

İletişim / Correspondence:

¹ Dr. / PhD.

Biyokimyager / Biochemist
Türkiye Sağlık Enstitüleri
Başkanlığı
berrakgb@gmail.com

² Uzm. / MSc.

Biyomühendis / Bioengineer
Türkiye Sağlık Enstitüleri
Başkanlığı
tanyeriyigit@gmail.com

³ Uzm. / MSc.

Biyomedikal Mühendisi
/ Biomedical Engineer
Türkiye Sağlık Enstitüleri
Başkanlığı
begumtokyay@gmail.com

⁴ Biyomühendis / Bioengineer

Türkiye Sağlık Enstitüleri
Başkanlığı
s.islambey@gmail.com

⁵ Biyomühendis / Bioengineer

Türkiye Sağlık Enstitüleri
Başkanlığı
serefoglu.beyza@gmail.com

⁶ Biyomühendis / Bioengineer

Türkiye Sağlık Enstitüleri
Başkanlığı
gizem.yolalan09@gmail.com

⁷ Doç. Dr. / Assoc. Prof.

TÜSEB Türkiye Biyoteknoloji
Enstitüsü Başkanı,
rabiacakirkoc@gmail.com

Geliş Tarihi: 16.08.2021

Kabul Tarihi: 25.08.2021

Received Date: 16.08.2021

Accepted Date: 25.08.2021

Anahtar Kelimeler:

Covid-19, Aşı, Üretim, İnaktif,
Rekombinant, mRNA, Vektör.

Keywords:

Covid-19, Vaccine, Production,
Inactive, Recombinant, mRNA,
Vector.

SARS-CoV-2'ye Karşı Geliştirilen Aşılar ve Üretim Metotları

**Berrak Gülçin BALABAN¹, Yiğit TANYERİ²,
Begüm Kübra TOKYAY³, Sezer İSLAMBEY⁴,
Beyza ŞEREFÖĞLU⁵, Gizem YOLALAN⁶, Rabia ÇAKIR KOÇ⁷**

Özet

Yeni koronavirüsün (SARS-CoV-2) sebep olduğu Covid-19 pandemisi dünya genelinde 4,3 milyon kişinin ölümüne ve 203 milyon kişinin hastalanmasına sebep olmuştur. Pandemiyi sonlandırmanın en etkili yolu aşı geliştirilmesi ve etkin aşılanmanın yapılmasıdır. Tüm dünyada ve ülkemizde Covid-19'a yönelik aşı geliştirme çalışmaları yapılmaktadır.

Geleneksel bir aşı türü olan inaktif aşılar, uzun yıllar çalışılmış, güvenilir aşılardır. İnaktive edilen virüsün immün yanıt oluşturmaya esasına dayanır. Rekombinant protein aşıları, rekombinant DNA teknolojisi ile virüsün viral proteinlerini sentezlemektedir. Virüs benzeri yapılar (VLP) ile oluşturulan aşılar, virüsü taklit ederek antijenik yapıyı tanıtır. Adenovirüs aşılarında antijen kodlayan genin adenovirüse entegre edilmesine dayanır. Sentetik peptid aşıları, patojenin immünojenik bölgesini taklit eden aminoasit dizilerinden oluşur. mRNA aşılarında ise amaç, viral proteinin insan hücresinde *in vivo* ekspresyonunun sağlanmasıdır. Bu derlemede, Covid-19'a yönelik geliştirilen aşıların teknolojileri ve üretim metotları avantaj ve dezavantajları ile birlikte değerlendirilmiştir.

Vaccines and Production Methods Developed Against SARS-CoV-2

**Berrak Gülçin BALABAN¹, Yiğit TANYERİ²,
Begüm Kübra TOKYAY³, Sezer İSLAMBEY⁴,
Beyza ŞEREFÖĞLU⁵, Gizem YOLALAN⁶, Rabia ÇAKIR KOÇ⁷**

Abstract

Covid-19 pandemic that is caused by the novel coronavirus (SARS-CoV-2) has led to 203 million people to get sick and 4.3 million people to die all around the world. The most effective way of ending the pandemic is developing vaccines and ensuring effective vaccination.

Inactivated vaccines which have been studied for a long time are the most conventional, trusted vaccine types. The way they generate immune response is through their virus content within the inactivated vaccine. Recombinant protein vaccines synthesize the viral proteins of the virus using the DNA technology. Virus like particles (VLP), aim to introduce antigenic structure through mimicry. Adenovirus vaccines are based on inserting the antigen-encoding gene into adenovirus. Synthetic peptide vaccines consist of amino acid sequences that mimic the immunogenic region of the pathogen with peptides. In mRNA vaccines, the aim is to provide *in vivo* expression of the viral protein inside the human cell. In this review, technologies and production methods of vaccines developed for Covid-19 were evaluated together with their distinct advantages and disadvantages.

1. Giriş

SARS-CoV-2, 2019'un Aralık ayında ilk olarak Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan, şiddetli akut solunum sendromuna ve Covid-19 pandemisine sebep olan virüstür. Covid-19 hastalığının hızlı ve şiddetli bir şekilde ilerleyişi nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 30 Ocak 2020'de acil durum ilan etmiştir. Virüs, Ağustos 2021'e kadar yaklaşık 203 milyon kişinin hastalanmasına ve 4,29 milyon kişinin ölümüne sebep olmuştur (Zhao, Gao, Xiao, Huang ve Wu, 2021). Covid-19 tedavisi için ilaç geliştirme çalışmaları yapılmış, ancak bu çalışmalardan "Remdesivir (Veklury)" ilacı hariç onay alan bir çalışma olmamıştır. Ancak Veklury, 12 yaşından büyüklere ve hastanede tedavi olması gereken ağır hastalara uygulanabildiği için önleyici etmenler kadar etkili olamamıştır (Centers for Disease Control and Prevention, 2020). Pandemi süreçlerinde bulaş ve ölüm oranlarını azaltmanın en iyi yolu önleyici sağlık yöntemlerinden en önemlisi olan aşılama kullanmaktır. Aşı, insan bağışıklık sistemini hastalığa karşı uyararak koruyucu antikor ve hücresel yanıt oluşturan biyolojik bir üründür. Bu derlemede, onaylanmış ve klinik aşamada olan farklı üretim teknolojilerine sahip aşuların özellikleri ve üretim metodolojileri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

2. İnaktif Aşular

İnaktif aşular; virüs, bakteri gibi hastalık edici bir patojenin kontrollü bir şekilde hücre kültür ortamında çoğaltılıp, sonrasında inaktivasyon işlemiyle etkisizleştirilerek hasta etme yeteneğinin sonlandırılmasıyla elde edilen aşulardır (Turner, Squires ve Murray, 1970). İnaktif aşular, en iyi bilinen, yaygın kullanılan geleneksel aşı türüdür. İnaktif aşular, çocuk felcine, koleraya, Hepatit A'ya, vebaya ve kuduza karşı geliştirilmiş ve kullanılmaktadır (Kocagöz, 2017).

İnaktif aşuların diğer aşı türlerine kıyasla daha bilinen bir teknoloji ile üretilmesi, saklama koşullarının ve taşınmasının kolay olması, adjuvan eklemeye müsait bir yapısının olması gibi birçok

avantajı bulunmaktadır. İnaktif aşuların saklama koşulları genellikle -20°C veya +4 °C seviyesinde olmakla beraber her aşının içerisindeki bileşenlere göre saklama koşulları değişmektedir (Marcelino ve diğ., 2007). İnaktif aşuların saklama koşulları, diğer aşı türlerinin gerektirebildiği -80°C ve benzeri saklama koşullarına nazaran daha maliyetsiz, kolay saklama ve taşıma olanağı sağlamaktadır (van Riel ve de Wit, 2020). İnaktif aşularda kalıcı bağışıklığın oluşması için doz tekrarı gerekmektedir (MacLachlan ve Dubovi, 2011).

İnaktif aşulara verilecek en bilinen Covid-19 aşısı örneği Sinovac firmasının üretmiş olduğu CoronaVac aşısıdır. CoronaVac aşısının çift-kör plasebo kontrollü Faz-III çalışmaları Türkiye'de de yapılmıştır. İkinci dozun alınmasından 14 gün geçtikten sonra çalışmanın uygulandığı kişilerde aşının etkinliği %83,5 olarak görülmüştür (Tanrıover ve diğ., 2021). Aşılama grubun içerisinde %18,9 oranında yorgunluk gibi basit semptomlardan oluşmuş yan etkiler gerçekleşirken, 4. seviye olarak değerlendirilen negatif bir etkiye rastlanmamıştır. Sonuç olarak ise CoronaVac aşısı Türkiye'de Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile tanısı konulan semptomatik Covid-19 hastalarına karşı yüksek etkinlik göstermiştir (Tanrıover ve diğ., 2021).

5 Mayıs 2020 tarihinde Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ ve ekibi tarafından yayınlanan makalede yeni koronavirüsün (SARS-CoV-2)'nin Türkiye'de yapılan izolasyonuna ait başarılı sonuçları paylaşılmıştır (Terkis ve diğ., 2020). Bu çalışmanın ardından, SARS-CoV-2 virüsüne karşı ülkemizde bir ilk olarak yerli ve milli bir inaktif aşı geliştirilmesine başlanmıştır. 21 Haziran 2021 tarihinde başlayan TURKOVAC aşısının Faz-III çalışmaları, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) ve Erciyes Üniversitesi iş birliğiyle devam etmektedir. Faz aşamalarının başarıyla sonuçlanmasının ardından aşının seri üretimine geçilecektir.

2.1. İnaktif Aşıların Üretim Yöntemleri

İnaktif aşılarda üretebilmek için hastalık yapıcı virüsün izole edilmesi ve hücrelerde çoğaltılması gerekmektedir. Memeli hücrelere virüs ekimi yapıldıktan sonra, virüsün hücrede yaptığı tahribattan dolayı oluşan kalıntılardan uzaklaştırılır, inaktive edilir ve ileri saflaştırma aşamalarından geçirilir. Ürün formuna ulaşan aşı ise en son olarak adjuvanlanır ve formüle edilir. Elde edilen ürünün sahip olduğu özelliklere göre sahip olması gereken saklama koşullarına uygun depolarda saklanır.

