

Bağışıklamada Yenilik: DNA Aşıları

Dr. Adem Aydın

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Sosyal Pediatri Bilim Dalı

Özet

DNA aşıları, antijen kodlayan genleri ve memeli hücrelerinde gen ekspresyonu yapan promoter bölgelerini içeren basit DNA halkalarından oluşur. DNA aşıları, antijen sunan hücreler, sitolitik lenfositler, yardımcı T hücreleri ve antikorları gibi istenen tüm bağışıklık tiplerini sağlamada yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Bu yazıda, DNA aşılarının mekanizması, deneysel ve klinik etkileri, veriliş yolları ve gelecekteki bakış açılarının gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: DNA aşısı, bağışıklık

Abstract

DNA Vaccines

The DNA vaccines are simple rings of DNA containing a gene encoding an antigen, and a promoter to make the gene express in mammalian cells. DNA vaccines are promising new approach for generating all types of desired immunity such as antigen presenting cells, cytolytic lymphocytes, T helper cells and antibodies. This review gives a general overview of the mechanism, preclinical and clinical efficacy, delivery routes and future perspectives of DNA vaccines.

Keywords: DNA vaccines, immunity

Giriş

Günümüzde kullanılmakta olan geleneksel aşılar, bulaşıcı hastalıkların kontrolünde ve ortadan kaldırılmasında oldukça etkindirler. Bununla birlikte, bazı aşıların verimli kullanımları ile ilişkili güçlükler vardır. Bunlar, i) yaşam boyu kalıcı ve etkin bir bağışıklık sağlamak için, çoğu zaman tekrarlayan dozlara gereksinim olması, ii) kısa raf ömrü nedeni ile buzdolabı ve transport aşamalarında soğuk zincir gereksinimi göstermesi, iii) birçok durumda bağışıklık sisteminin hümorale bağışıklık sistemi üzerine etkin olamamasına bağlı

olarak (çok ılımlı bir hücreyel yanıt gelişir) etkin olmayan kalıcı bağışıklık oluşturması şeklinde sıralanabilir (1).

Niçin yeni aşıya gereksinim vardır?

Aşı ile önlenemez birçok enfeksiyon hastalığına karşı henüz etkin bir aşı geliştirilememiştir. Her yıl, etkin aşı olmaması nedeniyle çoğunluğu çocuklardan oluşan milyonlarca kişi HIV/AIDS, verem ve sıtma gibi enfeksiyon hastalıklarından ölmektedir. Ek olarak, özellikle hepatit B, insan papilloma virusu gibi bazı hastalıklar sonrası kansere yatkınlık yaratmaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı tüm hastalıklara karşı etkin olan yeni aşı geliştirilmesine gereksinim vardır.

Yazışma adresi: Dr. Adem Aydın

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Sosyal Pediatri BD, İzmir
E-posta: adem.aydin@deu.eud.tr

İnsanlarda kullanılmakta olan geleneksel aşuların çoğu, zayıflatılmış ya da ölü kopyalanmış patojenlerden geliştirilmektedir. Buna karşın yukarıda sözü edilen bazı kısıtlamalar yüzünden geleceğin aşı bilimi nükleik asit ilişkili ya da immünojenlerin alt birimlerine odaklanmış durumdadır. Bu amaçla, birincil olarak protein ve polisakkarid antijenler ve hedef patojenler ile ilişkili DNA, RNA ya da oligonükleotidleri içeren aşı bileşenleri üzerindeki çalışmalar artarak sürmekte; enfeksiyon hastalıklarının önlenmesi, kanser tedavisi, otoimmün hastalıklar ve alerjik hastalıklara karşı aşı geliştirme çalışmaları hızla artmaktadır. Bu çalışmalar sırasında, bir yandan aşı bileşeni ile ilgili gelişmeler olurken, öte yandan aşı uygulama yolları, adjuvanlar ve taşıyıcı sistemler konusunda da önemli adımlar atılmaktadır. Bu yazıda yeni gelişmelerin odağında olan DNA aşuları tartışılacaktır.

