

Aşıların Tarihçesi ve Yeni Aşı Stratejileri

History of Vaccines and New Vaccine Strategies

© Selin Gamze Kılıç, © İştar Dolapçı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

1796 yılında Edward Jenner ile başlayan aşı serüveni, tıp tarihinin en büyük küresel başarılarından biri olarak kabul edilmekte ve günümüzde her yıl aşılanma ile 2-3 milyon insanın hayatı kurtarılmaktadır. Bu gerçeğe rağmen yine her yıl tüm dünyada 1,5 milyondan fazla insan aşı ile önlenemez hastalıklar yüzünden kaybedilmektedir. Günümüzde uluslararası hareketliliğin artışının bir getirisi olarak enfeksiyon hastalıkları sınır tanımamaktadır. Tüm dünya buna en son 2019 yılının sonunda Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 salgınının kısa bir süre içerisinde pandemiye dönüşmesi ile tanık olmuştur. Bu ve benzeri yeni ortaya çıkan ve henüz aşısı olmayan enfeksiyon hastalıkları olduğu gibi, yadsınamaz başarılarına rağmen mevcut aşı teknolojilerinin önleyemediği ve dünya genelinde mortalitenin büyük payını oluşturan başka enfeksiyon hastalıkları da bulunmaktadır. Bu hastalıklara karşı çok yönlü aşı geliştirme çalışmaları sürdürülmekte ve temel olarak yeni dağıtım platformları, yeni adjuvanlar, antijen sunumunda yeni yaklaşımlar ve yeni kararlı, etkin antijen üretimi alanlarına yoğunlaşmaktadır. Bu derlemede öncelikle aşının tarih boyunca gelişiminden kısaca bahsedilecek daha sonra aşı çalışmalarında yer alan yeni tasarım/teknolojilere, dağıtım platformlarına ve uygulama yollarına değinilecektir.

Anahtar Kelimeler: Aşı, Aşılanma, Aşı Stratejileri, Aşı Türleri

Abstract

Edward Jenner's invention of vaccination in 1796 has been considered as one of the greatest accomplishments in the history of medicine and vaccination currently prevents 2 to 3 million deaths every year. Despite this, more than 1,5 million people worldwide die from vaccine-preventable diseases each year. In today's increasingly mobile lifestyle, infectious diseases know no boundaries. The most recent example to this is the fact that severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 which originated in Wuhan, China has become the reason of a global pandemic in a very short time. As well as these and similar infectious diseases that have emerged and have not yet been vaccinated, there are other infectious diseases that existing vaccine technologies cannot prevent despite their undeniable success and constitute a large share of mortality worldwide. Versatile vaccine development studies are being done against these diseases and fields of new delivery platforms, new adjuvants, new approaches in antigen presentation and new stable and efficient antigen production are being focused on. In this review, firstly, the developmental history of vaccine is mentioned briefly and new designs and technologies, distribution platforms and application methods in vaccine studies are explained.

Key Words: Vaccine, Vaccination, Vaccine Strategies, Vaccine Types

Giriş

1796 yılında Edward Jenner ile başlayan aşı serüveni, tıp tarihinin en büyük küresel başarılarından biri olarak kabul edilmektedir. Kullanımda olan mevcut aşılar bulaşıcı hastalıklara bağlı mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde önleyerek her yıl tüm dünyada iki ila üç milyon ölümün önüne geçmektedir. Son

iki yüzyıl boyunca aşılar; çiçek hastalığını ortadan kaldırmış, çocuk ölüm oranlarını küresel alanda azaltmış ve sayısız doğum kusurunu ve çocuk felci gibi yaşam boyu sakatlıkları önlemiştir (1,2).

Bununla birlikte, yadsınamaz başarılarına rağmen mevcut aşı strateji ve teknolojileri ile önlenemeyen ve dünya genelinde mortalitenin büyük payını oluşturan pek çok enfeksiyon hastalığı

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Selin Gamze Kılıç,
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Tel.: +90 505 751 54 67 E-posta: selingamzekilic@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0002-2747-7293

Geliş Tarihi/Received: 03.09.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 30.11.2020

©Telif Hakkı 2021 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.

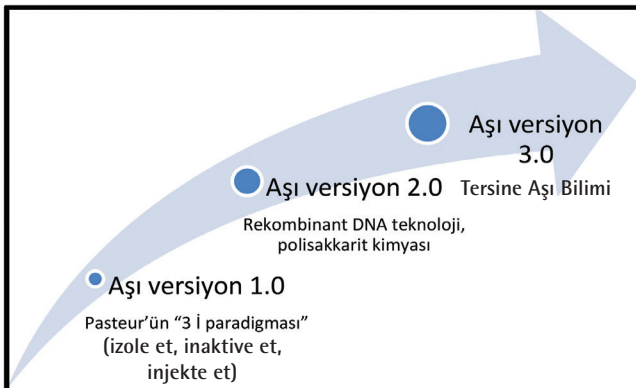


bulunmaktadır. Yıllardır kullanımda olan atenüe veya inaktif aşilar gibi başarılı aşilar, patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan doğal bağışıklığı taklit etmektedirler. Oysa doğal enfeksiyondan sonra kalıcı bağışıklığı indükleyemeyen [respiratuar sinsityal virüs (RSV) ve malarya gibi], kalıcı veya gizli enfeksiyona yol açan insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) ve hepatit C virüsü (HCV) gibi veya yüksek derecede değişkenlik gösteren HIV ve Dang virüsü gibi etkenlerle oluşan enfeksiyonlara karşı aşilar geliştirilememiştir (3). Bununla birlikte, immünoloji, patoloji ve mikrobiyoloji alanlarındaki artan bilgi birikimi, aşı gelişiminde daha "rasyonel bir tasarım" yaklaşımının benimsenmesine yardımcı olmaktadır (4). Aşı geliştirme çalışmaları günümüzde çok yönlüdür; temel olarak yeni dağıtım stratejileri, yeni adjuvanlar, antijen sunumunda yeni yaklaşımlar ve yeni kararlı, etkin antijen üretimi alanlarına yoğunlaşmaktadır (5). Bu derlemede öncelikle aşının tarih boyunca gelişiminden kısaca bahsedilecek daha sonra aşı çalışmalarında yer alan yeni tasarımlara, dağıtım platformlarına ve uygulama yollarına değinilecektir.

Aşıların Kısa Tarihi

Birinci kuşak olarak da anılan tarihteki ilk aşilar, Pasteur'un 3 İ paradigması "izole et, inaktive et, injekte et" prensibiyle üretilmiştir (6). Böylece doğal enfeksiyon taklit edilerek doğal bağışıklığa benzer bir yanıt elde edilmiştir. Aşı gelişiminin ilk yıllarındaki çalışmalar, hastalık etkeni patojenin tamamını içerecek şekilde atenüe ya da inaktive formlarda yapılmıştır. Bunlar konvansiyonel aşilar ya da aşı versiyon 1.0 (The Vaccine 1.0) olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1) (7). Uzun yıllar aşı geliştirmede ilk seçenek olarak kullanılan bu metod patojeni laboratuvarında üretmede zorluk, istenmeyen bağışık yanıt, patojenin antijenik çeşitlilik göstermesi (HIV, HCV) ya da hücre içi faza sahip olma (tüberküloz ve malarya) gibi durumlardan dolayı yetersiz kalmıştır (3).