İnaktif aşı üretiminde memeli hücrelerin kullanım zorunluluğu, onların hayatta kalmaları için gereken besin, sıcaklık, nem ve karıştırma hızları gibi önemli parametrelerin dikkatlice hazırlanmasını ve uygulamasını gerektirir (Lodish, Berk, Ziprusky, Matsudaira, Baltimore ve Darnell, 2000). Ayrıca adherent olan memeli hücrelerin, sadece uygun yüzeylerde büyüebilme özelliği, bu hücrelerin aşı üretimi için kullanımını zorlaştıran bir diğer etmendir. Tüm bunlara rağmen, daha önceden geliştirilmiş farklı teknolojiler sayesinde, memeli hücreleri de bu üretim süreçleri için başarıyla kültüre edilebilmekte ve kullanılabilir (Iversen ve Bavari, 2021).

Aşı üretimi için virüsün karakterizasyonuna göre, Covid-19 aşısı üretimi için ise virüsün türü nedeniyle biyogüvenlik seviyesi en az 3 olan laboratuvarlara ve üretim alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Hartman, Cole ve Homer, 2012).

2.1.1. Memeli Hücre Çoğaltma Aşaması

Endüstriyel ölçekte aşı üretimi yapılabilmesi için memeli hücrelerin optimize edilmiş koşullarda çoğaltılması gerekir. Covid-19 için 2021 yılının ilk yarısına kadar Faz-III çalışmalarına getirilen aşılarda tümünde Vero hücre hatları kullanılmıştır (Ndwanwe ve Wiysonge, 2021). Vero hücreleri bir memeli hücre hattı olup, genel olarak süspanse halde üreyemedikleri ve yüzeyde çoğalma karakteri gösterdikleri için laboratuvar ölçekli üretimlerde rolling sistemler kullanılmaktadır (Thomassen ve diğ., 2013). Büyük

ölçekli üretimlerde ise hücrelerin büyük hacimli biyoreaktörlerde süspanse halde üreyebilmesini sağlamak için hücrelerin tutunabileceği mikrotaşıyıcılarla kullanılmaları gerekmektedir (Montagnon, Fanget ve Vincent-Falquet, 1984).

2.1.2. Virüs İnokülasyonu Aşaması

Bir hastadan alınan ve izole edilen virüsün (Terkis ve diğ., 2020) ana suşu üzerinden pasajlanan çalışma suşları yine rolling sistemlerde memeli hücreleri kullanılarak çoğaltılır. Çoğaltılan virüsler, büyük ölçekli üretim metotları ile yüksek miktarlarda çoğaltılmış memeli hücreleri içerisine inoküle edilir. Virüsler, inokülasyon sonrasında, hücreleri enfekte ederek parçalarlar (Toriniwa ve Komiya, 2007). Biyoreaktörler içerisinde aktif olarak yer alan çoğaltılmış virüsler, inaktivasyon tanklarına aktarılırlar.

2.1.3. İnaktivasyon Aşaması

İnaktivasyon aşaması, virüslerin hücreyi enfekte etmesinden sonra, saflaştırma ve adjuvanlama aşamalarından önce, virüslerin üreme ve bağlanma yeteneklerinin sonlandırılmasını sağlayan bir aşamadır. İnaktivasyon işlemi bir kimyasalla, ısı veya radyasyonla yapılabilir. Kimyasal olarak genellikle beta propiolakton, glüteraldehit veya formaldehit kullanılır. Glüteraldehit ve formaldehit bir köprü oluşumuna neden olarak genom okumasını bloke etmeyi başarırken, beta propiolakton, viral genomu alkil grubuna dahil ederek bir füzyon oluşturmayı başararak virüsün inaktivasyonunu sağlar. Sıcaklık veya pH uygulanması gibi işlemler virüsün proteinini denatüre etmeyi amaçlarken, radyasyon içeren yöntemler ise direkt virüse zarar vermeyi amaçlayarak, genomunun bozulmasını amaçlar (Delrue, Verzele, Madder ve Nauwynck, 2012). Her bir inaktivasyon yönteminin kendi avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır ve aşı üretiminde gelişime ve yeniliğe özellikle ihtiyaç duyulan aşamalardan biridir. Geleneksel yöntemlerin yanı sıra, görünür aşırı kısa atımlı lazer veya düşük enerjili elektron ışınması gibi yöntemler bulunmaktadır ve gelecek

vadetmektedirler (Sabbaghi, Miri, Keshavarz, Zargar ve Ghaemi, 2019).

2.1.4. Saflaştırma Aşaması

Saflaştırma işlemi öncesi ürünün inaktive edildiği aşuların, saflaştırma aşamasına geçtiklerinde aynı biyogüvenlik seviyeleri şartlarını sağlamaya gerek yoktur. Virüsün inaktive olma hali, zararsız olduğu anlamına gelir. Üretilmek istenen ürüne göre klarifikasyon ve ultrafiltrasyon harici kromatografik yöntemler de ürünün saflaştırma aşamasında kullanılır. Kromatografik yöntemlerde kullanılmak istenen teknik, durgun katı olan fazın, biyomoleküllerle olan ilişkisine göre değişebilir. Bu yöntem içerisinde kullanılan farklı teknikler, afiniteden, iyon yükünden, boyut farkından veya hidrofobik etkileşimlerden yararlanan teknikler olabilir (Zhao ve diğ., 2019). Kullanılan yöntemlerin farklı olmasına rağmen, etkili bir saflaştırma işlemi uygulamak, aşı üretimi gibi çok hassas bir biyolojik üretimin etkin ve olabildiğince masrafsız olması için gereken ana unsurlardan biridir (Kon ve diğ., 2016).

2.1.5. Adjuvanlama ve Formülasyon Aşaması

Adjuvanlama işleminin inaktif aşı üretim sürecine dahil edilmesinin en önemli nedeni vücudun immün yanıtını kuvvetlendirmesidir. Alüminyum bazlı adjuvanlar, güvenlik konusunda çok iyi bir geçmişe sahiptirler ve antikor oluşumuna olan etkin katkılardan dolayı Covid-19 için üretilen inaktif aşılarda da sıkça tercih edilirler (Liang ve diğ., 2020). Formülasyon uygulaması, önceki aşamalarda doğru antijenin, inaktivasyon yönteminin veya adjuvanın uygulanmasını içerirken, bu aşamada, aşının doğru ve uygun dozda üretilmesinin yanı sıra doğru saklama koşullarının sağlanmasını da içerir (Wang, Peng, Xu, Cui ve Williams, 2020).

3. Rekombinant Aşı Teknolojileri

Geleneksel aşular, güvenilirdir ve etkinlikleri kanıtlanmıştır. Ancak pandemi şartlarında kısa zamanda milyonlarca doz aşı üretilmesini zorlaştıran maliyet ve SARS-CoV-2 gibi ajanlar için biyogüvenlik seviye 3 (BSL-3) altyapısına sahip tesis gereksinimleri bulunmaktadır (Soler ve Houdebine, 2007; Calina ve diğ., 2020). Alternatif olarak rekombinant teknolojisi hızlı, büyük hacimlerde ve düşük maliyette aşı üretilmesini mümkün kılmaktadır. Rekombinant aşular, enfeksiyöz ajanın genom analizi yapılmış ve viral proteinleri biliniyorsa geliştirilebilir (Van Riel ve de Wit, 2020).

SARS-CoV-2 genomu, E: zarf proteini, M: matris proteini, N: nükleokapsid proteini ve S: spike proteini olmak üzere dört ana yapısal protein içerir. Spike proteini; immünodominant antijen olmasından dolayı yapısal proteinler arasında aşı çalışmalarının birincil hedefi olmuştur (Pollet, Chen ve Strych, 2021). S proteini, virüsün anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2) hücre yüzeyi reseptörüne bağlanması ve ardından hücreye girişinden sorumlu olan protein bölgesi olup, S1 ve S2 iki alt biriminden oluşur (Dai ve Gao, 2020; Yadav ve diğ., 2020).

Covid-19 için rekombinant teknolojisi kullanılarak üretilen gerçekleştiren aşular; nükleik asit aşuları (DNA, RNA), rekombinant viral vektör aşuları, virüs benzeri parçacık (VLP) içeren aşular ve rekombinant protein aşularıdır ("Coronavirus Disease (COVID-19): Vaccines," 2021.), (Giese, 2016).

3.1. Rekombinant Protein Aşuları

Vücutta immün yanıtın patojenlerin yüzeyinde bulunan belirli antijen bölgelerine karşın oluştuğunun anlaşılması sonrasında aşı geliştirme çalışmalarında yüzey antijenlerinin rekombinant teknolojisi ile üretilme çalışmaları başlamıştır. Rekombinant protein aşuları, patojenin yüzeyinde bulunan ve genelde epitoplara olarak bilinen protein yapıdaki antijenik bölgelerin eksprese

edilmesi ile elde edilen protein aşılardır. (Nascimento ve Leite, 2012). Bu aşilar yüksek saflıkta olup, başlıca CD4+ Th hücre ve antikor yanıtlarını indüklerlerken CD8+ T hücre yanıtlarının zayıf aktivatörleridir. Bu sebeple adjuvan ile kullanılmakta ve tekrarlı uygulama gerektirmektedirler (Pollet ve diğ., 2021). En iyi bilinen rekombinant protein aşı örneği Hepatit B aşılardır (Jeyanathan ve diğ., 2020).

Antijenik protein bileşenlerinin rekombinant üretimi için bakteri, maya, memeli veya böcek hücreleri gibi rekombinant DNA'nın eklenebildiği, antijenik proteinleri kodlayabilen çeşitli *in vivo* sistemler kullanılır (Nascimento ve Leite, 2012). Rekombinant protein aşilar düşük maliyetle hızlı üretim sağlayıp yüksek etkinlik gösterirler, 2-8° C'de saklanabilir olması bu aşiların ticari anlamda sahip olduğu avantajlardan bir diğeridir (Philippidis, 2020). Ancak adjuvansız uygulandığında düşük etkinlik göstermeleri ve yüksek teknolojik altyapıya gereksinim duymaları bu aşiların dezavantajlarından (IP & LC, 2012).

