içine, hedef DNA molekülüne klonlanması ile başlar (Şekil 8.3). Bakteri hücrelerinde bu rekombinant plazmitin çoğaltımı (amplifikasyonu, çok sayıda kopyasının oluşturulması) sonrasında doğrusallaştırılır ve saflaştırılır. Doğrusallaştırılmış ve saflaştırılmış bu rekombinant DNA'dan hedef polipeptidi kodlayan bölgeden in vitro'da transkripsiyon gerçekleştirilerek büyük miktarlarda RNA elde edilir. Büyük ölçekte üretim gerçekleştirmek için geliştirilmiş yeni teknoloji kullanılarak bu RNA moleküllerinin 5' uçlarına kep yapısının eklenmesi kritik bir işlemdir.



Şekil 8.3: Bir mRNA aşısı üretiminin ana aşamaları.

In vitro transkripsiyon sonrasında mRNA saflaştırma basamakları uygulanır. mRNA aşılarının, mRNA'nın stabilitesi ve translasyonun etkinliğini sağlamak üzere 5' ve 3' translasyonu yapılmayan dizileri modüle edilir (Şekil 8.4). Ayrıca üridinler RNA stabilitesini artırmak ve spesifik olmayan bağışık tepkiyi azaltmak için N1-metilpseudoüridine (m1Ψ) değiştirilir.



Şekil 8.4: SARS Cov-2 S proteinini kodlayan bir mRNA molekülünün ve bir S polipeptiti içeren lipit nano parçacığının şematik görünümü.

Aşı uygulaması için mRNA aşıları lipit nano partikülleri (LNP) formunda spesifik lipit kompleksleri şeklinde hazırlanır (Şekil 8.4). Bu LNP yapısı mRNA'yı sadece doku içindeki yıkıma karşı korumaz aynı zamanda hücreye tutunmalarına ve RNA transkripsiyonu için sitoplazma içine salınmalarına da yardım eder. LNP yapısı; fosfolipitler, kolesterol, özel katyonik lipitler ve etilen glikol lipitleri gibi bileşenlerin özel oranlarda karıştırılmasıyla elde edilir.

