



DNA Vaccines and Their Using in Veterinary Medicine

İlke KARAYEL Feray ALKAN

Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ankara, Turkey

Received: 24.11.2015

Accepted: 08.12.2015

SUMMARY

Veterinary area protects health of pet animals, farm animals and wild animals. Besides, it has many responsibilities about economical livestock management because of the infections in management, region, country or even large geographical area and human health because of the zoonotic infection. The formation of immune populations against several etiological agents correspondingly, the development of conventional vaccines or a portion of the etiological agent (nucleic acid or protein) containing vaccines (subunit vaccines, vector vaccines, DNA vaccines, etc.) are important issues in science. The purpose of this review is to provide general information about the DNA vaccines that are formed by expression plasmid vectors, which contain encoding genes of antigenic proteins of microorganism and draw attention to the use of veterinary facilities.

Key Words: Vaccine, DNA Plasmid, Immunity

ÖZET

DNA Aşıları ve Veteriner Hekimlik Alanında Kullanımı

Veteriner hekimlik alanı pet hayvanları, çiftlik hayvanları, vahşi yaşamdaki hayvanların sağlığını korunmasının yanı sıra, işletme, bölge ya da ülkedeki ve hatta pandemik enfeksiyonlar nedeniyle geniş coğrafyalardaki çiftlik hayvanlarının ekonomik yetiştiriciliği, zoonoz enfeksiyonlar nedeniyle de, insan sağlığına ilgili sorumlulukları içermektedir. Bu bağlamda, birçok etken için bağışık popülasyonların oluşturulması; dolayısıyla geleneksel aşılar ya da etiyolojik ajanın bir kısmını (nükleik asit ya da protein) içeren aşıların (subunit aşı, vektör aşı, DNA aşısı, vb.) geliştirilmesi bilimin önemli konularındandır. Bu derlemenin amacı, mikroorganizmaların çeşitli antijenik karakterdeki proteinlerini kodlayan genlerin yerleştirildiği ekspresyon plazmid vektörleri olan DNA aşılarına ilgili genel bilgileri sunmak ve veteriner hekimlikte kullanım olanaklarına dikkat çekmektir.

Anahtar Kelimeler: Aşı, DNA Plazmid, Bağışıklık

GİRİŞ

Enfeksiyöz hastalıkların insanlar ve hayvanlar için oluşturduğu tehdit, özellikle toplu halde yaşama ile artmış ve hastalıkların kontrolü için önlemler geliştirilmesi yönünde arayışlara yol açmıştır. Bilimsel bilgi birikimi oluşup, hastalık etkenleri tanımlanmadan ve hastalıkların bulaş modelleri bilimsel olarak belirlenmeden önceki dönemlerde, daha önce yaşanan salgınlara ilgili gözlemlere dayanılarak, hastalıklar ile mücadele edilmeye çalışılmıştır. Nitekim aşılama ile ilgili ilk çalışmalar, bu gözlemlerin sonucu olarak, Çin ve Hindistan'da çiçek enfeksiyonu geçirmiş bireylerden sağlanan kabuk materyalleri kullanılarak çocukların bağışık hale getirilmesi olup, M.Ö. 590 yıllarına dayanmaktadır (Saint-Victor ve Omer 2013).

Hastalıkların kontrol ve eradikasyonunda birçok yöntem ve dikkat edilmesi gereken konu vardır. Aşılama bu yöntemler içinde önemli bir yer tutmaktadır. Bununla birlikte, aşı uygulamaları her zaman diğer bazı yöntemler

(uygun bakım ve besleme, iyi işletme yönetimi, vb.) ile desteklenmelidir. Aşılama insan ve hayvanları enfeksiyonlardan korumak, hastalık etkenlerinin saçılmasını ve yayılmasını önlemek, hastalıkların morbidite ve mortalitesini en alt seviyeye indirmek, sağaltım masraflarını ve verim kayıplarını azaltmak, vb. amaçlarla yararlanılan, çok önemli, pratik ve koruyucu bir uygulamadır (Grunathan ve ark. 2000; Arda ve Sareyyüboğlu 2002). Konvansiyonel aşılar olarak tanımlanan, canlı ya da inaktive edilmiş mikroorganizmaları içeren aşıların yanı sıra, etkenin uygun alt birimlerini içeren (subunit aşılar, sentetik peptid aşılar, toxoid aşılar, vb.) ve bir biyolojik etkenin hedef antijenik birimini kodlayan geninin vektör mikroorganizma gen kombinasyonu ile hazırlanan (vektör aşılar, rekombinant subunit aşılar vb.) aşıların geliştirilmesi bilimin konusu olmuş; bu bağlamda kullanıma aktarılan ya da aktarılamayan birçok aşı geliştirme çalışması gerçekleştirilmiştir (Grunathan ve

ark. 2000; Kumaragurubaran ve Kaliaperumal 2013; Pereira ve ark. 2014). Aşı geliştirme çalışmalarında, tanımlanan diğer aşuların getirdiği bazı dezavantajları bertaraf etmek amacıyla DNA aşuları geliştirilmesi, günümüzde üzerinde önemle durulan bilimsel çalışma konuları içinde yer almaktadır.

Genel Bilgiler

DNA aşısı nedir?

