

Biyonanoteknoloji

Nanoaşılar

Doç. Dr. Emrah Şefik Abamor

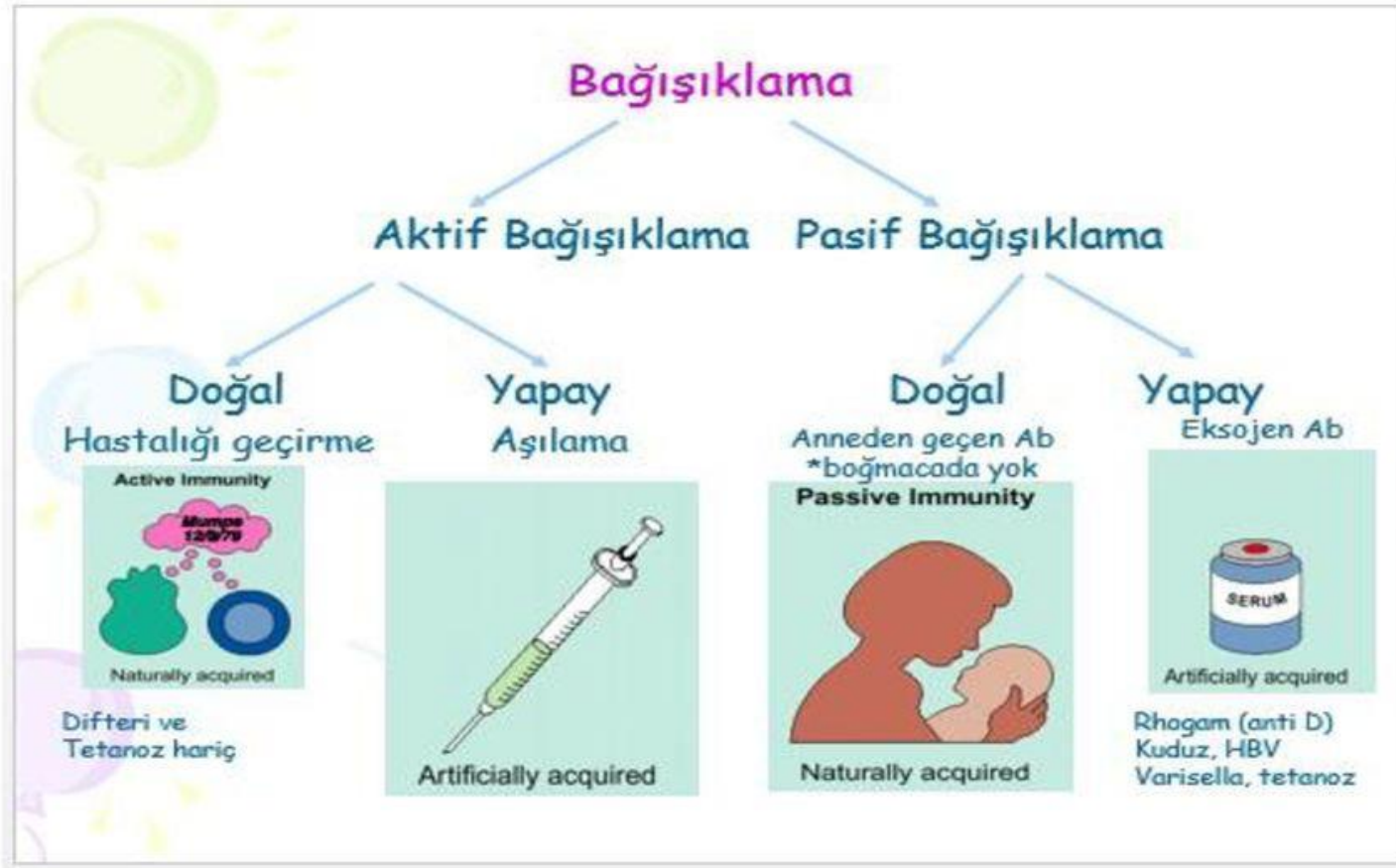
AŞI NEDİR?

- **Aşı:** Kişileri hastalıklardan ve onun kötü sonuçlarından koruyabilmesi için sağlam ve risk altındaki kişilere (bebekler, gebe kadınlar, erişkinler ve sağlık personeli) uygulanan biyolojik maddelere denir.
- Hastalık oluştuktan sonra (Örneğin: Hepatit B hastalığı gibi) hasta kişiye aşı yapmanın yararı yoktur.

İnsanda bağışıklık, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık olmak üzere iki şekilde kazanılır.



BAĞIŞIKLIK TİPLERİ NELERDİR?



Birincil Bağışıklık

- Antijenler vücuda girdiği zaman T ve B lenfositler çoğalırlar. Bunlardan bir kısmı antijenle savaşan kısa ömürlü hücrelere, bir kısmı da antijeni tanıyan hafıza (bellek) hücrelerine dönüşür.
- Bu olaya birincil bağışıklık denir.

İkincil Bağışıklık

- Aynı hastalık etkeni ikinci kez vücuda girdiğinde, daha önceden hafıza hücreleri tarafından tanımlandığı için tepki çok kısa sürede ve güçlü gerçekleşir.
- Buna da ikincil bağışıklık denir.