Covid-19'a karşı rekombinant protein aşı geliştirme çalışmalarında; S proteini ve S proteinin nötralize edici olmayan epitoplara maruz kalmayı sınırlayacak şekilde rekombinant protein eldesi amaçlanmıştır. Tam uzunluktaki S1 dizilimi temelli protein aşilar, yalnızca RBD proteini temelli aşilar ya da N protein, RBD ve S2 bölgelerinin farklı epitoplara aşı formülizasyonlarında bulunduğu çalışmalar yapılmıştır. (Huang, Yang, Xu, Xu, ve Liu, 2020; Pollet, Chen ve Strych, 2021).

Covid-19 için rekombinant protein aşilarından Novavax, "NVX-CoV2373/Covovax" Sanofi Pasteur ve GSK iş birliği ile üretilen "VAT00008" ve Vaxine-Cinnagen iş birliği ile üretilen COVAX-19® aşiları bakulovirüs ekspresyon sistemi kullanılarak böcek hücrelerinde; Çin merkezli Zhifei Longcom firmasına ait "ZIFIVAX/ ZF2001" ve Clover Biopharmaceuticals firmasına ait "SCB-2019" aşiları ise Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücrelerinde üretilmiştir (Pollet ve diğ., 2021; Kyriakidis, López-Cortés, González, Grimaldos ve

Prado, 2021; "Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ," 2021).

Dünya Sağlık Örgütü'nün acil kullanım onaylı aşilar listesinde yer alan rekombinant protein aşilarından Novavaxın, "NVX-CoV2373/Covovax" için SARS-CoV-2 ana virüs suşuna karşı açıklanan klinik etkinliği %96,4 olmuştur ("Novavax Publishes Results of United Kingdom Phase 3 Clinical Trial in New England Journal of Medicine, Demonstrating High Levels of Efficacy of COVID-19 Vaccine" 2021). Acil kullanım listesinde yer alan diğer iki rekombinant alt birim protein aşısından bir diğeri olan "ZIFIVAX (ZF2001)" 92% ila 97% arasında etkinlik gösterirken ZIFIVAX (ZF2001) aşısı halen Faz-I aşamasındadır (Yang ve diğ., 2021), ("SCB-2019 as COVID-19 Vaccine (NCT Number): NCT04405908," 2021).

3.1.1. Rekombinant Protein Aşı Üretim Yöntemleri

3.1.1.1. DNA Dizisi Seçimi ve İfade Vektörü Sistemi:

Üretim prosesinin ilk aşamasında virüsün belli bir proteini veya çoklu epitoplara kodlayan dizilimi virüsten izole edilir. Elde edilen DNA'da kodon optimizasyonu, ekleneceği ifade vektörüne uygun olarak yapılır (Pino ve diğ., 2020). Protein sentezinin gerçekleştirileceği konağa uygun plazmid vektörü seçilir ve ilgili gen bölgesi seçilen bu plazmide aktarılır. Elde edilen rekombinant plazmid sayısını arttırmak için bakteri kültüründe çoğaltılabilir (Chen ve diğ., 2017; Stuitable ve diğ., 2021).

3.1.1.2. Hücre Kültürü ve Protein Sentezi:

Çoğalan plazmidler saflaştırılarak toplanır ve daha sonra bir transfeksiyon reaktifi kullanılarak biyoreaktör ya da spinner flasklar içerisindeki uygun hücrelere yerleştirilir. (Hitchman, Possee ve King, 2009; Patent No. CN111607003A, 2020). Optimizasyonu sağlanmış kültür ortamında hedef proteinin milyonlarca kopyası sentezlenebilir. Virüslerin kullanıldığı proseslerde farklı olarak

rekombinant plazmidde çoğalan DNA, virüs genomuna eklenir ve ilgili protein sentezi hücrenin enfeksiyonu sonucunda sentezlenir (Adler, Kelsey, Maik, Ho Song ve Ho, 2020).

3.1.1.3. Saflaştırma:

Hedeflenen protein konsantrasyonuna ulaşıldığında protein saflaştırma işlemleri; hücre içerisinde yer alan proteinin çıkarılabilmesi için hücrenin parçalanması işleminin yapılması ile başlar. Hücresel kalıntıların azaltılması için saflaştırma prosesinin başında santifürüj kullanılabilir. Ardından prosese yönelik uygun saflaştırma basamakları, kromatografik yöntemler; boyut dışlama kromatografisi, afinite kromatografisi, kolon kromatografisi, Teğetsel Akış Filtrasyon (TFF), ultrafiltrasyon ve diafiltrasyon veya çeşitli filtrasyon teknikleri ile tamamlanır (Adler, Kelsey, Maik ve Song, 2021; Patent No. CN112552413A, 2020).

3.1.1.4. Adjuvanlama ve Formülizasyon:

Adjuvan eklenmesi, spesifik hücre reseptörlerini tetikleyebilir ve enjeksiyon bölgesinde ve drene olan lenf düğümlerinde doğal bağışıklık tepkisini indükleyebilir (Pollet ve diğ., 2021). Bu sebeple üretimin son aşamasında saflaştırılmış olan proteinler, immün yanıtı uyarmak ve antijen dozunun korunmasını sağlamak için fiziksel olarak adjuvanlanarak belirlenen dozda şişelenir (Soler ve Houdebine, 2007). Başarı ile kullanımda olan rekombinant protein aşılardan Hepatit B ve HPV aşılarda adjuvan olarak alüminyum tuzları kullanılmıştır. Covid -19 pandemisinde geliştirilen rekombinant protein aşılarda da en sık kullanılan adjuvant alüminyum hidroksit (Alum) olmuştur (Pollet ve diğ., 2021). Novavax (NVX-CoV2373/Covovax) aşısında nanopartiküler formunda kolesterol ve fosfolipitlerle formüle edilmiş Quillaja saponins, Matrix-M™ kullanılmıştır (Tian ve diğ., 2021).

3.2.VLP (Virüs Benzeri Parçacık) Aşıları ve Üretim Yöntemleri

VLP'ler yapısal olarak virüsü taklit eden aynı zamanda virüsün genetik materyalini taşımadığı için replike olamayan çoklu protein yapılarıdır. Zarf ve/veya kapsit proteinlerden oluşurlar, lipid zarf da içerebilirler. Eksprese edilmesi tasarlanan viral kapsidler konformasyonel olarak virüs orjinalindeki gibi oldukları için hücresel reseptörlerle fonksiyonel etkileşimleri de virüsü taklit eder (Roldão, Mellado, Castilho, Carrondo ve Alves, 2010). Koruyucu aşı olarak kullanılmalarının yanı sıra kanser immüterapi, otoimmünite, alerji ve bağımlılık tedavilerinde de kullanılabilirler. Hem humoral (MHC-II stimülasyonu) hem de hücre bazlı bağışıklık tepkisine yol açarlar (MHC-I) (Al-Barwani, Donaldson, Pelham, Young ve Ward, 2014). Yaklaşık 20–800 nm çaplarından dolayı lenf düğümlerinde tutulabilirler bu sayede koruyucu T yanıtını tetiklerler (Tagliamonte, Tornesello, Buonaguro ve Buonaguro, 2017; Karandikar, Mirani, Waybhave, Patravale ve Patankar, 2017).

Memeli hücreleri, böcek hücreleri, bakteriler (*E. coli*), maya ve bitki hücreleri kullanılarak üretilebilirler. Memeli hücreleri ile zarflı VLP yapıları üretilirken, bakulovirüs-böcek hücrelerinde komplike ve yüksek post translasyonel modifikasyonlara gerek duyulan VLP'lerin üretimi tercih edilir (Tagliamonte, Tornesello, Buonaguro ve Buonaguro, 2017).

Kanada'da "Medicago" ve Amerika'da "Kentucky BioProcessing" in klinik deneme aşamalarında aşı adayları mevcuttur (Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults, 2021). Bu aşı adayları üretimi için *Nicotinia benthamiana* bitkisi transgeni taşıyan *Agrobacterium tumefaciens* ile enfekte edilerek gen modifikasyonu sağlanır ve ilgili protein anlatımı sağlanmış olunur. *N. Benthamiana* manipilasyon kolaylığı ve daha kolay bir agroinfiltrasyon prosesi ile indirek gen transferi sağladığı için tercih edilir (Chen ve diğ., 2013). Gen transferinden sonra, 4-6 günlük inkübasyon gerçekleşir ve VLP üretilmiş

olur. Hasat edilen bitkiden VLP ekstrakte edilir ve saflaştırılır.

Farklı bir teknolojik yaklaşım olan SpyTag/SpyCatcher protein ("superglue") teknolojisi ile SpyBiotech firmasının aşı adayı Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) VLP'lerinin yüzeyinde koronavirüs spike protein gösterimi yapar. Bu aşı Faz I/II denemesindedir ("SpyBiotech and Serum Institute of India Announce That the First Subjects Have Been Dosed in a Phase I/II Trial of a Novel Virus-like Particle Vaccine Targeting COVID-19," 2020; Thrane, 2016).

Ayrıca hesaplamalı olarak tasarlanmış sentetik VLP'ler de mevcuttur. Örneğin, RBD, SpyTag/SpyCatcher aracılığıyla sentetik "SpyCatcher003-mi3" VLP üzerinde verimli bir şekilde görüntülenebilir (Tan ve diğ., 2021).

VLP aşılarda kullanılan diğer anlatım sistemlerinden biri rekombinant bakulovirüs-böcek hücresi (*Spodoptera frugiperda* - Sf9) ekspresyon sistemidir (Gopal ve Schneemann, 2018).

1980'lerde bakulovirüs vektörleri viral gen anlatımında oldukça tercih edilen bir sistem olmuştur. Yüksek düzeyde protein ekspresyonu, güvenlik, ölçeklenebilirlik ve ökaryotik post-translasyonel modifikasyonların gerçekleşmesi sistemin avantajları arasındadır (Gopal ve Schneemann, 2018).