Bu nedenle konvansiyonel aşı yaklaşımlarına alternatif yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Yirmi



Şekil 1: Aşıların tarihçesi

birinci yüzyıla geçilmesiyle genetik ve protein mühendisliği, rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA), polisakkarit ve karbonhidrat kimyası gibi çeşitli teknolojik ilerlemelerle aşı versiyon 1.0'dan aşı versiyon 2.0'a geçiş mümkün olmuştur (Şekil 1) (8,9). Bu teknolojiler kullanılarak hazırlanan, polisakkaritler veya protein antijenleri gibi saflaştırılmış mikrobiyal hücre bileşenlerinden oluşan ikinci nesil aşilar, aşı gelişiminde ikinci Rönesans olarak kabul edilmektedir (6). Subunit aşı olarak adlandırılan bu aşilar ya patojenden belirli bir proteinin izole edilerek kendi başına antijen olarak sunulması ya da genetik mühendislik teknolojisiyle virüs, bakteri, maya gibi bir vektör içinde antijenin klonlanmasıyla hazırlanır (3). Bu tip aşiların avantajları; patojenite risklerinin olmaması, çok miktarda üretilebilmeleri ve yan etki insidanslarının az olmasıdır. Dezavantajları ise rapel dozlara ihtiyaç duymaları ve adjuvan gerektirmeleridir (10). İnsan papilloma virüs (HPV), hepatit B virüs (HBV) ve aselüler boğmaca aşiları bu grubun temsilcileridir. İnfluenza, RSV, Norovirus, Parvovirus aşiları ise erken faz aşilarındadır (11).

Birçok enfeksiyon için etkili tedavinin olmaması, çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkışı, konvansiyonel lisanslı aşiların güvenliğini geliştirme ihtiyacı ve genomik, proteomik, immünomik gibi omik bilimlerinin bir noktada birleşmesi sonucunda bakteri genomu sekanslama çalışmaları hız kazanmış ve aşı versiyon 3.0 için itici güç olmuştur. Böylece tersine aşı bilimi (Reverse Vaccinology) adı verilen yöntem doğmuştur (12). Bu yöntemde öncelikle patojenin genomu taranmakta, immünoinformatik yardımıyla aşı hedefi olabilecek proteinleri kodlayan genler tanımlanmaya çalışılmaktadır (Şekil 1). Matematik ve bilişimsel yöntemlerden yararlanılarak uygun hedefler seçilmekte, ekspresyonları sağlanmakta ve hayvan modellerine uygulanarak bağışıklık oluşturmaları açısından incelenilmektedir (13,14). Dolayısıyla, yöntem, aşı adayının laboratuvarında kültüre gerek kalmadan seçilmesine olanak sağlamaktadır. Bu teknolojinin ilk başarılı uygulaması grup B meningokok (Men B) aşilarının üretimidir (15,16). Men B aşısının başarısı pek çok patojen için tersine aşı biliminin uygulanmasını teşvik etmiştir. Yöntemin kısıtlılığı ise polisakkaritler gibi aşilamada önemli birçok protein dışı antijenlerin kullanılamamasıdır (3). Ayrıca tersine aşilama yaklaşımları bazı endişeleri de ortaya çıkarmıştır. Bunlar, patojenler arasında genomik ve antijenik değişkenlik olması; popülasyon genomiklerinin ve bakteri türlerinin epidemiyolojisinin derinlemesine incelenmesi ihtiyacı; *in vivo* gen ekspresyon regülasyonu hakkında bilgi eksikliği olması ve biyoinformatik algoritmalar ve fonksiyonel genomik analizler için iyileştirmelerin gerekmesidir. Önümüzdeki yıllarda moleküler patogenezin daha iyi anlaşılması ve yeni patojenik mekanizmaların keşfedilmesiyle, tersine aşilamadaki mevcut boşlukların doldurulması beklenmektedir (7). Her üç aşı versiyonunun avantajı ve dezavantajları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Yeni Aşı Tasarımları

Virüs benzeri partiküllerin (VLP) aşısı olarak kullanılması, aşılarında sadece nükleik asitlerin yer alması ve patojenin bütünü yerine sentetik olarak elde edilen peptid ya da polisakkarit antijenlerinin kullanımıyla hazırlanan konjuge aşılar, atenuye ya da inaktive aşılarla alternatif olabilecek aşı tasarımları olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kanser tedavilerinde kullanılmakta

olan hücresel aşılar bulunmaktadır. Aşağıdaki paragraflarda bu tasarımlara tek tek değinilecektir (Tablo 2).

Virüs benzeri partiküller: Virüse ait enfektif nükleik asit içermeksizin, viral kapsid proteinlerinin kendi kendine birleşmesiyle oluşturulan çoklu protein yapılarıdır. Biyokimyasal bileşimi ve morfolojisiyle virüslere benzerler. Viral genom içermedikleri için replikasyon yetenekleri bulunmamaktadır (17). Bununla birlikte içerdikleri yüksek yoğunluklu kapsid proteini

Tablo 1: Aşı versiyonlarının birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları

	Aşı versiyon 1.0	Aşı versiyon 2.0	Aşı versiyon 3.0
Avantajları	Doğal enfeksiyonu taklit ederek doğal bağışıklığa benzer yanıt oluşturmaları	Patojenite risklerinin olmaması, Çok miktarda üretilebilmeleri, Yan etki insidanslarının az olması	Aşı adayı, laboratuvarında kültüre gerek kalmadan seçilebilir
Dezavantajları	<ul style="list-style-type: none"> Patojeni laboratuvarında üretmede zorluk İstenmeyen bağışık yanıt, Patojenin antijenik çeşitlilik göstermesi ya da hücre içi faza sahip olma gibi durumlarda yetersiz kalması 	<ul style="list-style-type: none"> Rapel doz ihtiyacı, Adjuvan gerektirmeleri 	<ul style="list-style-type: none"> Protein dışı antijenleri tanımlama etmede kullanılamaması, Patojenler arasındaki genomik ve antijenik değişikliklerden dolayı yetersiz kalması, Popülasyon genomiklerinin ve bakteri türlerinin epidemiyolojisinin derinlemesine incelenmesi ihtiyacının olması, <i>In vivo</i> gen ekspresyon regülasyonu hakkında bilgi eksikliği olması, Biyoinformatik algoritmalar ve fonksiyonel genomik analizler için iyileştirmelerin gerekmesi

Tablo 2: Yeni aşı tasarımları

	VLP	Hücresel aşılar	Nükleik asit aşıları	Konjuge aşılar
Özellikleri	<ul style="list-style-type: none"> Boyutlarının hızlı lenf nodu drenajı için uygun olması, Tekrarlayan yüzey geometrisine sahip olmaları, Hem doğal hem de edinsel bağışıklık yanıtı oluşturabilme kabiliyetleri, Ekonomik ve güvenli olmaları, Adjuvan içermeyen kombinasyonlarla uygulanabilmesi, Hızlı aşı üretimine olanak sağlaması. 	<ul style="list-style-type: none"> Büyük popülasyonların tedavisi için karmaşık, Üretim maliyeti yüksek. 	<p>DNA</p> <ul style="list-style-type: none"> Düşük maliyet, Üretim kolaylığı, Hem hücre hem humoral yanıt uyarımı, Enfeksiyon riski yok, Hücre içine ulaşan oranları düşük. <p>RNA</p> <ul style="list-style-type: none"> Düşük maliyet, Hızlı üretim, Çekirdek içine ulaşmalarına gerek yok, hücreye girmeleri yeterli, Molekül olarak kararsız, <i>In vivo</i> verimi düşük. 	<ul style="list-style-type: none"> Bulaşıcı materyal içermez, Adjuvanla birlikte kullanım ya da konjugasyon gerekliliği.
Uygulama alanı	HPV, HBV ve malarya	<ul style="list-style-type: none"> Prostat (Pankreas kanseri malign melanom, böbrek ve glioma tümörleri için klinik çalışmalar devam etmekte) 	<ul style="list-style-type: none"> (HIV, HPV, influenza virüsü, SARS virüsü, SARS-CoV-2, Ebola, Batı Nil virüsü, HBV, HCV, CMV, kuduz virüsü, Zika virüsü için klinik çalışmalar devam etmekte) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Haemophilus influenzae</i> tip B, pnömokok, meningokok ve malarya

