

PANDEMİK İNFLUENZA AŞILARI

PANDEMIC INFLUENZA VACCINES

Osman Şadi YENEN *

Özet: İnfluenza virusları mevsimsel epidemilere ve kimi kez de dünya ölçeğinde yaygın, şiddetli pandemilere neden olurlar. Yirminci yüzyılda ortaya çıkan üç pandemi milyonlarca ölüme neden olmuştur. Böylesi salgınların etkisini sınırlamak için güvenilir ve etkin aşuların varlığı önemlidir ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından yüksek öncelikli olarak değerlendirilmektedir.

Günümüzde, mevsimsel insan influenza aşularına ek olarak, prepandemik ve pandemik aşuların gerekli olduğu konusunda bir uzlaşma vardır. Bu yazıda prepandemik/pandemik influenza aşularını konusunda güncel bilgiler gözden geçirilmiştir.

Anahtar sözcükler: İnfluenza; Aşular; Pandemi; Aşı ruhsatlandırma; Skalen; Suda yağ emülsiyonları; Hücre substratlar

Summary: Influenza viruses have caused seasonal epidemics, and, on occasions, globally widespread, severe pandemic influenza outbreaks. Three influenza pandemics emerged in 20th century caused millions of death. The availability of safe and effective vaccines is important to limit the impact of such outbreaks and considered a high priority by the World Health Organization.

Today, in addition to seasonal human influenza vaccines, there is a consensus on requiring prepandemic and pandemic vaccines. This paper has reviewed up-to-date information on prepandemic/pandemic influenza vaccines.

Keywords: Influenza; Vaccines; Pandemic; Vaccine licensing; Squalene; Oil-in-water emulsions; Cell substrates

İnfluenza virusları mevsimsel salgınlar yanında kimi kez pandemik salgınlara yol açarlar. Yirminci yüzyılda tanık olunan üç pandemi (1918’de H1N1, 1957’de H2N2 ve 1968’de H3N2) yanında bir pandemi tehdidi (1997’den bu yana süren H5N1) ve 21. Yüzyılın ilk pandemisi (H1N1 2009) olarak değerlendirilen salgın yeni influenza viruslarının ortaya çıkışlarının birbirlerine benzemediklerini, pandemi oluşturacak suş hakkında öngörüle bulunmanın güç olduğunu ve virus suşlarının biyolojik (ve sonuçta klinik) davranışlarının kendine özgü olduğunu göstermiştir. İnfluenza salgınlarına bağlı ölümler ve influenza aşularının koruyuculuklarındaki rolleri gerek H5N1 tehdidi gerekse influenza A (H1N1) 2009 pandemisi nedeniyle influenza aşularını üzerinde yoğunlaşılmasına yol açmıştır. H5N1 suşları için geliştirilen prepandemik aşulara ilişkin klinik çalışmalar yayınlanmaya başlamış (40), influenza A (H1N1) 2009 için geliştirilmiş aşular belli ölçüde olarak kullanılmıştır. İnfluenza A (H1N1)

* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul (osadyenen@doruk.net.tr)

2009 pandemisinin mevsimsel influenzadan kimi klinik farklar gösterse de korkulduğu denli şiddetli hastalığa yol açmaması aşı kullanımını sınırlamış (Örneğin Batı Avrupa’da dağıtılan toplam 179 milyon doz aşının yaklaşık beşte biri kullanılmıştır; <http://www.ema.europa.eu/pdfs/influenza/35608710en.pdf>) ve influenza aşılı hakkında tartışmaların başlamasına yol açmıştır (http://www.who.int/mediacentre/multimedia/pc_transcript_29_march_10_fukuda.pdf), (http://assembly.coe.int/CommitteeDocs/2010/20100604_H1N1pandemic_e.pdf).

Bu yazıda genel olarak influenza aşılı, özel olarak prepandemik ve pandemik aşılı geliştirilmesindeki bilimsel temeller ve üretim süreçleri ele alınacaktır.

İnfluenza A virüsleri ve antijenik çeşitlilik mekanizmaları

Orthomyxoviridae ailesinden olan influenza virüsleri negatif kutupsallaşmalı (*sense*), tek iplikli ve segmentli RNA’dan oluşan bir genoma sahiptirler (influenza virüslerinin biyolojisi Kaynak 6’da gözden geçirilmiştir). İnfluenza virüslerinin, nükleoprotein ve matriks proteinlerinin antijenik farklılıkları temelinde ayrılmış ve A, B ve C tipi (ya da cinsi, *genus*) olarak adlandırılan üç tipi vardır. Dizileme çalışmaları bunların ortak bir genetik öncüle sahip olduğunu göstermekteyse de genetik olarak öylesine ayrılmışlardır ki tipler arasında RNA genom segmentlerinin değişimi (reasorman; aşağıya bakınız) söz konusu değildir. İnfluenza A ve B virüsleri 8 segmentli, influenza C virüsü ise 7 segmentli genoma sahiptirler. Segmentler, en uzunundan başlayarak azalan uzunluklarına göre numaralandırılmışlardır.