Tarihsel gelişim

DNA aşuları yolunu gen tedavisi açmıştır. İlk kez 1990 yılında Wolff ve arkadaşları, müsküler distrofi tedavisi için kas hücrelerinin içine çıplak DNA'nın verilebileceğini gösterdiler (2). Yine bu yıllarda gen silahı olarak kullanılan DNA aşularının etkinliği ile ilgili deneysel bir çalışma yayımlandı (3). Bundan bir yıl sonra, influenza virusu viral nükleoprotein ve hemaglutinini kodlayan genler kullanılarak fareler üzerinde denenen immünoprotrektif DNA aşuları ile ilgili ilk raporlar yayımlandı (4-6). Hemen hemen aynı dönemde diğer çalışmacılar HIV ve hepatit B virusu genlerinin farelere enjeksiyonundan sonra meydana gelen immün yanıtları incelediler (7,8). Yine aynı yıllarda Mancini ve ark. (9), geleneksel aşı antijenlerine karşı immüntolerans gösteren transgenik farelerde HBV yüzey antijenine karşı immün yanıt almayı başardılar.

DNA aşularının; sitotoksik T hücrelerini uyarıda yüksek etkinliğe sahip olması nedeniyle; özellikle hücre içi enfeksiyonlar şeklinde görülen, parazit infestasyonları, aşı ile yüksek etkinlikte korunması olası olmayan bazı viral hasta-

lıklar, daha önce kullanılan aşı yöntemleri ile yeterli yanıt alınamayan tüberküloz, AIDS ve SARS gibi hastalıklar ile ilgili çalışmalar yapıldı. Ek olarak, DNA aşuları özellikle immün yanıtları yönetme ve düzenleme şansını sunmaktadır. Bunun sonucunda immüntolerans durumları, alerjik hastalıklar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde de DNA aşularının kullanılabilirliği değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu hızlı gelişmenin bir diğer yönlendiricisi ise; son dönemlerde ortaya çıkan biyolojik savaş durumlarında DNA aşularının daha kolay, güvenilir ve hızlı olarak üretilebileceği öngörüsünün kabul edilmesidir (10).

Bu heyecan verici yeni teknoloji hızla gelişti ve yeni yayınların sayısı katlanarak arttı. Bu derlemenin hazırlandığı zamana değin DNA aşuları ile ilgili çalışmalar logaritmik olarak artarak son 20 yılda "pub-med" veri tabanında indekslenen dergilerde 4100'ü aşan makaleye ulaştı. İlk çalışmalar kısmen mekanik ve klinik öncesi modellerle yapılırken daha sonraları değişik hastalıklarda insan çalışmaları da yapıldı.

DNA aşularının bağışık yanıtını uyarma mekanizması

Değişik yöntemlerle, elde edilen virus, bakteri ve parazit DNA'sı bir plazmid ile bir dokuya enjekte edildiği zaman, örneğin kas hücresine DNA parçacığı içeren bu plazmidler kas hücresi tarafından alınır. Hücre zarından geçiş işleminin basit bir işlem olmayıp "Toll-like receptor" (TLR) aracılığı ile olduğu son dönemde gösterilmiştir (11). TLR'ler değişik organizmalar için değişik altgruplara sahiptir ve bunlar 1-9 arasında numaralandırılmıştır. Ancak TLR yalnız aşı suşuna özgü değildir. Her mikroorganizmanın kullandığı TLR alt birimleri farklı olabilir ve burada oluşan mutasyon ya da kodlama bozuklukları değişik direnç durumları ve aşı etkisinde yetersizliklere neden olabilir (11).

Vektöre bağlı olan plazmid DNA'nın işlenmek ve formülasyon için özel bir metot gerektirmediği gösterilmiştir (2). Ancak, gelenek-

sel kas içi ya da deri içi uygulamalardaki bazı yetersizlikler göz önüne alındığında; etkinliğin daha fazla olması ve daha küçük hacimlerde verilmesi gibi avantajlar sağlayacağından gen silahı, mukozal uygulama, basınçlı enjeksiyonlar ve elektroporasyon gibi yöntemlerle verilmesi etkinliğini artırıcıdır. Kas hücresi ve dendritik hücre gibi antijen sunucu bir hücreye geçen DNA parçacığı (aşı), hücre çekirdeğinde işlemlendikten sonra, ilgili mRNA sentezini sağlar. Enjekte edilen bölgede hücrelerin sadece çok az bir kısmı sunulan genleri eksprese ettiklerinden, kas hücreleri tarafından DNA alımı çok verimli görünmemektedir. Ancak dendritik hücreler gibi diğer antijen sunucu hücreler de oldukça etkindir.