VLP: Virüs benzeri partiküller, DNA: Deoksiribonükleik asit, RNA: Ribonükleik asit, HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü, HPV: İnsan papilloma virüsü, SARS: Şiddetli akut solunum sendromu, SARS-CoV-2: Şiddetli akut solunum sendromu-koronavirüs-2, HBV: Hepatit B virüsü, HCV: Hepatit C virüsü, CMV: Sitomegalovirüs

sayesinde, güçlü bağışıklık yanıtı oluşturabilen çok miktarda viral epitopa sahiplerdir (18). VLP, boyutlarının hızlı lenf nodu drenajı için uygun olması, tekrarlayan yüzey geometrisine sahip olmaları, hem doğal hem de edinsel bağışıklık yanıtı oluşturabilme kabiliyetleri, ekonomik ve güvenli olmaları gibi özellikleriyle aşı çalışmalarında kullanılan çok yönlü araçlardır (19,20). VLP'lerin adjuvan içermeyen kombinasyonlarla uygulanabilmesi ve konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı aşı üretimine olanak sağlaması, aşılama için yaygın olarak kullanılan atenüe virüslere göre avantajlarını oluşturmaktadır. Bu durum özellikle influenza gibi sık mutasyona uğrayan patojenlerin tedavisi için yararlı olmaktadır. İnfluenza aşısı üretimi; konvansiyonel yöntemlerle, yıllık suşun sekanslanmasından 9 ay sonra gerçekleşirken VLP üretimiyle bu süre 3-12 haftaya inmektedir (21,22). Günümüzde HPV, HBV ve malarya için lisanslı VLP aşıları bulunmaktadır. Klinik öncesi ve klinik araştırmaları devam eden VLP temelli aşı çalışmaları bulunmaktadır (19).

Aşıların enfeksiyöz etkenlere karşı olan başarıları, benzer yaklaşımın kanser tedavilerinde de kullanılmasında etkili olmuştur. Zayıflatılmış tümör hücreleri (otolog veya allojenik) ya da hastanın kendi bağışıklık hücrelerinin, özellikle de dendritik hücrelerinin belirli kanser türlerine karşı bağışıklık yanıtı oluşturmak için kullanılmasıyla hücre aşıları geliştirilmiştir. Şu anda pankreas kanseri tedavisi için faz II klinik çalışmalarında olan allojenik hücre aşıları bulunmaktadır (23). Prostat, malign melanom, böbrek ve glioma tümörlerine karşı klinik çalışmaları yürütülen çeşitli dendritik hücre aşı çalışmaları bulunmaktadır (24,25). Prostat kanserine karşı geliştirilen dendritik hücre aşısı, Gıda ve İlaç Uygulama onayı alan ilk terapötik kanser aşısıdır (26). Hücre temelli aşı çalışmaları ilgi çekici bir gelişme olmakla birlikte, yeni aşı yaklaşımlarından beklenen büyük popülasyonların tedavisi için daha az karmaşık olması ve daha uygun üretim maliyetine sahip olması hedeflerini karşılamada yetersiz kalmaktadır (27).

Nükleik asit aşıları: DNA'nın plazmid içinde aktarımı veya mRNA'nın direkt enjeksiyonu temeline dayanır. Düşük maliyetle kolayca üretilebilirler ve endojen protein sentezi ile doğal enfeksiyonu taklit ederler. Böylece T hücre yanıtının yanı sıra antikor yanıtı da oluşur. Enfeksiyon riski oluşturmamaları temel avantajlarıdır (28). Plazmidin elektriksel olarak negatif yüklü olması ve hücre dışı kompartmanda kolayca bozulması DNA aşılarının hücre içine ulaşan oranlarının düşük olmasına yol açmaktadır. Aşı hücre içine girse bile çekirdeğe girişinin yetersiz olması bir diğer sorundur. Bu nedenle, bağışık yanıtı yeteri kadar uyaramamaları DNA aşılarının dezavantajını oluşturur (29). Veterinerlik alanında lisanslı DNA aşıları bulunmakla birlikte henüz insanlarda kullanılmak üzere lisans almış DNA aşısı yoktur (30). Bununla birlikte HIV, HPV, influenza virüsü, Şiddetli akut solunum sendromu (SARS) virüsü, Ebola, Batı Nil virüsü,

HBV, HCV, Sitomegalovirüs ve melanoma için tasarlanan DNA aşılarının klinik çalışmaları devam etmektedir (5).

DNA vektörlerinin kısıtlılıkları, çalışmaların ribonükleik asit (RNA) temelli aşılarla yoğunlaşmasına yol açmıştır. DNA aşılarına benzer şekilde düşük maliyetli olmaları ve çok miktarda hızlı bir şekilde üretilebilmeleri önemli avantajlarından. Aynı zamanda, DNA aşılarından farklı olarak RNA aşılarının, çekirdek içine ulaşmalarına gerek olmaması, hücreye girmelerinin yeterli olması da avantajlarından (31). Ancak bunlara rağmen RNA molekülünün kararsızlığı ve *in vivo* veriminin düşük olması sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. RNA temelli aşı çalışmalarının ana odağı, kanserler olmuştur (32). Enfeksiyöz patojenler için ise replike olmayan ve kendi kendine çoğalan RNA aşısı olmak üzere temelde iki tip RNA aşısı kullanılmıştır. Replike olmayan RNA aşılarının üretimi daha basit ve ucuzdur, ancak bu yolla elde edilen ekspresyon süresi ve seviyesi sınırlı olabilmektedir. Kendiliğinden çoğalan RNA aşıları, alfavirüsler gibi pozitif polariteli tek zincirli RNA virüslerinden alınan sekanslara ve prensiplere dayanılarak tasarlanmaktadır. Bu vektörler yapısal olmayan genleri ve immünojenleri kodlar. Bu nedenle teorik olarak enfektif virüs üretimi riski olmadan replikasyon döngüsüne ulaşabilir. Böylece, küçük bir aşı dozu ile antijen kodlayan RNA'nın hücre içi amplifikasyonuna bağlı olarak büyük miktarda antijen üretilir (27). HIV, kuduz ve Zika virüsü gibi enfektif patojenler için RNA temelli aşılama kullanılarak yapılan çeşitli klinik çalışmalar bulunmaktadır (33,34).

Günümüzde Yeni Koronavirüs Hastalığı-2019 (COVID-19) pandemiden sorumlu etken olan SARS-koronavirüs-2 (CoV-2) için de pek çok farklı tipte aşı çalışmaları sürmektedir (35,36). Bu alanda daha çok nükleik asit temelli aşı çalışmaları ön plana çıkmaktadır. Çünkü bu aşı tipi pandemi koşulları için önem arz eden aşı üretimi niteliklerine sahiptir; enfektif virüs ile işleme gerek kalmadan hızlı, çok miktarda ve maliyeti uygun aşı üretimini mümkün kılmaktadır (36). SARS-CoV-2'nin yapısal proteinlerinden olan S proteini yeterli düzeyde nötralizan antikor yanıtı oluşturması ve koruyuculuğu sebebiyle aşı için ideal hedef olarak görünmektedir (37). Lipid nanopartiküllerle kapsüllenmiş mRNA temelli SARS-CoV-2 aşı adayının, virüsün ilk genetik sekansları yayımlandıktan kısa bir süre sonra (10 haftadan az bir sürede) faz I klinik çalışması başlamış bulunmaktadır (36).