VLP üretimi için en yaygın kullanılan iki böcek hücre türü, *Spodoptera frugiperda* (Sf9 veya Sf21) ve *Trichoplusia ni* (*T. ni* veya High Five) hücreleridir. *T. ni* hücreleri, hücrelerine kıyasla verimi önemli ölçüde arttırır (Gopal ve Schneemann, 2018).

Üretilmesi için, hedef geni eksprese eden rekombinant-baculovirus-transfer vektörü konstrakte ve izole edilir. *T. ni* hücreleri virüs ile enfekte edilir, 3 gün sonra hasat edilen kültürde hücrelerin %50'si ölmüş ama liziz olmamış olur. Pellet ile devam edilir, hücre liziz tamponu ile muamele edilir. Santrifüjlendikten sonra süpernatant ile devam edilir. %30 (w/w) sukroz gradient ve art arda birkaç %10-40 sukroz

gradient santrifüj uygulanır. Son basamakta elde edilen orta fazda yer alan mavi tonda beyaz bant VLP'leri içerir (Gopal ve Schneemann, 2018).

Icosavax firmasının geliştirdiği 60 kopya RBD gösterimi yapan VLP aşısı olan IVX-411, Seqirus firmasının geliştirdiği MF59 adjuvanı ile beraber verilerek faz çalışmalarına katılmıştır. Çalışma şu an Avustralya'da Faz I/II aşamasındadır (Icosavax Initiates Phase 1/2 Trial of COVID-19 VLP Vaccine Candidate, 2021). Ancak dünyada Faz-III aşamasına geçmiş sadece bir tane VLP aşısı adayı olup Medicago firması tarafından üretilmiştir (Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults, 2021).

3.2.1. VLP Üretim Yöntemleri

Genel olarak rekombinant protein üretim metodlarına benzemektedir. Hücrelerin üretimi sonrası süpernatant kısmında VLP yeterli miktarda yok ise hücreler liziz edilir. Saflaştırma basamağından önce hücre sedimentasyonu, derin filtrasyon veya TFF ile klarifikasyon işlemi yapılır, böylelikle hücre debris ve agregatlardan arındırılır. Konakçı hücre kontaminantlarından veya besiyeri bileşenlerinden kurtulmak için ultrafiltrasyon/diafiltrasyon (UF/DF) ve membranlı veya içi boş fiberli TFF yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. VLP elüsyonu için ise afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılır. Final saflaştırma işleminden sonra, filtre ile sterilizasyon ve final formulasyona geçilir. Bugüne kadar VLP aşılarda genellikle alüminyum tuzları adjuvan olarak kullanılmıştır (Nooraei ve diğ., 2021).

4. Viral Vektör (Adenovirüs)

Aşılari

Viral vektör aşılari, antijeni kodlayan genlerin replikasyon yeteneği ortadan kaldırılmış bir virüse eklenmesi yolu ile geliştirilen aşılardir. Viral vektör olarak en çok kullanılan virüsler Adenovirüslerdir. Adenovirüsler, zarf içermeyen çift sarmallı DNA virüsleridir. Boyutlari yaklaşık olarak 30-40 kilo

baz çiftidir. (Vemula ve Mittal, 2010). İlk Adenovirüs 1953'te insan adenoid dokusundan izole edilmiştir (Rowe, Huebner, Gilmore, Parrott ve Ward, 1953). Adenovirüs genomu nispeten kompakttır, bu da onu yabancı DNA'nın yerleştirilmesi için cazip bir seçenek haline getirir. Adenovirüs E1A geninin silinmesi, virüsün çoğalma yeteneğini ortadan kaldırır. Bu yetenek, örneğin E1A proteinini eksprese eden konakçı hücreler kullanılarak hücre kültüründe çoğalma sırasında geri yüklenebilir, böylece hedeflenen antijen çoğaltılmış olur (Tatsis ve Ertl, 2004).

Yapılan çalışmalarda grip benzeri hastalık yapan adenovirüsler genetik müdahale sonrası SARS-Cov-2 spike protein geni eklenerek insanda bağışıklık oluşturması amaçlanmıştır. Gamaleya Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen Sputnik-V, Oxford Üniversitesi - AstraZeneca tarafından geliştirilen Oxford/AstraZeneca (AZA-1222) ve CanSino Biologics tarafından geliştirilen ticari adı Convidecia olan AD5-nCOV aşıları viral vektör (Adenovirüs) aşılardır (Okuyay, 2020). Adenovirüs aşılarının içindeki mikroorganizmalar canlı olmakla birlikte, güçsüzleştirildiklerinden dolayı insanlarda ciddi bir hastalık yapamazlar. Saklama koşulları 2-8°C arasında olduğu için ayrı bir altyapı gerektirmez. Ayrıca Adenovirüs vektör bazlı aşılar, BSL-3 laboratuvarlarına ihtiyaç duymadan hücre kültürü tabanlı teknoloji ile kısa sürede ucuz bir şekilde büyük miktarlarda üretilebilir ve stoklanabilirler. Viral vektör aşıları sistemik ya da mukozal bir yoldan vektör verilmesine yanıt olarak antijene özgü humoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkilerinin yüksek seviyelerinin geliştirilmesini sağlar (Bangari ve Mittal, 2006). Bunların yanı sıra, viral vektörler ile hazırlanan aşılarda doz ayarı kritiktir, yüksek doz öldürücü olabilir. Viral vektör aşılarında taşıyıcı olarak kullanılan virüslere karşı daha öncesinde vücut tarafından geliştirilmiş bağışıklık var ise, aşının etkinliği düşebilir. Aynı zamanda, viral vektörlerin replikasyon özelliklerini yeniden kazanma ihtimali gibi dezavantajları vardır (Sing, Kumar ve Agrawal, 2019).

4.1. Viral Vektör (Adenovirüs) Aşılarının Üretim Yöntemleri

Viral aşılarda büyük ölçekli üretimi, verimli ölçeklenebilir üretim ve saflaştırma yöntemleri gerektirir (Monika Lusky, 2005). Adenovirüs vektörlerinin büyümesini destekleyen çeşitli hücre hatlarının büyük ölçekli çoğaltılması için mikrotarıyıcı biyoreaktör sistemleri ve süspansiyon hücre kültürü biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır. Bu büyük ölçekli memeli hücre kültürü sistemleri, ölçek büyütme potansiyeli, hasat ve sonraki işlem kolaylığı, süreç kontrolü ve düşük üretim maliyetlerini içeren çeşitli avantajlara sahiptir. Adenovirüs vektör üretimi için adherent, insan embriyonik böbrek (HEK 293) hücrelerinin büyük ölçekli üretimi mikrotarıyıcı biyoreaktör sistemlerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Iyer, Ostrove, ve Vacante, 1999). Bu sistemler, yüksek bir yüzey-hacim oranı sağlamaları nedeni ile yüksek viral titrelere ve yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılmasını sağlar (U.S. Patent No. 5994134, 1999). Süspansiyon kültürü biyoreaktörlerinde de Adenovirüs vektörlerinin büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilebilir. Bu sistemlerde Adenovirüs vektörlerinin üretimi için per.C6 (insan embriyonik retinal hücre hattı) ve 293SF gibi sürekli hücre hatları kullanılır. Serumsuz süspansiyon kültür sistemlerinin çalıştırılması ve yüksek hacimlere (1000-10000 L) kadar ölçeklendirilmeleri mikrotarıyıcı kültür sistemlerine göre daha kolaydır (Tsao, Condon, Schaefer, Lio ve Liu, 2001).

Adenovirüs vektörlerinin saflaştırılmasında genellikle sıralı kromatografi veya kromatografi içeren iki aşamalı saflaştırma adımları (ultrasantrifüjleme/filtreleme) kullanılır. Bu iki aşamalı işlemler, nükleaz ile muamele edilmiş (Benzonaz/Pulmozim) hücre lizatından Adenovirüsü yakalamak için bir ilk kromatografi adımından ve hücresel ve virüssüz proteinlerden kurtulmak için polishing kromatografisinin (Polishing kromatografi, biyofarmasötik üretiminin son aşamasında çok küçük

miktarlardaki safsızlıkların giderilmesini tanımlamak için kullanılan terimdir) kullanıldığı ikinci bir adımdan oluşur. Kromatografik tekniklerinin kullanımı, saflaştırma aşamasında verimi artırmaktadır (Vemula ve Mittal, 2010).

5. Sentetik Peptit Aşılar

Peptit aşıları, belirli bir patojene karşı bağışıklık oluşturmak için geliştirilen ve patojenin sahip olduğu proteinin belirli bir kısmını sentetik olarak taklit eden aşılardır. Bu aşılarda kullanılan peptitler, bir antijenin spesifik epitopunu temsil eden immünojenik bir peptit molekülünü oluşturmak üzere sentezlenen 20-30 amino asit dizisinden oluşur (Topuzoğulları ve diğ., 2020). Peptit aşıları, yüksek oranda hedeflenmiş bağışıklık tepkilerinin indüklenmesini sağlamak için kısa peptit parçalarının kullanımına dayanan ve sonuç olarak alerjenik ve/veya reaktogenik yanıtlardan kaçınan alternatif bir aşı stratejisidir (Li, Joshi, Singhanian, Ramsey ve Murthy, 2014).

Antijenik epitopların bazıları immün yanıtı oluşturmakta başarılı olurken, bazıları koruyucu bağışıklığın indüklenmesine zarar verebilir. Bu durum, yalnızca pozitif indükleyen ve aynı zamanda T ve B hücreleri bağlantılı bağışıklık oluşturan epitoplarla geliştirilebilen sentetik peptit aşılarına ilgi yaratmıştır (Sesardic, 1993). Peptit bazlı aşıların üretimi yüksek güvenlik laboratuvar ve hücre kültürü çalışmaları gerektirmediği için geleneksel aşılarla oranla daha düşük maliyetli ve güvenlidir. Ancak peptitler küçük moleküller olup, immün yanıtın düşük olmasına sebep olabilirler. İmmün yanıtın artırılması için taşıyıcı moleküller ve adjuvanlar eklenebilmektedir (Özcan, Karahan, Vijayaraj Kumar, Leng Tan, ve Na Tee, 2020).