İnfluenza A virüslerinde 1, 3, 4 ve 5 nolu segmentler birer protein kodlarlar: sırasıyla Polimeraz Bazık 2 [PB2], Polimeraz Asidik [PA], Hemaglutinin [HA] ve Nükleoprotein [NP] proteinleri. Segment 2 tüm influenza virüslerinde polimeraz alt birimi olan PB1’i kodlar. Kimi influenza A virüslerinin bu segmenti bir aksesuar protein olan PB1-F2’yi de kodlamaktadır. Bu 87 amino asitlik (aa) küçük protein pro-apoptotik etkinliğe sahiptir ve ne influenza B ne de influenza C virüslerinde benzerine rastlanmaktadır (6). İnfluenza A virüsünün 6, 7 ve 8. segmentleri, sırasıyla, Nöraminidaz [NA], Matriks 1 [M1] ve Nonstrüktürel protein 1 [NS1] ile NEP/NS2 proteinlerini kodlarlar. İnfluenza A genomunda Matriks 2 [M2] iyon kanal proteini de 7 numaralı segmentte kodlanmaktadır. HA ve NA proteinleri glikoprotein yapısındadırlar ve viriyonun yüzeyinde, konak hücreden türetilmiş kılıftan uzayan yüzeyel çıkıntılar halinde bulunurlar. Bir viriyonda HA sayısı yaklaşık 500 kadardır ve HA/NA oranı da kabaca 5/1 veya 4/1’dir.

İnfluenza A virüsleri, HA ve NA proteinlerinin antijenik özellikleri temelinde alt tipler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu farklı antijenik özelliklerden yola çıkılarak 16 HA (H1-H6) ve 9 NA (N1-N9) alt tip belirlenmiştir. Bu alt tiplerin tümü, herhangi bir belirgin hastalığa neden olmaksızın kendilerini yaban su kuşlarında sürdürmektedirler (38). Bunlar arasından sadece H5 ve H7 alt tipleri başka seçenek konaklara (örneğin, kümes hayvanlarına) bulaştıklarında ileri derecede patojen bir özellik kazanırlar. Öte yandan, influenza A virüslerinin en azından 18 memelide bulunabildiğine ilişkin kanıtlar elde edilmiştir (18). İnsanlarda çeşitli alt tipler (H1, H2, H3, H5, H7 ve H9) izole edilmekteyse de sadece 3 HA (H1, H2 ve H3) ile 2 NA (N1, N2) alt tipleri salgınlara (epidemilere) neden olmaktadır. İnfluenza A’nın iki alt tipi (H1N1 ve H3N2) ile influenza B insanlar arasında 1977’den bu yana mevsimsel olarak dolaşmaktadırlar. İnfluenza B ve C virüsleri için alt tipler tanımlanmamıştır.

İnfluenza A virüslerinde başat immünojenik proteinler virüsün konak hücrelere girişini

kolaylaştıran HA, progeni virusların enfekte hücrelerden salıverilmesini sağlayan NA ve replikasyonun gerçekleşebilmesi için viriyonun asidifikasyonundan sorumlu olan transmembran bir proton kanalı proteini M2'dir. HA proteinine karşı gelişen antikorlar influenza için en güçlü nötralizan antikorlardır ve enfeksiyon gelişimini önlerler. Buna karşılık NA proteinine karşı gelişen antikorlar enfeksiyonu önlemede yetersiz kalsalar da hastalığın şiddetini ve süresini azaltırlar. Bu ikinciler nöraminidaz inhibitörü antiviral ilaçların da hedefidirler. İnfluenza A viruslarına özgü M2 proteinlerine karşı gelişen antikorlar ise farklı alt tipten virusların enfeksiyonları arasında çapraz etkilidirler, ancak koruma düzeyleri düşüktür. Öte yandan, insanlarda homotipik antikorlar önemli düzeyde koruyucudurlar ve etkin koruma sağlarlar, oysa başka alt tiplerin HA ve NA'larına karşı gelişmiş (heterotipik) antikorlar ve hücresele bağışık yanıtlar uzun süreli bağışıklık oluşturmada az etkilidirler (45).

İnfluenza A virusları farklı mekanizmalar kullanarak devamlı olarak evrimleşmektedirler. Bu mekanizmaları antijenik sürüklenme (*drift*), antijenik kayma (*shift*), rekombinasyon ve glikozilasyon olarak sıralamak olanaklıdır.