Yeni sentezlenen protein, proteozom kompleksi tarafından sentezlenir ve bunun küçük peptidleri MHC-I moleküllerine bağlanır. Bu moleküller sitoplazmik membrana geçerek peptidleri CD8 taşıyan T lenfositlerine sunarlar. CD8 + T hücrelerine bağlanma, peptid özgül sitotoksik T hücrelerinin (CTL) seçilmesi ve uyarılması ile sonuçlanır. Aynı peptidlerin hücrelerin yüzeyinde görülmesiyle, bu hücrelere karşı letal CTL saldırısı başlatılır (4). Diğer taraftan yine işlemlenmiş mRNA, golgi aygıtı yolu ile işlemlendiğinde, MHC-II molekülleri aracılığı ile CD4+ hücrelerini etkileyerek sitokin salınmasına neden olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir (12-14).

Yukarıda tanımlanan mekanizmalar ile açığa çıkan değişik sitokinler kalıcı bağışıklık sağlamak üzere, hücre dışı ortamda B hücrelerini duyarlı kılar. Öte yandan B hücre reseptörleri ve antikor cevabının uyarılması için antijenlerin B hücreleri ile dolaşımında karşılaşabilmeleri, bunun için de üretildikleri hücrelerden mutlaka salınmaları gerekmektedir. Miyositlerin aktif olarak antijenleri sekrete edip etmediği bilinmiyor; ancak tıpkı sitotoksik T lenfositlerine antijen sunan hücreler gibi nekrotik veya apoptotik hücre ölümü de antijenleri çevreye salar ve B hücrelerine bu antijenleri sunar.

Yukarıda anlatılan bu basitleştirilmiş model, miyositler ve dendritik hücrelerin birer antijen sunucu hücre gibi davrandığını varsayar. Bu model DNA aşılarının etki mekanizmalarını tüm olarak göstermediği gibi, bu model dışında diğer bazı savunma mekanizmalarının da bağışık yanıtta etkisi vardır. Şimdiye kadarki bilgilere dayanılarak olayın görüldüğünden daha karmaşık olduğu söylenebilir. Miyositler tarafından salınan yabancı antijenlerin, önceden duyarlı miyosit hücresine enjekte edilmesi ile antijene karşı immün yanıt oluşturulduğu Ulmer ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (15). Diğer yandan, içine plazmid verilen kas iğciği, enjeksiyondan mümkün olan en kısa sürede (birkaç dakika içinde) cerrahi olarak çıkarıldığında, sitotoksik T hücrelerinin uyarılması ve antikor yanıtının oluşması üzerinde herhangi bir olumsuz etki yaratmadığı fareler üzerinde gözlenmiştir (16). Sonuç olarak, plazmidler verildikleri bölgeden çevreye hızlı yayılırlar ve diğer hücrelere geçerek immün yanıt oluştururlar. Plazmidler doku sıvılarıyla taşınabildiği gibi, alternatif olarak fagositler ve göç eden hücreler tarafından da taşınabilirler ve kastan uzaklaştırılırlar. Pek çok araştırmada, plazmid DNA'sının çok sayıda hücre çeşidi tarafından işlemlendiği ve içinde makrofajlar ve dendritik hücrelerinin olduğu RES hücreleri tarafından da alındığı gösterilmiştir (17-19).

Sonuç olarak, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunucu hücrelerin (APC), DNA aşılarının verilmesi sonucu oluşan bağışık yanıtta merkezi bir rol üstlendiği açıktır. MHC-I yolu aracılığıyla antijenin işlenmesi ve sunulmasına ek olarak APC'ler, B hücrelerinin yanıtını düzenleyen T-helper hücrelerini uyarak antijenleri MHC-II yolu ile de sunabilirler. APC'ler ya plazmidler tarafından doğrudan etkilenerek ya da, fabrika gibi çalışarak antijen üreten daha önceden duyarlanmış herhangi bir hücreden salınan değişik sitokinleri alarak bu işlemi gerçekleştirir.

DNA aşılarına karşı oluşan bağışık yanıtının geleneksel aşılarla karşılaştırılması

Geleneksel aşılar olarak bilinen ölü aşılar, etkinliği azaltılmış mikroorganizmaların tamamını ya da yalnız bazı bileşenlerini, canlı aşılar olarak bilinenler ise işlenmiş olsalar da organizmada çoğalma olasılığı olan mikroorganizmaları içerirler. Her ne kadar ölü aşılar mükemmel güvenlik gücüne sahip olsalar da, çoğu zaman bağışık yanıtını desteklemek için adjuvanlara ve yeterli derecede koruyucu bağışık yanıt oluşumunu uyarmak için rapellere ihtiyaç duyarlar. Çoğu canlı aşı sadece tek bir uygulamadan sonra bile doğal enfeksiyonu taklit ederek benzer veya yakın süreli bir koruyuculuk sağlar. Canlı aşılar etki mekanizması replikasyon yeterliliği ve patojenite eksikliği arasındaki hassas dengeye dayanmaktadır, ancak bu etkinliği azaltarak dezavantaj oluşturulabilir. Canlı aşılar CTL cevabını daha güçlü uyarır ve özellikle viral hastalıklara karşı çok başarılıdır. DNA aşıları görünüşte geleneksel aşıların her iki alt birimindeki uygun özellikleri kendinde toplamıştır (Tablo 1). Enfeksiyöz değildirler; fakat güçlü sitotoksik T hücrelerini uyarmak ve uygun yanıt oluşturmak için önceden gerekli olan antijenleri *in vivo* üretebilmeye