Doğru tasarlanmış bir aşı, güçlü ve uzun süreli hücre dışı ve hücre içi bağışıklık yanıtı oluşturmali, ancak daha da önemlisi, hedeflenen hastalığa karşı koruma sağlamalıdır. Peptit bazlı aşılar, genellikle kimyasal yöntemler uygulanarak oluşturulur. Kimyasal sentez, antijenlerin biyolojik kontaminasyonu ile ilgili tüm sorunları ortadan

kaldırabilir. Peptit üretimi kolay, yeniden tasarlanmaya müsait, hızlı ve uygun maliyetlidir. Peptitler, spesifik antijen epitopu üretimi için özelleştirilebilirler. Aynı zamanda bu aşılar, çoklu epitop yaklaşımı kullanılarak tek bir aşı içerisinde birkaç suşu hatta farklı patojeni hedef alacak şekilde de tasarlanabilir. Peptit aşıları, genellikle suda çözünür ve temel saklama koşulları altında stabildir (genellikle soğuk zincir gerektirmezler) (Skwarczynski ve Toth, 2016).

Gelişen teknoloji ile birçok peptit aşısı çalışması hız kazanmıştır, bunlar; insan immün yetmezlik virüsü (HIV), Hepatit C virüsü (HCV), Malaria (sıtma), Ayak ve El hastalığı (FMDV), İnsan papilloma virüsü (HPV) şeklinde örneklendirilebilir (Pelit Arayıcı, Acar, Karahan ve Mustafaeva, 2016).

Covid-19 pandemisinde Rusya'daki Vektör Devlet Viroloji ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi tarafından geliştirilen "EpiVacCorona", peptit bazlı bir koruyucu aşıdır. EpiVacCorona üreticilerine göre ise EpiVacCorona, halihazırda vücut bağışıklık sistemi tarafından tanınacak B hücre epitoplarını barındırmaktadır. Aşıda tüm peptitler, kimerik genin ekspresyon ürünü olan bir taşıyıcı proteine konjuge edilmiştir. Bu kimerik gen, farklı organizmalardan kaynaklanan iki genin, yani bir viral nükleokapsid proteinini kodlayan ve bir bakteriyel maltoz bağlayıcı proteini (MBP) kodlayan genin konjugasyonu ile oluşturulmuştur. Sonuç olarak, viral spike protein, nükleokapsid proteini ve MBP aşıya dahil edilmiştir. Alüminyum içeren bir adjuvan üzerine adsorbe edilmiş olarak hazırlanan aşı, Ocak 2021'de faz çalışmalarını tamamlamış ve Rusya Federasyonu ve Türkmenistan tarafından onaylanmıştır (Carlson ve Lutmer, 2021).

5.1. Sentetik Peptit Aşıların Üretimi

Aday bir sentetik peptit aşısının geliştirilmesi; enfektif ajanın immün-aktif bölgesinin seçimi ile başlar. Seçilen antijenik bölgenin peptitler ile sentezi ve gerekiyorsa bir taşıyıcı ile konjugasyonu sağlanır (Li, Joshi, Singhanian, Ramsey ve Murthy, 2014). Elde edilen aşı adayının deney hayvanları

üzerinde testi yapılarak, immünojenitesi ve koruyucu özelliklerinin belirlenmesi yapılır. Pre-klinik çalışmaların tamamlanmasının ardından klinik çalışmalar başlatılır (Faz I-II-III). Aşı adayının seri üretimi için gerekli olan laboratuvar altyapısı sağlandıktan sonra büyük ölçek üretime başlanır (Moisa ve Kolesanova, 2010). Peptit bazlı aşuların üretimi; peptit sentezi, peptit ve taşıyıcı proteinlerin konjugasyonu ve adjuvanlama/formülasyon basamaklarını kapsar.

5.1.1. Peptit Sentezi

Sentetik peptit aşularının üretiminde en dikkat çekici nokta epitop bölgesinin seçimi (immünojenik özelliği yüksek olan bölgenin seçimi) ve seçilen peptitin uygun yöntemle üretiminin sağlanmasıdır. Başarılı peptit sentezi, uygun reçinelerin, bağlayıcıların, aminoasitlerin ve birleştirme reaktiflerinin doğru seçimine bağlıdır. Sentez için genellikle katı faz peptit sentez yöntemi, sıvı faz peptit sentez yöntemi, genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalar veya hedef proteinlerin fragmanlara ayrılması gibi yöntemler kullanılır (Edelstein, Scott, Sherlund, Hansen ve Hughes, 1986), (RU Patent No. 2738081C1, 2021). Peptit üretiminin tek bir adımda yapılıyor olması endüstriyel ölçekte yapılacak olan çalışmalara maliyet ve zaman açısından büyük avantaj sağlar.

5.1.2. Peptit ve Taşıyıcı Proteinlerin Konjugasyonu

Peptitlerin bağışıklık yanıtını yükseltmek için taşıyıcı bir protein ile konjugasyonu gerekebilir, bu sebeple peptit sentezinin ardından taşıyıcı proteinin temini veya üretimi yapılmalıdır. Taşıyıcı protein olarak; sığır serum albümin (BSA), ovalbümin (OVA), maltoz bağlayıcı protein (MBP), anahtar deliği limpet hemosiyanin (KLH) veya farklı rekombinant proteinler kullanılabilir (RU Patent No. 2738081C1, 2021). Endüstriyel ölçekte bazı taşıyıcı proteinler ticari olarak alınabileceği gibi, rekombinant olarak da üretilebilir, fakat rekombinant protein üretimi endüstriyel ölçek için zaman alıcı ve maliyetli olabilir.

Peptit ve proteinin arasında oluşturulmak istenen kovalent bağ için farklı kimyasallar kullanılmaktadır; Glutaraldehit, Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), Sulfo-SMCC ve EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide gibi. Seçilen konjugasyon ajanının ilk olarak, taşıyıcı protein ile bağ yapması sağlanır (farklı sıcaklıklar ve inkübasyonlar ile). Ardından sefaroz rezin kolonu ile saflaştırılması yapılır ve peptitlere bağlanması için tekrar inkübasyon yapılır. Oluşan kompleks, son olarak sefaroz kolondan geçirilir ve bağlanmayan peptitlerden arındırılır (RU Patent No. 2738081C1, 2021).

5.1.3. Adjuvanlama ve Formülasyon

İmmün yanıtın artırılması ve antijenik yapının vücut içerisinde daha uzun süre kalması için adjuvanlama yapılır. Adjuvanlama için; Freund's adjuvant (CFA, FCA), alüminyum hidroksit veya MF59 adjuvanları kullanılabilir (RU Patent No. 2738081C1, 2021). Endüstriyel ölçekte, doz içerisinde bulunması gereken peptit konsantrasyonu belirlendikten sonra adjuvanlama için bir tank kullanılabilir. Bu aşamada karışım hızı, sıcaklık ve adjuvan konsantrasyonu çok önemlidir. (Edelstein ve diğ., 1986).

Sentetik peptit aşular, üretim kolaylığı, uygun maliyeti ve herhangi bir patojen içermemesi ile geleneksel aşulara göre avantajlıdır. Sentetik peptit aşularının üretimi ve kontrolü ile ilgili WHO tarafından 1999 yılında yayınlanmış bir Annex-I raporu bulunmaktadır (World Health Organization, 1999).

6. mRNA Aşular ve Üretim Yöntemi

mRNA aşular ilk olarak 1990 yılında J. A. Wolff ve arkadaşları tarafından çıplak, in vitro transkript edilmiş mRNA'nın fare kasına doğrudan enjeksiyonu sonrasında in vivo olarak eksprese edildiği bulunduğu beri dikkatleri üzerine çekmektedir (Wolff ve diğ., 1990), (Zhang,

Maruggi, Shan ve Li, 2019). Daha sonra çeşitli bulaşıcı patojen ve kanser aşılı mRNA teknolojisi kullanılarak çalışılmıştır. Kuduz, HIV, ebola bu bulaşıcı hastalıklara örnek olarak verilebilir (Zhang ve diğ., 2019).

mRNA aşılılarının temel çalışma prensibi; yapay olarak belirli bir veya birden fazla antijenik immünojeni kodlayabilecek şekilde sentezlenen mRNA'nın lipid nanopartiküller içerisinde konak hücrenin sitoplazmasına iletilmesine dayanır. Daha sonra konak hücrenin ribozomu ile hücreye giren transkriptin translasyonu gerçekleşir. Son olarak oluşan immünojenik proteinler eksprese edilir ve hücre membranında veya dışarı salınarak sunulur. Böylece kişinin kendi hücreleri viral protein üretimini gerçekleştirir ve hücre içine virüs veya virüs parçası girmeden bağışıklık sağlanmış olur (Kowalzik ve diğ., 2021), (Schoenmaker ve diğ., 2021), (Peters, 2020).

Sentezlenen mRNA modifikasyona uğratılabilen bir yapıdır. Dolayısıyla uygun modifikasyonlarla stabilite ve translasyon verimi artırılabilir. Hem CD4+ hem CD8+ T hücrelerini aktive ederek güçlü bir bağışıklık yanıtı oluştururlar. Büyük bir kitle için büyük ölçekli üretimi diğer aşılara nazaran daha kolay ve ucuzdur (Wang, Kream, ve Stefano, 2020), (Kowalzik ve diğ., 2021).

mRNA aşılı hızlı bir şekilde geliştirilebilir olması gibi sahip olduğu önemli avantajlar sayesinde pandemide öne çıkan çalışmalardan olmuştur. 2020 yılında virüsün genomu sekanslandıktan 10 hafta sonra faz çalışmalarına geçilmiş ve aşı ilk gönüllüye uygulanmıştır (Zeng, Zhang, Walker ve Dong, 2020). mRNA vücuda verildikten sonra doğal yıkıma uğrar dolayısıyla enfeksiyon ve mutagenез riski en aza iner. Bunun yanında mRNA hassas bir yapı olduğu için dağıtımında (Biontech için -70°C, Moderna için -20°C) soğuk zincir oluşturulmalıdır. Bu da bazı ülkelerin aşılı ulaşımını zorlaştırmaktadır (Pardi, Hogan, Porter ve Weissman, 2018).