DNA aşuları bakteri, virus ve parazit gibi mikroorganizmaların çeşitli antijenik karakterdeki proteinlerini kodlayan genlerin yerleştirildiği *ekspresyon plazmid vektörlerinden* oluşurlar. Bu plazmid vektörler, DNA yapısındaki ekstrakromozomal genetik yapılarıdır. Wolff ve ark. (1990) tarafından, plazmide "çıplak" olarak yerleştirilen bir gen DNA'sının farelere intramuskuler olarak enjekte edildiğinde, hücreler tarafından bu DNA'ların alındığının ve eksprese edildiğinin keşfedilmesi, DNA aşularının geliştirilmesi çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.

Herhangi bir gen aktarımı ve bu yoldan aşı geliştirme ya da gen terapisi stratejisinin temeli, istenilen etkiye sahip ve geni istenilen hücrenin içine aktarabilecek vektörü ya da taşıyıcı sistemi tanımlamaktır. Günümüzde memelilerde gen transferi için kullanılan teknikler DNA'nın retrovirus, vacciniavirus ya da adenovirus gibi rekombinant viral vektörlere paketlenmesini, katyonik olarak yüklenmiş lipozomlar, kalsiyum tuzları ya da dentrimerler gibi moleküllere bağlanmasını (Gregoriadis ve ark. 1997; Gould-Fogerite ve ark. 1998; Walther ve Stein 2000; Xie ve ark. 2015) ya da DNA'nın hücrelere 'çıplak' olarak taşınmasını içerir (Wolff ve ark. 1990; Fynan ve ark. 1993). Genler hücrelere ex vivo olarak da transfer edilebilir (McDonnell ve Askari, 1999). "Çıplak" DNA plazmidini ile çalışmanın viral vektörler kullanıldığı zaman oluşabilecek üretim ve güvenlik problemleri, taşıyıcı vektörden kaynaklanan komplikasyonlar veya immün yanıt interferensi gibi problemlerin ortadan kaldırılmasına olanak sağlaması (McDonnell ve Askari 1999; Schalk ve ark. 2006) nedeniyle, DNA aşuları gelecekte birçok enfeksiyonun kontrolü amacıyla geliştirilecek aşular için gün geçtikçe artan bir umut vadetmektedir (Dunham ve ark. 2002; Nobiron ve ark. 2003; Lodmell ve ark. 2006; Gupta ve ark. 2007; Tesoro-Cruz ve ark. 2008).

DNA plazmidini tarafından kodlanan antijenlerin, geleneksel aşılardan farkı, gerçek bir patojen ya da patojenlerin pürifiye veya rekombinant proteinleri olmamaları ve aşı sonrası immünizasyonda in vivo olarak sentezlenmeleridir (Nabel ve ark. 2010). Bu durum hem humoral hem de hücresel bağışıklık açısından birçok avantajı da beraberinde getirmektedir (Schalk ve ark. 2006).

Plazmidler tarafından kodlanan viral proteinlerin, hem hücresel yanıt, hem de antikor yanıtı oluşturabilmesinin yanında, klonlanan genin alındığı virus suşundan oldukça farklı bir virus suşu ile oluşacak enfeksiyon için de koruma sağlayabilecek aşuların hazırlanmasını olanaklı kıldığının gösterilmesi, bu teknolojinin laboratuvar araştırmalarından lisansı alınmış veteriner aşularına kadar uzanan geniş bir alanda kullanılmasını sağlamış ve günümüzde insanlar için bazı biyomedikal uygulamaların geliştirilmesine imkan sunmuştur (Schalk ve ark. 2006 ; Liu 2011).

DNA aşularının özellikleri: Avantaj ve dezavantajları nelerdir?

DNA aşularının en önemli özelliklerinden biri, adoptif immuniteyi üç koldan (antikor, yardımcı T hücreleri ve

sitotoksik T lenfositler) uyarabilmesi ve bunun yanı sıra doğal immün yanıtı da indükleyebilmesidir (Schalk ve ark. 2006). DNA plazmidlerinin kolay ve çabuk elde edilebilir olması acil bir pandemi tehdidine karşı aşı yapılmasında kritik bir öneme sahiptir (Pereira ve ark. 2014). Attenüe edilmiş virus aşuları gibi aşular için komplike bir işlem süreci varken, biyoteknolojideki ilerlemeler ve DNA aşularının üretim sürecinin jenerik olması nedeniyle, DNA aşuları çok çabuk ve kolay bir şekilde üretilebilir. Ayrıca bu tip aşular hücre kültür sistemlerinin geliştirilmediği yeni bir virusa karşı, antijen kodlayan gen sekansının elde edilmesi, vektörde klonlama ve bakteriyel kültürde üretim aşamalarını takiben elde edilerek kullanım avantajına sahiptir (Dufour 2001; Liu 2011).

Aşı geliştirme sürecinde arzu edilen unsurlardan birisi aşının stabilitesidir. DNA aşuları viral veya bakteriyel vektörler gibi enfeksiyöz etkenler olmadan, yalnızca plazmidlerden oluştuğu için, 4-20°C'de canlı attenüe aşılara göre büyük oranda daha stabildir (Dufour 2001; Pereira ve ark. 2014).