Antijenik sürüklenme (drift)

İnfluenza A viruslarının evrimleşmesinde en önemli mekanizmalardan biri çok sayıda nokta mutasyona yol açabilen (yani antijenik değişmeye yol açabilen) bir mekanizma olan, virus genomunun RNA segmentlerinin replikasyonu sırasında virus RNA polimerazının hata düzeltme (*proofreading*) yeteneğinin olmamasıdır. Dolayısıyla virusun her replikasyonunda virus genomunun çeşitli segmentlerinde nokta mutasyonlar oluşur. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu nötraldir ve proteinlerin konformasyonunu etkilemezler; ancak kimi mutasyonlar, konak antikorlarının bağlanmalarını etkileyecek şekilde virus proteinlerinde değişikliklere neden olurlar (Kaynak 5 ve 8'de gözden geçirilmiştir). Sonuç olarak, bir önceki dolaşan suşlara karşı gelişmiş ya da aşılama ile uyarılmış antikorlar artık yeni, antijenik sürüklenmeye/değişmeye uğramış enfeksiyon etkeni viruslara karşı koruma sağlayamazlar. Yine, HA'daki antijenik sürüklenmenin (*driftin*) konak bağışıklık sistemi tarafından uygulanan seçim basıncından kaynaklandığına ilişkin çok sayıda örnek vardır. Antijenik değişme influenza A ve B viruslarının tüm suşlarında ortaya çıkmasına karşın gözlenen evrimleşme kalıpları influenza A'da alt tiplere göre değişmektedir. Örneğin influenza A (H1)'de drift varyantlar birçok soy hattıyla birlikte dolaşımda bulunurlar (influenza B virusları için de benzer bir durum söz konusudur); bu da eski suşların yeniden başat suş olarak ortaya çıkmasına olanak tanır. Oysa örneğin, influenza A (H3) viruslarında yeni varyantlar genellikle eskilerin yerini almaktadırlar.

Bir yıllık süre içerisinde H ve N amino asit dizilerindeki mutasyon sıklığının % 1'den az olduğu hesaplanmaktadır ve oluşan antijenik farklılıkların serolojik testlerle (örneğin, hemaglutinasyon inhibisyon testi) saptanabilmesi 2-5 yıllık bir süreyi almaktadır (2). Sürekli antijenik değişme, mevsimsel influenza aşılıları içerisinde bulundurulacak virusların belirlenebilmesi için influenza viruslarının sürekli izlenmelerini gerektirmektedir.

Antijenik kayma (shift)

İnfluenza A (ve B) viruslarının evrimleşmelerindeki bu ikinci mekanizma kaynağını virusun segmentli yapısından almaktadır. İki ya da daha çok influenza virusuyla enfekte bir konak hücresinde virus alt tiplerinin segmentleri arasında değişimler olur. Bir başka deyişle, segmentlerin reasortmanı, yani viral gen segmentlerinin yeniden düzenlenmesi söz konusudur. Bu mekanizmanın en önemli sonucu yeni

influenza virus suşlarının (alt tipler) ortaya çıkmasıdır ki bunlar influenza pandemilerine yol açabilirler. Örneğin, insan topluluklarının bağışık olmadıkları yeni PB1, H ve/veya N proteinlerinin bu yolla kazanılmaları 1957 ve 1968 pandemilerinin başlıca kaynağıdır. Farklı influenza A alt tipleriyle çoğul enfeksiyonlar sırasında görülebildiği gibi, bu mekanizma, örneğin, mevsimsel influenza virusları türümsülerinde kimi fenotipik (örneğin, antijen yapısı ya da ilaç direnci) özelliklerin kazanılması ya da kaybedilmesinde de rol oynamaktadır (intrasubtipik reasorman) (17).

Öte yandan, 1918 İspanyol gribi etkeni influenza A (H1N1) örneğinde de görüldüğü gibi, zoonotik bir influenza virusunda insandan insana etkin bulaşma ortaya çıkaracak şekilde doğrudan mutasyon/ların bir sonucu olarak da antijenik kayma (*shift*) gelişebilmesi olanaklı gibi görünmektedir (34).

Rekombinasyon

Bu mekanizma, influenza A viruslarında, kalıp dönüşümü (*template switching*) yoluyla oluşan rekombinasyonun ifadesidir. Böylesi bir rekombinasyon farklı suşların RNA segmentlerinden parçaların rekombinasyonu şeklinde olabildiği gibi iki farklı RNA segmentinden parçaların rekombinasyonu halinde de gelişebilir ve virusun patojenitesinde değişmelere yol açabilir. Yine de böylesi rekombinasyonların daha çoklukla avian influenza viruslarında ortaya çıktığı, insan influenza viruslarında ise nadiren gözlemlendiği yolunda veriler elde edilmiştir (21). Öte yandan, domuz influenza virusları ile insan influenza virusları ve/veya soğuğa adapte edilmiş insan influenza aşısı virusları arasında da rekombinasyon olayları saptanmıştır.