Hastalık etkeni ile
ilk karşılaşma

Hastalık etkeni ile ikinci
kez karşılaşma

Birincil bağışıklık
sonucunda ulaşılan
antikor seviyesi

İkincil bağışıklık sonucunda
ulaşılan antikor seviyesi

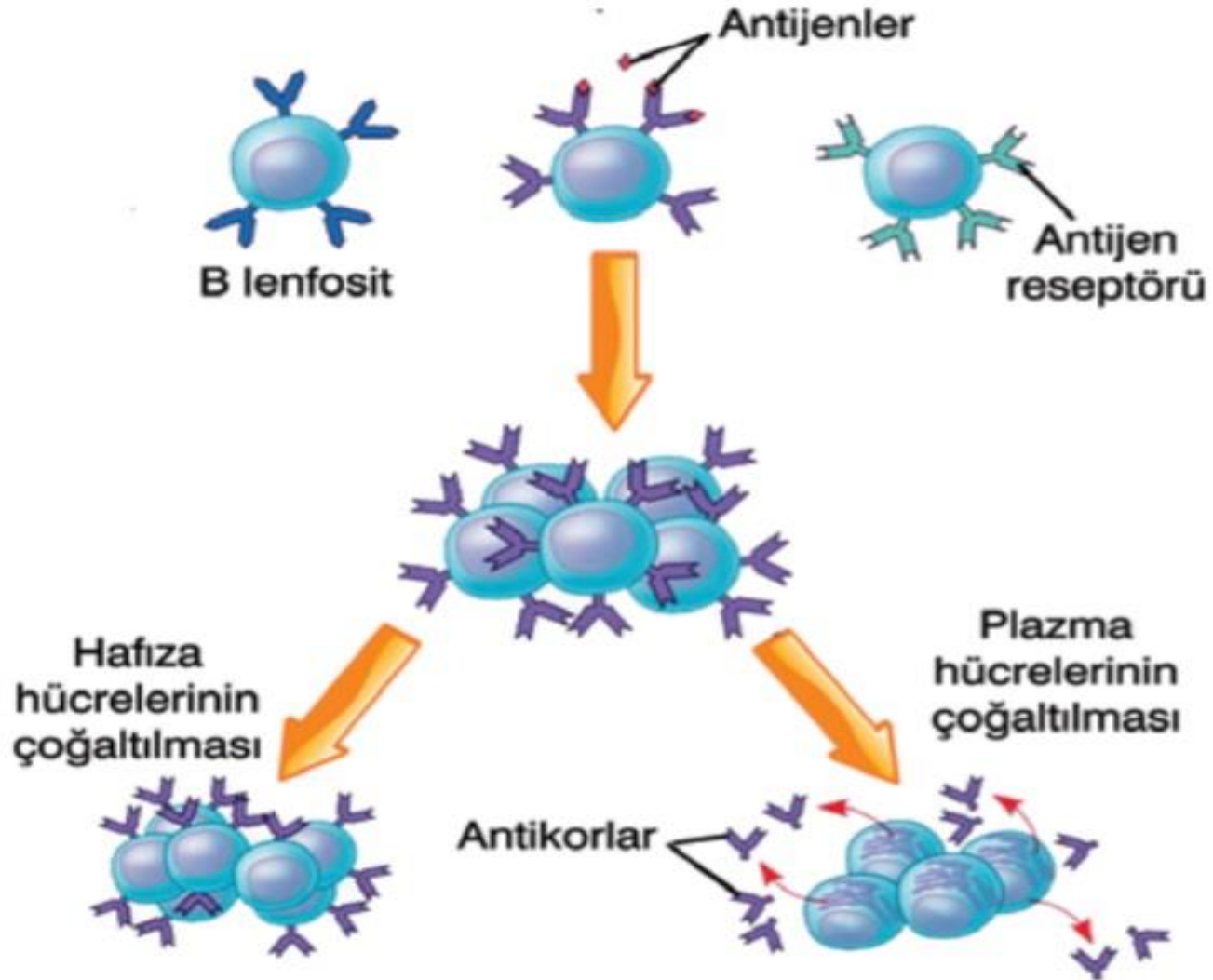


Humoral Bağışıklık

- **B lenfositleri ve antikorlarla yapılan bağışıklıktır.**

Antijenin vücuda girmesi sonucunda B lenfositlerin bir kısmı **hafıza hücrelerine** dönüşürken, bir kısmı da **plazma hücrelerine** dönüşerek antikor üretir.

- Üretildikten sonra kan ve lenfe verilen antikorlar, enfeksiyon bölgesine giderek antijenleri etkisiz hale getirir.

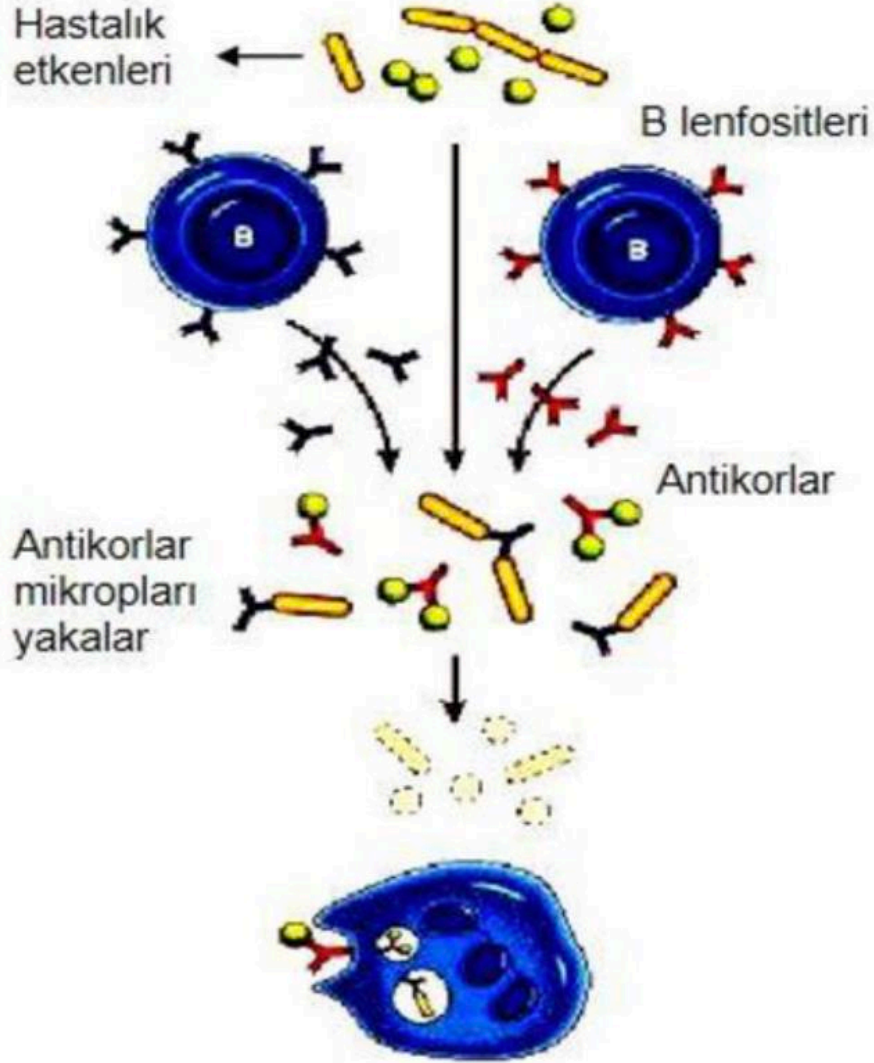


B lenfositler bağışıklığın sağlanmasında hafıza hücrelerini oluşturarak ve antikor üreterek etkili olur.

Hücresel Bağışıklık

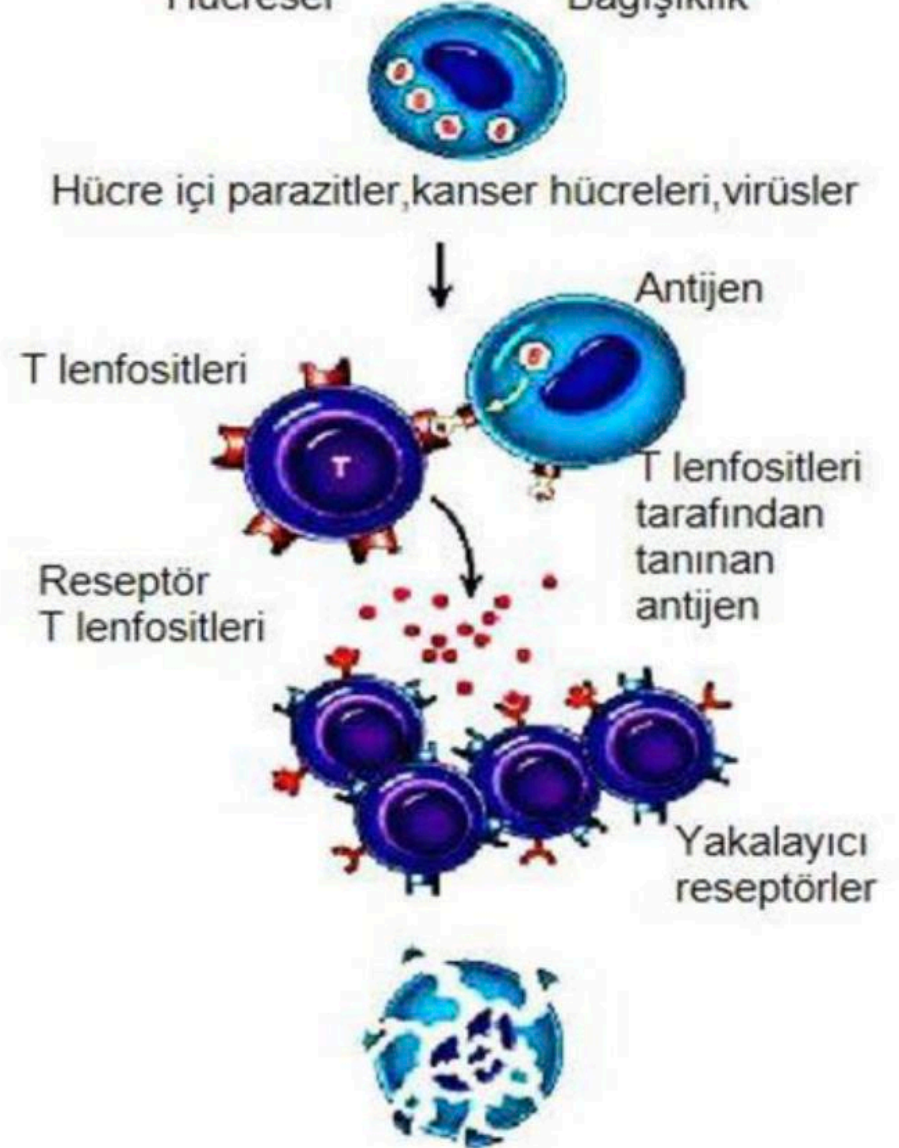
- Antijen vücuda girdiğinde, antijene özgü olmayan T lenfositleri hızla çoğalır antijeni yok etmeye çalışır. T lenfositler antijenle doğrudan temas ettiği için hücresel bağışıklık denir.
- Hücresel bağışıklık **kanserli hücreler, parazitler, mantarlar, doku nakli, bakteri ve virüsle enfekte olmuş hücreler üzerinde etkilidir.**

Humoral (sıvısal) Bağışıklık



Hastalık etkeni fagosit edilerek lizozom enzimleri ile sindirilerek yok edilir.