özelliğine sahiptirler. Antijen işleme ve sunma ile ilgili olarak dışarıdan verilen antijenlerle karşılaştırıldığında, antijenlerin hücre içi sentezinde önemli bir üstünlük göstermektedirler.

Hücre içinde sentezlenmiş proteinler, proteozom kompleks tarafından düzenli olarak peptidler halinde işlenirler. Bu peptidler özelleşmiş taşıyıcı proteinler tarafından endoplazmik retikuluma taşınırlar ve MHC-I molekülleri, β_2 mikroglobülin ile birlikte bir kompleks oluştururlar. Hemen her hücrede bulunan MHC-I molekülleri ile antijen sunumu esas olarak interlökin-2 (IL-2) interferon gama (IFN- δ) ve tümör nekroz faktör beta (TNF- β) ve yüksek düzeyde IgG 2a antikoruyla düzenlenmiş bir Th-1 tipi T hücre cevabını başlatır. Asıl efektör mekanizma olarak dokulardan göç etme yeteneği olan CTL hücrelerini seçer ve stimüle eder. Yukarıdaki bölümde söz edildiği gibi, DNA aşıları bu mekanizmaları yoğun olarak kullanır.

Ekstrasellüler antijenler daha farklı işlenirler. Özgül ve profesyonel APC'den dış ortama salınan antijenler, özgül olmayan pinositoz ya da antijeni intrasellüler veziküller içinde hapseden reseptör aracılı (immünooglobülin Fc fragmanı veya kompleman) endositoz yoluyla alınır. Bu veziküller içindeki proteolizis MHC-II molekül-

Tablo 1. DNA aşıları, canlı aşılar ve ölü aşılar antijen sunumu ve bağışıklık düzenleme mekanizmaları

	DNA Aşıları/Canlı Aşılar	
	Ölü Aşılar	
Antijen hedef	Ekstrasellüler (pirojenler, alerjenler, toksin, dolaşan mikroorganizmalar, sekresyonlar)	Sitozol/Hücre içi Virus, enfekte hücreler, tümör hücreleri, doku nakli, oto antijenler
APC işlenmesi	Hücre içi veziküller	Protozoamlar
İşlenme	MHC II	MHC I
Ana düzenleyiciler	Th2	Th1
Özgül sitokinler	IL4, 5,10,13	IL 2, INF- δ , TNF- β
Etki mekanizması	Nötralizasyon, komplemana bağlı lizis, antikora bağlı hücrel sitotoksisite	Sitotoksik T hücreleri

leri aracılığı ile sunulan peptid oluşumuyla sonlanır. MHC-II peptid kompleksleri B hücre cevabına yardım eden özgül T-helper hücre altgruplarını uyarır. Bunlar esas olarak interlökin 4,5,10,13 ile düzenlenir ve antikörlerin IgG-1 subtipi ile tanımlanır.

Egzojen antijenlerin MHC-I molekülleri ile birleştiği ve CTL yanıtını uyardığı alternatif yolların var olduğu da bilinmelidir. Bu yollar ya antijenin proteozoma gidebilmek için, sitozol içine salınmasına ya da antijen parçalarının vakuolar kompartmanlar içinde boş MHC-I molekülleri ile bağlanmasına ya da hücreden salgılandıktan sonra MHC-I'ya bağlanmasına gereksinim duyar.