Glikozilasyon

HA proteini siyalik asit içeren konak hücre reseptörlerine virusun tutunmasından ve enfeksiyon sürecinde membran füzyonundan sorumludur. HA monomerlerinin küresel bir yapı gösteren baş kısmı ve sap bölümünde oligosakkaridler (glikanlar) yerleşiktir. Bunlar HA'nın işlevsel özelliklerini etkilemektedirler. Nitekim, farklı avian influenza A (H1N1) viruslarındaki glikozilasyon kalıplarının klasik reseptör bağlanma yeteneklerini etkilediği/değiştirdiği gösterilmiştir (29). Bu oligosakkaridlerin yapı ve bileşimleri viral genomun amino asit dizilimleri ve üredikleri konak hücrelerdeki enzimlerle belirlenmektedir. Dolayısıyla bir yandan virustaki mutasyonel dinamiklere (*drift*), bir yandan da virusun enfekte ettiği konak hücrelerin özelliklerine göre değişimler göstermektedirler. İnfluenza A viruslarının farklı subtipleri arasında HA'nın baş kısmındaki glikozilasyon alanlarında büyük değişiklikler görülüyorken sap kısmındaki oligosakkaridler göreceli olarak iyi korunmuşlardır ve füzyon aktivitesi için gereklidirler (49). NA proteinin de alttipler ve suşlar arasında farklı glikozilasyon kalıpları gösterdiğine ilişkin veriler elde edilmektedir.

İnfluenza viruslarına karşı bağışıklık

İnfluenza viruslarına karşı gelişen bağışıklık doğal ve edinsel bağışıklığın çok sayıdaki elemanı içerir. Doğal bağışıklık sistemi enfeksiyonunun ilk günlerinde virus replikasyonunu sınırlandırırken, göreceli olarak özgül değildir ve enfeksiyona karşı koruyuculuk sağlamak üzere aktivasyon süreçleri henüz yeteri kadar etkin değildir.

Üç influenza A virusu proteini enfeksiyon sırasında güçlü antikor yanıtları oluştururlar: NP, NA ve HA. NP hücre yüzeylerinde sergilenmesine ve hedef hücrelerin tahribi için kullanılabilmesine rağmen

anti-NP antikorlarının influenza viruslarına karşı gelişen bağışıklıkta önemli bir rol oynadıkları gösterilememiştir. NA'ya özgül antikolar virusun hücrelerden salıverilmesini önlerler ve bulaşmayı sınırlandırır. HA'ya özgül antikolar virusun hücre membranlarına tutunmasını ve/veya füzyonunu engelleme yoluyla virusun hücreye girişini önlerler ve bu antikolar, bağışıklık sisteminin influenza virus enfeksiyonlarını önleyen tek efektör işlevidir. Sonuç olarak, epidemiyoloji ve aşılama açısından şimdiye dek saptanmış en önemli virus proteindir (22). M2 daha az immünojeniktir, fakat çapraz koruma aşılması için umut verici bir hedeftir, çünkü onun hücre dışındaki kısa hedef bölgeciği (*domain*) ileri derecede korunmuştur ve antikolar öldürücü dozlara karşı koruyucudurlar. Bu durum, antikor baskısı altında antijenik olarak hızla evrimleşen HA ve NA'nın tam tersine bir durumdur.

Öte yandan, influenza A (H1N1) 1918 virusuna karşı gelişmiş antikoların (H1N1) 2009 virusu için kısmi koruma özelliğine sahip olmasının iki virusun HA proteinlerinin benzer glikozilasyon kalıplarına sahip olmalarından kaynaklanabileceğine ilişkin veriler elde edilmiştir (43).

Koruyuculuğun karşılıkları

HA'ya karşı gelişmiş suşa özgül nötralizan antikolar enfeksiyona ve klinik hastalığa karşı korunmanın birincil immün efektörleridir. Öte yandan, NA'ya karşı gelişen antikolar virustan temizlenmeyi artırarak hastalığın şiddetini azaltabilmektedirler. İnsan serumlarında 1:32-1:40 hemaglutinasyon inhibisyon (HI) titreleri genel olarak 'koruyucu titreler' olarak kabul edilmektedir (Kaynak 41'de gözden geçirilmiştir). Bu sınırların bireylerin ancak yaklaşık %50'sinin korunacağı titreler olduklarının ve enfeksiyondan korunmayı garanti edecek bir titre değerinin bulunmadığının belirtilmesi gerekir. Yine de serumdaki anti-HA antikör titrelerindeki artış genellikle influenza enfeksiyonuna dirençle uyumludur, düşük antikör titreleri ise influenza viruslarıyla karşılaşan kişilerde artmış hastalık riskiyle ilişkilidir.