Hücresel Bağışıklık



Hastalıklı hücreler parçalanarak etkisiz hale getirilir.

AŞILAR:

- BCG (Verem)
- Polio (Çocuk Felci)
- Difteri
- Boğmaca
- Tetanoz
- Hib (Menenjit)
- KPA (Zatürre)
- Hepatit A
- Hepatit B
- KKK (Kızamık, Kızamıkçık, Kabakulak)
- Su Çiçeği
- Td (Erişkin tipi tetanoz difteri)

Konvansiyonel Aşılar

- Halen en çok kullanılan aşılar

- Aşılar klasik yöntemlerle hazırlanır ve bağışıklık olağan mekanizmalarla sağlanır

1. Canlı Aşılar

2. İnaktif Aşılar

3. Toksoid Aşılar

4. Subunit Aşılar

Canlı (Attenüe) Aşılar

- Canlı aşılar hastalığa neden olan yaban virüsün ya da bakterinin laboratuvar koşullarında zayıflatılmasıyla üretilir.
- Bu şekilde elde edilen aşıdaki mikroorganizma çoğalma ve bağışıklık yanıtı oluşturma yeteneğine sahiptir.
- Hastalık yapıcı özellikleri ise zayıflatılmıştır.
- Canlı aşılar, bağışıklık sistemi zayıflamış ya da baskılanmış kişilere uygulanmamalıdır.
- Ülkemizde kullanılan canlı aşılar BCG, OPA, KKK ve suçiçeği aşılarıdır.

Canlı Aşılar

-
- “Canlı mikroorganizmalar içerir, öz. Viruslar”

-
- “**sitotoksik T lenfositlerinin** baskın olduğu **hücrel immun yanıtı** uyarırlar”

-
- “**intrasellüler patojenlere** karşı en etkili savunma şeklidir”.

-
- “Canlı m.o.lar vücutta çoğalabildiklerinden immun yanıtı uzun süre uyabilirler---bağışıklık uzun sürer!!!”

-
- “Aynı etkenler inaktive edilerek vücuda verilirse **yardımcı T lenfositleri** vasıtasıyla **humoral immun yanıtı** uyarırlar”.

-
- “Aşı hazırlanacak patojenlerin yaşama güçleri ve immunojeniteleri korunurken, virulensleri hastalık yapmayacak düzeye indirilir---**attenuasyon** (zayıflatma)”

İnaktif aşılar (ölü aşılar)

- Fiziksel veya kimyasal yöntemlerle öldürülmüş m.o.ları içeren aşılardır
- Hangi tip m.o. olursa olsun **ekzojen** antijen şeklinde algılanırlar.

Antijen sunan hücreler tarafından işlenip yardımcı T lenfositlerine sunulurlar ve **humoral immun yanıt** oluştururlar".

- Hücre dışı bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarda etkilidirler
- Canlı aşılara kıyasla bağışıklık süresi kısadır

Toksoid Aşılar

- Toksinlerin inaktive edilmesi ile toksoid aşılar hazırlanır.
- Formaldehid gibi kimyasallar kullanılır
- Toksoid aşılar sadece humoral immun yanıtı uyarır ve oluşan antikorlar bakteriler tarafından salgılanan toksinleri nötralize ederek koruma sağlarlar.

Subunit Aşılar

- Enfeksiyonların patogeneğinde rol oynayan **proteinler, lipoproteinler, karbohidratlar** kullanılarak da aşılar hazırlanabilir---**subunit (alt ünite) aşıları"**
- Bu proteinlerin tek başlarına toksik etkileri olmadığı için, bunların inaktivasyonuna gerek yoktur
- Subunit aşıda kullanılacak molekülleri saf olarak elde etmek yeterlidir

Canlı ve inaktif aşıların farkları

1. Bağışıklık süresi yönünden karşılaştırıldıklarında canlı aşılar ölü aşılar
göre **daha uzun süreli bağışıklık** verir.
2. Bağışıklık verme gücü yönünden, canlı aşılar ölülere göre genellikle
daha iyi bağışıklık kazandırır.
3. **İnaktif aşıların** etkili bir bağışıklık kazandırması için genellikle
adjuvantlarla birlikte verilmeleri gerekir.
4. Canlı aşıların immun yanıtı uyaran **dozları** genellikle **daha düşüktür**.

Canlı ve inaktif aşıların farkları

5. Canlı aşıların genellikle tek doz uygulaması yeterli iken, inaktif aşıların bağışıklığı uyarması için **belli aralıklarla iki doz** uygulanması gerekmektedir.

6. Canlı aşıların aşırı duyarlılık ve enjeksiyon yerinde lokal reaksiyon oluşturma riski ölü aşılarla göre daha düşüktür.

7. Ölü aşıların aşısındaki patojenden dolayı enfeksiyon oluşturma riski yoktur. Ancak canlı aşılardaki **attenuated m.o.ların patojen hale geçme riski** her zaman bulunmaktadır.

Canlı ve inaktif aşıların farkları

- 8. Ölü aşıların başka patojenlerle kontamine olma riski genellikle yoktur. Ancak, canlı aşıların doku kültürlerinde ve başka hayvanlarda hazırlanışı sırasında, aşının diğer patojenlerle kontamine olma riski yüksektir.
- 9. Ölü aşıların hazırlanışı daha kolaydır ve buna bağlı maliyeti daha düşüktür. Canlı aşıların hazırlanışı daha komplike işlemler gerektirir, bu da maliyeti artırır.
- 10. Ölü aşıların dayanıklılığı daha fazladır ve hazırlandıktan sonra daha uzun süre bozulmadan kalabilirler. Canlı aşılar ise dayanıksızdır, uygun koşullarda saklanmaları halinde bile daha kısa sürede tüketilmeleri gerekmektedir.

Adjuvan

- Adjuvanlar antijenlerle birlikte kullanılan ve immün sistemi non-spesifik olarak harekete geçiren biyolojik ya da kimyasal bileşenlerdir.

Adjuvanlar

Alüminyum tuzları (alum),

Saponinler

Sitokinler

Yağ emisyonları

Bakteriyal türevleri

Karbohidratlar

Lipozomlar

Alum

Alüminyum temelli bileşenler aşı çalışmalarında en sık kullanılan adjuvanlardır.

Ancak bazı önemli dezavantajları bulunur:

Peptid aşılarında düşük immünite

Th1 yolağını aktive edememe

Enjeksiyon bölgesinde ciddi alerjik reaksiyonların gelişimi

Nano- aşılar

Aşı çalışmalarında nanopartiküller iki amaçla kullanılır:

1. Antijenlerin aktif ve pasif olarak taşınmasını sağlayan araçlar

2. Antijenik özellik göstererek immün sistemi tetikleyebilecek adjuvanlar

Boyut

- Nanomalzemelerin aşı taşınmasında aşı olarak etkinlik göstermesinde en önemli etken bu malzemelerin boyutlarıdır.
- Nanopartiküllerin boyutları ve yüzey alanının genişliği antijenlerin immün sistem hücreleri tarafından alımını ve hedef hücrelerle etkileşimini arttırabilir.

Boyut

- Küçük boyuta sahip nanopartiküller mukozal dokulara daha yüksek verimlilikle penetre olabilirler.
- 20-200 nm boyuta sahip nanopartiküllerin endositoz yoluyla Antijen Sunucu Hücreler (ASH) tarafından alındıkları ve T hücre aracılı hücresel immüniteyi tetikledikleri gösterilmiştir.
- Buna karşılık, 0.5–5 μm boyuta sahip partiküllerin fagositoz yoluyla hücre içerisine alındıkları ve humoral yanıtı tetikledikleri bilinmektedir.

Yüzey yükü

- Kullanılan nanopartiküllerin yüzey yükü de hedeflenen hücrede farklılıklar doğurabilir ve antijen trafiğini değiştirebilir.
- Örneğin katyonik nanopartiküller ASH'lar tarafından çok hızlı bir şekilde alınabilir ve lizozomal etkiden en az zararı görerek daha yüksek bir immün yanıt oluşturabilirler.