6.1. mRNA Aşılı Üretim Yöntemi

6.1.1. mRNA'nın Yapısı:

Ökaryotik mRNA'nın 4 ana unsuru bulunur; 5' Şapka (5' Cap), tercüme edilmeyen bölge (untranslated region, UTR) (5'UTR VE 3' UTR), açık okuma penceresi (open reading frame, ORF), poli (A) kuyruğu. 5' ucundaki Şapka, translasyonun başlamasını sağlarken mRNA'nın bütünlüğünün korunmasına da yardımcı olur. UTR bölgelerinde bulunan özel sekanslar post transkripsiyonel gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alır. Dolayısıyla translasyon verimi üzerinde önemli etkileri vardır. ORF, hedef proteinin genetik bilgisini taşır. Poli (A) kuyruğu mRNA'nın 3' ucundan 5' ucuna doğru nükleaz degradesiyonundan koruyarak bütünlüğü sağlar. Bunu PABP'ye (poli (A) bağlanma proteini) bağlanarak gerçekleştirir ve bu kuyruğun uzunluğu PABP'ye güçlü bir şekilde bağlanabilmesi açısından önemlidir (Kwon ve diğ., 2018), (El Hajjami, Brantner, Boumlic, Mantri ve Cebi, 2021).

6.1.2. Plazmid DNA Üretimi, Linearizasyonu ve Saflaştırılması

Üretim, sentezlenecek mRNA'nın gen dizisini ve bir DNA'ya bağımlı RNA polimeraz promotörü içeren pDNA (plazmid DNA) tasarımı ile başlar. Bu aşama bütün prosesi etkileyeceği için oldukça önemlidir. Tasarlanan pDNA'lar *Escherichia coli* kullanılarak çoğaltılır. pDNA, restriksiyon enzimi ile istenmeyen mRNA formlarından kaçınmak için linearize edilir ve DNA'ya bağımlı RNA polimeraz (T7, T3, SP6 gibi) kullanılarak bir *in vitro* transkripsiyon (IVT) reaksiyonu için bir şablon olarak kullanılır. Linearize edilme süreci ısı (65 °C) veya EDTA kullanılarak durdurulur. Bu işlemler sonucunda ortamda safsızlık oluşturan restriksiyon enzimleri, DNA fragmentleri, BSA ve diğer küçük moleküller bulunur. Dolayısıyla uzaklaştırılmaları gerekir. Saflaştırma için TFF ve kromatografi sıklıkla kullanılan etkili metotlardır

(El Hajjami ve diğ., 2021), (Jackson, Kester, Casimiro, Gurunathan ve Derosa, 2020).

6.1.3. mRNA Transkripsiyonu, 5' Ucuna Şapka Yapısının Eklenmesi

pDNA'nın saflaştırılmasından sonra mRNA'ya transkript edilmesi gerekir. Bu proses, RNA polimeraz enzimini ve nükleotid trifosfatların kullanıldığı enzimatik bir yöntemle gerçekleşir. Şablon olarak kullanılan pDNA mRNA'ya transkript olduktan sonra mRNA'nın yapısını koruyabilmesi ve hücre içinde ribozom tarafından tanınabilmesi için 5' ucuna Şapka yapısının eklenmesi gerekir. Bu yapı ko-transkripsiyonel olarak veya enzimatik olarak eklenir. Ko-transkripsiyonel metotta bir guanozin trifosfata dört cap analog oranında karışım hazırlanır. 37 °C'lik inkübasyon sonrasında DNAaz enzimleri ile DNA şablonu degrades edilir ve daha sonra mRNA'lar saflaştırılır. Enzimatik reaksiyon ise mRNA saflaştırıldıktan sonra 'vaccina virus capping' enzimi kullanılarak gerçekleşir. Ko-transkripsiyonel metot daha ucuz olsa da enzimatik reaksiyonun verimi daha yüksektir (Bancel, Issa, Aunins, ve Chakraborty, 2014; El Hajjami ve diğ., 2021).

6.1.4. mRNA Saflaştırılması

Üretilen mRNA'ların saflaştırma aşamasında, mRNA dışındaki safsızlıkları gidermek için TFF yöntemi sıklıkla kullanılır. Bu yöntemin avantajı saflaştırma, konsantre etme ve diafiltrasyonun tek bir ünite de gerçekleştirilebilir olmasıdır. TFF'e alternatif olarak ters fazlı iyon çifti, anyon değişimi veya afinite kromatografisi kullanılabilir (El Hajjami ve diğ., 2021; Patent No. WO 2014/152966 A1, 2014).

6.1.5. mRNA'nın Taşınması

Son aşama üretilen mRNA'ların vücuda doğru bir şekilde taşınmasıdır. Bunun için genelde lipid nanopartiküller kullanılır. Bu sistemler RNA ilaçları için en gelişmiş ve potent uygulamadır. 4 ana unsuru vardır. Nötral fosfolipid, kolesterol,

polietilen glikol (PEG)-lipid ve iyonlaşabilen katyonik lipid. Kolesterol, pozitif yüklü amin grupları içerir. mRNA'nın anyonik bir yapısı olduğu için etkileşime girer. Ayrıca hücreye giriş sırasında membran füzyonunu kolaylaştırır. PEG - lipid depolama sırasında agresyonu önler ve partikül boyutunu etkiler. Yaklaşık olarak 60 - 100 nm boyutunda partiküller oluşturur. mRNA, partiküllerin içerisine enkapsüle edilerek hücreye ulaştırılır (Schoenmaker ve diğ., 2021). Şu anda mRNA aşısı olarak onay almış 2 aşı çeşidi bulunmaktadır. Pfizer-BioNTech firmasına ait BNT162b2 aşısı ve Moderna şirketine ait mRNA-1273 aşısı. Her iki aşının da %95 koruma sağladığı bildirilmiştir (Baden ve diğ., 2021; Polack ve diğ., 2020).

7. Sonuç

Tüm dünyayı etkisi altına almış olan bu pandemiyi sonlandırmak için en önemli adım koruyucu etkisi olan aşı geliştirilmesidir. Dünya'daki birçok bilim insanı bu alanda çeşitli teknolojiler kullanarak farklı üretim metotlarına dayalı aşılar geliştirmeye çalışmaktadır. Bu çalışmaların, Covid-19 pandemisi ile mücadeleye pozitif etkilerinin yanı sıra gelecekteki aşı adaylarına da çok faydalı bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir. Tüm aşı üretim yaklaşımlarını ele alacak olursak; hızlı, düşük maliyetle üretilen, etkili ve uzun süreli immün yanıt sağlayan yöntemler bu yarışta öne çıkacaktır. Geleneksel yöntemler arasında yer alan inaktif aşı üretim prosesi günümüzde birçok virüs çeşidi için kullanılmaktadır. Bu sebeple üretim basamaklarının optimize edilmiş olması, benzer virüsler için kullanılmasında kolaylık ve hız kazandırır. Alüminyum bazlı etkisi bilinen adjuvanların kullanımı yöntemin güvenilirliğini artırır. Saklama koşulları ve taşınması nispeten kolaydır. Bu durum, aşının küresel olarak dağıtımını kolaylaştırır (Marcelino ve diğ., 2007; Liang ve diğ., 2020).

mRNA aşılarının yüksek immün yanıt sağlaması avantajlarından biridir. Covid-19

pandemisinde acil durum kullanım onayı olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak düşük sıcaklıkta saklama koşulu gerektirdiğinden, bazı ülkeler için soğuk zincir taşımada zorluk yaratabilir (Verdecia, ve diğerleri 2021).

Rekombinant protein aşıları güvenliği kanıtlanmış aşılardır, spesifik immün yanıt oluştururlar ancak teknolojik alt yapı gereksinimleri ve doğal bağışıklığın zayıf aktivatörü olmaları dezavantajlarındandır (Jeyanathan ve diğ., 2020).

VLP aşılarının virüsü taklit etmesi ve hastalık oluşturmaması bu aşıların öne çıkan özelliğidir. Ancak stabilitesinin zayıf olması gibi dezavantajları mevcuttur. (Dai, Wang ve Deng, 2018).

Viral vektör aşıları ölçek büyütme ve vektör geliştirilmesinde avantajlara sahiptir. Ancak Adenovirüse karşı daha önceden immün yanıt oluşturmuş kişilerde aşının etkinliği düşebilmektedir (Vannucci, Lai, Chiuppesi, Ceccherini-Nelli ve Pistello, 2013).

Sentetik biyolojinin gelişmesi ile sentetik peptit aşıları gibi teknolojik aşılar önem kazanmıştır. İmmünojenik epitopun peptitler ile sentezlenmesi prensibine dayanan aşıların üretimi hızlı ve kolaydır. Fakat küçük peptitler düşük immün yanıtlara sebep olabileceği için ek proteinlerin eklenmesi gerekebilir (Li, Joshi, Singhanian, Ramsey ve Murthy, 2014).

Tüm avantaj ve dezavantajlar ele alınarak üretim metotları değerlendirilmeli ve pandemi sürecinde her yaklaşımın değerli olduğu unutulmamalıdır. İncelenen üretim metotlarının ve klinik çalışmaların, günümüzdeki ve gelecekteki aşı çalışmalarına ışık tuttuğu açıkça görülmektedir.

8. Teşekkür

Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenen 11548NL numaralı, ""SARS-CoV-2 Virüsüne Karşı İnaktif Virüs Aşısı ile

Rekombinant Aşısı Üretimi için Preklinik Sonrası Proses Geliştirilmesi" başlıklı proje kapsamında hazırlanan derlemede kuruma destekleri için teşekkür ederiz.