İnfluenza virusunun hücreye girişinin engellenmesinde sekretuar IgA (sIgA) IgG ya da monomerik IgA'ya göre çok daha etkilidir. İnaktif influenza aşılı intramüsküler olarak verilmektedir; bu nedenle de iyi serum antikör yanıtları indüklemelerine karşın yerel mukozal antikör gelişimleri zayıftır. Buna karşılık yerel olarak uygulanan canlı atenüe aşılıların kullanılması virusa özgül IgA yanıtlarını uyarmaktayken yetersiz serum antikör yanıtları geliştirirler. Her iki tip aşının da klinik etkinliği benzerken, kolayca anlaşılabilirliği gibi, korunmanın immün karşılıkları farklıdır.

Mevsimsel influenza aşılı

Mevsimsel influenza aşılı H1N1 ve H3N2 alt tiplerinden birer influenza A virusu ile bir influenza B virusu içermektedirler (trivalan/üçlü aşı). Bu aşılıların dolaşan influenza viruslarının HA ve NA proteinlerindeki mutasyonları (antijenik drift) karşılayabilmesi için her 1-3 (ya da daha fazla) yılda bir yenilenmelerine gereksinim vardır (Kaynak 16, 33 ve 46'da gözden geçirilmiştir).

İnaktif aşılı 60 yılı aşkın bir zamandan bu yana kullanılmaktadırlar. Tipik olarak, dolaşımdaki virusun HA ve NA segmentlerine sahip bir tohum virus üretmek üzere reasorman yöntemi kullanılmakta ve virusun geri kalan segmentlerini, embriyonlu tavuk yumurtalarında yetkin üremeyi sağlamak üzere A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virusunun segmentleri oluşturmaktadır. Virusla enfekte edilen embriyonlu tavuk yumurtalarının allantoik sıvısı zonal santrifügasyon ya da kolon kromatografi yöntemleriyle saflaştırılmakta ve yoğunlaştırılmakta ve daha sonra da formalin ya da β -propiolaktone ile inaktive edilmektedir. Deterjanlar ya da eter ile muamele ve vRNP komplekslerinin

uzaklaştırılması, intramüsküler ya da subkutan olarak uygulanabilen split ya da subünit aşılardan üretilmesine olanak tanımaktadır. Genel olarak, bir embriyonlu tavuk yumurtasından 1 doz trivalan aşı üretilmektedir. Bir doz aşı her bir suştan 15 mikrogram olmak üzere toplam 45 mikrogram HA içermektedir.

ABD’de 2-49 yaş arasındaki bireylerde kullanılmak üzere canlı atenüe bir influenza aşısı ruhsatlandırılmıştır. Kısaca, A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) virusunun ya da B/Ann Arbor/1/66 virusunun düşük ısılarda ardışık pasajları ısıya duyarlı, soğuğa adapte olmuş ve atenüe virusların gelişimini sağlamaktadır. Bundan sonra bu viruslar, bu özellikler zemininde dolaşımdaki virusların HA ve NA genlerine sahip tohum virusların elde edilmesi için dolaşımdaki vahşi tip influenza viruslarıyla reasorte edilirler.

Rusya’da ilk atenüe aşı A/Leningrad/134/17/57 soğuğa adapte tohum viruslarının elde edilmesiyle üretilmeye başlanmış ve ilk klinik çalışmalar 1961-1964 döneminde önce sağlıklı erişkinlerde daha sonra da 1-6 yaş çocuklarda gerçekleştirilmiştir. 1-2 yaşlardaki çocuklarda kabul edilemez semptomların gelişmesi üzerine uygulama bırakılmıştır. Erişkinlerde ve 3-6 yaş arası çocuklarda %92 oranında HAI antikör titrelerinde 4 kat ya da üstünde artışlar saptanmış ve aşılannmışlarda aşılannmayanlara göre influenza atak oranlarında önemli düşüşler gözlenmiştir (20).

Canlı atenüe aşılardan hem hümmoral hem de hüccresel bağışık yanıtları uyarırlar ve bu nedenle de inaktif aşılardan üstün olarak kabul edilmektedirler. Gerçekten de, bebekler ve küçük çocuklarda canlı atenüe influenza aşılardan inaktif aşılardan daha iyi koruma sağlamaktadırlar, ancak yan etkiler kimi kez bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır.