RNA temelli aşılar, nükleotid temelli seçenekler arasında daha cazip görünse de, DNA'nın kodlama kapasitesi ve immünojenik protein üretiminin seviyesi ve süresi açısından daha avantajlı olduğu unutulmamalıdır. Partikül aracılı aktarım ya da elektroporasyon teknolojisiyle aktarım ile DNA aşılarının dağıtımındaki sınırlılıkların üstesinden geldiği takdirde, kullanımlarına karşı olan ilgi yeniden canlanacaktır (5). Tablo 3'te DNA ve RNA aşılarının karşılaştırılması verilmiştir.

Konjuge aşılar: Atenüe veya inaktive aşılar, hem polisakkarit hem de protein temelli pek çok farklı antijen içerir. Aslında

koruyucu bağışıklığı sağlamak için bunlardan sadece birkaçı gereklidir ve seçilmiş tek ya da çoklu epitoplara yeterli olmaktadır. Bu gerçeğin keşfedilmesi ile peptid temelli aşı çalışmalarının önü açılmıştır (38,39). Patogenin bütünü yerine sentetik olarak elde edilen peptid ya da polisakkarit antijenlerinin kullanımıyla konvansiyonel aşılarıdaki bulaşıcı materyal ile kontaminasyon riski de ortadan kalkmış olur. Peptid veya polisakkarit temelli aşılar, bağışıklık sistemini bir patojenin tamamına göre daha az uyarabilmektedir, bu sebeple bir adjuvanla birlikte uygulanması gerekir (40). Başka bir yol ise, her ne kadar bağışıklık yanıtının yardımcı moleküle yönlendirilmesine yol açabilse de, antijeni bağışık yanıtı artırdığı bilinen protein veya polisakkarit ikinci bir yardımcıya konjuge etmektir (41,42). *Haemophilus influenzae* tip B, pnömokok, meningokok ve malarya için insanlarda kullanılan konjuge aşılar bulunmaktadır (27).

Aşıların çoğu, optimal etkinliği ve en iyi yolu sunduğu varsayımı ile geleneksel aşı dağıtım yolu olan enjeksiyonla uygulanmaktadır. Derlemenin ilerleyen bölümlerinde belki de aşı kullanımını geliştirmenin bir yolu olarak dikkate alınabilecek farklı aşı dağıtım platformları ve uygulama yolları hakkında bilgi verilmektedir.

Yeni Aşı Dağıtım Platformları

Yeni aşı dağıtım platformları Tablo 4'te toplu olarak sunulmuştur.

İnorganik partiküller: Bağışıklık yanıtını güçlendirmek için hem adjuvan hem de antijen taşıyıcı araç olarak kullanılmıştır. Aşılarında sıklıkla tercih edilen dört inorganik partikül türü altın, alüminyum, kalsiyum fosfat ve silikadır. Saf karbondan oluşturulan yapılar da bu alanda araştırılmıştır (43).

Altın partikülleri oldukça kararlıdır ve çeşitli şekil ve boyutlarda kolaylıkla sentezlenebilir (44). Yüzeyleri oldukça değiştirilebilir olup, bu durum pratikte antijen konjugasyonunu kolaylaştırır (45). Bu özelliklerinden yola çıkılarak, melanom,

influenza ve HB gibi bir dizi hastalık için çeşitli klinik çalışmalarda taşıyıcı olarak kullanılmıştır (46,47).

Alüminyum aşılarında yaygın olarak kullanılan bir adjuvandır (48). Alüminyum partiküllerinin; antijeni, antijen yapısını değiştirip aşı etkinliğini azaltmaya sebep olacak kadar sıkı bir şekilde adsorbe edebildiğini gösteren çalışmalar olsa da, alüminyum partiküllerinin bağışıklık sistemini uyarmak için hem taşıyıcı hem de adjuvan rolünü oynayabildiği de gösterilmiştir (49,50).

Kalsiyum fosfat partikülleri: Biyolojik olarak tekrar emilebilir olması, toksik olmaması, adjuvan olabileceği özelliği taşıması ve kolayca antijenle yüklenebilmesi nedeniyle aşı uygulamalarında kendine kolaylıkla yer bulmuştur (51). Önceleri difteri, tetanoz, boğmaca ve polio aşıları için adjuvan olarak kullanılan kalsiyum fosfat, 1980'lerde yerini alüminyum tuzlarına bırakmıştır. Alüminyum adjuvanlarla ilgili toksisite ve yan etki endişeleri nedeniyle, ticarileştirilmiş aşılarında adjuvan olarak tekrar yer alması önerilmiştir (52).

Silika temelli partiküller: Biyolojik olarak uyumlu olmaları ve hücrelerle etkileşimleri, boyutları ve şekilleri değiştirilerek modifiye edilebilmeleri nedeniyle aşı araştırmalarında popülerdir (53).

Karbon nanopartikülleri çeşitli nanotüpler ve mezoporöz küreler şeklinde sentezlenebilmektedir (54,55). Karbon nanotüpleri potansiyel olarak birden fazla antijen taşıyabilir ve antijen sunucu hücreler tarafından hızla alınır (56). Karbon mezoporöz kürelerin ise, oral aşılama yöntemi olarak kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (57).

Polimerik partiküller: Potansiyel olarak avantajlı biyoyumlulukları ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri nedeniyle, aşı dağıtım alanlarında giderek daha fazla araştırılmaktadır (58). Hem doğal hem sentetik polimerler aşı dağıtımında kullanılmak üzere partikül oluşturmak için kullanılmıştır. Bu partiküller, spesifik bir hücreye aktarmak için antijeni yakalayabilir veya adsorbe edebilir veya yavaş biyolojik

Tablo 3: DNA ve RNA aşılarının birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları

Özellik	DNA aşıları	RNA aşıları
Düşük maliyet, kolay ve hızlı üretim	+	+
Hücrel ve humoral immünite oluşumu	+	+
Enfeksiyon oluşturma riski	-	-
Molekül kararlılığı, <i>in vivo</i> verim	+	±
Genetik kod kapasitesi	+++	+
İmmünojenik protein üretiminin süresi ve seviyesi	+++	+
Aşı platformu çeşitliliği	+	+
Hücre dışı ortama dayanıklılık	Güçlü değil, kolay bozulur	Dayanıklı
Aşının hücre içine ulaşan miktarı	Düşük	Yeterli
Etki için çekirdeğe girme zorunluluğu	Çekirdek içine ulaşmalı	Hücreye girmesi yeterli

DNA: Deoksiribonükleik asit, RNA: Ribonükleik asit

bozunma hızlarından dolayı uzun süreli antijen salımına izin verir (59). Son özellikleri, polimerik partikülleri, rapel doz ihtiyacını ortadan kaldıracak tek doz, gecikmeli salımlı aşıların geliştirilmesi için ana odak noktası haline getirmiştir (60). Bir poli (laktik-ko-glikolik) asit partikülünün antijen salım profili, birkaç günden bir yıldan fazlaya kadar değiştirilebilir (61). İnsülin türevi bir mikropartikül olan Advax, klinik çalışmalarda HB, influenza ve böcek sokması alerjisi aşıları için adjuvan olarak kullanılmıştır (62,63).

Enfektif materyaller: Bakteri ve virüsler, başka bir patojenin antijenini üretmek amacıyla genetik olarak düzenlenebilir (64,65). Bu yöntem için kullanılan suşların, doğal patojenitelerinin düşük olması tercih edilir veya atenüasyon sebebiyle genellikle güvenli oldukları kabul edilir. Bununla birlikte, oluşan bağışıklık yanıtı, hedeflenen antijene karşı değil, taşıyıcı vektöre karşı gözlenebilmektedir (66).