8.3 Viral Vektör Aşıları

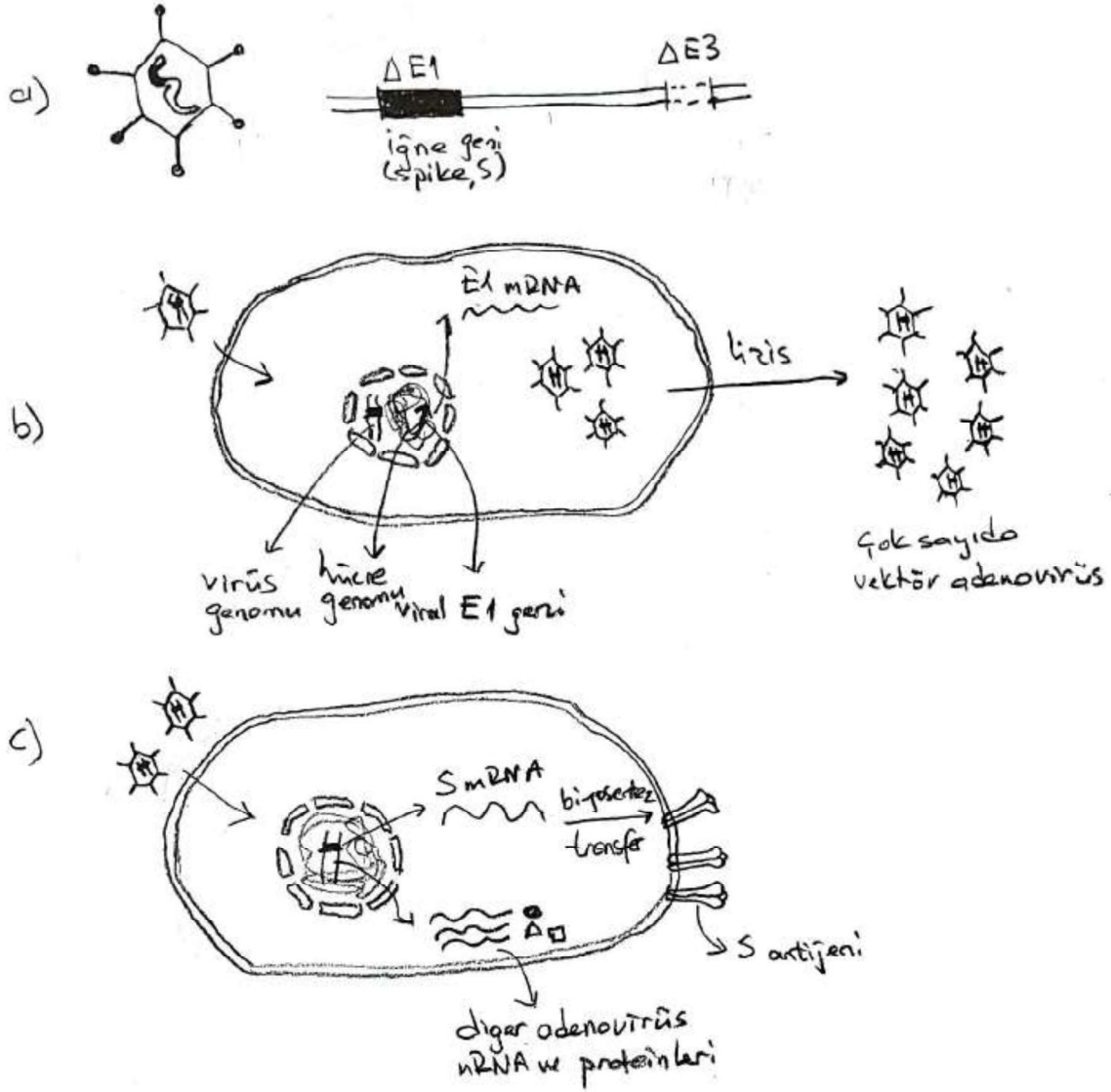
İmmünojenik bir veya daha fazla polipeptiti kodlayan genleri klonlayarak ve memeli hücrelerinde ekspresyonu yapılacak şekilde manipüle ederek DNA aşıları elde edilir. Aşı olarak hazırlanan bu DNA molekülleri eğer memeli hücre çekirdeğine ulaşırsa burada transkripsiyonu ve RNA işleme işlemleri yapılarak mRNA'ya dönüştürüldükten sonra sitoplazmaya geçerek ribozomlarda anijenik polipeptit sentezini yönetir. Çoğu durumda DNA aşılarının hücre çekirdeğine etkili bir şekilde ulaştırılması temel zorluktur. Bu temel zorluğu aşmak üzere DNA molekülünü hücre çekirdeğine taşıyacak sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulur. Bu sistemlerden biri virüs kökenli vektörlerdir.

Bazı virüsler enfeksiyonun başlamasından hemen sonra genomik DNA'larını konak hücrenin çekirdeğine etkili bir şekilde iletirler. Sonrasında genomlarının replikasyonu ve proteinlerini ekspresyonu yapılarak yeni virüs parçacıklarının üretilmesi gerçekleştirilir. Viral enfeksiyon hücre için elbette öldürücüdür; fakat genomlarını etkili bir şekilde çekirdeğe ulaştırıyor olmaları bu virüsleri DNA aşılarının, aşılanacak kişilerin hücrelerinin çekirdeğine taşımak için bir araç yapar. Bunun için virüsün sözgelimi DNA replikasyonunu yürüten

fonksiyonu kontrol eden genom bölgesi silinirse böyle bir virüs parçacığı genomunu çekirdeğe iletecek fakat genom replikasyonunu gerçekleştiremeyeceği için viral enfeksiyon devam edemeyecektir. Böyle bir virüs genomuna hazırlanmış bir DNA aşısı (DNA molekülü!) eklenirse bu DNA'nın kodladığı polipeptitin transkripsiyonu gerçekleşecek, sonuçta bu hücrede antijenik polipeptit sentezlenecektir. Bu şekilde hedef bir DNA molekülünü hücre çekirdeğine taşımak üzere tasarlanmış enfeksiyon yeteneği yok edilmiş virüslere vektör virüsler denir. Vektör virüs olarak farklı virüs grupları kullanılır. Bunlar arasında adenovirüsler, herpes virüsler, vaksinia virüsleri ve retrovirüsler sayılabilir.