Çıplak DNA'nın uygulanmasında plazmidlerin kullanımı

DNA aşıları için kullanılan plazmidlerin ekspresyonu 5 gerekli ana eleman içerir. Etkinlik için, bakteri kaynaklı bu replikasyon, güçlü bir memeli hücresi promotörü, çoğaltıcısı, yabancı antijenleri içine yerleştirmek için çok sayıda klon bulunan bir bölge, bir memeli poliadenilasyon/sonlanma sinyali ve bakteri kültürü esnasında seçim için bir antibiyotik direnç geni gerektiği bilinmektedir (20). Sık kullanılan promotörlerin çoğu insan CMV geni veya diğer viruslardan elde edilmektedir. Diğer promotörler örneğin miyosit spesifik desmin promotörü, antijeni belli bir hücre tipine hedefleyip ekspresyonunu sadece bu hücrelerde sınırlamak için kullanılabilir (21). Poli A-sonlandırma sinyalleri genellikle büyükbaş hayvan büyüme hormonu ya da belli viruslardan alınmaktadır. Plazmid seçimi için genellikle ampisilin, neomisin veya kanamisin kullanılmaktadır. Çoğu plazmidin diğer bir ortak parçası GpC dinükleotidleridir (11,22). Bu metile olmamış nükleotidler özellikle bakterilerin temel yaşam koşullarına özgüdür fakat ökaryotik genler için değildir. Bunlar B-hücrelerinin güçlü direkt uyarıcılarıdır ve ayrıca dolaylı olarak doğal katil hücrelerini ve T hücrelerini de aktive ederler (22,23).

Aşı uygulama yöntemi

DNA aşı uygulamalarında günümüze değin kullanılan deri, derialtı ve kas içi uygulamalar yanında; mukozal enjeksiyon, gen silahı gibi yeni yöntemler de uygulanmıştır. Üzerinde en çok çalışma yapılan alanların başında mukozal bağışıklama gelmektedir.

Dozlar genellikle her uygulama için yaklaşık 100 µg bir aralıkta plazmid DNA'sı kadardır. Ancak bazen deney hayvanlarında daha yüksek dozlar da kullanılmıştır. Şu anki bilgiler, yüksek plazmid DNA konsantrasyonlarının denenmesine karşın, doz-yanıt ve etkinlik niteliği hâlâ istenilen ve uygulanabilir düzeyde olmadığı yönündedir (24). Enjekte edilen pek çok DNA aşısının yetersiz etkinlik göstermesi nedeniyle plazmid alımının elektroforezle artırılması konusu üzerinde son dönemde çalışılmaktadır (25,26).

Çok daha az dozda plazmid DNA'sı ihtiyacı var gibi gösteren partikül araçlı "gen silahı" uygulamaları ilginç bir alternatif sunabilir. Gen silahı; plazmidlerle kaplanmış mikrometre boyutlu koloidal altın partiküllerini epidermisin içine sevk etmek için sıkıştırmış helyumu kullanır. Altın partiküllerinin sınırlı emilme kapasitesi nedeniyle her enjeksiyonda 1 µg'ın altında plazmid DNA'sı alınır. Gen silahı uygulamaları; immün yanıtın artırılmasında iki nedenden ötürü daha etkili bir metot olarak görülmektedir. Birincisi; plazmidler doğrudan hücrelerin içine aşılandığında aşı etkin madde transferi daha yüksek olabilir. İkincisi; daha yüksek oranda plazmidlerin profesyonel APC (Langerhans hücreleri) ile temas etmesi ve immün yanıtı destekleyen sitokinler üretebilme kabiliyetine sahip keratinositleri etkilemeleri nedeniyle daha gelişmiş immün yanıtlar alınabilir (27,28).

Mukozal immün yanıt geliştirmeyi hedefleyen pek çok ileri araştırmada ise, aşı formülasyonu ve adjuvanlar üzerine yeni çalışmalar yapılmaktadır (29-31).

Ancak bu çalışmaların bulguları henüz genel uygulama çizebilecek yeterlilikte sonuçlar elde edilemediğini göstermektedir (29).

Klinik öncesi çalışmalarda DNA aşıları

Değişik enfeksiyon hastalıklarında (viral, bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlar), kanser, otoimmün hastalıklar ve alerjik hastalık deneysel modellerinde DNA aşılması sonrası oluşan koruyucu yanıtlar gösterilmiştir (32-34). Aşı hedef çeşitliliğini göstermesi açısından bazı çalışmalar maymunlarda, primate (35-37) ve çiftlik hayvanlarında yapılmıştır (38). Genellikle bu çalışmalar, deney hayvanlarında DNA aşılarının etkinliğinin yüksek olduğunu destekleyici yöndedir. Ancak, özellikle tüberküloz, sıtma ve AIDS gibi hastalıklarda etkinliğin yetersiz olduğunu ileri süren çalışmalar da vardır (39,40).