Yüzey yükü

- Benzer şekilde PLGA nanopartiküllerinin yüzeyinde bulunan pek çok asidik gruba protonların eklenmesiyle nanopartikül yüzey yükü negatiften pozitifte çevrilebilir.
- Bu durum lizozomal aktiviteden kaçmalarına neden olabilir

Nanoaşıların Sub-unit aşılara göre avantajları

1. Antijenlerin nanotaşıyıcıların içerisine enkapsülasyonu antijenik degradasyonu önler ve antijen stabilitesini arttırır

2. Antijenlerin ve adjuvanların eş zamanlı enkapsülasyonu sağlanabilir

3. Nanopartiküller ASH'lar tarafından yüksek düzeyde alınabilir ve antijenler işlenebilir

4. Çapraz reaksiyonu mümkün kılar ve böylece sitotoksik T hücreleri aktive eder.

5. Yüzeyleri modifiye edilerek lenfoid organlara yönlendirilebilirler.

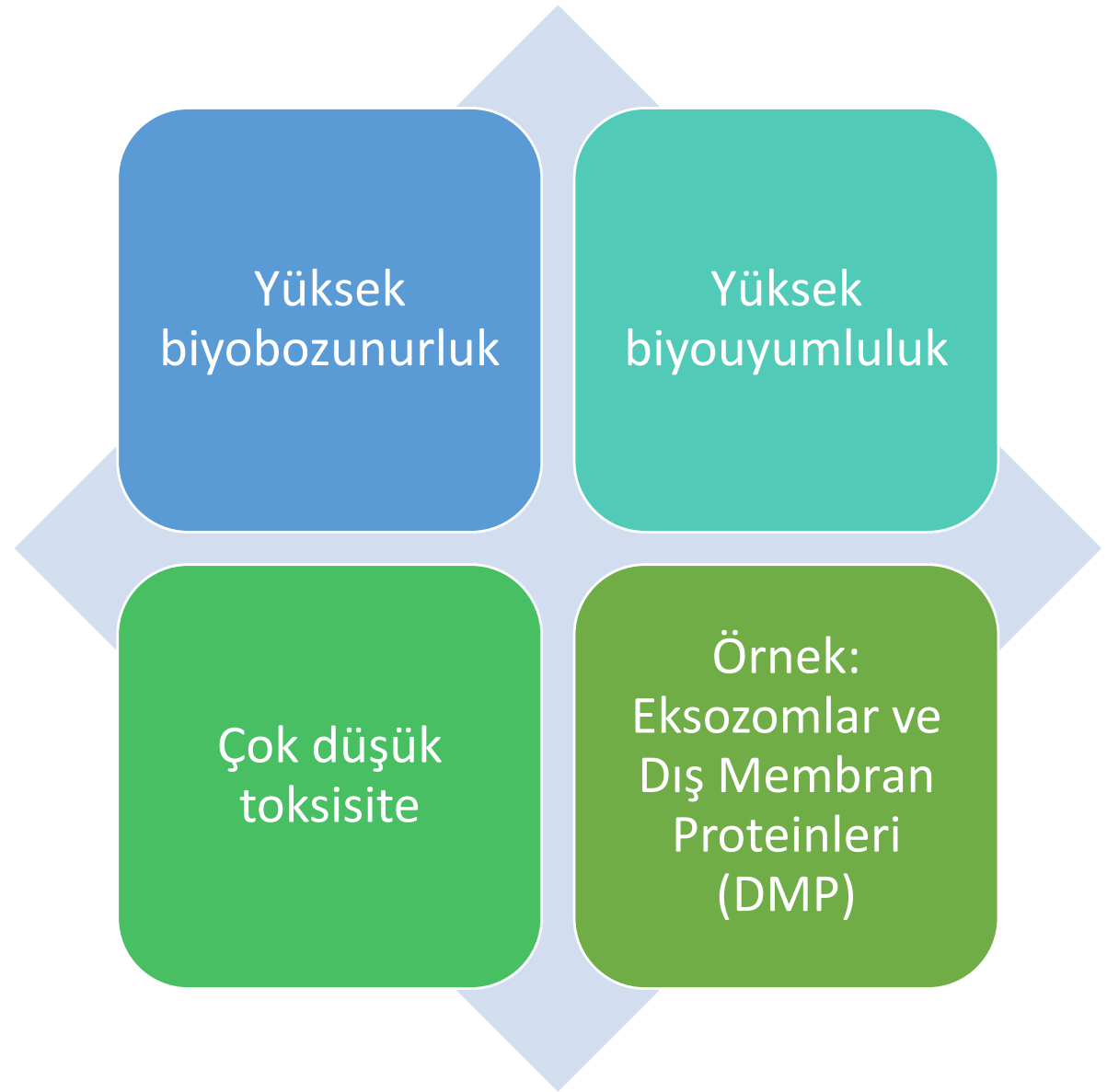
Nano-aşı taşıyıcılar 3 başlık altında toplanabilir

1. Biyogenik
Nanopartiküller

2. Yarı-sentetik
Nanopartiküller

3. Sentetik
Nanopartiküller

Biyojenik Nanotaşıyıcılar



Eksozomla

30 ila 150 nm arasında değişen boyuta sahip eksozomlar aşı taşıyıcı sistemler için yüksek potansiyele sahip platformlardır.

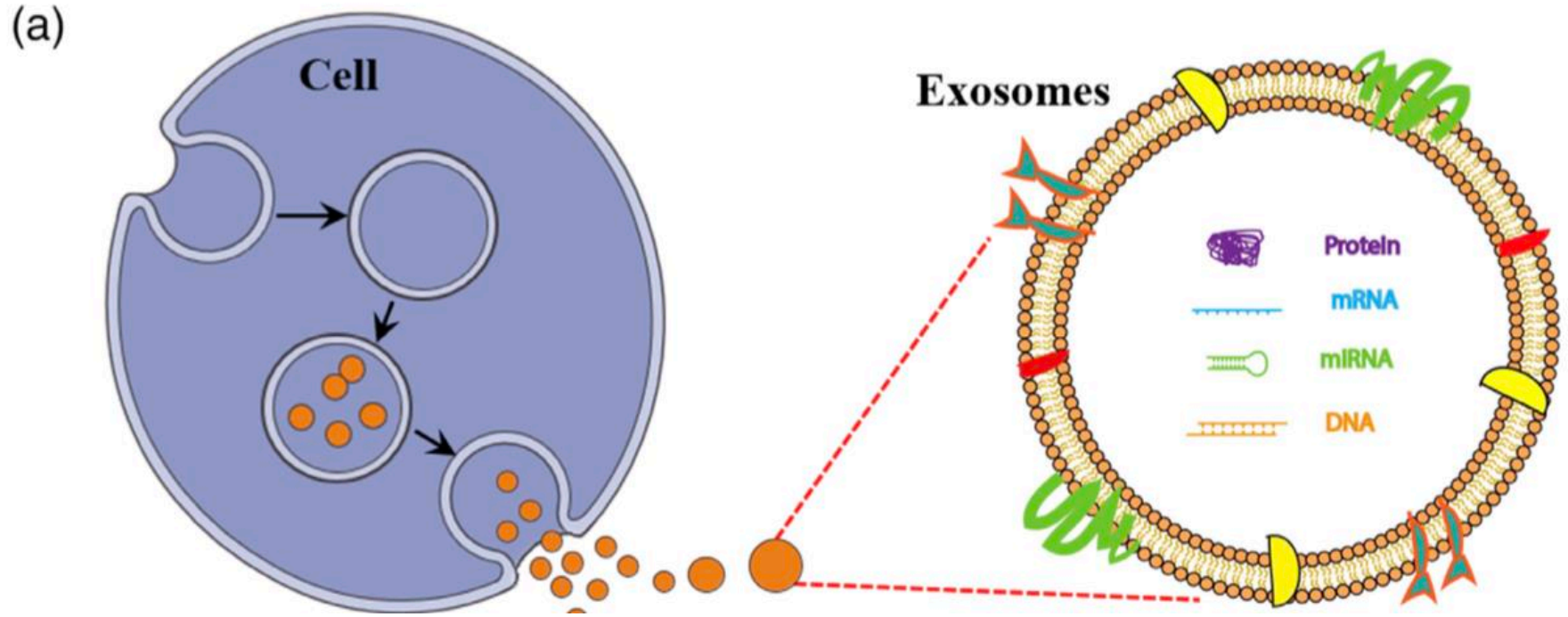
T hücreleri, B hücreleri, Antijen sunucu hücreler ve kanser hücreleri gibi çeşitli hücre türleri tarafından salınabilirler

Eksozomlar

- Bu nanopartiküller çoğunlukla hücre membranına bağlı olarak bulunan mikroveziküler yapılardan orjinlenir
- Hücreler eksozomları çevredeki diğer hücreler ile iletişim kurabilmek için kullanırlar.