Dış membran vezikülleri: Bakteriyel fosfolipidler, lipopolisakaritler, dış zar proteinleri ve periplazmik bileşenleri içerir ve gram negatif bakteriler tarafından doğal olarak üretilen, kendi kendine replike olmayan veziküllerdir (67). Yüzeylerinde patojenle ilişkili moleküler içerik taşıdıkları için doğal olarak bağışıklık yanıtını uyarabilirler, bu da dış membran veziküllerini adjuvan bir partikül yapar. Dezavantajları, veziküllerin birçok immünojenik bileşen içermesi nedeniyle bağışıklık yanıtının baskın olarak hedeflenen antijene karşı oluşmamasıdır. Bugüne kadar menenjit serogrup B için, insanlarda kullanılmak üzere lisans alan iki dış zar vezikül aşısı bulunmaktadır (68,69).

Bağışıklık yanıtını uyan kompleksler: Fosfolipid, kolesterol, saponin ve protein antijenlerinin karıştırılmasıyla kendiliğinden oluşan küresel kafes benzeri parçacıklardır (70). Bağışıklık yanıtını uyan kompleksler (ISCOM) yapısının oluşması için amfipatik proteinlerin kullanılması gerekir, bu da yapıya katılacak olan antijen tipini kısıtlar. ISCOM'un alternatif bir biçimi ISCOMATRIX ise antijen olmadan formüle edilen bir yapıdır (71). Neredeyse tüm antijenler potansiyel olarak ISCOMATRIX adjuvanı ile birleştirilebileceğinden, bu yaklaşım daha esnek bir uygulama imkânı sağlar. ISCOMATRIX adjuvanı hem profilaktik hem de terapötik aşıların klinik çalışmalarında kullanılmıştır (72).

Tablo 4: Yeni aşı dağıtım platformları

İnorganik partiküller
Polimerik partiküller
Enfektif materyaller
Dış membran vezikülleri
Bağışıklık yanıtını uyan kompleksler
Emülsiyonlar
Lipozomlar
Bitki benzeri materyaller

Emülsiyonlar: Aşılarda çoğunlukla adjuvan olarak kullanılan heterojen sıvılardır. En basit formu yağ içinde su veya su içinde yağdır, ancak su içinde yağ içinde su gibi daha karmaşık çoklu emülsiyon sistemleri de üretilebilir (73). Bir emülsiyonun antijen salım özelliklerini; damlacık boyutu, viskozite ve yağ-su oranı gibi pek çok faktör belirlemektedir (74). Günümüzde insan aşılarında sıklıkla kullanılan emülsiyon, inaktive influenza aşısı içerisinde bulunan, su içinde yağ, skualen bazlı bir emülsiyon olan MF59'dur (75). İntranazal uygulanan nanoemülsiyon aşıları, hem mukozal hem de sistemik bağışıklık yanıtı oluşturmaktadır (5).

Lipozomlar: Biyolojik olarak uyumlu fosfolipitlerden oluşan lipid çift tabakalı küresel veziküllerdir. Aşılamada özellikle aktarım aracı olarak ya da bir adjuvan olarak kullanılırlar (76). Antijenler Lipid çift tabakasının içine gömülebilir veya yüzeyine konjuge edilebilir (77,78). Antijenin lipozomlardaki konumu, aşıya karşı oluşan bağışıklık yanıtının türünü etkiler. T hücre yanıtı hem lipid içine gömülen hem de yüzeye konjuge edilmiş antijenler tarafından uyarılırken, B hücre yanıtı sadece yüzeye konjuge edilmiş antijen tarafından uyarılır (79). Lipozomlar ilk olarak 1974'te difteri toksini için aşının bir parçası olarak kullanılmıştır (80). Sonrasında, insanlarda kullanım için onaylanan hepatit A ve influenza için lipozom temelli aşılar üretilmiştir (81).

Bitki benzeri materyaller: Kolay kullanım, hızlı ve çok miktarda üretim, düşük maliyet, büyük popülasyonları kolayca aşılayabilme avantajlarıyla oral uygulama için cazip bir aşı dağıtım platformudur. Bu tekniğin özellikle pandemilerde yarar sağlayacağı düşünülmektedir (82). Bitkilerin hücre duvarının, hücre içindeki materyali, midenin zorlu koşullarından koruyabilmesi avantajlarıdır. Aşılamada kullanılmak üzere antijenik materyali ekspres etmek/üretmek amacıyla transgenik bitki hücreleri üretilmektedir (83). Pirinç ve mısır gibi mahsuller ekspresyon vektörleri olarak kullanılmıştır (84). Ayrıca patates, domates, muz, marul, havuç, tütün gibi bitkilerle de influenza virüsü, hepatit B ve *Bacillus anthracis* dahil çok çeşitli patojenler için bitki hücresi temelli aşılar geliştirilmiştir (82). Bu yaklaşımın potansiyel bir sınırlaması, mikrobiyomun karmaşıklığının ve çeşitliliğinin aşı yanıtının güvenilirliğini nasıl etkileyeceğidir.

Tek hücreli algler de sahip oldukları sert hücre duvarı ile başka bir cazip aşı dağıtım platformudur. Alg temelli aşıların bitki temelli aşılarla göre bazı üstünlükleri vardır; genetik olarak daha kolay değiştirilebilirler, biyoreaktörlerde yetiştirilebilirler ve büyümek için geniş arazi alanları, mevsim koşulları veya uzun süreler gerektirmezler (85). El ayak ağız hastalığı ve diabetes mellitus gibi hastalıklar ve ayrıca HPV, HBV gibi çeşitli patojenlerin hedeflendiği alg temelli aşı çalışmaları bulunmaktadır (82).

Aşı Uygulama Yolları

Günümüzde aşıların pek çoğu intramusküler veya subkütanöz enjeksiyon ile yapılmaktadır. Fakat enjeksiyonun; ağrı, iğne fobisi, çapraz kontaminasyon, kesici delici alet yaralanması, eğitilmiş personel gerektirmesi, yetersiz veya aşırı doz uygulanması, artmış maliyet ve zayıf hasta uyumu gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerin kırsal bölgelerindeki hastaların aşı uygulaması için hastaneye gitmesi gerekmesi de ayrı bir sorundur (86). Bu nedenle son yıllarda aşıların farklı yollardan uygulanması üzerine yapılan araştırmalar yoğunlaşmaktadır (Tablo 5).

Mukozal uygulama: Patojenlerin çoğunun vücuda girişi solunum, gastrointestinal veya genitoüriner sistem mukozası gibi mukozal yüzeylerdir. Bu sebeple mukozal olarak aktif aşılar yoluyla bu bölgelerde enfeksiyonun önlenmesi, aşı gelişimi için umut verici ve rasyonel bir yaklaşımdır (87). Mukozal aşılarla iğne ve enjektör ile aşılamaya benzer şekilde sistemik bağışıklık oluşturulabilirdiği gibi mukozal IgA üretilmesi sağlanarak mukozal bağışıklık oluşturulduğu da gösterilmiştir (88). Ancak mukozal aşı geliştirme çabalarının önünde gibi birçok zorluk vardır. Örneğin; antijenler epitel boyunca nispeten sınırlı sayıda bölgeden girebilmektedir, mukozaların asidik ve proteolitik ortamı uygulanan antijenlerin stabilitesini, bütünlüğünü ve tutulma süresini etkilemektedir ve etkili bağışıklık yanıtı oluşturmak için adjuvanların eklenmesi gerekebilmektedir (89). Bu zorluklara rağmen, en yaygın ikisi intranazal ve oral; diğerleri oküler, intravajinal ve intrarektal olmak üzere çok çeşitli mukozal aşılama yolları araştırılmaktadır. Uygulamada nazal sprey şeklinde influenza virüs aşısı ve oral yolla kullanılan tifo, kolera, rotavirüs, polio virüs aşıları bulunmaktadır (27). İntravajinal

aşılama, HIV, HPV ve klamidya gibi genital sistem yoluyla bulaşan patojenlere bağlı enfeksiyonları önlemek amacıyla üzerinde çalışılmış bir aşılama yoludur (90). Popülasyonun sadece kadın bireylerinin bağışıklanabilmesi, yeterli kitle bağışıklığını sağlamaması gibi nedenlerle bu yöntem diğerleri kadar kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (27).