Aşı içeriğinde yer alacak suşların belirlenmesi

Yukarıda da değinildiği gibi influenza enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklıkta birincil hedef HA proteindir ve antijenik sürüklenme (*drift*) nedeniyle HA proteinlerinin antijenik özellikleri zaman içerisinde değışmektedir. Bu özellikten hareketle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1947’de kurulan ve şimdilerde 96 ülkedeki 125 merkezden oluşan Küresel İnfluenza İzleme Ağı (The World Health Organization Global Influenza Surveillance Network, WHO GISN) aracılığıyla, influenza aşı suşları seçimi amacına yönelik olarak influenza drift mutantların gelişimi ve göçleri izlenmektedir. Bu merkezlerde toplanan yerel dolaşımdaki virus örnekleri DSÖ’nün, ABD, Avustralya, İngiltere ve Japonya’daki 4 influenza referans laboratuvarından birine gönderilir. Bu laboratuvarlarda hemaglutinasyon inhibisyon (HI) testleri kullanılarak suşların antijenik özellikleri belirlenir (Kaynak 31 ve 42’de gözden geçirilmiştir). Bu laboratuvarların oluşturduğu HI test sonuçları verilerinden, İngiltere’de Cambridge Üniversitesi Patojen Değerlendirme Merkezinde influenza viruslarının antijenik haritaları oluşturulur ve suşlar arasındaki antijenik farklılıklar saptanır. Bu farklılıkların yaklaşık % 10 kadarının da HA geninin HA1 bölgeciğinin dizileme yöntemiyle genetik incelemesi de yapılır. Böylelikle suşlardaki antijenik değışikliklerin yanı sıra ortaya çıkmakta olan evrimsel eğilimlerin de öngörülmesi olanaklı olur.

İnfluenza aşısı suş seçiminin ana bileşenleri halen dolaşımda olan suşlarla aşı suşları arasındaki örtüşmeyi değerlendirmek ve yeni ortaya çıkan varyantları tanımlamaktır. Eğer aşı, halen dolanımda olan suşlarla örtüşmüyor ya da yeni ortaya çıkan bir varyantın yaklaşmakta olan influenza mevsiminde ana varyant olacağı öngörülüyorsa aşı içeriği güncellenir. DSÖ İnfluenza Aşı İçeriği Danışma Grubu yılda iki kez toplanarak Kuzey Yarıküre için Şubat ayında, Güney Yarıküre için de Eylül ayında aşı

içeriği önerilerini belirler. Ancak bu aşamada aşı tohum suşları tanımlanmaz; bu süreç ABD’de, Avrupa Birliği (AB)’nde, Avustralya’da ve Japonya’da birbirine benzer ancak farklı işleyişlerle (aşağıya İnfluenza aşılı ruhsatlandırma süreci bölümüne bakınız) tamamlanır (31, 32). Sürveyans sırasında elde edilen suşlar hücre kültürlerinde izole ediliyorsa da aşı suşlarının yumurtada pasajlanmaları gerekir. Tohum viruslar, yukarıda da değinildiği gibi, influenza A(H1N1) için A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) veya benzerleri kalıp viruslarda reasorman yöntemiyle sağlanır ya da influenza B için doğrudan yumurta pasajlarına adapte suşlar kullanılır. Tohum virusların eldesinde kullanılan bir başka yöntem de tersine genetik adı verilen yöntemdir. Tersine genetik yöntemi başlıca yumurtada etkin üretimi sağlanamayan virusların eldesi için kullanılmaktadır. Bu yöntemde, yine bütün genlerinin klonlandığı plazmidlerden oluşturulmuş bir A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) omurgasında klonlanmış hedef virus HA ve NA genlerinin rekombinasyonu ile tohum viruslar elde edilir.

Tohum virusların oluşturulması her zaman istenildiği ölçüde başarılı olmaz. Son 15 yıllık süre içerisinde Kuzey Yarıküre için aşı formülasyonunda 15 değişiklik önerildiği halde en azından 4 tam örtüşmezlik ve 12 kısmi örtüşmezlik deneyimlenmiştir (1). Örneğin 1997-1998, 2003-2004, 2004-2005 ve 2005-2006 mevsimlerinde influenza A(H3N2) aşı viruslarıyla tohum virusların örtüşmediği saptanmıştır. Bu dönemde influenza A viruslarıyla böyle bir sorun yaşanmamışken influenza B viruslarıyla üç kez örtüşmezlik deneyimlenmiştir (44). Örtüşmezlik kimi kez aday virusun yumurtaya adapte edilememesinden kaynaklanabilir. Örneğin 2003-2004 mevsiminde influenza A (H3N2) Fujian yumurtaya adapte edilememiş, bunun üzerine bir önceki yıl tohum viruslar kullanılmış, bu da aşı etkinliğini olumsuz etkilemiştir. B suşu için de 2009 yılında benzer bir sorun yaşanmıştır. Öte yandan, influenza viruslarının yumurtada izolasyonu da memeli hücrelerinden daha çok özellikle avian hücreler üzerinde bulunan belli bir karbonhidrat bağına tanyan virusların seçilimine yol açar. Dolayısıyla kimi kez yumurtada üretimin doğrudan kendisi örtüşmezliğin kaynağı olabilmektedir. Bu antijenik farklılıklar yanında yumurtada üretimin bir pandemi halinde yetersiz kalması üreticileri hücre kültürlerinde üretime yöneltmiştir (32).