9. Kaynaklar

- Adler, R., Kelsey, N., Maik, M., & Song, J. H. (2021). Production of a SARS-CoV-2 Spike Protein Vaccine Using the Baculovirus Expression Vector System. *Senior Design Reports (CBE)*. Erişim adresi: https://repository.upenn.edu/cbe_sdr/131
- Al-Barwani, F., Donaldson, B., Pelham, S. J. Young, S.L., & Ward, V.K. (2014) Antigen delivery by virus-like particles for immunotherapeutic vaccination. *Ther Deliv* 5:1223–1240. <https://doi.org/10.4155/tde.14.74>
- Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., ve diğerleri. (2021). Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 384(5), 403–416. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>
- Bancel, S., Issa, W. J., Aunins, J. G., & Chakraborty, T. (2014). Manufacturing Methods for Production of Rna Transcripts.
- Bangari, Dinesh S., & Suresh K. Mittal. (2006). "Development of Nonhuman Adenoviruses as Vaccine Vectors." *Vaccine* 24(7):849–62. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.08.101.
- Calina, D., Docea, A. O., Petrakis, D., Egorov, A. M., Ishmukhametov, A. A., Gabibov, A. G., ve diğerleri. (2020). Towards effective COVID-19 vaccines: Updates, perspectives and challenges (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 46(1), 3. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2020.4596>
- Carlson, R., & Lutmer, H. (2021). EpiVacCorona Vaccine — Precision Vaccinations. Erişim adresi: <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/epivaccorona-vaccine>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2020), Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/therapeutic-options.html>
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., ve diğerleri. (2013) Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med* 01:1–21. <https://doi.org/10.4172/atbm.1000103>
- Chen, W. H., Chag, S. M., Poongavanam, M. V., Biter, A. B., Ewere, E. A., Rezende, W., ve diğerleri. (2017). Optimization of the Production Process and Characterization of the Yeast-Expressed SARS-CoV Recombinant Receptor-Binding Domain (RBD219-N1), a SARS Vaccine Candidate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(8), 1961–1970. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.037>
- ClinicalTrials.gov. (2021). Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults. Erişim adresi: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04636697>
- ClinicalTrials.gov. (2021). Study of the Tolerability, Safety, Immunogenicity and Preventive Efficacy of the EpiVacCorona Vaccine for the Prevention of COVID-19. Erişim adresi: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04780035>
- Coronavirus disease (COVID-19): Vaccines.WHO., What types of COVID-19 vaccines are being developed? How would they work? (2021). Erişim adresi: [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7Dvegclid=CjwKCAjwjmlBhA4EiwAQdCbXgEpRqmN1zv1xwgjNghhEg9zGLvZdlf-wQX6AMrz87oGoZKl0jdTuBoCUUwQAvD_BwE](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines?adgroupsurvey=%7Badgroupsurvey%7Dvegclid=CjwKCAjwjmlBhA4EiwAQdCbXgEpRqmN1zv1xwgjNghhEg9zGLvZdlf-wQX6AMrz87oGoZKl0jdTuBoCUUwQAvD_BwE)
- Dai, L., & Gao, G. F. (2020). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology* 20 21:2, 21(2), 73–82. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
- Dai, S., Wang, H., & Deng, F. (2018). Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Journal of Immunological Sciences*, 2(2), 36–41. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2018/2.1118>
- Delrue, I., Verzele, D., Madder, A., & Nauwyck, H. J. (2012). Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: Merits, risks and challenges. *Expert Review of Vaccines*, 11(6), 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
- Edelstein, M., Scott, P. E., Sherlund, M., Hansen, A. L., & Hughes, J. L. (1986). Design Considerations for Pilot Scale Solid Phase Peptide Synthesis Reactors. *Chemical Engineering Science*, 41(4), 617–624.
- El Hajjami, N., Brantner, M. M., Boumlic, A., Mantri, S., & Cebi, B. (2021). Manufacturing Strategies for mRNA Vaccines and Therapeutics | Sigma-Aldrich. In Merck Technical Documents. Erişim adresi: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/white-papers/manufacturing-strategies-for-mrna-vaccines.html>

- Ellis, R. W. (2001). MIU 26 MEDICAL INTELLIGENCE UNIT 26 New Vaccine Technologies (R. W. Ellis, Ed.). Eureka.com / Landes Bioscience, 810 South Church Street. Erişim adresi: www.Eureka.com
- Giese, M. (2016). Types of Recombinant Vaccines. *Introduction to Molecular Vaccinology*, 199–232. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25832-4_9
- Giroux, D.D., Ramachandra, M., & Shabram, P. Viral production process. US5994134; (1999).
- Gopal, R. & Schneemann, A. (2018) Production and application of insect virus-based VLPs. *Methods Mol Biol* 1776:125–141. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7808-3_8
- Hartman, A. L., Cole, K. S., & Homer, L. C. (2012). Verification of Inactivation Methods for Removal of Biological Materials from a Biosafety Level 3 Select Agent Facility. *Applied Biosafety*, 17(2), 70–75. <https://doi.org/10.1177/153567601201700204>
- Heartlein, M., Derosa, F., Dias, A., & Karve, S. (2014). Patent No. WO 2014/152966 Al. WIPO (PCT). Erişim adresi: <https://patents.google.com/patent/WO2014152966A1/en#citedBy>
- Hsieh, C., Goldsmith, J.A., Schaub, J.M., ve diğerleri. (2020) Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. 0826:1–9
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., & Liu, S. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica* 2020 41:9, 41(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Icosavax Initiates Phase 1/2 Trial of COVID-19 VLP Vaccine Candidate, 2021. Erişim adresi: <https://investors.icosavax.com/news-releases/news-release-details/icosavax-initiates-phase-12-trial-covid-19-vlp-vaccine-candidate/>
- Iversen, P. L., & Bavari, S. (2021). Inactivated COVID-19 vaccines to make a global impact. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(6), 746–748. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00020-7)
- Iyer, P., Ostrove, J. & Vacante, D. (1999). "Comparison of Manufacturing Techniques for Adenovirus Production." *Cytotechnology* 30(1–3):169–72. doi: 10.1023/a:1008040221630.
- Jackson, N. A. C., Kester, K. E., Casimiro, D., Gurnathan, S., & Derosa, F. (2020). The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *Nature Partner Journals*. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8>
- Jeyanathan, M., Afkhami, S., Smaill, F., Miller, M. S., Lichty, B. D., & Xing, Z. (2020). Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nature Reviews Immunology*, 20(10), 615–632. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-00434-6>
- Karandikar, S., Mirani, A., Waybhave, V., Patravale, V. B., & Patankar, S. (2017). Nanovaccines for oral delivery-formulation strategies and challenges. In *Nanostructures for Oral Medicine* (pp. 263–293). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00011-0>
- Kocagöz, S. (2017). Aşı Teknolojisi ve Aşı Tipleri.
- Kon, T. C., Onu, A., Berbecila, L., Lupulescu, E., Ghiorgisor, A., Kersten, G. F., ve diğerleri. (2016). Influenza vaccine manufacturing: Effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. *PLoS ONE*, 11(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150700>
- Kowalzik, F., Schreiner, D., Jensen, C., Teschner, D., Gehring, S., & Zepp, F. (2021). mRNA-Based Vaccines. *Vaccines*, 9(390), 1–15.
- Kwon, H., Kim, M., Seo, Y., Moon, Y. S., Lee, H. J., Lee, K., & Lee, H. (2018). Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine. *Biomaterials*, 156, 172–193. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.034>
- Kyriakidis, N. C., López-Cortés, A., González, E. V., Grimaldos, A. B., & Prado, E. O. (2021). SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *Npj Vaccines* 2021 6:1, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>
- Li, W., Joshi, M. D., Singhanian, S., Ramsey, K. H., & Murthy, A. K. (2014). Peptide vaccine: Progress and challenges. *Vaccines*, Vol. 2, pp. 515–536. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>
- Liang, Z., Zhu, H., Wang, X., Jing, B., Li, Z., Xia, X., ve diğerleri. (2020). Adjuvants for Coronavirus Vaccines. *Frontiers in Immunology*,

11(November).

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589833>

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2010). *Molecular Cell Biology*. In Fourth Edition, W. H. Freeman.

MacLachlan, J. N., & Dubovi, E. J. (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. In Fourth Edition, Elsevier.

Marcelino, I., Vachiéry, N., Amaral, A. I., Roldão, A., Lefrançois, T., Carrondo, M. J. T. ve diğerleri. (2007). Effect of the purification process and the storage conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. *Vaccine*, 25(26), 4903–4913. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.055>

Moisa, A. A., & Kolesanova, E. F. (2010). Synthetic peptide vaccines. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 4(4), 321–332. <https://doi.org/10.1134/S1990750810040025>

Monika Lusky. 2005. "Good Manufacturing Practices Production of Adenoviral Vectors for Clinical Trials." *Human Gene Therapy* 291(March):281–91.

Montagnon, B. J., Fanget, B., & Vincent-Falquet, J. C. (1984). Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. *Reviews of Infectious Diseases*, 6 Suppl 2(June), 0–3. https://doi.org/10.1093/clinids/6.supplement_2.s341

Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), 1102. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>

Ndwandwe, D., & Wiysonge, C. S. (2021). COVID-19 vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 71(Figure 1), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.003>

Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z.S., ve diğerleri. (2021) Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnology* 19:59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>

Novavax Publishes Results of United Kingdom Phase 3 Clinical Trial in New England Journal of

Medicine, Demonstrating High Levels of Efficacy of COVID-19 Vaccine - Jun 30, 2021. (2021). Erişim tarihi ve adresi: 9 Ağustos 2021, <https://ir.novavax.com/2021-06-30-Novavax-Publishes-Results-of-United-Kingdom-Phase-3-Clinical-Trial-in-New-England-Journal-of-Medicine.-Demonstrating-High-Levels-of-Efficacy-of-COVID-19-Vaccine>

Okuy, P. (2020). "Covid-19 Aşı Çalışmaları." *Türk Tabipleri Birliği Covid-19 Pandemisi Altıncı Ay Değerlendirme Raporu*, 228–52.

