



Journal of

Molecular Virology and Immunology

SARS-CoV-2 Pandemisinde mRNA Aşılarının Güvenlik Profili, Avantaj ve Dezavantajlarına Genel Bakış

An Overview of the Safety Profile, Advantages and Disadvantages of mRNA Based Vaccines in the SARS-CoV-2 Pandemic

Oktay SARI¹ [ID], Kemal TEKİN² [ID]

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Family Medicine, Gulhane Training and Research Hospital, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

²Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 25.01.2021. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 03.02.2021.

İletişim [Correspondence]: Kemal Tekin; Uzm.Dr., Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-posta: ktekin1978@gmail.com [Kemal Tekin; MD, Department of Medical Microbiology, Gulhane Training and Research Hospital, Ankara, Turkey. E-mail: ktekin1978@gmail.com]

Özet

Haberci ribonükleik asit (mRNA) gen ekspresyonu ve aşı teknolojisinin geleneksel aşı yöntemlerine (canlı attenüe, inaktif, protein subünit) ve yeni nesil sistemlere (DNA- deoksiribonükleik asit- ve viral vektörler) kıyasla belirli avantajları ve dezavantajları vardır. mRNA aşılarında ekspresyon sisteminin tek bir bariyeri (hücre membranı) geçip ribozomlara ulaşması yeterli olduğundan bu aşılar tasarım avantajına sahiptir ve ayrıca insersiyonel mutagenез riski taşımamaktadır. mRNA sistemlerinin geçici ekspresyon oluşturmaları, üretilen antijen ile ilgili ek riskleri minimize etmektedir. mRNA ekspresyon sistemlerinin en önemli dezavantajlarından biri RNA'nın stabil bir molekül olmaması ve bu aşılar için genellikle soğuk saklama ve transport koşullarının gerekmesidir. mRNA molekülünün in-vitro ve in-vivo stabilitesinin artırılması ve doğal bağışıklığın hücrel sensörlerinden saklanabilmesi için çeşitli teknikler (kapak sistemleri, sekans optimizasyonu, modifiye nükleozitler) geliştirilmiştir. Geleneksel aşılar göre hızlı tasarımı ve ölçeklenebilir üretimi ve düşük doz aşılama ile yüksek immünojenik aktivite sunması bu aşıları özellikle salgınlara müdahalede (SARS-CoV-2, *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, pandemisinde olduğu gibi) güçlü araçlar haline getirmektedir. Antijen üretiminin ve sunumunun doğal koşullara benzer olarak yapılması bu aşıların immün sistemin hücrel ve humoral yollarını başarılı bir şekilde aktive etmesini sağlamaktadır. Klinik çalışmalarda, çeşitli bulaşıcı hastalıkları ve kanserleri hedefleyen mRNA aşılarının genellikle güvenli olduğu ve iyi tolere edildiği değerlendirilmekle beraber, SARS-CoV-2 pandemisi sürecinde aşılana milyonlarca kişiden elde edilecek veriler bu sistemin etkinliğini ve güvenliğini diğer aşı platformları ile karşılaştırma imkanı sunacaktır. mRNA molekülleri hücrelere çıplak olarak veya nanopartikül taşıyıcılar içerisinde iletebilmektedir. Bazı taşıyıcı partiküller için toksisite ve alerjik reaksiyon riskleri bulunduğu gibi, bu aşıların otoimmün reaksiyonlara neden olabileceğine dair endişeler de vardır, bu nedenle aşı içeriğindeki tüm bileşenler için olası risklerin kapsamlı çalışma verileri ile incelenmesi ve aşıların güvenlik profilinin uzun dönem sonuçlarını sunan izlem çalışmaları ile ortaya konması gerekmektedir. Düşük sıklıkta da olsa, aşılama sonrası anafilaktik reaksiyon riski bulunduğu için aşı yapılan yerlerde anafilaksiye müdahale edebilmek için gerekli malzeme ve ekipmanlar bulundurulmalı, aşı yapan ekip bu konuda farkındalık sahibi olup aşılana bireyleri bir süre izlemde tutmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Advers olaylar, Alerjik reaksiyon, Otoimmünite, Anafilaksi, Hızlı üretim, Düşük maliyet.

Abstract

Messenger ribonucleic acid (mRNA) gene expression and vaccine technology has certain advantages and disadvantages compared to traditional vaccine methods (live attenuated, inactive, protein subunit) and new generation systems (DNA-deoxyribonucleic acid- and viral vectors). mRNA vaccines have a design advantage since the expression system needs to cross a single barrier (cell membrane) and reach the ribosomes, also there is no risk of insertional mutagenesis in these vaccines. The transient expression of mRNA systems minimizes the additional risks associated with the antigen produced. One of the most important disadvantages of mRNA expression systems is that RNA is not a stable molecule and generally cold storage and transport conditions are required for these vaccines. Various techniques (cap systems, sequence optimization, modified nucleosides) have been developed to increase the in-vitro and in-vivo stability of the mRNA molecule and to stealth from cellular sensors of innate immunity. Its rapid design and scalable production compared to traditional vaccines and high immunogenic activity with low dose vaccination make these vaccines particularly powerful tools in response to epidemics (as in the current Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2, pandemic). Antigen production and presentation similar to natural conditions enables these vaccines to successfully activate the cellular and humoral pathways of the immune system. In clinical studies, it is evaluated that mRNA vaccines targeting various infectious diseases and cancers are generally safe and well tolerated, however the data to be obtained from millions of people vaccinated during the SARS-CoV-2 pandemic will provide the opportunity to compare the effectiveness and safety of this system with other vaccine platforms. mRNA molecules can be delivered to cells naked or in nanoparticle carriers. There are risks of toxicity and allergic reactions to some carrier particles, as well as concerns that these vaccines may cause autoimmune reactions, therefore, possible risks for all components in the vaccine content should be examined with comprehensive study data and the safety profile of vaccines should be revealed through follow-up studies that present long-term results. Despite the low frequency, since there is a risk of anaphylactic reaction after vaccination, necessary materials and equipment should be available in places where the vaccine is administered, and the vaccinating team should be aware of this issue and keep the vaccinated individuals under follow-up for a while.

Keywords: Adverse events, Allergic reaction, Autoimmunity, Anaphylaxis, Fast production, Low cost.