Prepandemik ve pandemik influenza aşılı

Prepandemik influenza virus aşılı, tür engelini aşabilen hayvan influenza viruslarının varlığı durumunda, DSÖ tarafından henüz düzey 6 pandemi evresi uyarısı yapılmamış bir pandemi tehdidine karşı geliştirilmiş aşılarken, pandemik aşıl pandemi oluşturan virusa karşı pandemi onaylandıktan sonra üretilen aşılı ifade eder (23). Prepandemik aşılıların, influenza viruslarındaki genetik değişiklikler ve driftler nedeniyle sonuçta ortaya çıkabilecek pandemik suşla iyi bir şekilde örtüşüp örtüşmeyeceğini öngörmek olası değildir. Öte yandan, influenza viruslarıyla heterosubtipik bağışıklanma olanağı nedeniyle, böylesi prepandemik aşılıların toplumların olası pandemilere hazırlanmasında (*priming*) işlevi olabileceği ileri sürülmektedir ve avian influenza H5N1 virusu için prepandemik aşılı hazırlanmıştır (26).

Bir pandemi durumunda, toplumların büyük çoğunluğunda daha önceden gelişmiş bir bağışıklık sözü konusu olamayacağından büyük olasılıkla iki doz aşı uygulaması gerekecektir. Bu gereksinim H5N1 virusu için ortaya çıkmıştır. Öte yandan, influenza A (H1N1) 2009 virusunda olduğu gibi, tek doz aşının yeterli olduğu durumlarda bile dünyanın aşı gereksinimini kısa sürede karşılamak olanaklı değildir. Yukarıda da değinildiği gibi influenza aşılı başlıca embriyonlu yumurtaya dayalı yöntemlerle üretilmekte ve üretim süreci tohum suşların belirlenmesinden itibaren yaklaşık 20-24 haftalık bir süreyi kapsamaktadır. Bu bağlamda önemli bir sorun da dünya aşı üretim kapasitesidir. Büyük çoğunluğu gelişmiş endüstrileşmiş ülkelerde olan aşı üretim firmaları yakın yıllara kadar yıllık

300 milyon doz üçlü aşı üretmekteydiler. Hem H5N1 tehdidi hem de 2009 H1N1 salgını aşı üretim kapasitelerinin büyütülmesi baskısını doğurmuş, dahası kimi yeni üreticilerin de ortaya çıkmasına yol açmıştır. Haziran 2009 tarihi itibarıyla üçlü aşı üretim kapasitesinin yaklaşık 500 milyon doza ulaştığı öngörülmektedir (10). Bu da bir monovalan aşı için yıllık 1,5 milyar dozluk bir üretim demektir. Öte yandan, influenza aşısı üretimi burada ele alınmayacak birçok nedenden dolayı her zaman planlandığı gibi gerçekleşmemekte ve bu nedenle de, mevsimlik influenza taleplerinin karşılanmasında bile sıkıntılar doğurmaktadır. DSÖ tarafından 2009 yılı Haziran ayında yapılan değerlendirmede, dünyadaki 33 üreticinin 37 üretim tesisinde 1 Aralık 2009 tarihine kadar 2.459.000 doz olarak üretilmesi öngörülmüş, buna karşılık monovalan H1N1 aşısı üretiminde gerçekleştirilen üretim ancak 534 milyon olmuştur (37).

Aşı kapasitesinin artırılmasında adjuvanlar yardımıyla antijen miktarının azaltılması, aşı viruslarının hücre kültürlerinde üretilmesi gibi yeni yöntemlerin kullanılmaya başlanmasının da etkisi olmuştur.

İnfluenza aşılarında kullanılan adjuvanlar ve genel geçer (üniversal) aşı çalışmaları

Ramon ve Glenni'nin 1920'lerdeki çalışmalarıyla etkileri ilk kez fark edilen adjuvanlar, kendileri herhangi bir antijenik uyarıya neden olmaksızın birlikte verildikleri aşı antijenlerinin immünojenik gücünü artıran maddeler olarak tanımlanabilirler (Adjuvanlara ilişkin güncel bilgiler Kaynak 36 ve 50'de gözden geçirilmiştir). Adjuvanlar, bu çerçevede, başlıca antijenin yavaş salınımını sağlayarak bir "depo" görevi üstlenme, antijenin antijen sunan hücrelere ulaşımını kolaylaştırma, dolayısıyla fagositözlerini güçlendirme ve antijenin tek başına indükleyeceği immün yanıtın gücünü artırma ya da değiştirme (modülasyon) gibi işlevlere sahip maddelerdir. Kimi doğal maddelerin yanında 1960'ların sonundan bu yana kimi sentetik maddelerin de adjuvan özelliklerinin belirlenmesiyle, günümüzde üzerinde çalışılan ve kimileri klinik araştırma ve uygulamalar girmiş çok geniş bir adjuvanlar yelpazesi ortaya çıkmıştır. Bir yandan immünolojideki gelişmeler (doğal immün reseptörler ve sinyalleme yollarının anlaşılması gibi) bir yandan da adjuvan özelliğe sahip yeni maddelerin keşfi adjuvanların sınıflandırılmasını güçleştirmiş, sentetik katkı maddelerin ikinci kuşak adjuvanlar olarak adlandırılması (örneğin alüminyum bazlı olanlar ve MF59 birinci kuşak, AS03 ikinci kuşak gibi) önerisi yanında kimi sınıflandırmalarda da adjuvanın yukarıda sıralanan işlevlerden önde olanına göre (örneğin, immün güçlendiriciler, antijen ulaşımını kolaylaştırıcılar gibi) sınıflandırılmaları yapılmaya başlanmıştır.