Intrarektal aşılama: Enterik patojenler, cinsel yolla bulaşan hastalıklar ve kanser gibi hastalıkları önlemek için araştırılan başka bir aşı uygulama yöntemidir (91,92). Bu aşılama yöntemi hastalar tarafından zayıf kabul edilebilirliği sebebiyle yaygın olarak kullanılmamaktadır (93).

Transdermal (transkutanöz) uygulama: Antijenin epidermis ve/veya dermis tabakasına bozulmamış veya ön işlem görmüş deri üzerinden verilmesidir. Sadece deriye erişim kolaylığı açısından değil aynı zamanda Langerhans hücreleri, dermal dentritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar ve mast hücrelerinin burada yoğun bir ağ oluşturması nedeniyle deri dokusunun sahip olduğu benzersiz immünolojik özelliklerinden dolayı aşılama için oldukça cazip bir alternatif yoldur (94). Bir aşının kutanöz yoldan verilmesinin, bazı olgularda daha düşük aşı dozları kullanılsa bile, intramusküler enjeksiyon yolu ile karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek bağışıklık yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir (95). Bu özellikler, aşı tedarikinin sınırlı olduğu ve dozun azaltılmasının gerektiği pandemi koşulları için özel bir öneme sahiptir.

Transdermal olarak antijen aktarımı pasif ya da aktif yolla yapılabilir. Pasif yol, en basit teknikle, bütünlüğü bozulmamış cilde veya soyma-sıyırma gibi stratum corneumun aşındırılması ile ön işlem görmüş cilde pasif difüzyon yoluyla uygulanabilir (96). Non-invaziv bir yöntem olması ve stratum corneum tabakasının yıkılmasını gerektiren yöntemlere kıyasla ikincil

Tablo 5: Aşı uygulama yolları

Aşı uygulama yolu	Avantaj	Dezavantaj
<ul style="list-style-type: none"> Enjeksiyon (intramusküler veya subkütanöz) 	<ul style="list-style-type: none"> Geleneksel yol 	<ul style="list-style-type: none"> Ağrı oluşturması, İğne fobisi olanlarda uygulama zorluğu (zayıf hasta uyumu), Çapraz kontaminasyon oluşabilmesi, Kesici delici alet yaralanmasına yol açabilmesi, Eğitilmiş personel gerektirmesi Yetersiz veya aşırı doz uygulanabilmesi, Yüksek maliyet
<ul style="list-style-type: none"> Mukozal uygulama (intranazal, oral, oküler, intravajinal, intrarektal) 	<ul style="list-style-type: none"> Patojenleri vücuda giriş yerinde karşılaması, Mukozal IgA üretilmesi 	<ul style="list-style-type: none"> Antijenlerin epitel boyunca nispeten sınırlı sayıda bölgeden girebilmesi, Mukozaların asidik ve proteolitik ortamının uygulanan antijenlerin stabilitesini, bütünlüğünü ve tutulma süresini etkilemesi, Adjuvanların eklenmesinin gerekebilmesi,
<ul style="list-style-type: none"> Transdermal uygulama 	<ul style="list-style-type: none"> Uygulama kolaylığı, Düşük doz ile enjeksiyon ile benzer yanıt 	<ul style="list-style-type: none"> Yanıt oluşumu için uzun süre gerekebilmesi

enfeksiyon riskinin daha düşük olması avantajıdır (97). Dezavantajı ise bağışık yanıtın oluşması için uzun süre (16 saat olduğunu bildiren çalışma bulunmaktadır) geçmesinin gerekmesidir (98).

Aktif aktarım yaklaşımlarında antijen, iğne içermeyen jet ve toz enjeksiyonla veya üst deri katmanlarında mikro kanallar veya geçici boşluklar oluşturarak doğrudan bağışıklık hücrelerine aktarılır. Bu tür aktif mikroporasyon teknikleri arasında mikro iğnelerin kullanımı, termal mikroporasyon, radyofrekans ablasyon ve lazer porasyonunun yanı sıra elektroporasyon ve sonoporasyon bulunur (99).

Gelişim Aşamasında Olan Yeni Aşılar

Bugün tüm dünyada gözler, 2019'un son aylarında saptanan ve hızla pandemi oluşturan COVID-19'a çevrilmiş durumdadır. Salgının ilk başladığı günlerden itibaren sayısız klinik araştırma yapılmış ve yapıyor olmakla birlikte, tüm hasta gruplarında etkin bir antiviral ilaç henüz bulunamamıştır. Bu durum tüm toplumun SARS-CoV-2'ye karşı aşılmasının gerekliliğini ve pandemiyi kontrolünde belki de en etkili yolun aşılamaya olduğunu göstermektedir. Şu anda 100'den fazla aşı adayı üzerinde çalışmalar devam etmekte ve bu sayı her geçen gün artmaktadır. İnaktive, mRNA temelli, vektör olarak bakteri, adenovirüs ya da lentivirüs kullanan, DNA plazmid ya da rekombinant protein içeren aşılar üzerine araştırmalar devam etmektedir. Ancak geliştirilecek olan aşının güvenilirliği, etkinliği, koruma düzeyi ile ilgili pek çok klinik çalışmaya ihtiyaç duyulduğu gibi, etkin bağışık yanıt oluşturması için gereken doz ve uygulama yolu gibi faktörlerin kesinlik kazanması ve son olarak da aşının yeterli miktarda üretimi, depolanması ve dağıtımı ile ilgili pek çok sorunun üstesinden gelinmesi gerekmektedir (100).

Sonuç

Aşıların başarılı tarihi ve günümüzde eriştiği teknolojiye rağmen yeni aşı çalışmalarının önünde aşılması gereken birçok zorluk vardır. Yeni bir aşının oluşturulması sırasında, aşı sonrası oluşan bağışık yanıt türü (hümmoral ya da hüresel yanıtlar), aşının etki gücü (herhangi bir seviyedeki enfeksiyona karşı koruma sağlar mı ciddi enfeksiyonu azaltır mı), uzun ömürlülüğü (rapel doz ihtiyacı) gibi sorulara yanıt bulunmalıdır. Dahası, bağışıklık yanıtının nasıl oluşturulduğu (protein, epitop, antikor) ve nasıl aktarıldığı (vektörler, adjuvanlar, formülasyonlar) da cevaplanması gereken sorular arasındadır. Hayvan modelleriyle geliştirilen bir aşının; kütleye göre ölçeklendirilmesi (insan denemelerinde kullanımı), doz ayarlaması, uygulama yolu (oral, intranasal, intramusküler), etkili bir şekilde koruyacağı hedef popülasyonunun genişliği (infantlar, ileri yaşlılar, bağışıklık sistemi baskılı olanlar) konusunda da sıkıntılar olabilir. Bu maddelerin her biri aşı geliştirilirken incelenmesi, anlaşılması,

araştırılması gereken unsurlardır. Tüm bu zorluklarına rağmen, aşılamaya enfeksiyon hastalıklarını önleme ve halk sağlığını geliştirme adına önemli ve maliyet etkin bir yöntemdir.

Atenüe ya da inaktive tipte aşılarından oluşan konvansiyonel yaklaşımın eksikliklerinin, yeni geliştirilen aşı tasarımları, dağıtım yolları, uygulama teknolojileri ile giderilebileceğini düşünmekteyiz. İnsan bağışıklık sistemindeki ve konak-patojen ilişkisindeki artan anlayışımızla birleşen bu araçlar; daha etkili, daha uygun maliyetli, doz miktarı daha az olan, yan etkileri en aza indirilmiş, hızlı ve çok miktarda üretilebilen, kolay uygulanabilen, gelişmekte olan ülkeler için dağıtımı ve saklanması kolay olan kısacası rasyonel ve minimalist prensipte aşıların üretilmesi için güçlü stratejiler sağlarlar. Böylece aşıların tıp tarihindeki başarılı serüvenlerine artan ivmeyle devam etmeleri beklenmektedir.