Giriş

200 yıldan daha uzun bir geçmişi olan geleneksel aşı uygulamaları birçok önemli enfeksiyona karşı kalıcı koruyucu bağışıklık yanıtı uyarmakta ve her yıl milyonlarca insanı ciddi hastalıklardan korumaktadır [1,2]. Bu başarıya rağmen, belirli enfeksiyöz patojenlere, özellikle de başlıca T ve B hücre aracılı adaptif (kazanılmış) bağışıklık tepkisinden daha iyi kaçabilenlere karşı, aşı geliştirmenin önünde halen büyük engeller vardır [1,3]. Yüksek etkinlik potansiyeli sunması ve düşük maliyetli üretim avantajı nedeniyle mesajcı RNA (mRNA) aşıları, geleneksel aşı platformlarının “bazı etkenler için koruyucu immün yanıt tepkisini uyarmadaki yetersizlik veya bu yanıtın kısa süreli olması, aşı üretiminin zaman alıcı ve pahalı olması ve bazı durumlarda güvenlik sorunları” gibi belirli zayıflıklarını aşmada ümit verici bir alternatif olarak görülmektedir [4]. Ek olarak, geleneksel aşı yaklaşımları kanser gibi bulaşıcı olmayan hastalıklara uygulanamayabilir,

bu nedenle çok yönlü (kişiselleştirilmiş antijenleri kodlayan, daha uzun süreli antijenik uyarım yapabilen veya antijenik uyarım yanında immün blokaaj etkisi de olan) aşı platformlarının geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır [1,5,6].

Aşı platformları için önemli gereksinimlerden biri de Zika virus, Ebola virus ve betakoronaviruslar gibi yeni ortaya çıkan ve salgın oluşturma riski taşıyan virüslere karşı hızlı aşı tasarımı ve ölçeklenebilir üretime imkan verebilecek özellikleri taşımasıdır [7]. Salgın dönemlerinde yeni etkenlere karşı geliştirilen aşlarının çoğu için temel sorun, geleneksel yaklaşımların etkinliği ile ilgili problemlerden ziyade, daha hızlı aşı geliştirme süreci ve geniş ölçekli üretim ve dağıtım ihtiyacıdır [1]. Bu durumun dikkat çekici bir örneği; aşı üretimine uygun tesislerin az sayıda ülkede ve sınırlı sayıda olması nedeniyle devam etmekte olan SARS-CoV-2 pandemisinde aşı firmalarının farklı ülkelerin taleplerine cevap vermede yetersiz kalması ve

AstraZeneca ve Avrupa Birliği arasındaki öncelik sırası için yapılan sert tartışmalardır [8]. Bununla birlikte, mRNA'nın stabil bir molekül olmaması ve çıplak mRNA'nın verimsiz *in-vivo* iletimi nedeniyle mRNA temelli klinik aşı çalışmaları yakın zamana kadar çok fazla ilgi görmemiştir [1]. Son yıllardaki teknolojik gelişmelerle beraber bu sorunlar büyük ölçüde aşılar, bulaşıcı hastalıklara ve çeşitli kanser türlerine karşı çok sayıda mRNA aşı platformu hem hayvan modellerinde hem de insanlarda denenmiş ve cesaret verici sonuçlar elde edilmiştir [1]. SARS-CoV-2 pandemisi sürecinde salgına yanıtta öne çıkan mRNA temelli aşılarda acil kullanım onayları alarak [9-11] birçok ülkede yaygın olarak kullanıma girmesiyle birlikte bu aşılarda güvenilirliği ve etkinliği merak edilen bir konu haline gelmiştir [12]. Bu makalede mRNA aşılarda avantaj ve dezavantajlarına, ayrıca güvenlik profili özelliklerine değinilecektir.

mRNA Aşılarında İmmünojenite Dengesi

mRNA aşılarda genel olarak iki gruba ayrılabilir, bazı sistemler hücre içerisine ulaştıktan sonra amplifiye olmazlar (*non-replikatif*) ve yeni mRNA molekülleri üretilmediği için belirli bir süre sonra fizyolojik süreçlerle ortadan kaldırılırlar, diğer bir grup ise amplifiye olabilen (*self-amplifying mRNA*, *saRNA*, *SAM*) sistemlerdir [7]. Amplifiye olabilen sistemlerin en önemli avantajları aşı hedefi olan proteini kodlayan mRNA'nın hücre içerisinde yeni kopyalarının üretilmesi ile daha uzun süre antijenik uyarım elde edilmesi ve daha düşük doz mRNA ile daha yüksek düzeyde antijenik uyarım yapılmasıdır [1,7]. Bununla beraber, mRNA temelde bir minimal genetik vektördür ve farklı mRNA tasarımları ile anti-vektör bağışıklığından kaçınıldığı için mRNA aşılarda tekrar tekrar uygulanabilir, bu durum viral vektör temelli aşılarda için önemli bir dezavantaj olarak görülmektedir [1].

SAM aşılarda hücre içerisinde replike olurken üretilen ikincil RNA yapıları veya aşılarda IVT (*in vitro-transcribed*) mRNA üretimi sürecinde oluşan kontaminan çift sarmallı (ds) RNA fragmanları endozomal TLR3 (*Toll Like Receptor*) yolu aracılığıyla doğuştan bağışıklık sistemini aktive edebilmektedir [7,13]. Bu tür yabancı motifler aşı etkinliğinde bir azalmaya neden olabileceği gibi, aşılarda kendi adjuvanları olarak da işlev

görebilirler [7,13]. dsRNA moleküllerinin, TLR'lere ek olarak retinoik asit indüklenebilir gen I (RIG-I) ve melanom farklılaşması ile ilişkili protein 5 (MDA5) gibi sitozolik RNA sensörlerini aktive ettiği de gösterilmiştir [7,14,15]. mRNA moleküllerinin bu uyarıcı sensörlere bağlanması, bu reseptörlerin spesifik adaptör molekülleri (TLR7/8 için MyD88 ve TLR3 için TRIF) aracılığıyla tip I interferon (IFN) ve diğer proinflatuar sitokinlerin (IL- 6 ve TNF- α gibi) üretilmesini uyarmaktadır [7]. Buna karşılık, tip I IFN'lar da otokrin veya parakrin reseptörlerine bağlanarak, antiviral immüniteye dahil olan yüzlerce proteinin gen ekspresyonunu düzenleyen Janus kinaz sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon (JAK-STAT) yolunu uyarır [7]. Sonuç olarak, bu sinyalleme yolları, mRNA'nın "doğal adjuvan etkisi (*self-adjuvant effect*)" olarak adlandırılan, farklı doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtların aktivasyonunu ve teşvikini koordine eder [7]. Bununla birlikte, bu moleküller PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) motiflerinin kendine özgü doğası, SAM aşılarda inflammatuar profilini veya yan etkilerini modüle etmeyi zorlaştırabilir [1,7].