Klinik çalışmalar

İnsanlarda DNA aşıları ile ilişkili çalışmalar AIDS, sıtma, grip, hepatit B ve değişik kanser türlerine karşı koruyucu ve tedavi amaçlı yürütülmüştür (41-47). Bu çalışmalar küçük gönüllü gruplarda güvenlik çalışması olarak düzenlenmiştir. Bu nedenle ölçülen immün parametreler etkinlikte sınırlı oranda fikir sağlamıştır. İnsanda ilk denemeler viral nef, rev, tat regülatör genlerini içeren (42) ya da zarf ve rev genlerinin bir kombinasyonunu içeren Tip-1 HIV için yapılmıştır (41,48). Bu çalışma sonuçları göstermiştir ki; 100/300 µg plazmid DNA'nın 3-4 kez intramüsküler enjeksiyonu, asemptomatik HIV vakalarındaki CTL cevabını değiştirebilmektedir. Daha sonra AIDS ile yapılan çalışmaların çoğu çelişkili sonuçlar vermekle beraber; değişik formülasyonlarla başarı şansının artacağı umulmakta ve bu konudaki çalışmalar sürdürülmektedir.

Hepatit B virus yüzey antijenini ve gen tabancasını kullanan Tacket ve arkadaşlarının (49) 0.25 µg'lık DNA plazmidleriyle yaptığı 2 aşılama da primer immün cevap oluşturulamamıştır. Daha yüksek dozlar (1,2,4 µg) kullanılan bir çalışmada, yüksek plazmid konsantrasyonları ve tekrarlayan uygulamalar yapılarak yüksek dozlarda; primer doz sonrası %50-60 serokonversiyon sağlanmış, rekombinant antijen aşısına kıyasla ilk DNA aşılmasından sonraki serokonversiyon

oranı %17 olarak saptanmış ve tepe antikor düzeyi düşük bulunmuştur (43).

Plasmodium falciparum'a karşı denenen DNA aşısı ile ilgili farklı görüşler yayımlanmıştır (44,50). Yirmi kişilik gönüllü gruba 20, 100, 500 ya da 2500 µg'lık DNA intramüsküler yolla verildiğinde, gönüllülerin hiçbirinde deneysel sonuçların aksine saptanabilen antikorlar oluşmadığı görülmüştür. Ancak aynı zamanda intradermal uygulama sonrası titrelerin intramüsküler uygulama sonrasına göre 3 kat fazla olduğu da gösterilmiştir. CTL cevapları düşük doz, grubun 2/5'inde, 500 µg dozluk grubun 3/5'inde ve 2500 µg dozluk grubun da 4/5'inde elde edilmiştir. *Plasmodium falciparum*'daki CTL epitoplarının allelik varyantlarının farklılığı sonucu oluşan CTL'nin genetik çeşitliğinin sıtma aşısının geliştirilmesindeki temel engel olduğu kabul edilmektedir. Deney hayvanları ön çalışmalarında başarılı sonuçlar alınırken, klinik çalışmalarda yeterli yanıt alınamamasının diğer bir nedeninin de parazitin değişik konaklarda süren ardışık evrelerinin olması ve parazitin 5000 civarında gen içermesi olabileceği bildirilmektedir.

Bu sıkıntıları aşmak için deneysel ve klinik çalışmalar sürmekte olup, hedeflenen nokta, herhangi bir tek gen kullanılarak tüm plazmidyum türlerine karşı kalıcı bağışıklık oluşturmaktır. En son yapılan deneysel bir çalışma sonuçları bu konuda ümit vermektedir. PY01316 adı verilen bir genden elde edilen vektör DNA aşısı karaciğer hastalığını %65-90 azaltmış görünmektedir (51).

DNA aşısı kullanımında beklenen yan etkiler

Geleceğin aşısı olarak bakılan DNA aşılarının da bazı yan etkileri beklenmektedir. Teorik olarak, gen tedavisi ve tümörögenesis ile benzer mekanizmaları kullandığından aşı uygulaması sonrası, mutagenesi ve tümör oluşumu ile sonuçlanan durumlar beklenebilir. DNA plazmidlerin çeşitli hücre tiplerinde uzun süre var olabilmesi gibi şüpheler olsa da *in vivo* ve *in vitro* yapılan model çalışmalara dayanılarak, toplumda

görülen spontan mutasyon oranının altında bir mutasyon beklenmektedir (52,53).