Plazmidler çok kolay ve hızlı bir şekilde protein kodlamaları için kullanılabilirler. Kodlanan bu proteinler, immünojenik özelliklere ya da diğer fonksiyonlara zarar verebilecek bölgeleri elimine edilmiş modifiye proteinlerdir. Böylece doğal ajanlar, proteinlerde ve antijenlerdeki bu düzenlemelerle, immün sistemi uyarma nitelikleri korunarak, güvenli bir şekilde vücuda taşınabilirler (Liu 2011). Ayrıca DNA aşuları, canlı attenüe aşılardan farklı olarak, aşı suşlarının patojen fenotiplere dönüşme ve bu yoldan aşılama sonrası enfeksiyona neden oluşturma riskini ortadan kaldırır (Dufour 2001). Konvansiyonel aşılarda, aşuların üretim sürecinin aşı virusunda mutasyonlarla sonuçlanabilmesi, proteinlerin sekonder ve tersiyer yapısının farklılaşması ve dolayısıyla aşı etkeninin antijenik yapısının değişikliğe uğrayarak, immün yanıtın etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir (McDonnell ve Askari 1999; Tuting ve ark. 2000). Oysa DNA aşularında, konakçı hücre viral epitopu kendi sentezlediğinden, aşı uygulaması sonrasında oluşan proteinler, aşı hazırlanması için seçilmiş virusun doğal antijeninden farklı olmayacaktır. Ayrıca antijen eksprese eden plazmidler, bakteriyel kültürlerde çoğaltıldığından, ökaryotik hücrelerdeki konvansiyonel aşı üretiminde olası olan virus/protein kontaminasyonu riskini de taşımazlar (Dufour 2001; Pereira ve ark. 2014; Wahren and Liu 2014).

DNA aşuları, bir enfeksiyonla ilgili etiyolojik etkenin tek bir antijenini kodlayan geni içerebildiği gibi, bir etkenin birden fazla sayıdaki antijenik birimini ya da farklı patojenle ilgili hedef genleri içerecek şekilde hazırlanabilme potansiyeline sahiptir. Bu durum hem insan hekimliği, hem de veteriner hekimlikte hedef popülasyonun bağışık kılınması için gereken aşı sayısında azalma sağlanabilmesi ve bu yoldan birçok kazanım (zaman, aşı takviminin planlanması, uygulama, maliyet) elde edilmesi avantajını oluşturmaktadır (McDonnell ve Askari 1999).

Enfeksiyonların kontrolü ve eradikasyonu amacıyla yapılacak planlamalarda, doğal enfeksiyon oranlarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu noktada aşı uygulaması yapılan enfeksiyonlarda, doğal enfeksiyon oranlarının belirlenmesinde aşıya bağlı antikor varlığı, gerçek enfeksiyon oranlarının saptanmasında sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle, genel olarak DIVA stratejisi (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) olarak adlandırılan stratejide, yapısal proteinlerin tespiti (Uttenthal ve ark. 2010) ya da çıkartılan genlere ilgili

antikor tespiti (Kaashoek ve ark. 1995), vb. kriterler kullanılarak, gerçek seroprevalans değerlerinin belirlenmesi son yıllarda önem kazanmıştır. DNA aşıları da, aktarılan bir ya da sınırlı sayıda genin kodladığı antijene ilgili antikor oluşumuna yol açtığından, epidemiyolojik verilerin sağlıklı oluşturulmasına ve uygulamaların yapılmasına imkan sağlamaktadır.

DNA aşılarının, konvansiyel aşılardan ya da gen mühendisliği ile hazırlanan diğer bazı aşılara (örneğin vektör aşısı) göre birçok avantajının olmasının yanı sıra, güvenliğine ilişkin bazı endişeler de bilim dünyasında tartışılmaktadır (Babiuk ve ark. 2002; Liu 2011). Bunlardan birisi, plazmid DNA'nın hücrenel DNA'ya entegrasyonudur. Test edilen DNA aşıları konakçı hücre DNA'sı ile entegrasyon göstermemektedir (Ledwith ve ark. 2000). Bununla birlikte, günümüzde entegre olan DNA aşılarının insersiyonel mutasyona yol açıp, onkojenleri aktive etmesi veya tümör baskılayan genleri inaktive etmesi ihtimali üzerinde durulmaktadır. Bir diğer endişe ise, spesifik DNA sekanslarının anti-DNA antikorlarını indüklemesi ve otoimmün hastalıklara yol açmasıdır (Glenting ve Wessels 2005). Ancak, insan olmayan primatlarda yapılan denemelerde anti-nükleer veya anti-DNA antikorları saptanmamıştır. Otoimmünite geliştiğine dair de bir bilgi bulunmamaktadır (Kutzler ve Weiner 2008). Bunlardan başka DNA aşılıyla ilgili olarak, antibiyotik dirençliliği konusuna da dikkat çekilmekte ve taşıyıcı bakteriden antibiyotik dirençliliği geninin olası transferi nedeniyle, geniş spektrumlu DNA aşılarının kullanım olanağının sınırlanabileceği bildirilmektedir (Kutzler ve Weiner 2008).