DNA aşılarının hücre çekirdeğine ulaştırılmasında vektör olarak kullanılan virüslerden birisi adenovirüslerdir. İnsan ve maymun adenovirüs suşları bu amaç için geliştirilmişlerdir. Bu virüslerin genomunun E1 bölgesi replikasyondan sorumlu bölgedir. Yine E3 bölgesi de bazı viral savunma fonksiyonların yürütülmesinden sorumlu diğer bir bölgedir. Bu virüsün E1 bölgesine aşı olarak geliştirilmiş DNA molekülü yerleştirildiğinde replikasyon fonksiyonu yok olur ve virüs çoğalamaz (Şekil 8.5a). Böylece bu virüs, çoğalamayan ama genomunu çekirdeğe transfer edebilen bir vektör aşuya dönüşür. Bu adenovirüs vektörü, aşı DNA bölgesiyle beraber genomunu çekirdeğe ulaştırır, sonra aşı DNA bölgesinden antijenik polipeptitin ekspresyonu gerçekleşir. Fakat temel problem çoğalamayan bir virüs parçacığından aşı olarak kullanmak üzere yeterli miktarda üretilmesidir.

SARS Cov-2 için geliştirilen aşılarından birisi ChAdOx1-S (University of Oxford, AstraZeneca) aşısıdır ve modifiye edilerek hazırlanmış maymun adenovirüsü (şempanze adenovirüs Y25) vektör olarak kullanılmıştır. Öncelikle virüsün E1 genom bölgesi silinerek yerine SARS Cov-2 yüzey antijen genini (S geninin) tamamı integre edilmiştir (ChAdOx1-S). Böylece manipüle edilmiş S DNA geni virüs yapısına eklenirken virüsün replike olması ve çoğalması da engellenmiştir. Bu virüsün E3 bölgesi de ayrıca silinmiş ve virüs çoğalmasının engelleniyor olması daha da kesinleştirilmiştir. Böyle bir genoma sahip bir virüs parçacığı normal insan doku kültürü hücrelerinde çoğalamaz. Bunun için viral E1 genini taşıyan hücre hatlarından oluşan doku kültürleri kullanılmıştır (Şekil 8.5b). E1 fonksiyonu, yani viral replikasyon için gerekli enzimler doku kültür hücreleri tarafından genomlarına integre olmuş bir E1 DNA'sı tarafından sağlandığı için bu doku kültürlerinde vektör adenovirüs ChAdOx1-S büyük miktarlarda üretilmiştir. ChAdOx1-S vektör adenovirüsün çoğaltılması için insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293 hücre hattı kullanılmıştır. Büyük miktarda vektör parçacıklarının saflaştırılması için, doku kültür hücrelerinin deterjanlarla parçalanması ve diğer hücre bileşenlerinden ve viral RNA'dan saflaştırılması işlemleri gerçekleştirilir.



Şekil 8.5: a) E1 ve E3 bölgeleri modifiye edilmiş adenovirüs genomu, b) Vektör adenovirüsün E1 DNA'sı taşıyan hücre hatlarında çoğaltılması ve c) vektör adenovirüsün aşılanan bireyin hücrelerinde SARS Cov-2 S antijeninin üretilmesi ve hücre yüzeyine transferi.

HEK293 hücre hatlarında çoğaltılan ve saflaştırılan ChAdOx1-S vektör aşısı kas içine uygulandığında virüsün tutunma ve penetrasyon mekanizmaları yardımıyla sitoplazmaya ve orandan çekirdeğe ulaşır. Replikasyon fonksiyonundan sorumlu E1 bölgesi bulunmadığı için adenovirüs çoğalamaz. Buna karşın E1 bölgesinde yerleşik durumdan S geninin transkripsiyonu gerçekleşir (Şekil 8.5c). Üretilen bu S proteinleri hücre yüzeyinde transfer edilir ve bağışık sistem hücreleri tarafından tanınırlar ve bağışık tepki oluşturulur.