Replike olmayan mRNA aşılarda için ise hücre içerisinde dsRNA yan ürünleri oluşmasa da, aşı üretim sürecinde oluşan dsRNA'ların saflaştırılma düzeyi aşılarda immünojenitesini ve etkinliğini doğrudan etkilemektedir [1]. Yetersiz saflaştırma immünojenik etkiyi artırırken, transkripsiyon öncesi mRNA moleküllerinin doğal immün yanıt reseptörleri tarafından tanınması ve ortadan kaldırılması protein ekspresyon verimliliğinin ve dolayısıyla da aşı etkinliğinin azalması ile sonuçlanabilir. Bu nedenle hem replike olan hem de replike olmayan aşı platformlarında saflaştırma ön planda tutulurken, aşı içeriğine ek adjuvanların eklenmesi (RNAactive sistemi veya protamin modifikasyonu gibi) ile immünojenite artırılmaya çalışılır, ancak bu durum maliyet artışına neden olur ve ek güvenlik analizleri gerektirir, ki tüm bu ek işlemler üretim hızında azalmaya neden olacaktır [16,17]. SAM aşılarda ile ilgili optimize edilmesi gereken iki farklı nokta daha bulunmaktadır. Replike olmayan standart mRNA'lara kıyasla, SAM aşılarda mRNA platformuna eklenen gen (aşı antijeni) için boyut kısıtlamaları söz konusu olabilir ve ikinci olarak mRNA molekülünün hücre içerisinde çoğalabilmesi

için aşı antijeninin yanına eklenen replikasyon sistemlerinde yer alan proteinler immün sistem tarafından tanınabilir ve bu durum teorik olarak aşılarda tekrarlayan kullanımını sınırlandırabilir [1].

mRNA Aşılarında Antijen Sunumu

Antijen kodlayan mRNA aşılarını kullanmanın önemli avantajlarından biri de, bu sistemin MHC-I antijen sunum yolağını uyarak sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtlarını ortaya çıkarmak için kolay bir yaklaşım sunmasıdır [7]. Proteinlerin hücre içinde doğal bir şekilde ekspresyonunu sağlayan mRNA sistemleri, rekombinan protein üretim platformları veya hücre kültürlerindeki zorlu protein üretime ve sınırlı stabilite sorunlarına çözümler sunarak, uygun şekilde katlanmış ve glikozile edilmiş antijenlerin üretimini sağlar ve immün sistemi doğal bir enfeksiyona benzer şekilde uyarırlar. Özetle, IVT mRNA sistemleri, viral enfeksiyonlara benzer şekilde, seçilen antijenlerin geçici bir süre için sitoplazmada birikmesine (*accumulation*) ve ekspresyonuna izin verir ve bu antijenler daha sonra verimli bir şekilde peptitlere işlenebilir ve MHC sınıf I antijen sunum yoluna yüklenebilir. Birkaç mRNA molekülünün sitozolik varlığı CTL'lere kapsamlı bir antijen sunumunu sağlayabilirken, protein temelli sistemler daha az verimli olan çapraz sunum yollarına gereksinim duyarlar. mRNA sistemleri ile bir diğer antijen sunma yolu olan MHC sınıf II yolağı da hedeflenebilir. Bu işlem, ya mRNA ile eksprese edilen proteinlerin hücre dışına salgılanması ve geri dönüşümünden (*recycling*) sonra yapılır ya da antijenlerin sitozolden lizozomlara doğrudan aktarılması yoluyla gerçekleştirilir (örneğin, mRNA yapısına bir lizozomal hedefleme dizisinin dahil edilmesi ile) [7].

Protein bazlı aşılarla kıyaslandığında, mRNA aşılarının sunduğu genişletilmiş antijen kullanımı, yani kodladığı antijenik determinantların tipi ve sayısı açısından yüksek derecede çok yönlülük sunması, güçlü antikor yanıtları ile sonuçlanır ve bu yaklaşımın afinite olgunlaşması üzerine de önemli etkilerinin olduğu ve bunun da daha kalıcı bir korumayla sonuçlandığını bildiren raporlar bulunmaktadır [7]. mRNA sistemleri bölünmeyen hücrelerde gen aktarımı ile tam uzunluktaki proteinleri kodlayabilir ve böylece bir hastanın

MHC haplotipiyle ilgili kısıtlamalardan etkilenmez [1,7]. Ayrıca mRNA molekülleri aynı anda birden fazla antijenik kodu içeren tandem yapılar olarak da tasarlanabilir [7]. BioNTech şirketi bu stratejiyi esas alıp, talebe bağlı kişiselleştirilmiş mRNA tabanlı kanser aşıları geliştirmiştir; bu yaklaşım bireysel ve immünojenik tümör mutasyonlarını tanımlamayı ve bu mutanomdaki neo-epitopları kodlayan mRNA aşılarının üretimini içerir [5]. İnsanlarda ilk kez yapılan bir çalışmada, bu yaklaşımın ileri düzey melanom kanserleri için klinik fizibilitesini ve güvenliğini göstermiştir, şöyle ki, aşılanan tüm hastaların seçilen antijenlere karşı CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtları geliştirdiği ve bazı hastalarda anti tümör yanıtlarının uyarıldığı gösterilmiştir [18]. Bu sistem aynı zamanda enfeksiyon hastalıklarına karşı geliştirilen aşılarla birden fazla antijen kodlayan mRNA modellerinin tasarlanması ve üretimi için de uygundur. Örneğin, bu prensiple Moderna Therapeutics, insan sitomegalovirus (CMV) pentamerik kompleksinin beş farklı alt birimini kodlayan bir mRNA aşısı üretmiştir [19]. CMV glikoproteini gB'ye karşı bir mRNA dizisi kodlayan bu çoklu antijenik mRNA aşısı, bağışıklanmış farelerde ve insan olmayan primatlarda güçlü ve dayanıklı nötralizan antikor titrelerini indüklemiştir [19].

Tasarım ve Üretim Avantajları

Terapötik veya aşı amaçlı mRNA sistemleri bir DNA şablonu üzerinden rekombinan enzimler ile ribonükleotid trifosfatlar (NTP'ler) kullanılarak in-vitro reaksiyonlarla üretilir [1]. Bu nedenle, geleneksel sistemler olan canlı aşılar, inaktive aşılar veya protein subünit virüs aşılarının üretim platformlarına kıyasla üretilmesi hızlı ve nispeten basittir. Reaksiyonun yüksek verimliliği yanında basit olması, küçük bir GMP (*good manufacturing practice*) tesisinde hızlı aşı üretimini mümkün kılar. Üretim süreci sekanstan bağımsızdır ve esas olarak RNA'nın uzunluğu, nükleotid ve kapatma kimyası ve ürünün saflaştırılması gibi özelliklere göre belirlenir. Bununla birlikte, aşırı uzunluk gibi belirli dizi özelliklerinin saflaştırma gibi üretim basamaklarında zorluklar ortaya çıkarabilmesi de mümkündür. Mevcut deneyimlere göre, bu sistem hemen tüm kodlanmış protein immünojenlerinin üretimini mümkün kılacak şekilde standart hale

getirilebilir ve bu da mRNA aşılarını yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklara karşı hızlı yanıt için güçlü bir araç hale getirir [1]. mRNA ürünleri genel olarak 2000-10.000 bp gibi bir uzunluk aralığında üretilebilmekle beraber, daha uzun mRNA üretmek mümkün olsa da bu uzun moleküller kırılğan olduğundan işlenmeleri zor olacaktır [20].