Eksozomlar



Bu veziküller ikili fosfolipit bir membran yapısından oluşmaktadır.
DNA, protein, MRNA gibi biyolojik molekülleri taşıma kapasitesine sahiptir

Eksozomlar

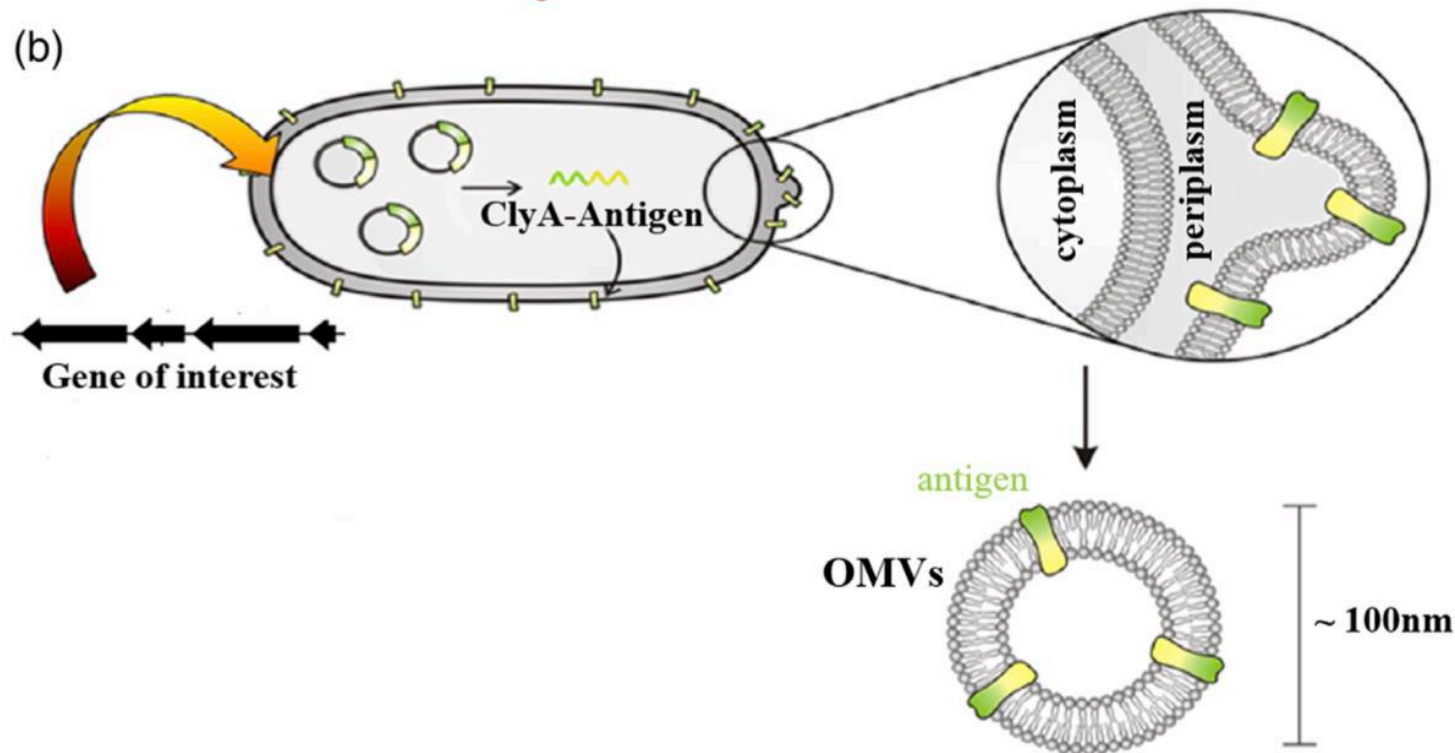
- Özellikle dendritik hücreler tarafından salınan eksozomlar yüzeylerinde T hücre aktivasyonunda ve antijen sunumunda görev alan son derece önemli reseptör ya da molekülleri bulundurduğu için aşı ve immünoterapi çalışmaları için oldukça büyük bir potansiyele sahiptir.

Dış Membran Vezikülleri (DMV)

- DMV'ler özellikle Gram negatif bakterilerin dış membranlarında bulunan ve bakterilerin kendi türleriyle ya da çevrede bulunan diğer bakterilerle iletişim kurmasını sağlayan oldukça küçük yapılardır.
- 50 ila 250 nm arasında değişen boyutlara sahiptir.

Dış Membran Vezikülleri (DMV)

- DMV'ler bakteri hücre sinyalizasyonunda görev alan biyokimyasalları, DNA, RNA, protein, endotoksinler veya çeşitli virülans faktörlerini içerebilir.



Dış Membran Vezikülleri

Bu sayede oldukça güçlü immünostimülatör adjuvanlar olarak görev yapabilirler

Bunun yanında küçük boyutları sayesinde içerdikleri antijenleri direkt olarak lenf nodüllerine ve ASH'lere taşıyabilirler.

Bakteriyel enfeksiyonlara ve kansere karşı oldukça güçlü bir aşı taşıyıcı sistem olarak görev alabilirler.

- For instance, OMVs were loaded with antitumor cytokines CXCL10 and interferon- γ as therapeutic agents (Kim et al., 2017), which showed remarkable efficacy to induce long-term antitumor immune responses that eradicated established tumors with- out notable adverse effects. Further, engineered OMVs have been engineered to display Human Papillomavirus 16 (HPV16) E7 protein to induce E7-specific cellular immunity. These OMVs showed significant therapeutic efficacy, thus demonstrating the potential of OMVs as cancer nanovaccines

Yarı Sentetik Nanotaşıyıcılar

Yarı sentetik nanotaşıyıcılar, biyojenik bileşenlerle sentetik bileşenlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan platformlardır.

Biyojenik bileşenlerin, biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi özelliklerini, sentetik bileşenlerin ise kolay ve büyük ölçekte üretim potansiyeli gibi önemli özelliklerini birlikte yansıtabilirler.

Yarı Sentetik Nanotaşıyıcılar

3 grupta
değerlendirilebilir:

Hücre membranı kaplı
nanotaşıyıcılar

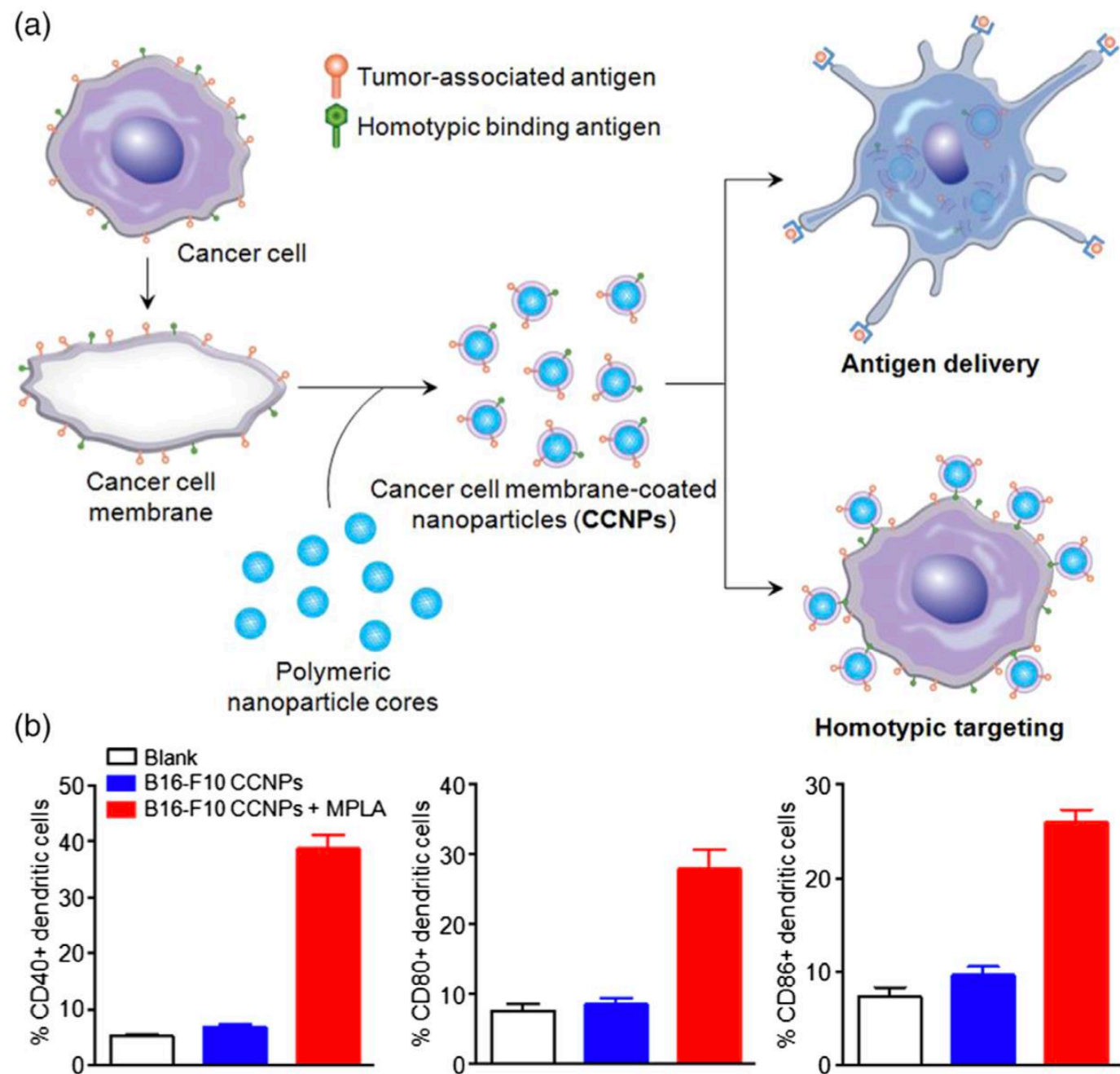
Virüs benzeri partiküller

Endojenik protein
temelli taşıyıcılar

Hücre membrani kaplı nanotaşıyıcılar

- İstenen hücre membranı ekstrakte edilebilir ve nanopartiküllerin yüzeyine bağlanarak güçlü nanotaşıyıcı platformlar geliştirilebilir.
- Özellikle kanser aşılarının geliştirilmesinde oldukça ilgi çekici ve potansiyeli yüksek bir yöntemdir.

FIGURE 3 Cell membrane camouflage-based nanocarriers of vaccines. (a) Schematic representation of the fabrication of cancer cell membrane-coated nanoparticle (CCNP) and the potential applications. (b) CCNPs for the delivery of tumor-associated antigens, and maturation of dendritic cells. (Reprinted with permission from Fang et al. (2014). Copyright 2014 American Chemical Society Publishing Group)



Hücre membrani kaplı nanotaşıyıcılar

- Ayrıca kanser aşısı olarak üçlü kombinasyon uygulamaları da geliştirilebilir:
- Nanopartikül kansere özgü antijenleri ve bir adjuvanı içerirken, yüzeyine kanser membranı kaplanarak oldukça güçlü anti-kanserojen immünite oluşturabilecek sistemler elde edilebilir.

Virüs Benzeri Partiküller

VBP'ler yapısal olarak virüslere benzerler

Enfeksiyöz değildir çünkü genetik materyal içermezler

In vitro ortamda ekspresyonu sağlanan viral yapısal proteinlerin kendi kendine kompleks oluşturmasıyla sentezlenirler.

Hem B hem de T hücre epitoplarını içerebilecek virüs benzeri partiküller daha uzun süreli ve daha güçlü bir koruma sağlayabilirler.

Virüs Benzeri Partiküller

Oldukça güvenlidirler

Konak hücre ve dokularından kolaylıkla penetre olabilirler

Hem hücresel hem de humoral immün yanıtı tetikleyebilirler

Rotavirüs ve HPV'e karşı lisanslı ürün

Virüs Benzeri Partiküller

20-800 nm arasında değişen VLP'ler bir çok virüsten farklı mekanizmalarla üretilbilirler.

Bilinen en sentez yöntemi; kapsid proteinlerinin konak hücre içerisinde eksprese edilmesi ve kendi kendilerine birleşmelerinin ardından saflaştırma işleminin gerçekleştirilmesidir.

Bu partiküllerin kontaminasyona uğramaması oldukça önemlidir.

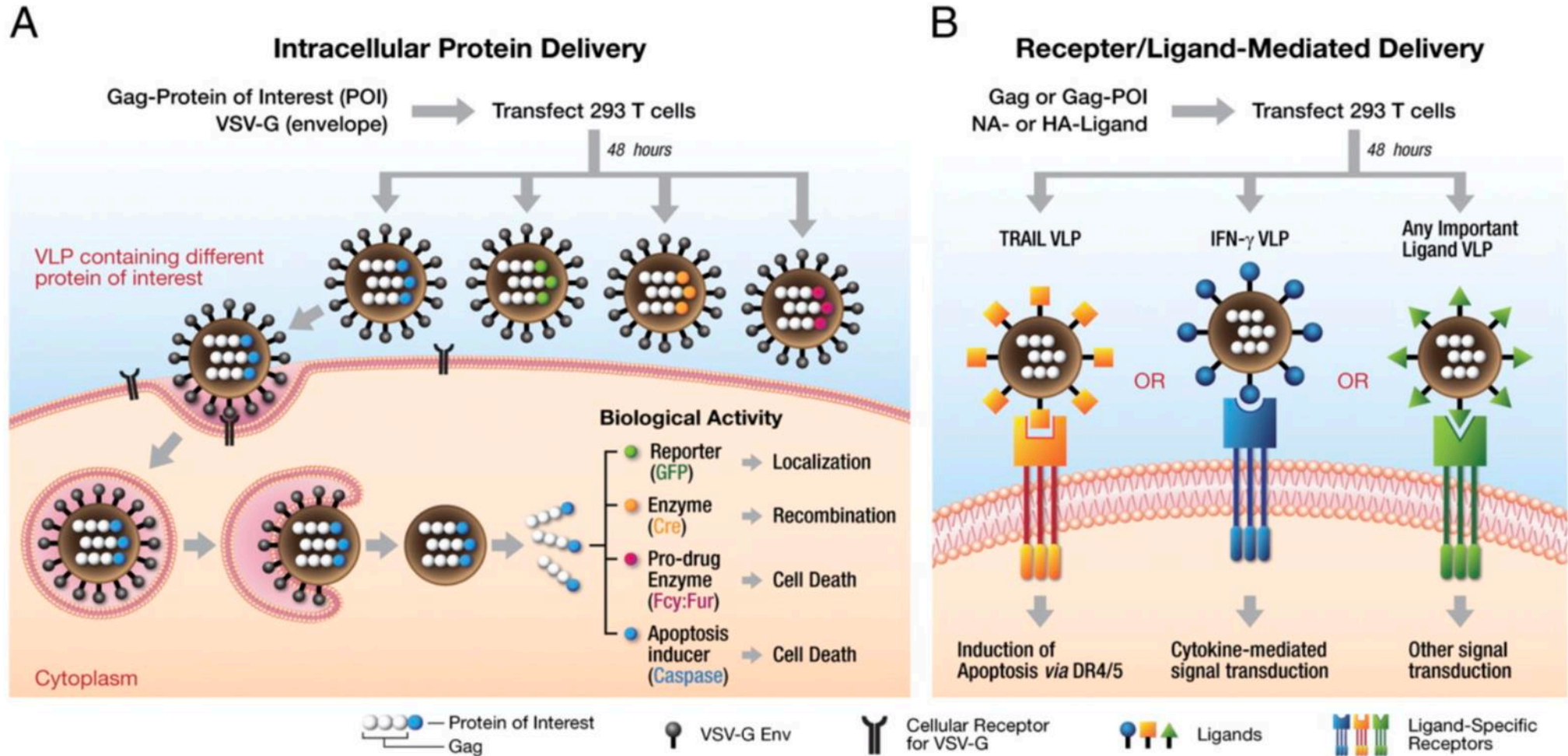


Figure 2. Schematics of the generation of functional virus-like particle (VLP) and (A) the delivery of proteins of interest intracellularly, and (B) by receptor/ligand-mediated protein delivery. Reproduced with permission from Ref. [57]; Copyright © 2011, National Academy of Sciences.