Hücre çekirdeğinde S geninden mRNA üretildiğine göre mRNA aşılılarıyla aynı sonuca ulaşıldığı düşünülebilir. Ancak adenoviral vektör aşılardan mRNA üretilme mekanizması çok daha karmaşıktır. Öncelikle adenoviral vektör DNA'sının çekirdeğe geçmesi, sonra çekirdekte transkripsiyonunun yapılması, yine çekirdekte RNA işleme

işlemlerine tabi tutulması ve sitoplazmaya transfer edilmesi gerekir. Yapılan çalışmalar çekirdekte öncü S mRNA'sına alternatif splaylama ve farklı bölgelerden poliadenilasyon işlemlerinin uygulanmış olduğunu göstermektedir. mRNA aşılarında ise sitoplazmaya doğrudan mRNA molekülü ulaşır ve sadece S polipeptiti üretilir.

8.4 Endüstriyel ve Sosyal Boyut

Aşı araştırma ve geliştirme yetişmiş eleman ve büyük yatırım gerektiren bir alandır. Bu nedenlerle aşı endüstrisine yatırım yapan girişim sayısı azdır. Bu girişimcilerin çoğu ABD ve Avrupa orijinlidir. Aşı üretiminin dünyanın daha gelişmiş belli bölgelerine yoğunlaşmış olması salgın şartlarında aşı dağıtımında ayrımcılığa neden olmakta ve özellikle düşük gelirli bölgelere aşı ulaşmasını zorlaştırmaktadır. Sınırlı aşı stoku ve eşit olamayan dağıtım küresel eşitsizliklere neden olmaktadır. Sözelimi serviks kanserine karşı mevcut insan papillomavirüs (HPV) aşısının hastalık sıklığının daha yüksek olduğu düşük gelirli ülkelere ulaşma oranı %41 iken yüksek gelirli ülkelerde bu oran %83'tür. COVID-19 aşılarının sağlanmasında daha ağır bir eşitsizlik gözlemlenmiştir. Çin, Hindistan ve Breziya gibi ülkelerde aşı araştırma ve geliştirmesine yatırım yapan girişimcilerin sayısı gittikçe artmaktadır.

Yeni bir aşının geliştirilmesi oldukça pahalı ve zaman alan süreçleri içerir. Yeni bir aşı geliştirmenin maliyeti 1991 yılında 231 milyon ABD doları iken 2003 yılında 802 milyon dolara, 2010 yılında da 1 milyar dolara ulaşmıştır. Bu hesaplamalar bütün masrafları içerecek şekilde hesaplanmıştır: olumsuz sonuçlanmış ürün araştırma geliştirme masrafları, lisanslama sonrası klinik çalışmalar ve üretim süreçlerinin iyileştirilmesi. Lisanslama için hazır yeni bir aşı elde etmek için 600-800 milyon dolarlık bir harcamaya ihtiyaç olduğu hesaplanmaktadır. Bir girişim böyle bir ürün için yıllık 100 milyon dolar yatırım yapması durumunda ancak 6-8 yılda ürünü hazır hale getirebilir. Sözelimi insan papillomavirüs ve rotavirüs aşıları 14-16 yılda tamamlanabilmiştir. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7151793/>)

2021 yılında 141 milyar ABD doları değerinde 16 milyar doz aşı piyasaya sunulmuştur. Bu sayı 2019 yılı pazar hacminin hemen hemen 3 katı (5.8 milyar doz) ve pazar değerinin neredeyse 3.5 katı (38 milyar dolar) kadardır. 2019-2021 yılları arasındaki bu farkı oluşturan ana neden COVID-19 aşılarıdır. Bu durum aşı üretiminin sağlık ihtiyaçlarına bağlı olarak nasıl büyük bir hızla arttığını göstermektedir (<https://www.who.int/news/item/09-11-2022-who-releases-first-data-on-global-vaccine-market-since-covid-19>). Küresel rekombinant aşı pazar büyüklüğü 2021 yılında 8.1 milyar dolar olarak gerçekleşmiştir. 2031 yılında yıllık %11.4'lük bir artışla 24.7 milyar dolara çıkması öngörülmektedir.