mRNA aşılarının en önemli avantajlarından biri de düşük doz aşılama ile yüksek antijenik etki elde edilmesidir, özellikle SAM platformlarında 0.1-10 µg aşı dozu ile koruyucu bağışıklama elde edilebilmekte ve bu düşük doz aşı gereksinimi ölçeklenebilir üretim ile salgınlara küresel düzeyde hızlı müdahaleyi mümkün kılmaktadır [21].

mRNA'nın GMP üretimi için gerekli tüm enzimler ve reaksiyon bileşenleri, ticari tedarikçilerden "sentezlenmiş kimyasallar veya bakteriyel olarak eksprese edilen, hayvansal bileşen içermeyen reaktifler" olarak elde edilebilir, böylece hücre kültürü bazlı aşı üretimini etkileyen çeşitli güvenlik endişelerinden kaçınılmış olur [1]. Plazmid DNA, faj polimerazlar, kapama enzimleri ve NTP'ler gibi tüm bileşenler, GMP-düzeyinde izlenebilir bileşenler olarak kolaylıkla temin edilebilir; ancak, bunlardan bazıları şu anda yalnızca sınırlı ölçekte veya yüksek maliyetle mevcuttur. Gelecekte mRNA terapötikleri ticarileşmeye doğru ilerlerken, üretim ölçeği arttıkça daha ekonomik seçenekler erişilebilir hale gelebilir [1].

mRNA'ların farmasötik formülasyonu aktif bir geliştirme alanıdır. Erken faz çalışmaları için çoğu ürün dondurulmuş olarak saklansa da (-70°C), aşı dağıtımı için daha uygun olan yüksek sıcaklıklarda stabil olan formülasyonlar için geliştirme çabaları devam etmektedir [1]. Mevcut raporlar, soğutulmuş koşullarda (+4°C ila +8°C) veya oda sıcaklığında stabilitesini koruyan formülasyonların geliştirilebileceğini göstermektedir [1]. RActive platformunun liyofilizasyon ve 5-25°C'de 3 yıl ve 40°C'de 6 ay depolama sonrası aktivitesini koruduğu bildirilmiştir [22]. Başka bir rapor, dondurularak kurutulmuş çıplak mRNA'nın, soğutulmuş koşullar altında en az 10 ay boyunca stabil olduğunu göstermiştir [23]. mRNA ürünlerinin stabilitesi, lipid nanopartiküller (LNP) içinde paketlenerek veya RNaz inhibitörleri ile

birlikte formülasyon yoluyla da geliştirilebilir [24]. Terapötik kalitede mRNA üretimi şu anda özellikle zor olmasa da, mevcut protokoller seri üretim için ideal olmayabilir [25].

Mevcut mRNA üretim protokollerinin çoğu, diğer reaksiyon bileşenlerini uzaklaştırmak için her adımdan sonra nükleik asit çöktürme ile DNA şablon hazırlama, IVT ve 5' kapama için ayrı enzimatik reaksiyonlar gerektirir [25]. Bu yinelemeli süreç, her adımda numune kaybını içerir, üretim süresini ve maliyetini artırır. İlginçtir ki, benzer bir sorun PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) teknolojisinin ilk keşfi sırasında da yaşanmıştır. Devam eden süreçte termostabil polimerazların keşfi ile bu problemin üstesinden gelindiği gibi, bu keşif hem PCR hem de moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları için bir dönüm noktası olmuştur [26].

Ek olarak, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) gibi bazı mevcut mRNA saflaştırma yöntemleri kolayca ölçeklendirilemez, bu da seri üretimi daha da zorlaştırır. Bu yaklaşımlar küçük ölçekte iyi çalışsa da, büyük ölçekli üretim için yetersiz kalmaktadır. PCR reaksiyonlarının tek tüpte gerçekleştirilmesinin getirdiği kolaylığa benzer şekilde, mRNA üretiminde ürünün ölçeklenebilir bir saflaştırma yöntemiyle "tek kap (*one-pot*)" içerisinde yürütülen bir reaksiyonla hazırlanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır [25].

Yakın zamanda açıklanan iki yenilik ile bu konuda bazı ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunlardan biri, IVT sırasında spesifik bir transkripsiyon başlangıç sekansına doğal bir 5' cap1 yapısı ekleyen CleanCap® adlı kapak oluşturma stratejisidir, ki böylece dsRNA kontaminantlarının oluşma riski ve ek saflaştırma adımlarına gereksinim azaltılmıştır [27]. İkinci metodolojik yenilik, laboratuvar ve endüstriyel ölçeklerde yararlı olan HPLC saflaştırmaya çekici bir alternatif olarak selüloz adsorpsiyonu yönteminin denenmesidir. Çift sarmallı RNA yapıları kontaminan moleküllerin ucuz ve bol bulunan bir polisakkarit olan selüloza adsorpsiyonu yoluyla mRNA saflaştırması için kolay uygulanabilir bir yöntem olarak tanımlanmıştır [28]. Bu ölçeklenebilir ve ucuz yöntemin IVT mRNA örneklerinden dsRNA kontaminantlarını uzaklaştırmada HPLC kadar işe

yaradığı gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında, son birkaç yılda yapılan araştırmalar, terapötik mRNA'nın büyük ölçekli üretimini önemli derecede kolaylaştırmıştır ve bu alandaki ek araştırmaların, mRNA üretiminin basitliğini ve maliyet etkinliğini daha da artırması muhtemeldir [25].

Sonuç olarak günümüze gelindiğinde; diğer aşı üretim teknikleri ile karşılaştırıldığında mRNA aşıları, esas olarak IVT reaksiyonlarının yüksek verimi nedeniyle hızlı, ucuz ve kapasite artırımına yönelik ölçeklenebilir (*scalable*) üretim potansiyeline sahiptir [1].

Aşıların Verilme Yolunun Önemi

mRNA aşılarının etkililiğini ve güvenliğini belirleyen diğer bir anahtar parametre ise aşının verilme yolunun seçimidir. Uygulama yoluna bağlı olarak, partikül optimizasyonları gerektiren spesifik hücre dışı engellerle karşılaşılabilir. mRNA molekülleri çeşitli modifikasyonlar ile veya nanopartikül taşıyıcılarla komplekslenerek daha yüksek transkripsiyon etkinliği gösterebilen kararlı moleküller haline getirilebilir ya da LNP gibi taşıyıcı moleküller içerisinde formüle etmek suretiyle bu molekülün sitoplazmaya alımı ve ekspresyonu hızlandırılabilir [1].