Aşı ile önlenebilir hastalıklar sağlık hizmeti sistemi üzerinde önemli bir yük olmaya devam etmektedir. Özellikle yaşamakta olduğumuz COVID-19 pandemisinde, etkin korunma yöntemlerinin tüm dünyada yetersiz kaldığının görülmesi aşı çalışmalarına büyük umutlar bağlanmasına neden olmuştur. Günümüzde aşı çalışmalarının bir bölümü özel sektör, bir bölümü üniversitelerin araştırma ayağı tarafından desteklenirken, büyük bir bölümü de devlet desteği ile yürütülmektedir. Bu alanda özellikle gerekli alt yapı ve finansal desteğin sağlanması büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda tüm dünyanın yakından izlediği COVID-19 aşısı geliştirme alanındaki çalışmalar, multidisipliner iş birliklerinin gerekliliğini ve veriminin yüksekliğini gözler önüne sermiştir. Günümüzde yaşadığımız bize, koruyucu hekimlik uygulamalarının yetersiz kaldığı ve tedavisi olmayan pek çok enfeksiyon hastalığı arasından kolay bulaşan, hayatı tehdit eden ve pandemiye yol açabilecek olanlarına öncelik verilerek, bu alandaki aşı çalışmalarına ağırlık verilmesi gerektiğini göstermiştir.

Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunun içinden ve dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: S.G.K., İ.D., Dizayn: S.G.K., İ.D., Veri Toplama veya İşleme: S.G.K., İ.D., Analiz veya Yorumlama: S.G.K., İ.D., Literatür Arama: S.G.K., İ.D., Yazan: S.G.K., İ.D.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005;18:21-25.
2. World Health Organization. The global eradication of smallpox: final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, December 1979;1-122.
3. Loomis RJ, Johnson PR. Emerging Vaccine Technologies. Vaccines (Basel). 2015;3:429-447.

4. De Gregorio E, Rappuoli R. From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:505-514.
5. Stanberry LR, Strugnell R. Vaccines of the future. *Perspectives in Vaccinology*. 2011;1:151-199.
6. Bragazzi NL, Gianfredi V, Villarini M, et al. Vaccines Meet Big Data: State-of-the-Art and Future Prospects. From the Classical 3Is ("Isolate-Inactivate-Inject") Vaccinology 1.0 to Vaccinology 3.0, Vaccinomics, and Beyond: A Historical Overview. *Front Public Health*. 2018;6:62.
7. Rhee JH. Towards Vaccine 3.0: new era opened in vaccine research and industry. *Clin Exp Vaccine Res*. 2014;3:1-4.
8. Lepenies B, Yin J, Seeberger PH. Applications of synthetic carbohydrates to chemical biology. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14:404-411.
9. Pardee K, Slomovic S, Nguyen PQ, et al. Portable, On-Demand Biomolecular Manufacturing. *Cell*. 2016;167:248-259.
10. Türkiye EKMUD- Erişkin Bağışıklama Rehberi Türkiye Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği. 2. Güncelleme-2016.
11. Plotkin S, Orenstein W, Offit P. A short history of vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (Eds.) *Plotkin's Vaccines*, sixthed, Saunders Elsevier, 2018:1-8.
12. Bagnoli F, Baudner B, Mishra RP, et al. Designing the next generation of vaccines for global public health. *OMICS*. 2011;15:545-566.
13. Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:109-116.
14. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3:445-450.
15. Pizza M, Scarlato V, Masignani V, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000;287:1816-1820.
16. Mora M, Veggi D, Santini L, et al. Reverse vaccinology. *Drug Discov Today*. 2003;8:459-464.
17. Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9:1149-1176.
18. Akahata W, Yang ZY, Andersen H, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat Med*. 2010;16:334-338.
19. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, et al. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*. 2017;34:123-132.
20. Fuenmayor J, Gódia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *N Biotechnol*. 2017;39:174-180.
21. Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science*. 2006;312:380-382.
22. López-Macias C. Virus-like particle (VLP)-based vaccines for pandemic influenza: performance of a VLP vaccine during the 2009 influenza pandemic. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8:411-414.
23. Lee V, Rodriguez C, Shupe E-M, et al. Phase II study of GM-CSF secreting allogeneic pancreatic cancer vaccine (GVAX) with PD-1 blockade antibody and stereotactic body radiation therapy (SBRT) for locally advanced pancreas cancer (LAPC). *J Clin Oncol* 2017; 35:15_suppl.
24. Tryggestad AA, Bigalke I, Axcrone K, et al. 21 - results from a first in man phase I/II adjuvant dendritic cell vaccine study in high risk prostate cancer patients following radical surgery. *Cytotherapy*. 2017;19:15.
25. Phuphanich S, Wheeler CJ, Rudnick JD, et al. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62:125-135.
26. Plosker GL. Sipuleucel-T: in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drugs*. 2011;71:101-108.
27. Wallis J, Shenton DP, Carlisle RC. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. *Clin Exp Immunol*. 2019;196:189-204.
28. Francis MJ. Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2018;48:231-241.
29. Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:91-96.
30. Redding L, Weiner DB. DNA vaccines in veterinary use. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8:1251-1276.
31. Bettinger T, Carlisle RC, Read ML, et al. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and post-mitotic cells. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:3882-3891.
32. Grunwitz C, Kranz LM. mRNA Cancer Vaccines—Messages that Prevail. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;405:145-164.
33. Jacobson JM, Routy JP, Welles S, et al. Dendritic Cell Immunotherapy for HIV-1 Infection Using Autologous HIV-1 RNA: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016;72:31-38.
34. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*. 2017;168:1114-1125.
35. World Health Organization. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. 2020 [https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines]. (Erişim tarihi: 30 MAYIS 2020).
36. Lurie N, Saville M, Hatchett R, et al. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. *N Engl J Med*. 2020;382:1969-1973.
37. Subbarao K. SARS-CoV-2: A New Song Recalls an Old Melody. *Cell Host Microbe*. 2020;27:692-694.
38. Li W, Joshi MD, Singhania S, et al. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. *Vaccines (Basel)*. 2014;2:515-536.
39. González-Fernández A, Faro J, Fernández C. Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice. *Vaccine*. 2008;26:292-300.
40. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, et al. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm*. 2008;364:272-280.
41. Schutze MP, Leclerc C, Jolivet M, et al. Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J Immunol*. 1985;135:2319-2322.
42. Bröker M, Berti F, Schneider J, et al. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a "neglected valency" - Potential and limitations. *Vaccine*. 2017;35:3286-3294.
43. Smith JD, Morton LD, Ulery BD. Nanoparticles as synthetic vaccines. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;34:217-224.
44. Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, et al. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013;7:3926-3938.
45. Gregory AE, Judy BM, Qazi O, et al. A gold nanoparticle-linked glycoconjugate vaccine against *Burkholderia mallei*. *Nanomedicine*. 2015;11:447-456.
46. Ginsberg BA, Gallardo HF, Rasalan TS, et al. Immunologic response to xenogeneic gp100 DNA in melanoma patients: comparison of particle-mediated epidermal delivery with intramuscular injection. *Clin Cancer Res*. 2010;16:4057-4065.
47. Roy MJ, Wu MS, Barr LJ, et al. Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine*. 2000;19:764-778.
48. Sun B, Ji Z, Liao YP, et al. Engineering an effective immune adjuvant by designed control of shape and crystallinity of aluminum oxyhydroxide nanoparticles. *ACS Nano*. 2013;7:10834-10849.
49. Maquieira Á, Brun EM, Garcés-García M, et al. Aluminum oxide nanoparticles as carriers and adjuvants for eliciting antibodies from non-immunogenic haptens. *Anal Chem*. 2012;84:9340-9348.
50. Fox CB, Kramer RM, Barnes V L, et al. Working together: interactions between vaccine antigens and adjuvants. *Ther Adv Vaccines*. 2013;1:7-20.
51. Lin Y, Wang X, Huang X, et al. Calcium phosphate nanoparticles as a new generation vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:895-906.
52. Masson JD, Thibaudon M, Bélec L, et al. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:289-299.
53. Niut Y, Popatt A, Yu M, et al. Recent advances in the rational design of silica-based nanoparticles for gene therapy. *Ther Deliv*. 2012;3:1217-1237.
54. Parra J, Abad-Somovilla A, Mercader JV, et al. Carbon nanotube-protein carriers enhance size-dependent self-adjuvant antibody response to haptens. *J Control Release*. 2013;170:242-251.