DNA aşılarının uygulama yolları

DNA aşılarının en yaygın kullanım yolları, intramuskuler ve daha az sıklıkla da subkutan ya da intradermal uygulamalardır. Her bir aşısındaki DNA plazmid miktarı hedef antijene, aşının geliştirildiği türe, uygulama yoluna, aşı uygulamasında kullanılan araçlara, vb. göre değişiklik göstermektedir (Sasaki ve ark. 1998; Nabel ve ark. 2010; Pereira ve ark. 2014). Örneğin, genellikle intramuskuler ve subkutan uygulamalarda immün yanıt oluşturabilmek için yeterli olan DNA plazmid miktarı, gen tabancası kullanılarak yapılan immünizasyonda sitotoksik T lenfosit ya da antikor yanıtını indükleyebilmek için gereken DNA plazmid miktarından daha fazladır (Fynan ve ark. 1993). Benzer durum aşılacak türler için de söz konusudur. Örneğin; farelerde intramuskuler olarak yapılan her bir enjeksiyon için 25-100 µg genellikle yeterli olmasına rağmen, primatlar ya da insanlar için daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı model sistemlerde tek bir DNA aşısı uygulamasıyla hem antikor, hem de sitotoksik T lenfosit yanıtı oluşurken, birbirini izleyen uygulamalarla hem hücrenel, hem de antikor yanıtı artırılarak aşı daha etkin olabilmektedir (Grunathan ve ark. 2000).

DNA aşısının uygulama yolunun belirlenmesi ve aşı başarısında, formülasyonda yer alan bazı araçlar (Gregoriadis ve ark. 1997; Rosati ve ark. 2008; Pereira ve ark. 2014) etkilidir. Örneğin, DNA'nın mukozal olarak taşınmasında kullanılan araçlarda mikropartiküller kullanılmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilen mikropartiküllerin içerisine sıkıştırılan plazmid DNA ile polilaktik-ko-glikolik ve kitosan gibi polimerlerin birleştirilmesiyle hazırlanan ve oral yolla kullanılan rotavirus aşılarının koruyucu immün yanıt oluşturabilme yeteneği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Herrmann ve ark. 1999).

DNA aşılarının etkinliğinin artırılmasında kullanılan araçlar

“Çıplak” DNA plazmid ile yapılan transfeksiyon, kompleks formülasyonlardan uzak, basit ve direkt bir metottür. Ancak, yetersiz membran permeabilitesi ve DNA plazmid vektörünün hücreye alınmasının düşük miktarda olması, protein ekspresyonunun düşük olmasına ve dolayısıyla DNA aşılarının etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır (Pereira ve ark. 2014). İntramuskuler olarak enjekte edilen DNA'nın büyük çoğunluğunun yapısı ekstrasellüler deoksiribonükleazlar tarafından değişmektedir. DNA'yı bu değişimden korumak ve DNA aşılarının etkinliğini arttırmak için, DNA'nın direkt olarak hedef hücreler tarafından alınmasını sağlayan bir takım başarılı metotlar (gen tabancası kullanımı, elektroporasyon, lipozom, kohleatlar ve attenüe edilmiş mikroorganizmaların kullanımı, vb.) geliştirilmiştir (Fynan ve ark. 1993; Grunathan ve ark. 2000; Nabel ve ark. 2010; Wahren and Liu 2014).

Gen Tabancası: DNA'yı sıvı formda ya da altın tanecikleriyle formüle edilmiş formda, direkt olarak deriye püskürtülen bir takım biyolistik bombardıman araçları, preklinik ve klinik denemelerde kullanılmaktadır (Fynan ve ark. 1993; Grunathan ve ark. 2000; Arda ve Sareyyüboğlu 2002; Nabel ve ark. 2010). Altın partikülleri direkt olarak hedef hücrelerin sitosollerine püskürtüldüğünde, bu hücrelerdeki hedef gen ekspresyon seviyesinin arttığı ve gen tabancasıyla yapılan uygulamaların, intramuskuler enjeksiyona kıyasla daha etkin bir immün yanıt oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, gen tabancası ile taşınabilen dozun kısıtlı olması nedeniyle, birden fazla alana uygulama yapılması gerekebilmektedir. Biyoenjektör gibi diğer araçlar ise yüksek basınç altında direkt intradermal olarak sıvı DNA püskürtmektedirler (Nabel ve ark. 2010).

Elektroporasyon: Elektroporasyon, plazma membranında oluşturulan gözenekler sayesinde geçirgenliği artırarak DNA plazmid vektörün hücrelere girmesini sağlayan, elektrikli bir enjeksiyon tekniğidir (Pereira ve ark. 2014). Bu yöntemin, hücreler tarafından DNA plazmid alınımını arttırmak, antijen üretiminde ve immün sistemi uyarma niteliğinde artış meydana getirdiği saptanmıştır (Rosati ve ark. 2008).

Lipozomlar: Fosfolipidler, tek katmanlı ya da çok katmanlı veziküller yapıları gibi amfipatik (polar ve nonpolar bölgeler) molekülleri içeren, çift katmanlı membranlar olan ve vezikül yüzey yükleri, boyut, lipid ve adjuvant içeriğine bağlı olarak çok çeşitli şekillerde hazırlanabilen lipozomlar, aşı optimizasyonunda kolaylık sağlamaktadırlar (Grunathan ve ark. 2000; Wahren and Liu 2014). Lipozomların, plazmid DNA'nın hücrelere alınımını kolaylaştırarak, “çıplak” DNA ile karşılaştırıldığında, daha yüksek antikor titresi ve artan seviyede interferon gamma (IFN-γ) ve interlekin-4 (IL-4) oluşumunu (Gregoriadis ve ark. 1997); intranasal uygulama sonrasında ise farelerde hem sistemik hem de mukozal immün yanıtın gelişmesini (Yang ve ark. 2008) sağladığı bildirilmiştir.