Deri, iki ayrı mekanizma ile bir bağışıklık tepkisine yol açabilen çok uygun bir aşı verme yolunu temsil eder. Birincisi mRNA LNP'ler lenfatiklere göç eden antijen sunan hücreleri (*Antigen-Presenting Cell*, APC) lokal olarak transfekte ederek aktive edebilir, ikinci olarak mRNA LNP'ler lenfatik sistem yoluyla pasif olarak lenf nodlarına drene olur ve böylece mRNA molekülleri doğrudan lenf nodlarında yerleşik APC'lere ve T hücrelerine çok yakın bir yere iletilir [7]. Bu ikinci yolda mRNA-LNP kompleksinin partikül boyutu, nanopartiküllerin verimli lenfatik taşınmasını sağlamak için kritik bir faktördür. Raporlar, 200 nm'ye kadar olan nanopartiküllerin lenfatik damarlara girebildiğini, buna karşın daha büyük partiküllerin enjeksiyon bölgesinde tutulduğunu göstermektedir. PEGilasyon prosedürü (polietilen glikol; PEG), LNP'lerin lenfatik sisteme drenajını hızlandırırken, selektif dendritik hücre (DH) reseptörlerine karşı mannoz ve antikorlar gibi ligantların hedeflenmesi, lipozomların drene oldukları lenf nodları içerisinde tutulmasını artırabilir [7].

Kanser immünoterapisinde, anti-tümör immünitesi elde etmek için sistemik bir immün tepki uyandırmanın gerekli olduğu gösterilmiştir, bu da mRNA bazlı kanser aşıları için intravenöz yolu oldukça çekici bir uygulama yolu olarak sunmaktadır. mRNA-LNP kompleksleri kan dolaşımına girdikten sonra boyut, yüzey yükü ve yapısal konformasyon gibi partikül özelliklerinin büyük ölçüde değişeceği beklenen bir durumdur. Yani mRNA-LNP komplekslerinin biyolojik sıvılar ile etkileşimi analiz edilmesi gereken diğer bir kritik noktadır.

Seyreltilmemiş biyolojik ortamda LNP'lerin boyutunu, stabilitesini ve mRNA kapsülleme verimliliğini, floresan tek parçacık izleme ve floresans korelasyon spektroskopisi gibi gelişmiş mikroskopi yöntemleri kullanarak belirlemek iyi bir uygulamadır. Yardımcı lipid kompozisyonlarını değiştirerek LNP'lerin serum stabilitesini değiştirmek de mümkündür. Birincisi, kolesterol tipik olarak LNP'lerin rijiditesini artırmak (yani lipid membranın geçirgenliğini azaltmak) için kullanılır ve bu nedenle serum bulunan ortamda gelişmiş LNP stabilitesine ve bütünlüğüne katkıda bulunur [7]. Alternatif olarak, PEGillenmiş lipidlerin dahil edilmesi, bir "görünmezlik etkisi" sağlamak için yaygın olarak kullanılır. Bu, genel protein adsorpsiyonunu azaltır ve LNP'lerin koloidal stabilitesini iyileştirir, ancak aynı zamanda LNP'lerin hücre alımını ve transfeksiyon kapasitesini de düşürür. Bu sorunu bir derece aşmak için de, daha kısa asil zincirlerine sahip PEG-lipitler ile daha yüksek transfeksiyon verimliliği hedeflenmiştir. Genel olarak, intravenöz olarak enjekte edilen nanopartiküllerin "fagositik hücreler tarafından alımını ve dolayısıyla nanopartikül klerensini kolaylaştıran" bazı opsonik kan proteinleriyle (kompleman fragmanları, immünglobulinler ve fibronektin gibi) reaksiyona girdiği bilinmektedir. Aslında, mRNA-LNP komplekslerinin biyolojik sıvılar ile etkileşimi, endojen proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin yüzey adsorpsiyonuna yol açarak "adeta bir biyomoleküler veya protein korona" oluşumuna neden olur. Biyomoleküler bir korona oluşturulması, doğal olarak oluşan antikorların bağlanabileceği self-epitopların açığa çıkmasına neden olur. Kompleman aktivasyonunu tetiklemek için sadece birkaç yüzeye bağlı

immünoglobulin molekülü yeterlidir. Doğal opsonizasyon süreçleri; APC'leri hedefleyen pasif bir strateji olarak manipüle edilebilir veya kompleman kaskadını aşılama amaçları için bir uyarıcı sinyal olarak kullanmanın mümkün kılabilir. Bununla beraber, geniş kapsamlı kompleman aktivasyonu sonucu gelişen nanopartikül aracılı infüzyon reaksiyonlarının pulmoner intravasküler makrofajların akut intoksikasyonu (hızlı fagositik yanıt hipotezi) ile tetiklendiğini ve bu durumun kliniğe kardiyopulmoner distres olarak yansıdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu nedenle, bu farklı yüklü mRNA-LNP'lerin intravenöz verilme sonrası organ dağılımında ve hücre hedeflemede gözlemlenen çeşitlilik mekanizmasının daha ayrıntılı olarak açıklanması yararlı olabilir [7].

Güvenlik

Modern profilaktik aşılar da güvenlik gerekliliği son derece katıdır çünkü bu aşılar sağlıklı kişilere uygulanmaktadır [1]. Örneğin, canlı virüs aşılarının birçok durumda viral hastalıkların önlenmesinde son derece etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır [29]. Bununla birlikte, ökaryotik hücre kültürlerinde geleneksel canlı aşıların üretilmesinin pek çok dezavantajı vardır. Bunlar, beklenmedik diğer enfeksiyöz etkenlerle kontaminasyon potansiyeli, çoğaltma işlemi sırasında oluşabilen genetik değişiklikler ve kullanım öncesi kapsamlı testlerin yapılma gerekliliği olarak sıralanabilir [30]. Bu nedenle yeni kullanılan tüm aşılar için aşı ile ilgili olabilecek yan etkilerin izlenmesi ve analiz edilmesi önemlidir [31].

Kısa mRNA dizileri canlı aşılar veya replike olabilen vektör temelli aşılarından farklı olarak enfeksiyöz olmamaları veya DNA temelli aşılarından farklı olarak kromozomal yapılara entegre olma riski taşımayan platformlar olmaları nedeniyle, potansiyel bir enfeksiyon riski veya insersiyonel mutagenез riski taşımazlar [1]. Ek olarak, mRNA molekülleri normal hücresel süreçlerle bozulur ve in-vivo yarı ömrü, çeşitli modifikasyonlar ve iletim yöntemleri kullanılarak düzenlenebilmektedir. mRNA aşıları için üretim süreci, beklenmedik-rastlantısal (*adventitious*) virüslerle kontamine olabilecek hücre kültürlerinin kullanımını veya toksik kimyasalların kullanımını içermediğinden,