Özcan, Ö. Ö., Karahan, M., Vijayaraj Kumar, P., Leng Tan, S., & Na Tee, Y. (2020). New Generation Peptide-Based Vaccine Prototype. In *Prototyping Technology* (pp. 1–20). <https://doi.org/10.5772/intechopen.89115>

Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>

Pelit Arayıcı, P., Acar, T., Karahan, M., & Mustafaeva, Z. (2016). Review Paper / Derleme Makalesi A New Approach For Development Of Synthetic Peptide Vaccines For Viral Infections. *Sigma J Eng ve Nat Sci*, 7(2), 193–204.

Peters, J. (2020). What are the advantages of an mRNA vaccine for COVID-19? *Massive Science*. Erişim adresi: <https://massivesci.com/articles/mrna-vaccine-covid19-coronavirus-moderna/>

Philippidis, A. (2020). The Cold Truth about COVID-19 Vaccines. Erişim adresi: <https://www.genengnews.com/news/the-cold-truth-about-covid-19-vaccines/>

Pino, P., Kint, J., Kiseljak, D., Agnolon, V., Corradin, G., Kajava, A. V., ve diğerleri (2020). Trimeric SARS-CoV-2 Spike Proteins Produced from CHO Cells in Bioreactors Are High-Quality Antigens. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 1539, 8(12), 1539. <https://doi.org/10.3390/PR8121539>

Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., ve diğerleri. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 383(27), 2603–2615. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034577>

- Pollet, J., Chen, W. H., & Strych, U. (2021a). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 71. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.001>
- Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176. <https://doi.org/10.1586/erv.10.115>
- Rowe, P.W., Ruebner, H. J., Gilmore, L. K., Parrott R.H., & Ward T. K. (1953). Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84(3):570-573. doi:10.3181/00379727-84-20714
- Sabbaghi, A., Miri, S. M., Keshavarz, M., Zargar, M., & Ghaemi, A. (2019). Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Reviews in Medical Virology*, 29(6), 1–11. <https://doi.org/10.1002/rmv.2074>
- Sapsford, K.E., Algar, W.R., Berti, L., ve diğerleri. (2013) Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem Rev* 113:1904–2074. <https://doi.org/10.1021/cr300143v>
- SCB-2019 as COVID-19 Vaccine (NCT number): NCT04405908. (2021). 11 Ağustos 2021 tarihinde ClinicalTrials.gov'dan erişilmiştir. Erişim adresi: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04405908>
- Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., & Crommelin, D. J. A. (2021). mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 601, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>
- Sesardic, D. (1993). Synthetic peptide vaccines. *Medical Microbiology*, 39, 241–242.
- Singh, S., Kumar, R., & Agrawal, B. (2019). Chapter 4 Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies : Current Status and Future Prospects.
- Skwarczynski, M., & Toth, I. (2016). Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science*, 7(2), 842–854. <https://doi.org/10.1039/c5sc03892h>
- Soler, E., & Houdebine, L. M. (2007). Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnology Annual Review*, 13, 65–94. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13004-0](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13004-0)
- SpyBiotech and Serum Institute of India announce that the first subjects have been dosed in a Phase I/II trial of a novel virus-like particle vaccine targeting COVID-19. (2020, September 8). Erişim adresi: <https://www.spybiotech.com/news/-/>
- Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ. (2021).
- Stuible, M., Gervais, C., Lord-Dufour, S., Perret, S., L'Abbé, D., Schrag, J., ve diğerleri. (2021). Rapid, high-yield production of full-length SARS-CoV-2 spike ectodomain by transient gene expression in CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 326, 21. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2020.12.005>
- Tagliamonte, M., Tornesello, M.L., Buonaguro, F. M., & Buonaguro, L. (2017) Virus-Like Particles. In: *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*. Elsevier, pp 205–219
- Tan, T.K., Rijal, P., Rahikainen, R., ve diğerleri. (2021) A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses. *Nat Commun* 12:542. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20654-7>
- Tanriover, M. D., Doğanay, H. L., Akova, M., Güner, H. R., Azap, A., Akhan, S., ve diğerleri (2021). Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet*, 398(10296), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01429-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01429-X)
- Tatsis, N., & Ertl, H.C.J. (2004). "Adenoviruses as Vaccine Vectors." *Molecular Therapy* 10(4):616–29. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013.
- Terkis, S., Pavel, I., Yetiskin, H., Aydin, G., Id, C. H., Uygut, M. A., ve diğerleri. (2020). Isolation and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in Turkey. 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238614>
- Thomassen, Y. E., van 't Oever, A. G., Vinke, M., Spiekstra, A., Wijffels, R. H., van der Pol, L. A., & Bakker, W. A. M. (2013). Scale-down of the inactivated polio vaccine production process. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(5), 1354–1365. <https://doi.org/10.1002/bit.24798>

- Thrane, S., Janitzek, C.M., Matondo, S., ve diğerleri. (2016). Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. *J Nanobiotechnology* 14:30. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0181-1>
- Tian, J.H., Patel, N., Haupt, R., ve diğerleri. (2021). SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat Commun* 12: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20653-8>
- Topuzoğulları, M., Acar, T., Pelit Arayıcı, P., Uçar, B., Uğurel, E., Abamor, E. Ş., Arasoğlu, T., Turgut-Balik, D., & Derman, S. (2020). An insight into the epitope-based peptide vaccine design strategy and studies against COVID-19. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 44(3), 215–227. <https://doi.org/10.3906/biy-2006-1>
- Toriniwa, H., & Komiya, T. 2007. Japanese encephalitis virus production in Vero cells with serum-free medium using a novel oscillating bioreactor. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.02.002>
- Tsao, Y.S., Condon, R., Schaefer, E., Lio, P., & Liu, Z. (2001). "Development and Improvement of a Serum-Free Suspension Process for the Production of Recombinant Adenoviral Vectors Using HEK293 Cells." *Cytotechnology* 37(3):189–98. doi: 10.1023/A:1020555310558.
- Turner, G. S., Squires, E. J., & Murray, H. G. S. 1970. Inactivated smallpox vaccine. A comparison of inactivation methods. *Journal of Hygiene*, 68(2), 197–210. <https://doi.org/10.1017/S0022172400028679>
- van Riel, D., & de Wit, E. 2020. Next-generation vaccine platforms for COVID-19. *Nature Materials* (2020) 19:8, 19(8), 810–812. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0746-0>
- Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., ve Pistello, M. (2013). Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*, 36(1), 1–22.
- Vemula, S.V., & Mittal, S.K. 2010. "Production of Adenovirus Vectors and Their Use as a Delivery System for Influenza Vaccines." *Expert Opinion on Biological Therapy* 10(10):1469–87. doi: 10.1517/14712598.2010.519332.
- Verdecia, M., Kokai-Kun, J. F., Kibbey, M., Acharya, S., Venema, J., ve Atouf, F. (2021). COVID-19 vaccine platforms: Delivering on a promise? *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 00(00), 1–21. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.1911204>
- Wang, F., Kream, R. M., & Stefano, G. B. (2020). An evidence based perspective on mRNA-SARScov-2 vaccine development. *Medical Science Monitor*, 26, 1–8. <https://doi.org/10.12659/MSM.924700>
- Wang, J., Peng, Y., Xu, H., Cui, Z., & Williams, R. O. (2020). The COVID-19 Vaccine Race: Challenges and Opportunities in Vaccine Formulation. *AAPS PharmSciTech*, 21(6), 1–12. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01744-7>
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, 247(4949), 1465–1468.
- World Health Organization. (1999). Guidelines for the production and quality control of synthetic peptide vaccines.
- Xiaojuan, C., Chen Yan, Hou Ye, Lan Qin, Si Huanhuan ve Song Chunyu. (2020). Patent No. CN112552413A. Taizhou Baike Biological Tech Co Ltd. Erişim adresi: [https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/075031652/publication/CN112552413A?q=ti all %22recombinant%22 AND ta all %22protein%22 AND ta all %22vaccine%22 AND ta all %22cov%22](https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/075031652/publication/CN112552413A?q=ti%20all%20recombinant%20AND%20ta%20all%20protein%20AND%20ta%20all%20vaccine%20AND%20ta%20all%20cov%20)
- Yadav, T., Srivastava, N., Mishra, G., Dhama, K., Kumar, S., Puri, B., & Saxena, S. K. (2020). Recombinant vaccines for COVID-19. *Human Vaccines ve Immunotherapeutics*, 16(12), 1. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1820808>
- Yang, S., Li, Y., Dai, L., Wang, J., He, P., Li, C., ve diğerleri. (2021). Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *The Lancet. Infectious Diseases*, 21(8), 1107. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00127-4)
- Yilmaz, I. C., Ipekoglu, E., Bulbul, A., ve diğerleri. (2021). Development and Preclinical Evaluation of Virus Like Particle Vaccine Against COVID-19 Infection. *Authorea*. <https://doi.org/10.22541/au.162615692.26217047/v2>

Zeng, C., Zhang, C., Walker, P. G., & Dong, Y. (2020). Formulation and Delivery Technologies for mRNA Vaccines. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 1-40). https://doi.org/10.1007/82_2020_217

Zhang, C., Maruggi, G., Shan, H., & Li, J., (2019). Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00594>

Zhao, M., Vandersluis, M., Stout, J., Haupts, U., Sanders, M., & Jacquemart, R. (2019). Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time? *Vaccine*, 37(36), 5491-5503. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.090>

Zhao, Q., Gao, Y., Xiao, M., Huang, X., & Wu, X. (2021). Synthesis and immunological evaluation of synthetic peptide based anti-SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Chem Commun (Camb)*, 15;57 (12): 1474-1477. doi: 10.1039/d0cc08265a.

Борисович, Р. А., Александрович, Р. Е., Поликарповна, Б. М., Васильевна, Г. Е., Дмитриевна, Д. Е., Рамисович, И. И., ve diğerleri (2021). Peptide immunogens and a vaccine composition against coronavirus infection covid-19 using peptide immunogens, RU2738081C1.