Kohleatlar: Kohleatlar anyonik fosfolipidlerin, kalsiyum kaynaklı spiral katmanlarıdır. Zorlu çevre şartlarında ve liyofilizasyondan sonra stabilitelelerini koruyabilirler. Hedef hücre membranıyla kontakt sırasında, membran ile kohleatın dış katmanı arasında meydana gelen füzyonda, kohleat içeriği sitosole aktarılır. DNA-kohleat formülasyonları, parenteral ya da oral uygulamalardan sonra güçlü bir sitotoksik T lenfosit ve antikor yanıtı

oluşturabilmektedir (Gould-Fogerite ve ark. 1998; Grunathan ve ark. 2000).

Attenüe Edilmiş Organizmalar: DNA'nın taşınmasında aynı zamanda attenüe edilmiş intrasellüler bakteriler de kullanılmaktadır. DNA'yı taşıyan bakteriler antijen sunan hücreler (APC) tarafından fagosite edilir ve böylece plazmid DNA konak hücrenin fagozomu ya da sitosolüne bırakılır. Bu DNA nükleusa giderek, transkripsiyona uğrar ve kodlanmış olduğu antijenler eksprese edilir (Grunathan ve ark. 2000; Schoen ve ark. 2004). Günümüzde bu amaçla en çok kullanılan attenüe edilmiş bakteriler *Shigella flexineri* (Fennelly ve ark. 1999), *Salmonella typhimurium* (Woo ve ark. 2001), *Listeria monocytogenes* (Miki ve ark. 2004), *Escherichia coli* (Cicin-Sain ve ark. 2003) ve *Lactococcus lactis* (de Azevedo ve ark. 2012)'dir.

Veteriner hekimlikte DNA aşılarının kullanım olanakları

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde sürü sağlığı, her bir hayvanın ayrı ayrı sağlığından daha önemlidir. Bu nedenle, çiftlik hayvanlarında DNA immünizasyonu için birincil hedef virus, bakteri ve parazit gibi enfeksiyöz ajanlardır. DNA immünizasyonunu kullanarak tümörler ya da otoimmün hastalıklar ile mücadele etmek, çiftlik hayvanlarının kısa yaşam sürelerinden dolayı pek önem arz etmezken; bu durum kedi, köpek gibi diğer pet hayvanları için büyük önem taşımaktadır. Vahşi hayvanlar için ise, yem tuzaklarıyla oral olarak uygulanan ucuz ama etkili aşılarla gereksinim vardır (Van Den Hurk ve ark. 2000; Redding ve Weiner 2009).

Plazmid DNA'ların bazı özellikleri onları, hayvanlarda koruyucu antijenleri kodlayan genlerin taşınması için mükemmel bir vektör konumuna getirmiştir. Bu özellikler,

DNA aşılarının üretiminin büyük bir hız ve kolaylıkla yapılabilmesi, ucuz olması, kalite kontrolü, aşı üretimi için yüksek biyogüvenlik seviyelerine ihtiyaç duyulmaması, sıcakta stabil kalabilmeleri, taşıma kolaylığı, DNA integrasyonunun ve vektörün kendi immünojenitesinin olmaması olarak özetlenebilir. Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalarda, DNA immünizasyonu kullanılarak erken yaşlarda multikomponent aşuların tek bir dozuyla, immünizasyonun sağlanabileceği ve bunun uzun süreli bir immünizasyon oluşturabileceği kanıtlanmıştır (Van Den Hurk ve ark. 2000; Redding ve Weiner 2009).

Bu güne kadar Feline Immunodeficiency Virus (FIV) enfeksiyonu (Dunham ve ark. 2002; Gupta ve ark. 2007), Feline Leukemia Virus (FeLV) enfeksiyonu (Hanlon ve ark. 2001), kuduz (Lodmell ve ark. 2006; Tesoro-Cruz ve ark. 2008), Bovine Viral Diyarre Virus (BVDV) enfeksiyonu (Nobiron ve ark. 2003), şap hastalığı (Wong ve ark. 2002; Niborski ve ark. 2006), Toxoplazma gondii enfeksiyonu (Cao ve ark. 2015), anthrax (Hahn ve ark. 2006) ve kuş gribi (Laddy ve ark. 2008) vb. hastalıklar için, DNA aşılarının geliştirilmesine dair çalışmalar yapılmış ve hatta bazı aşılar denenmiş olmasına rağmen, günümüzde veteriner hekimlikte kullanım için lisansı alınan dört DNA aşısı bulunmaktadır (Pereira ve ark. 2014). Bunlar; balıklardaki Enfeksiyöz Hematopoetik Nekrozu (IHN) ve atlardaki Batı Nil Virus (WNV) Enfeksiyonu'na karşı profilaktik amaçlı, köpeklerde malignant melanoma için kanser immunoterapi amaçlı ve domuzlarda "Growth Hormone Releasing Hormone" (GNRH) gen terapisi amaçlı DNA plazmid ürünleridir (Redding ve Weiner 2009; Pereira ve ark. 2014) (Tablo 1).