mRNA üretimi "canlı virüs, viral vektörler, inaktive virüs ve subünit protein aşıları" dahil olmak üzere diğer aşı platformlarıyla ilişkili ortak riskleri taşımamaktadır. Ayrıca, mRNA aşılarının kısa üretim süresi, kontaminan mikroorganizmaların bulaşını önlemek için de bazı ek fırsatlar da sunar. Sıralanan nedenlerden dolayı, mRNA aşılarının nispeten güvenli bir aşı formatı olduğu düşünülmektedir [1]. Klinik çalışmalarda test edilen farklı mRNA aşılarının güvenli olduğu ve genel olarak iyi tolere edildiği gösterilmiştir [1]. Bununla birlikte, insan deneylerinde, farklı mRNA platformları için orta derecede ve nadir durumlarda şiddetli enjeksiyon bölgesi reaksiyonları veya sistemik yan etkiler de bildirilmiştir [1,32,33]. Gelecekteki prelinik ve klinik çalışmalarda daha detaylı olarak değerlendirilmesi gereken muhtemel potansiyel güvenlik endişeleri arasında "lokal ve sistemik inflamasyon, eksprese edilen immünojenin biyolojik dağılımı ve kalıcılığı, oto-reaktif antikorların uyarılma olasılığı ve tüm doğal olmayan nükleotid ve iletim sistemi bileşenlerinin potansiyel toksik etkileri" gibi başlıklar yer alır [1]. Nanopartikül taşıyıcıların mRNA moleküllerini hücrelere ulaştıramadan tanınması ve fagositik hücreler tarafından hızlı temizlenmesini azaltmak için PEGilasyon stratejileri kullanılmıştır. Bununla birlikte, PEGilasyonun da kendi sınırlamaları vardır; önceden mevcut anti-PEG antikorları olan hastalarda, PEGillenmiş LNP'lerin infüzyonu kontrendikedir, çünkü bu, daha güçlü bir kompleman aktivasyonunun yanı sıra PEGillenmiş nanopartiküllerin hızlandırılmış kan klerensine yol açabilir [7]. Bunun dışında, polimer bazlı taşıyıcı nano materyallerde doza bağlı toksisite riski ve katyonik polimerlerin konak DNA'ya bağlanma riski de istenmeyen yan etkilere neden olabilir [34]. Benzer şekilde, inorganik nanopartiküller (örneğin, demir oksit ve altın gibi metal nanopartiküller) de potansiyel toksisite riski taşırlar [34]. Muhtemel diğer bir endişe, bazı mRNA bazlı aşı platformlarının yalnızca enflamasyonla değil aynı zamanda potansiyel olarak otoimmünite ile ilişkili olan güçlü tip I interferon tepkilerini indüklemesi olasılığıdır [35,36]. Bu nedenle, mRNA aşılama süreci önce otoimmün reaksiyon riski yüksek olan bireylerin belirlenmesi ve makul önlemlerin alınması

şeklinde bir yaklaşım izlenebilir [1]. Tip I IFN'ların bağışıklık toleransının düzenlenmesine müdahil olması otoreaktif B hücrelerinin ve T hücrelerinin gelişimini teşvik edebileceği için önemli bir tehdit oluşturabilir. Bu durum, sistemik lupus eritematozus ve diyabet gibi ciddi otoimmün sonuçlara dahi yol açabilir [7]. Farklı mRNA aşılarının klinik sonuçları bu sistemlerin potansiyel yan etkileri hakkında yeni bilgiler sunarken SARS-CoV-2 aşılarının uzun dönem sonuçlarının bu konuda muazzam bilgiler sunacağını beklenmektedir [7]. Araştırmacılar otoimmün hastalıklar için potansiyel riskler de dahil olmak üzere klinik olarak test edilmiş mRNA aşılarında gözlenen bazı yan etkilerin dikkatle izlenmesi gerektiğini belirtmektedir [1].

Diğer bir potansiyel güvenlik sorunu, mRNA aşılama sırasında hücre dışı RNA varlığından kaynaklanabilir. Hücre dışı çıplak RNA'nın, sıkıca paketlenmiş endotel hücrelerinin geçirgenliğini arttırabildiği ve bu şekilde ödem oluşmasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir [37]. Başka bir çalışma, hücre dışı RNA'nın kan pıhtılaşmasını ve patolojik trombus oluşumunu teşvik edebildiğini öne sürmüştür [38]. Bu nedenlerle, farklı mRNA modaliteleri ve iletim sistemleri insanlarda ilk kez kullanıldığında ve daha büyük hasta popülasyonlarında test edildiğinde, yeni uygulanan her bir sistemin ve metodolojinin güvenliği sürekli olarak değerlendirilmeye muhtaçtır [1].

Kuduz virüsüne karşı geliştirilen profilaktik bir mRNA aşısının klinik çalışma sonuçlarının sunulduğu bir çalışmada; aşılama yedi gün sonra neredeyse tüm katılımcılarda hafif ila orta derecede enjeksiyon bölgesi reaksiyonları bildirilmiş ve katılımcıların %78'i en az bir sistemik bir reaksiyon (örneğin ateş, baş ağrısı ve titreme) yaşamıştır [22]. Bir kişide ise aşı ile ilişkili olması muhtemel bir ciddi bir yan etki olarak geçici ve orta dereceli bir Bell paralizi (yüz felci) izlenmiştir [22]. Benzer bir durum SARS-CoV-2 mRNA aşılarında da gözlemlenmiştir. FDA (U.S. Food and Drug Administration) incelemesinde Moderna'nın 30.000'den fazla klinik deneme katılımcısı arasında dört Bell felci vakasına dikkat çekilmiştir [39]. Bu kişilerden üçü aşı grubunda iken (felç aşından 22 gün ile 32 gün sonra meydana geldi), bir kişi ise plasebo grubunda idi. Pfizer-

BioNTech klinik denemesinde de benzer şekilde, 43.000 katılımcıdan dördünde Bell felci vakası rapor edilmiş ve Bell felci vakalarının tümünün aşı grubunda olduğu ve yüz felcinin aşılama 3-48 gün sonra geliştiği bildirilmiştir [40]. Bununla beraber bu geçici durumun aşılama ile doğrudan ilgili olup olmadığı netlik kazanmamıştır.

FDA tarafından "16 yaş ve üzeri kişiler için 21 gün arayla intramusküler iki doz acil uygulama onayı alan BNT162b2" ve "18 yaş ve üzeri için 28 gün arayla intramusküler iki doz acil uygulama onayı alan Moderna" aşılarında en yaygın bildirilen advers reaksiyonlar; enjeksiyon yeri reaksiyonları, yorgunluk, baş ağrısı, kas ağrısı, titreme, eklem ağrısı ve ateştir [9,11,32,33]. Her iki aşıda da benzer oranlarda, şiddetli advers reaksiyonlar 2. doz aşılama sonrası ilk dozdan sonra olduğundan daha sık görülmüştür [32,33]. Bununla beraber, ilk doz aşılama sonrası ortaya çıkan "yorgunluk, baş ağrısı, titreme, kas ağrısı ve ateş" gibi yan etkilerin, SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirip iyileşen kişilerde seronegatif bireylere kıyasla daha yüksek oranlarda izlendiği bildirilmiştir [41].

mRNA temelli aşılama bir diğer avantajı da, canlı virüs aşılama ile bağışıklamanın risk oluşturduğu immün sistemi baskılanmış hastalara güvenle uygulanabilmesidir. Örneğin SARS-CoV2 pandemisinin en yaygın kullanılan iki aşısı olan Pfizer-BioNTech ve Moderna aşılama bu hasta grubunu da kapsayacak şekilde uygulanmaktadır, ancak bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerin aşılara yanıt verip vermeyeceğini ve COVID-19'dan korunup korunmayacağını henüz net olarak bilinmemektedir [42].