İnsanda geniş uygulamalar yapılmadan önce klinik denemeler dikkatle alınıp incelenmeli, farmakodinamik özellikler araştırılmalıdır. Ayrıca tekrarlı toksikoloji çalışmaları ve immünotoksikoloji araştırmaları yapılmalıdır. Bu çalışmalar normal kullanım için planlanan koşullar altında beklenmeyen sistemik yan etkiler ve toksikoloji hakkında yeterli bilgi sağlamak üzere planlanmalıdır. Özgün risk gruplarını ve immünite açısından predispozan durumlar altında bulunanları belirlemek için özel çalışmalara ihtiyaç duyulabilir. DNA aşılması sonrası immünolojik olarak tetiklenen yan etkilerin spesifik aksiyon moduna bağlı olduğu varsayılmıştır ve birkaç çalışmada gözlemlenmiştir.

Son söz

Etkinliklerinin gösterildiği on yıldan bu yana DNA aşıları ile birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmıştır. Yeni kuşak aşılar olarak adlandırılan DNA aşıları, uygulama araçlarındaki gelişmeler, karma aşı uygulamalarının yapılabilecek olması nedeni ile yeni aşı ve immün tedavilerin geliştirilmesi açısından umut vaat etmektedir.

Kaynaklar

1. Gander B. Trends in particulate antigens and DNA delivery system for vaccines. *Ad Drug Delivery Rev* 2005; 57:321-3.
2. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990;247:1465-8.
3. Tang D, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-4.
4. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-9.
5. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunization by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11478-82.
6. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a hemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993;11:957-60.
7. Wang B, Ugen KE, Srikantin V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaeli Y, Sato AL, Boyer JD, Williams WV, Weiner DB. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4156-60.
8. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 1993;2:1847-51.
9. Mancini M, Hadchouel M, Tiollais P, Pourcel C, Michel ML. Induction of anti-hepatitis B surface antigen (HBsAg) antibodies in HBsAg producing transgenic mice: a possible way of circumventing "nonresponse" to HBsAg. *J Med Virol* 1993;39:67-74.
10. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Int Med* 2003;253:402-10.
11. Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo R, Griebel P, van Drunen Littel-van den Hurk S, Hecker R, Babiuk L. TLR9-/- and TLR9+/+ mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology*. 2004;113:114-20.
12. Mwangi W, Brown WC, Splitter GA, Zhuang Y, Kegerreis K, Palmer GH. Enhancement of antigen acquisition by dendritic cells and MHC class II-restricted epitope presentation to CD4+ T cells using VP22 DNA vaccine vectors that promote intercellular spreading following initial transfection. *J Leukoc Biol*. 2005;78:401-11.
13. Wang R, Epstein J, Baraceros FM, Gorak EJ, Charoenwit Y, Carucci DJ, Hedstrom RC, Rahardjo N, Gay T, Hobart P, Stout R, Jones TR, Richie TL, Parker SE, Doolan DL, Norman J, Hoffman SL. Induction of CD4 (+) T cell-dependent CD8 (+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10817-22.
14. Rodrigues MM, Ribeiro M, Pereira-Chiocola V, Rentia L, Costa F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun*. 1999;67:3855-63.
15. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 1996;89:59-67.
16. Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 1997;158:4529-2.
17. Condon C, Watkins SC, Celluzzi CM, Thompson K, Falo LD. DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2:1122-8.