Tablo 1. Lisanslı DNA aşuları (Pereira ve ark. 2014)

Table 1. Licensed DNA vaccines (Pereira ve ark. 2014)

Tip	Tür	Hedef Etken	Ürün/Firma	Lisans Tarihi - Ülke
Profilaktik Aşı	At	Batı Nil Virus (WNV)	West Nile-Innovator®/ Fort Dodge Animal Health	2005 - Amerika
Profilaktik Aşı	Atlantik Somonları	Enfeksiyöz Hematopoetik Nekroz Virus (IHN)	Apex-IHN®/Novartis Animal Health	2005 - Kanada
Kanser İmmüno-terapisi	Köpek	Melanoma	Oncept™/Merial	2010 - Amerika
Gen Terapisi	Domuz	Growth Hormone Releasing Hormone (GNRH)	LifeTide® SW5/VGX™ Animal Health	2008 - Avustralya

Kullanım lisansını almak için başvuru alan ilk DNA aşuları, kültür Atlantik somonlarında IHN ve atlarda WNV nedenli oluşan hastalıkları önlemek için geliştirilen aşılardır.

IHN, *Salmonidae* familyasındaki balıkları enfekte ederek, erken yaş dönemlerinde hematopoetik dokularda geniş alanlı nekrozlara neden olur (Lorenzen ve Lapatra 2005). Virusun yüzeyinde bulunan glikoproteinlere (G) yönelen antikorlar hastalığa karşı koruma sağlamasına rağmen, diğer viral proteinler koruyucu immünite için birer hedef olamamaktadır. IHN enfeksiyonundan korunma amaçlı geliştirilen ve Temmuz-2005'de "Canadian Food Inspection Agency, Veterinary Biologics and Biotechnology Division (VBBS)" tarafından pazarlama için onaylanan (Nabel ve ark. 2010) DNA aşısı ile yapılan denemelerde, G proteinini kodlayan IHN DNA aşısının düşük dozdaki (10 µg) tek bir enjeksiyonunun bu hastalığa karşı uzun süreli bir immünite sağladığı gösterilmiştir (Salonius ve ark. 2007). Aşının yüksek etkinliğinin olası nedeninin, IHN'un da

dahil olduğu Rhabdovirusların G proteininin hücreler tarafından kısa sürede tip 1 interferon üretimini uyarabilmesi ve bu nedenle G proteinine karşı tetiklenen erken doğal immün uyarımın oluşmasının yanı sıra, bu proteine karşı oluşan uzun süreli bellek immün yanıtı oluşumu olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak balıklarda, IHN DNA aşısının başarısına ilişkin immünojenik faktörler henüz tam olarak açıklanamasa da, oluşan immün yanıtın hem nötralizan antikorları hem de T hücre yanıtını içerdiği bilinmektedir (Lorenzen ve Lapatra 2005; Purcell ve ark. 2006).

Batı Nil virusun Pre M ve E antijenini kodlayan DNA aşısı ise, Temmuz-2005'de atlarda kullanım için lisansını almıştır. Farklı hayvan modelleri (fare ve kanatlı) ile yapılan çalışmalarda (Davis ve ark. 2001; Kilpatrick ve ark. 2010; Amanna ve Slifka 2014) bu aşının güçlü etkisi ve etkinliğiyle ilgili veriler elde edilmiştir. Atlarda yapılan çalışmalarda da, nötralizan antikorların oluşumu, epruvasyon sonrasında viremi seviyesindeki azalma ve

klirik hastalık oluşunun engellenmesi gibi diğer türlerde saptananlara benzer sonuçlar alınmıştır (Davis ve ark. 2001). Tüm bu cesaret verici bilgiler insan klinik denemeleri için benzer bir aşının geliştirilmesine öncülük etmiştir. Martin ve ark. (2007), Batı Nil virusu DNA aşısı ile yaptıkları klinik denemelerde, insanlarda T hücreleri ve antikor immün yanıtın oluştuğunu ortaya koymuşlardır.

Mart-2007'de köpeklerdeki melanomları tedavi etmek amacıyla geliştirilen ve insanlardaki tirozinazı kodlayan terapötik DNA aşısı, Amerika Birleşik Devletleri'nde önce şartlı kullanım onayını, 2010 yılında da lisansını almıştır (Nabel ve ark. 2010; Liu 2011). Aşı sonrası oluşan ksenojenik protein, toleransı kırmakta ve köpek tirozinazına karşı etkili bir antikor yanıtı oluşturmaktadır (Bergman ve ark. 2003).

Bir diğer lisansı alınan DNA plazmidini ise, 2008 yılında gıda amaçlı olarak anaç domuz üretiminde kullanılmak üzere lisans alınmış olan, GNRH kodlayan bir gen terapisi ürünüdür (Liu 2011). Anaç domuzlara yapılan GNRH DNA enjeksiyonuyla, anaç domuzlardan daha fazla canlı yavru elde edilmiş ve elde edilen bu yavruların ağırlıkları da artmıştır (Khan ve ark. 2010).