Aşı İçeriğindeki Maddelere Karşı Duyarlılık

Bir aşı, ilaç veya gıdaya karşı anafilaksi öyküsü olan kişilere mRNA aşılarının uygulanmasından kaçınılması ve bu aşılama ilk dozunun uygulanmasını takiben anafilaksi yaşayan hiç kimseye ikinci bir doz verilmemesi gerektiği vurgulanmaktadır [42]. Önemli endişe kaynaklarından biri hem Moderna hem de Pfizer-Biontech aşılarında bulunan polietilen glikoldür [42,43]. PEG türevleri ilaçlarda, kozmetiklerde ve ev ürünlerinde yardımcı maddeler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yakın zamanda mRNA bazlı COVID-19 aşılarının piyasaya sürülmesi,

aşıya karşı alerjik reaksiyonların olası bir suçlusu olarak PEG üzerinde artan bir odaklanmaya yol açmıştır. Tüketiciler, üreticiler ve doktorlar arasında PEG'in alerjenik potansiyeline ilişkin düşük farkındalık, PEG'lere alerjinin eksik teşhisine ve eksik rapor edilmesine yol açarak hastaları tekrarlayan şiddetli reaksiyon riskine sokabilir [43].

BNT162b2 aşısının alerjik hastalar açısından diğer herhangi bir aşı ile aynı kontrendikasyonlara sahip olduğu bildirilmiştir [42]. Diğer bir deyişle, aşı bileşenlerinden biri için (PEG ve Tween 80 gibi) daha önce alerjik reaksiyon öyküsü olan hastalar veya bu maddeleri içeren aşılarla karşı önceden reaksiyonu olan hastalar için bu aşıların kullanılması önerilmemektedir. BNT162b2 faz 3 çalışması aşı grubunda hipersensitivite ile ilişkili advers olayların, plasebo grubuna kıyasla sayısal olarak daha yüksek olduğu (137 %0.63'e karşı ve 111 %0.51), ancak genel riskin nispeten düşük olduğu bildirilmiştir [32]. Aşı içeriğindeki sorumlu maddeyi tanımlamak için SARS-CoV2 aşılarına alerjik reaksiyon gösteren deneklerde bir alerji çalışması yapılması gerekmektedir [42]. Pfizer-BioNTech ve Moderna'nın "FDA Acil Kullanım İzni" kılavuzunda, SARS-CoV-2 aşısının herhangi bir bileşenine karşı anafilaksi veya alerjik reaksiyon geçmişi olduğu bilinen kişilere bu aşıların uygulanmaması gerektiği belirtilmiştir [31,42]. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) önerilerinde personelin anafilaksiyi tanımlayıp yönetebilmesi için tüm hastaların COVID-19 aşılamasından sonra 15 dakika gözlemlenmesi gerektiğini tavsiye edilmekte ve aşı uygulanan lokasyonlarda anafilaksiyi yönetmek için gerekli malzeme ve ekipmanın bulunması gerektiği

vurgulanmaktadır [44,45]. Amerika Birleşik Devletleri'nde "Aşı Olumsuz Olay Raporlama Sistemi" tarafından yapılan izlemede 14-23 Aralık 2020 tarih aralığında, 1.893.360 ilk doz Pfizer-BioNTech COVID-19 aşı uygulamasında 21 anafilaksi vakası gelişmiş (milyon doz başına 11.1 vaka) ve bunların %71'inin aşılamadan sonraki 15 dakika içinde meydana geldiği bildirilmiştir [45]. Bu 21 anafilaksi vakasının dışında 86 kişide de anafilaksi dışı alerjik reaksiyon saptanmıştır [45].

Sonuç

Yeni bir aşı platformu olan mRNA temelli in-vivo antijen ekspresyon sistemleri hızlı tasarım ve ölçeklenebilir üretim avantajı ile SARS-CoV-2 ve benzeri pandemilere müdahale gücü ile dikkati çekmektedir. Vektör temelli aşılarından farklı olarak tekrar uygulanabilme avantajı, DNA temelli aşılarından farklı olarak hücrel genoma entegre olma riski taşıması ve geleneksel aşılarla görülen kontaminasyon risklerini taşıması gibi avantajları vardır. mRNA aşılarının tüm aşılarla gözlemlenen yan etki profili yanında, taşıyıcı sistemlerle ilgili toksisite veya alerjik reaksiyon riskleri, uzun dönem etkiler ile ilgili sınırlı veriler ve aşı tasarımına göre değişmek üzere doğal bağışıklık reseptörlerinin veya RNAzlarla ilişkili yıkımlara bağlı transkripsiyon etkinliğinde azalma olasılığı gibi geliştirilmesi gereken özellikleri de bulunmaktadır. Son 10 yılda gerçekleşen önemli ilerlemeler ile birlikte SARS-CoV-2 pandemisinde aşılamanın milyonlarca kişiden elde edilecek verilerin diğer aşı platformlarının sunduğu verilerle karşılaştırılması sonrasında mRNA temelli aşıların farklı yaş grupları ve popülasyonlardaki güvenlik ve etkinliği hakkında kapsamlı verilere ulaşılması beklenmektedir.

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. Makalenin içeriğinden ve yazılmasından tek başına yazarlar sorumludur. **Finansal destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17(4): 261-79. [Crossref]
2. Henderson DA. The eradication of smallpox--an overview of the past, present, and future. *Vaccine* 2011; 29 Suppl 4: D7-9. [Crossref]

3. Şahiner F, Cebeci İ. Hepatit C Virüsü: Genetik Özellikleri, Aşı Geliştirme Çalışmalarında İlerlemeler ve Güncel Zorluklar. *J Mol Virol Immunol* 2020; 1(1): 1-13. [Crossref]
4. Alameh MG, Weissman D, Pardi N. Messenger RNA-Based Vaccines Against Infectious Diseases. *Curr Top*

Microbiol Immunol 2020. [Epub ahead of print] [[Crossref](#)]

5. Sahin U, Türeci Ö. Personalized vaccines for cancer immunotherapy. *Science* 2018; 359(6382): 1355-60. [[Crossref](#)]

6. Fleeton MN, Chen M, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Murphy M, et al. Self-replicative RNA vaccines elicit protection against influenza A virus, respiratory syncytial virus, and a tickborne encephalitis virus. *J Infect Dis* 2001; 183(9): 1395-8. [[Crossref](#)]

7. Verbeke R, Lentacker I, De Smedt SC, Dewitte H. Three decades of messenger RNA vaccine development. *Nano Today* 2019; 28: 100766. [[Crossref](#)]

8. Anadolu Ajansı, Ankara, Türkiye. AB ile AstraZeneca arasındaki anlaşmazlık büyüyor. Available at: <https://www.aa.com.tr/tr/dunya/ab-ile-astrazeneca-arasindaki-anlasmazlik-buyuyor/2124719> [Accessed January 27, 2021].