Virüs Benzeri Partiküller

Konak hücrede kapsid proteinlerinin yanı sıra ek proteinlerin de eksprese edilmesiyle VLP'ler antigen taşıyıcı ajan olarak da kullanılabilir.

Benzer şekilde VLP'lerin yüzeyinde kimyasal değişiklikler yapılarak proteinlerin ya da karbohidratların konjugasyonu sağlanabilir. Bu da gelişecek immün yanıtı arttırabilir.

Endojenik Proteinler

Doğal yoldan oluşan bir çok protein kendi kendine birleşerek 10 ila 150 nm arasında değişen boyutta nanopartikül oluşturma eğilimindedir.

Bu nanopartiküller mikroorganizmanın doğal yapısını taklit etme özelliğine sahip oldukları için aşı taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirler

Endojenik Proteinler

Endojenik bir protein olan albümin nanopartiküler bir aşı ve ilaç taşıyıcı sistem olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Bu tür protein temelli kendi kendine oluşabilen nanokompleksler lenfatik drenajdan yüksek bir verimlikle geçebilir ve taşıdıkları aşılardan veya antijenleri lenfatik organlara veya ASH'lara taşıyabilirler

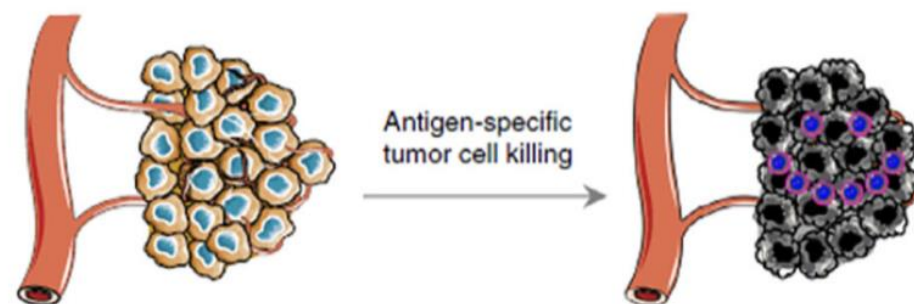
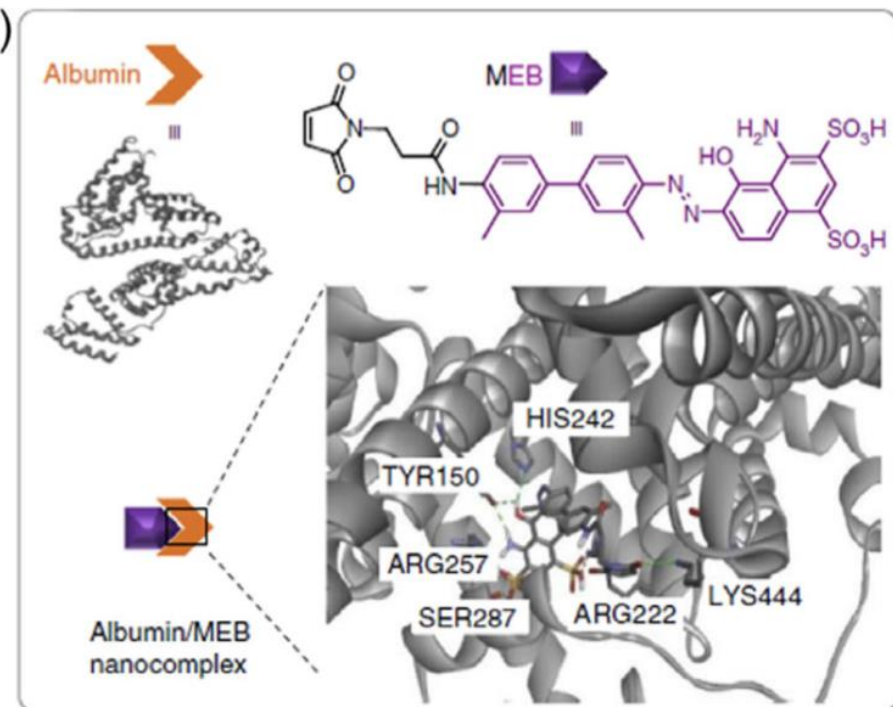
Albumin

- Albumin bağı lipitler ile konjuge edilmiş sub-unit aşıların tek başına aşı kullanımına göre lenf nodüllerinde çok daha yüksek miktarda biriktiği ve immün sistemi daha fazla aktive ettiği gösterilmiştir.

Endojenik Proteinlerin Avantajları

- Albumin kan dolaşımında 20 günden uzun süre kalabilir.
- Albumin reseptörlerinden biri monosit, makrofaj, DH gibi ASH'lerde yüksek düzeyde eksprese edilir. Bu durum albümin-aşı komplekslerinin ASH'lara yüksek verimlilikle taşınmasına ve tanıtılmasına yardımcı olmaktadır.
- GMP koşullarında büyük ölçekte üretime uygundur.

(a)



Tumor infiltration

Invigorated CTLs

Anti-PD-1

Immune checkpoint blockade

Anergic CD8+T cells

Memory T cell

Ag cross presentation

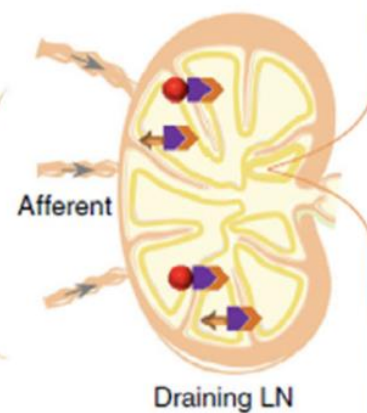
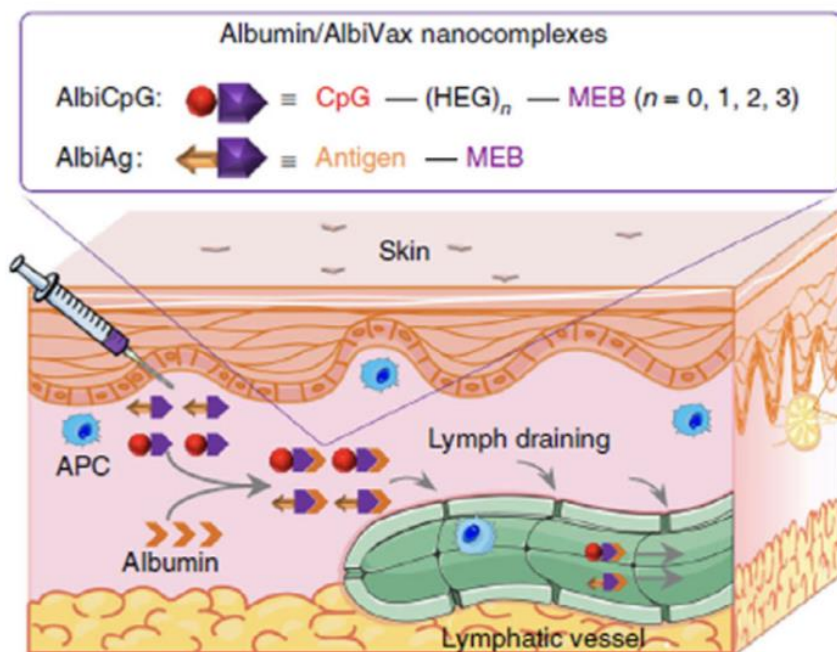
CD8+T cell

Costimulation

Maturation

APC

Endocytosis



Quantitative PET pharmacoinaging in mice

Light-sheet fluorescence imaging in LNs

Super-resolution microscopy in APCs

Ferritin

Ferritin hücreyi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hasardan koruyan bir proteindir.