Günümüzde, dört DNA plazmid ürünü veteriner hekimlikte kullanım için lisans almasına rağmen, insanlarda kullanım için lisansı alınmış bir DNA aşısı bulunmamaktadır (Wahren ve Liu 2014). Kullanımda olan hayvanlara yönelik DNA aşılarında elde edilen sonuçlar, insanlar için DNA aşısı geliştirilmesi yönünde umut vadetmektedir (Pereira ve ark. 2014). İnsanlarda, erken klinik denemelerdeki sınırlı immünojeniteye rağmen, ekspresyon vektörlerindeki gelişmeler, üretim ve taşıma teknolojisi, bu teknolojinin etkinliğini ve bu alana karşı olan ilgiyi arttırmaktadır. Spesifik patojenlere yönelik farklı antijenlerin koruyucu rolünü geliştirmek için oluşturulan DNA plazmidlerinin yapılarındaki kolaylıklar, insanlardaki sıvısal ve hücreli bağışıklığın sürekli ve doğru olarak ölçülebilmesi (hem yardımcı hem de sitotoksik T lenfositler dahil), üretim kolaylığı (global skaladaki aşı ihtiyacı) ve DNA aşılarının taşıma araçları ve adjuvantlar gibi diğer teknolojilerle kombine edilebilirliği gibi birtakım faktörler, DNA aşısı teknolojisini ileriye taşımaktadır (McDonnell ve Askari 1999; Nabel ve ark. 2010; Liu 2011).

Sonuç olarak, veteriner hekimlik alanında DNA aşıları üzerine yapılan çalışmalar başarı kazandıkça, hem sağlıklı pet ve çiftlik hayvanlarına sahip olunması hem de zoonoz hastalıkların önemli ölçüde önlenmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca kazanılan deneyimler gelecekte insanlar için kullanılacak etkili DNA aşılarının üretilmesine de katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Amanna IJ, Slifka MK (2014). Current trends in West Nile virus vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 13(5), 589-608.

Arda M, Sareyyüpoğlu B (2004). Aşılar Hazırlama Teknikleri Avantaj ve Dezavantajları, İnkansa Yayınları, İskitler/Ankara.

Babiuk S, Baca-Estrada ME, Foldvari M, et al. (2002). Electroporation improves the efficiency of DNA vaccines in large animals. *Vaccine*, 20, (27-28), 3399-3408.

Bergman PJ, Mcknight J, Novosad A, et al. (2003). Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogenic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res* 9, 1284-1290.

Cao A, Liu Y, Wang J, et al. (2015). *Toxoplasma gondii*: Vaccination with a DNA vaccine encoding T- and B-cell epitopes of SAG1, GRA2, GRA7 and ROP16 elicits protection against acute toxoplasmosis in mice. *Vaccine Pii*, S0264-410X(15)01506-6.

Cicin-Sain L, Brune W, Bubic I, Jonjic S, Koszinowski UH (2003). Vaccination of mice with bacteria carrying a cloned herpesvirus genome reconstituted in vivo. *J Virol*, 77, 8249-8255.

Davis BS, Chang GJ, Cropp B, et al. (2001). West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol*, 75(9), 4040-4047.

De Azevedo M, Meijerink M, Taverne N, et al. (2015). Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer. *Vaccine*, 33(38), 4807-4812.

Dufour V, (2001). DNA vaccines: new applications for veterinary medicine. *Vet Sci Tomorrow*, 2, 1-26.

Dunham SP, Flynn JN, Rigby MA, et al. (2002). Protection against feline immunodeficiency virus using replication defective proviral DNA vaccines with feline interleukin-12 and -18. *Vaccine*, 20, 1483-1496.

Fennelly GJ, Khan SA, Abadi MA, Wild TF, Bloom BR (1999). Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J Immunol*, 162(3), 1603-1610.

Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL (1993). DNA vaccines: protective immunization by parenteral, mucosal and gene gun inoculation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (24), 11478-11482.

Glenting J, Wessels S (2005). Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb Cell Fact*, 4, 26.

Gould-Fogerite S, Kheiri MT, Zhang F, et al. (1998). Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 32(3), 273-287.

Gregoriadis G, Saffie R, de Souza JB (1997). Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Lett*, 402(2), 107-110.

Grunathan S, Klinman DM, Seder RA (2000). DNA vaccines immunology application and optimization. *Annu Rev Immunol*, 18, 927-974.

Gupta S, Leutenegger CM, Dean GA, Steckbeck JD, Cole KS, Sparger EE (2007). Vaccination with attenuated feline immunodeficiency virus proviral DNA vaccine expressing interferon γ . *J Virol*, 81, 465-473.

Hahn UK, Aichler M, Boehm R, Beyer W (2006). Comparison of the immunological memory after DNA vaccination and protein vaccination against anthrax in sheep. *Vaccine*, 24(21), 4595-4597.

Hanlon L, Argyle D, Bain D, et al. (2001). Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors. *J Virol*, 75(18), 8424-8433.

Herrmann JE, Chen SC, Jones DH, et al. (1999). Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. *Virology*, 259(1), 148-153.

Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J, et al. (1995). An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*, 13(4), 342-346.

Khan AS, Draghia-Akli R, Shypailo RJ, Ellis KI, Mersmann H, Fiorotto ML (2010). A comparison of the growth responses following intramuscular ghrh plasmid administration versus daily growth hormone injections in young pigs. *Mol Ther*, 18, 327-333.