18. Parker SE, Borellini F, Wenk ML, Hobart P, Hoffman SL, Hedstrom R, Le T, Norman JA. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. *Hum Gene Ther* 1999;10:741-58.
19. Lunsford L, McKeever U, Eckstein V, Hedley ML. Tissue distribution and persistence in mice of plasmid DNA encapsulated in a PLGA-based microsphere delivery vehicle. *J Drug Target* 2000;8:39-50.
20. Gregerson JP. DNA vaccines. *Naturwissenschaften* 2001;88:504-13.
21. Kwissa M, Kampen K von, Zurbriggen R, Gluck R, Reimann J, Schirmbeck R. Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. *Vaccine* 2000;18:2337-44.
22. Krieg AM. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine* 2001;19:618-22.
23. Rothenfusser S, Jahrsdoerfer B, Krug A, Endres S, Hartmann G O CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA. *Dt Aerztebl* 2001;98:981-5.
24. Fomsgaard A, Nielsen HV, Nielsen C, Johansson K, Macbuca R, Bruun L, Hansen J, Buus S. Comparisons of DNA-mediated immunization procedures directed against surface glycoproteins of human immunodeficiency virus type1 and hepatitis B virus. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1998;106:636-46.
25. Kadowaki S, Chen Z, Asanuma H, Aizawa C, Kurata T, Tamura S. Protection against influenza virus infection in mice immunized by administration of hemagglutinin-expressing DNAs with electroporation. *Vaccine* 2000;18:2779-88.
26. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, Leung L, Otten GR, Thudium K, Selby MJ, Ulmer JB. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation. *J Immunol* 2000;164:4635-40.
27. Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankaukas MA, Baird SM, Rhodes GH. Intradermal gene immunizations: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9519-23.
28. Nickoloff BJ, Turka LA. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am J Pathol* 1993;143:325-31.
29. McCluskie MJ, Brazalot Millan CL, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, Widera G, Hayes JR, Purcell RH, Davis HL. Route and method of delivery of DNA vaccines influence immune responses in mice and non-human primates. *Mol Med* 1999;5:287-300.
30. Fan H, Lin Q, Morrissey GR, Khavari PA. Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat Biotechnol* 1999;17:870-2.
31. Hobson P, Barnfield C, Barnes A, Klavinskis LS. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Methods* 2003;31:217-24.
32. Lai WC, Bennett M. DNA vaccines. *Crit Rev Immunol* 1998;18:449-84.
33. Alarcon JB, Waine GW, McManus DP. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol* 1999;42:343-410.
34. Tuteja R. DNA vaccines: a ray of hope. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999;34:1-24.
35. Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, Chattergoon M, Frost P, Javadian A, Williams WV, Refaeli Y, Ciccarelli RB, McCallus D, Coney L, Weiner DB. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 1997;3:526-32.
36. Davis HL. DNA-based immunization against hepatitis B: experience with animal models. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;226:57-68.
37. Gramzinski RA, Brazalot Millan CL, Obaldia N, Hoffman SL, Davis HL. Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in Aotus monkeys: a comparison of vaccine formulation, route, and method of administration. *Mol Med* 1998;4:109-18.
38. Beard CW, Mason PW. Out on the farm with DNA vaccines. *Nat Biotechnol* 1998;16:1325-8.
39. Hoffman SL, Doolan DL, Sedegah M, Wang R, Scheller LF, Kumar A, Weiss WR, Le TP, Klinman DM, Hobart P, Norman JA, Hedstrom RC. Toward clinical trials of DNA vaccines against malaria. *Immunol Cell Biol* 1997;75:376-81.
40. Doolan DL, Hedstrom RC, Wang R, Sedegah M, Scheller LF, Hobart P, Norman JA, Hoffman SL. DNA vaccines for malaria: the past, the present, & the future. *Indian J Med Res* 1997;106:109-19.
41. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Baine Y, Higgins TJ, Ciccarelli RB, Coney LR, Ginsberg RS, Weiner DB. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 1998;178:92-100.
42. Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandstrom E, Wahren B. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-infected patients. *Lancet* 1998;351:1320-5.
43. Roy MJ, Wu MS, Barr LJ, Fuller JT, Tussey LG, Speller S, Culp J, Burkholder JK, Swain WF, Dixon RM, Widera G, Vessey R, King A, Ogg G, Gallimore A, Haynes JR, Heydenburg Fuller D. 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* 2001;19:764-78.
44. Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenwit Y, Sedegah M, Epstein JE, Kumar S, Wang R, Doolan DL, Maguire JD, Parker SE, Hobart P, Norman J, Hoffman SL. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 2000;18:1893-1901.

45. Ugen KE, Nyland SB, Boyer JD, Vidal C, Lera L, Rasheid S, Chattergoon MA, Bagarazzi ML, Ciccarelli RB, Higgins TJ, Baine Y, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. DNA vaccination of HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* 1998;16:1818-21.
46. Calarota SA, Kjerrstrom A, Islam KB, Wahren B. Gene combination raises broad human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Hum Gene Ther* 2001;12:1623-37.
47. Calarota SA, Weiner DB. Present status of human HIV vaccine development. *AIDS* 2003;17 Suppl 4:S73-84.
48. Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, Lacy KE, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J Infect Dis* 2000;181:476-83.
49. Tacket CO, Roy MJ, Wiedera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase I safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 1999;17:2826-9.
50. Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J, Weiss WR, Sedegah M, Taisne CA de, Norman J, Hoffman SL. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998;282:476-80.
51. Haddad D, Bilcikova E, Witney AA, Carlton JM, White CE, Blair PL, Chattopadhyay R, Russell J, Abot E, Charoenvit Y, Aguiar JC, Carucci DJ, Weiss WR. Novel antigen identification method for discovery of protective malaria antigens by rapid testing of DNA vaccines encoding exons from the parasite genome. *Infect Immun* 2004;72:1594-602.
52. Kurth R. Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Ann N Y Acad Sci* 1995;772:140-51.
53. Martin T, Parker SE, Hedstrom R, Le T, Hoffman SL, Norman J, Hobart P, Lew D. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther* 1999;10:759-68.