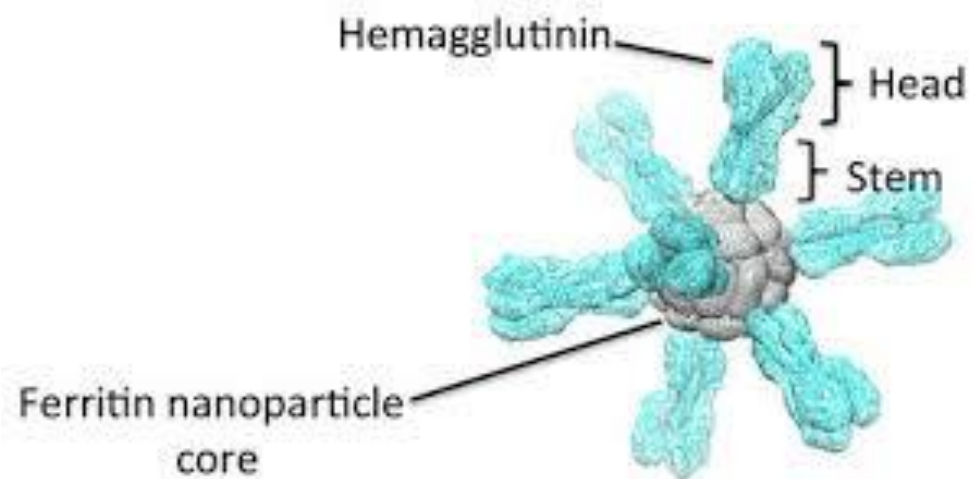
Oksijenli ortamda serbest haldeki Fe (II) hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek toksik hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur.

Oyuklu bir yapıya sahip olan ferritin bu oyukun içerisinde demirin hapsolmasını sağlayarak toksik etkisini ortadan kaldırır.

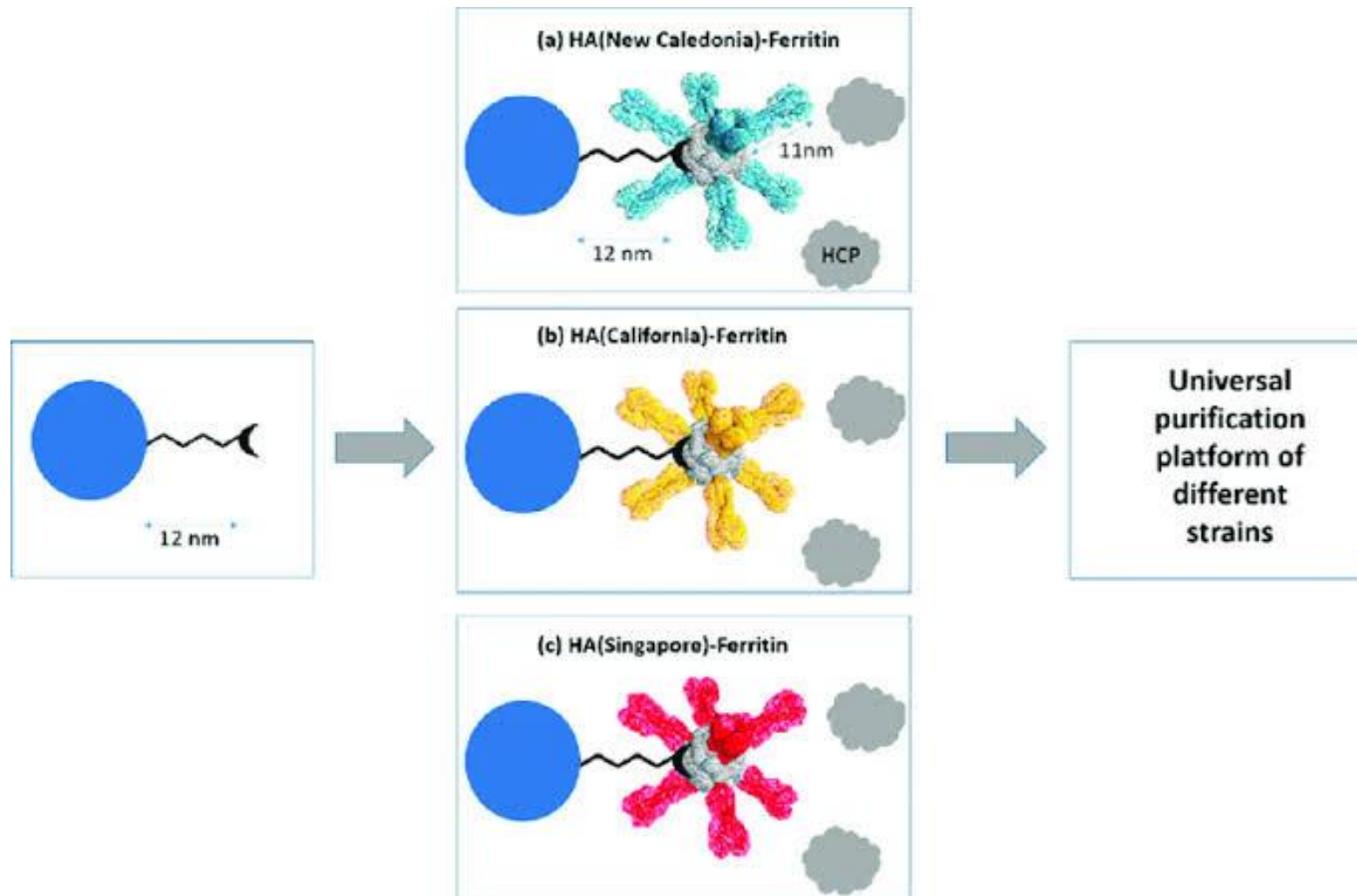
Ferritin

Ferritin kendi kendine küresel nano-yapılara dönüşebilir ve Influenza virüsünün en önemli yüzey antijeni olan hemagglutinin ile bağlanarak virüse özgü oktohedral simetriyi kendiliğinden geliştirebilir.

Kendiliğinden oluşan bu yapının inaktive edilmiş Influenza virüsüne kıyasla çok daha güçlü bir immün koruma sağladığı gösterilmiştir.



Ferritin Nanopartikülleri



Sentetik
Nanotaşıyıcılar

Polimerik
nanopartiküller

Lipozomlar

Inorganik
nanopartiküller

PLGA

Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanopartikülleri aşı taşıyıcı sistem olarak da kullanılabilir.

PLGA biyobozunur bir polimerdir. In vivo sistemlerde laktik asit ve glikolik aside parçalanır

PLGA nanopartiküllerinin boyutu, çözünürlüğü ve stabilitesi sentez esnasında değiştirilebilir.

PLGA

Ayrıca PLGA, polietilen glikol (PEG) ya da polieterimid (PEI) ile birleştirilerek kendiliğinden oluşan miseller geliştirilebilir.

Bu tür polimerik misellerbir çok peptit antijeninin enkapsüle edebilir.

Antijen yüklü polimerik aşılarda moleküler antijenlere kıyasla T hücre yanıtını çok daha yüksek düzeyde uyardıkları tespit edilmiştir.

Lipozomlar

Lipozomlar hücre membranını taklit eden, hidrofilik bir baş ve hidrofobik kuyruklardan oluşan taşıyıcı sistemler olarak sıklıkla kullanılan komplekslerdir.

Hem suda hem de organik çözücülerde çözünebilen antijenleri aynı anda enkapsüle etme yeteneği bu nanopartiküllerin en önemli özelliklerindendir.

Virozomlar

Lipozomların viral zarf proteinleri ile kombinasyonu ile oluşturulan komplekslerdir.

Virozomlar replike olmazlar

İçerdikleri viral proteinler immün sistem hücreleri içerisinde uzun süre kalmalarını sağlar. Bu durum virozomların aktif taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasına yardımcı olur.

Virozomlar

İstenen antijen virozomların içersine enkapsüle edilebilir ya da virozomların dışına hidrofobik etkileşimlerle bağlanabilir.

Böylece immün sistemin tetiklenmesinde hem bir taşıyıcı hem de bir adjuvan rolü üstlenirler.

Virozomlar

Ayrıca endozomlardaki düşük pH virozomların hücre membranlarıyla füzyonunu sağlar. Bu sayede virozomlar içerdikleri antijenleri kolaylıkla hücre içerisine salabilirler

Hepatit, influenza ve herpes virüslerine ait pek çok antijenin virozomlar tarafından taşındığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

İnorganik Nanopartiküller

- Altın nanopartikülleri nükleik asitlerin yüzeye bağlanmasıyla ya da core-shell yapısının içerisine kapsüle edilerek modifiye edilebilir ve nano-aşı olarak kullanılabilir.