9. US Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, Maryland, USA. Moderna COVID-19 Vaccine EUA Letter of Authorization. Available at: <https://www.fda.gov/media/144636/download> [Accessed December 29, 2020].

10. European Medicines Agency (EMA), Amsterdam, Netherlands. EMA recommends first COVID-19 vaccine for authorisation in the EU. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPA_R/comirnaty [Accessed December 29, 2020].

11. US Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, Maryland, USA. Pfizer COVID-19 Vaccine EUA Letter of Authorization. Available at: <https://www.fda.gov/media/144412/download> [Accessed December 29, 2020].

12. Mahase E. Covid-19: UK approves Pfizer and BioNTech vaccine with rollout due to start next week. *BMJ* 2020; 371: m4714. [[Crossref](#)]

13. Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(21): e142. [[Crossref](#)]

14. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5(7): 730-7. [[Crossref](#)]

15. Matsukura S, Kokubu F, Kurokawa M, Kawaguchi M, Ieki K, Kuga H, et al. Role of RIG-I, MDA-5, and PKR on the expression of inflammatory chemokines induced by synthetic dsRNA in airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143 Suppl 1:80-3. [[Crossref](#)]

16. Heidenreich R, Jasny E, Kowalczyk A, Lutz J, Probst J, Baumhof P, et al. A novel RNA-based adjuvant combines strong immunostimulatory capacities with a favorable safety profile. *Int J Cancer* 2015; 137(2): 372-84. [[Crossref](#)]

17. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RActive(®) vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9(10): 2263-76. [[Crossref](#)]

18. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017; 547(7662): 222-6. [[Crossref](#)]

19. John S, Yuzhakov O, Woods A, Deterling J, Hassett K, Shaw CA, et al. Multi-antigenic human cytomegalovirus mRNA vaccines that elicit potent humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine* 2018; 36(12): 1689-99. [[Crossref](#)]

20. McCaffrey A. Design and Manufacturing of Messenger RNA Therapeutics. Education Session from the American Society of Gene & Cell Therapy's 22nd Annual Meeting, April 29 - May 2, 2019. Washington Hilton, Washington DC, USA. Available at: https://www.youtube.com/watch?v=8j33dGRZ_S4&list=LL&index=3 [Accessed December 28, 2020].

21. Güzel Tanoğlu E. Production and Distribution of mRNA Vaccines: SARS-CoV-2 Experience. *J Mol Virol Immunol* 2020; 1(3): 27-34. [[Crossref](#)]

22. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, Mehr KT, Backert L, Finak G, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet* 2017; 390(10101): 1511-20. [[Crossref](#)]

23. Jones KL, Drane D, Gowans EJ. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* 2007; 43(5): 675-81. [[Crossref](#)]

24. Probst J, Brechtel S, Scheel B, Hoerr I, Jung G, Rammensee HG, et al. Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet Vaccines Ther* 2006; 4: 4. [[Crossref](#)]

25. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol* 2020; 65: 14-20. [[Crossref](#)]

26. Ishino S, Ishino Y. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. *Front Microbiol* 2014; 5: 465. [[Crossref](#)]

27. Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, Henderson JM, Hendel A, Shore S, et al. Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 12: 530-42. [[Crossref](#)]

28. Baiersdörfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, Karikó K. A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019; 15: 26-35. [[Crossref](#)]

- 29.** Knuf M, Faber J, Barth I, Habermehl P. A combination vaccine against measles, mumps, rubella and varicella. *Drugs Today (Barc)* 2008; 44(4): 279-92. [[Crossref](#)]
- 30.** Mandl CW, Aberle JH, Aberle SW, Holzmann H, Allison SL, Heinz FX. In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat Med* 1998; 4(12): 1438-40. [[Crossref](#)]
- 31.** Oliver SE, Gargano JW, Marin M, Wallace M, Curran KG, Chamberland Met al. The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Moderna COVID-19 Vaccine - United States, December 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021; 69(5152): 1653-6. [[Crossref](#)]
- 32.** Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al.; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; 383(27): 2603-15. [[Crossref](#)]
- 33.** Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al.; COVE Study Group. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2020; [Online ahead of print]. [[Crossref](#)]
- 34.** Gümrall R. In-vivo Delivery of mRNA-Based Vaccines and Administration Routes, *J Mol Virol Immunol* 2020; 1(3): 18-26. [[Crossref](#)]
- 35.** Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 307-36. [[Crossref](#)]
- 36.** Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005; 202(1): 135-43. [[Crossref](#)]
- 37.** Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, et al. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood* 2007; 110(7): 2457-65. [[Crossref](#)]
- 38.** Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(15): 6388-93. [[Crossref](#)]
- 39.** US Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, Maryland, USA. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee December 17, 2020 Meeting Presentation - FDA Review of Efficacy and Safety of Moderna COVID-19 Vaccine Emergency Use Authorization Request. Available at: <https://www.fda.gov/media/144585/download> [Accessed December 29, 2020].
- 40.** US Food and Drug Administration (FDA), Silver Spring, Maryland, USA. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting December 10, 2020 FDA Briefing Document Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. Available at: <https://www.fda.gov/media/144245/download> [Accessed December 29, 2020].
- 41.** Krammer F, Srivastava K, PARIS team, Simon V. Robust spike antibody responses and increased reactogenicity in seropositive individuals after a single dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *medRxiv* 2021.01.29.21250653. [[Crossref](#)]
- 42.** Ortega Rodríguez NR, Audicana Berasategui MT, de la Hoz Caballer B, Valero Santiago A. The century of mRNA vaccines: COVID-19 vaccines and allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2021. [Epub ahead of print] [[Crossref](#)]
- 43.** Bruusgaard-Mouritsen MA, Johansen JD, Garvey LH. Clinical manifestations and impact on daily life of allergy to polyethylene glycol (PEG) in ten patients. *Clin Exp Allergy* 2021. [Epub ahead of print]. [[Crossref](#)]
- 44.** Banerji A, Wickner PG, Saff R, Stone CA Jr, Robinson LB, Long AA, et al. mRNA Vaccines to Prevent COVID-19 Disease and Reported Allergic Reactions: Current Evidence and Suggested Approach. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020; S2213-2198(20)31411-2. [[Crossref](#)]
- 45.** CDC COVID-19 Response Team; Food and Drug Administration. Allergic Reactions Including Anaphylaxis After Receipt of the First Dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine - United States, December 14-23, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021; 70(2): 46-51. [[Crossref](#)]