55. Li S, Pasc A, Fierro V, et al. Hollow carbon spheres, synthesis and applications – a review. *J Mater Chem A*. 2016;4:12686–12713.
56. Kim M-G, Park JY, Shon Y, et al. Nanotechnology and vaccine development. *Asian J Pharm Sci*. 2014;9:227–235.
57. Wang T, Zou M, Jiang H, et al. Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. *Eur J Pharm Sci*. 2011;44:653–659.
58. Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014;32:327–337.
59. Zeng Q, Li H, Jiang H, et al. Tailoring polymeric hybrid micelles with lymph node targeting ability to improve the potency of cancer vaccines. *Biomaterials*. 2017;122:105–113.
60. Walters AA, Krastev C, Hill AV, et al. Next generation vaccines: single-dose encapsulated vaccines for improved global immunisation coverage and efficacy. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67:400–408.
61. Bailey BA, Desai KH, Ochyl LJ, et al. Self-encapsulating Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres for Intranasal Vaccine Delivery. *Mol Pharm*. 2017;14:3228–3237.
62. Gordon D, Kelley P, Heinzl S, et al. Immunogenicity and safety of Advax™, a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin, when formulated with hepatitis B surface antigen: a randomized controlled Phase 1 study. *Vaccine*. 2014;32:6469–6477.
63. Heddle R, Russo P, Petrovsky N, et al. Immunotherapy – 2076. A controlled study of delta inulin-adjuvanted honey bee venom immunotherapy. *World Allergy Organization Journal* 2013 6(Suppl 1):P158.
64. Brault AC, Domi A, McDonald EM, et al. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Sci Rep*. 2017;7:14769.
65. Jong WS, Daleke-Schermerhorn MH, Vikström D, et al. An autotransporter display platform for the development of multivalent recombinant bacterial vector vaccines. *Microb Cell Fact*. 2014;13:162.
66. Kotton CN, Lankowski AJ, Scott N, et al. Safety and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivering an HIV-1 Gag antigen via the *Salmonella* Type III secretion system. *Vaccine*. 2006;24:6216–6224.
67. Gerritzen MJH, Martens DE, Wijffels RH, et al. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnol Adv*. 2017;35:565–574.
68. Shirley M, Dhillon S. Bivalent rLP2086 Vaccine (Trumenba®): A Review in Active Immunization Against Invasive Meningococcal Group B Disease in Individuals Aged 10–25 Years. *BioDrugs*. 2015;29:353–361.
69. Carter NJ. Multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB; Bexsero®): a review of its use in primary and booster vaccination. *BioDrugs*. 2013;27:263–274.
70. Morein B, Sundquist B, Höglund S, et al. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. 1984;308:457–460.
71. Drane D, Gittleson C, Boyle J, et al. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6:761–772.
72. Cebon JS, McArthur GA, Chen W, et al. Randomized, double-blind Phase II trial of ny-eso-1 iscomatrix vaccine and iscomatrix adjuvant alone in patients with resected stage IIc, III, or IV malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2014;32:9050.
73. Khan AY, Talegaonkar S, Iqbal Z, et al. Multiple emulsions: an overview. *Curr Drug Deliv*. 2006;3:429–443.
74. Saroja Ch, Lakshmi P, Bhaskaran S. Recent trends in vaccine delivery systems: A review. *Int J Pharm Investig*. 2011;1:64–74.
75. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, et al. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12:13–30.
76. Alving CR, Beck Z, Matyas GR, et al. Liposomal adjuvants for human vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13:807–816.
77. Hills T, Jakeman PG, Carlisle RC, et al. A Rapid-Response Humoral Vaccine Platform Exploiting Pre-Existing Non-Cognate Populations of Anti-Vaccine or Anti-Viral CD4+ T Helper Cells to Confirm B Cell Activation. *PLoS One*. 2016;11:0166383.
78. Matyas GR, Mayorov AV, Rice KC, et al. Liposomes containing monophosphoryl lipid A: a potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin hapten analogs. *Vaccine*. 2013;31:2804–2810.
79. Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines*. 2014;2:159–182.
80. Allison AG, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*. 1974;252:252.
81. Bovier PA. Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7:1141–1150.
82. Concha C, Cañas R, Macuer J, et al. Disease Prevention: An Opportunity to Expand Edible Plant-Based Vaccines? *Vaccines (Basel)*. 2017;5:14.
83. Sala F, Manuela Rigano M, Barbante A, et al. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*. 2003;21:803–808.
84. Azegami T, Itoh H, Kiyono H, et al. Novel transgenic rice-based vaccines. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63:87–99.
85. Specht EA, Mayfield SP. Algae-based oral recombinant vaccines. *Front Microbiol*. 2014;5:60.
86. Zheng Z, Diaz-Arévalo D, Guan H, et al. Noninvasive vaccination against infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14:1717–1733.
87. Su F, Patel GB, Hu S, et al. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12:1070–1079.
88. Sasaki S, Sumino K, Hamajima K, et al. 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*. 1998;72:4931–4939.
89. Corthésy B, Bioley G. Lipid-Based Particles: Versatile Delivery Systems for Mucosal Vaccination against Infection. *Front Immunol*. 2018;9:431.
90. Pavot V, Rochereau N, Genin C, et al. New insights in mucosal vaccine development. *Vaccine*. 2012;30:142–154.
91. Kozłowski PA, Williams SB, Lynch RM, et al. Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *J Immunol*. 2002;169:566–574.
92. Kim-Schulze S, Kim HS, Wainstein A, et al. Intrarectal vaccination with recombinant vaccinia virus expressing carcinoembryonic antigen induces mucosal and systemic immunity and prevents progression of colorectal cancer. *J Immunol*. 2008;181:8112–8119.
93. Shakya AK, Chowdhury MYE, et al. Mucosal vaccine delivery: Current state and a pediatric perspective. *J Control Release*. 2016;240:394–413.
94. Nicolas JF, Guy B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7:1201–1214.
95. Kim YC, Quan FS, Yoo DG, et al. Enhanced memory responses to seasonal H1N1 influenza vaccination of the skin with the use of vaccine-coated microneedles. *J Infect Dis*. 2010;201:190–198.
96. Strid J, Hourihane J, Kimber I, et al. Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur J Immunol*. 2004;34:2100–2109.
97. Pielenhofer J, Sohl J, Windbergs M, et al. Current Progress in Particle-Based Systems for Transdermal Vaccine Delivery. *Front Immunol*. 2020;11:266.
98. Alkilani AZ, McCrudden MT, Donnelly RF. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*. 2015;7:438–470.
99. Engelke L, Winter G, Hook S, et al. Recent insights into cutaneous immunization: How to vaccinate via the skin. *Vaccine*. 2015;33:4663–4674.
100. Wang J, Peng Y, Xu H, et al. The COVID-19 Vaccine Race: Challenges and Opportunities in Vaccine Formulation. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21:225.