Kilpatrick AM, Dupuis AP, Chang GJ, Kramer LD (2010). DNA vaccination of american robins (*Turdus Migratorius*) against west Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10, 377-380.

Kumaragurubaran K, Kaliaperumal K (2013). DNA vaccine: the miniature miracle. *Vet World*, 6(4), 228-232.

Kutzler MA, Weiner DB (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet*, 9, 776-788.

Laddy DJ, Yan J, Kutzler M, et al. (2008). Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens. *PLoS One*, 3(6), e2517.

Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, et al. (2000). Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology*, 43(4-6), 258-272.

Liu MA (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*, 239(1), 62-84.

Lodmell DL, Ewalt LC, Parnell MJ, Rupprecht CE, Hanlon CA (2006). One-time intradermal DNA vaccination in ear pinnae one year prior to infection protects dogs against rabies virus. *Vaccine*, 24(4), 412-416

Lorenzen N, Lapatra S (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev Sci Tech*, 24(1), 201-213,

Martin JE, Pierson TC, Hubka S, et al. (2007). A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J Infect Dis*, 196(12), 1732-1740.

McDonnell MW, Askari FK (1999). The emerging role of DNA vaccines. *MedGenMed*, 1(3).

- Miki K, Nagata T, Tanaka T, et al. (2004).** Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect and Immun*, 72, 2014-2021.
- Nabel GC, Kaslow DC, Ulmer JB, Liu MA (2010).** DNA Vaccines IN New Generation Vaccines: Levine MM, Dougan D, Good MF, Liu MA, Nabel G, Nataro JP, Rappuoli R. (Ed) 386-395 Forth Edition, Informa Healthcare Inc.
- Niborski V, Li Y, Brennan F, et al. (2006).** Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. *Vaccine* 24(49-50), 7204-7213.
- Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins ME (2003).** DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, 21(17-18), 2082-2092.
- Pereira VB, Zurita-Turk M, Saraiva TDL, et al. (2014).** DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World Journal of Vaccines*, 4, 50-71.
- Purcell MK, Nichols KM, Winton JR, et al. (2006).** Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Immunol*, 43(13), 2089-2106.
- Redding L, Weiner DB (2009).** DNA vaccines in veterinary use. *Expert Rev Vaccines*, 8, 1251-1276.
- Rosati M, Valentin A, Jalah R, et al. (2008).** Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine*, 26(40), 5223-5229.
- Saint-Victor DS, Omer SB (2013).** Vaccine refusal and the endgame: walking the last mile first. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1623), 20120148.
- Salonius K, Simard N, Harland R, Ulmer JB (2007).** The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr Opin Investig, Drugs*, 8(8), 635.
- Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, et al. (1998).** Induction of systemic and mucosal immune responses to human immunodeficiency virus type 1 by a DNA vaccine formulated with QS- 21 saponin adjuvant via intramuscular and intranasal routes. *J Virol*, 72, 4931- 39.
- Schalk JAC, Mooi FR, Berbers GAM, van Aerts LAGJM, Ovelgönne H, Kimman TG (2006).** Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines. *Hum Vaccin*, 2 (2), 45-53.
- Schoen C, Stritzker J, Goebel W, Pilgrim S (2004).** Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol*, 294, 319-335
- Tesoro-Cruz E, Calderon-Rodriguez R, Hernandez-Gonzalez R, Blanco-Favela F, Aguilar-Setien A (2008).** Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. *Vet Res*, 39(2), 16.
- Tuting T, Austyn J, Storkus WJ, Falo Jr. LD (2000).** The Immunology of DNA Vaccines. In: DNA Vaccines Methods and Protocols. Lowrie DB, Whalen RG. (Ed) 35, Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Utenthal A, Parida S, Rasmussen TB, Paton DJ, Haas B, Dundon WG (2010).** Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Expert Rev Vaccines*, 9(1), 73-87.
- Van Den Hurk SDL, Braun RP, Babiuk LA (2000).** Veterinary DNA Vaccines. In: DNA Vaccines Methods and Protocols. Lowrie DB, Whalen RG. (Ed), 79, Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Wahren B, Liu MA (2014).** DNA vaccines: recent developments and the future. *Vaccines*, 2(4), 785-796.
- Walther W, Stein U (2000).** Viral vectors for gene transfer. *Drugs*, 60(2), 249-271
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. (1990).** Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949), 1465-1468.
- Wong HT, Cheng SC, Sin FW, Chan EW, Sheng ZT, Xie Y (2002).** A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. *Vaccine*, 20(21-22), 2641-2647.
- Woo PCY, Wong L, Zheng B, Yuen, K. (2001).** Unique immunogenicity of hepatitis b virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*, 19, 2945-2954.
- Xie L, Yan M, Wang X, et al. (2015)** Immunogenicity and efficacy in mice of an adenovirus-based bicistronic rotavirus vaccine expressing NSP4 and VP7. *Virus Res*, 2, 210, 298-307.
- Yang K, Whalen BJ, Tirabassi RS, et al. (2008).** A DNA vaccine prime followed by a liposome-encapsulated protein boost confers enhanced mucosal immune responses and protection. *J Immunol*, 180(9), 6159-6167.