Avian influenza (H5N1) tehdit algılamasının 2005 yılındaki dalgayla güçlenmesi sonunda DSÖ'nün de teşvikiyle artan influenza prepandemik aşı geliştirme çalışmaları, hem yukarıda değinilen aşı üretim kapasitesini artırma hem de aşı immünojenliğini güçlendirme amaçlarına yönelik olarak çoklukla adjuvanlı aşılar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda üzerinde çalışılan başlıca adjuvanlar alüminyum temelli olanlar ve suda yağ emülsiyonları olmuştur (29). Hem H5N1 hem de influenza A (H1N1) 2009 virusu için hazırlanan alüminyumlu aşıların, muhtemelen alüminyum üzerine absorbe edilen antijenlerin salıverilmesindeki gecikmeye bağlı olarak, aynı antijen içeriğinin adjuvansız hallerinden daha az etkili oldukları yönünde veriler elde edilmiştir (14, 28). Burada influenza aşıları bağlamında alüminyum adjuvanlı aşılar üzerinde daha fazla durulmayacaktır.

Emülsiyon temelli aşılarında kullanılan adjuvanlar yağda su emülsiyonları ve suda yağ emülsiyonları olmak üzere ikiye ayrılırlar (Kaynak 48'de gözden geçirilmiştir). Kısaca, yağda su emülsiyon adjuvanlı influenza aşısı İngiltere'de ruhsatlandığı ilk iki yıl içerisinde (1963-1964) yaklaşık bir milyon doz kullanılmış, ancak yan etkileri nedeniyle kullanımdan kalkmış; suda yağ emülsiyon

adjuvanlı influenza aşısı ise 1997'den bu yana Avrupada ruhsatlandırılmış olarak kullanılmaktadır. Bu son aşı MF59 diye bilinen adjuvanı içermektedir (aşağıya bakınız). Suda yağ emülsiyonlarının tam olarak ortaya çıkarılamamış olmasına karşın eldeki veriler ışığında etki mekanizmalarının bu adjuvanların monosit ve granüositleri enjeksiyon alanına cezp edecek şekilde kemokin salıverilmesini tetiklediğini, yerleşik dendritik hücrelerin (DC'ler) olgunlaşmalarını ve infiltre olan monositlerin DC'lere olgunlaşmalarını uyardıklarını, antjenin bu hücreler tarafından endositozlarını uyardıklarını ve olgun DC'lerin lenf düğümlerine göçlerini artırdıklarını içerdiğini göstermektedir. Günümüzde influenza aşılarında kullanılmak üzere üç tür suda yağ emülsiyon temeline dayalı adjuvan Avrupa'da aşılarda birlikte ruhsatlandırılmıştır: MF59 (Novartis Vaccines and Diagnostics), AS03 (GlaxoSmithKline) ve AF03 (Sanofi Pasteur).

MF59 düşük yağ içerikli bu nedenle de non-visköz ve enjeksiyona elverişli bir formülasyondur. Yağ olarak % 4.3 w/v oranında skalen (bir doz aşıda 9.75 mg) ve surfaktan olarak da Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monoolate; %0.5 w/v; suda çözünür surfaktan) ile Span-85 (sorbitan triolate; %0.5 w/v; yağda çözünür surfaktan) içerir. Surfaktanlar küçük yağ damlacıklarını dayanıklı kılmaktadırlar. Skalen hücre zarlarının doğal bir bileşenidir, insan steroid hormonlarının üretiminde biyosentetik yolağın aracısıdır ve kolesterol sentezinin öncülüdür (35). İnsan vücudunun normal bir bileşeni olması ve yağ bezlerinin sekresyonlarında bol miktarda bulunması nedeniyle skalen hem insan vücuduyla biyolojik olarak uyumlu hem de kolay degrade olabilir bir niteliktedir. Aşı endüstrisinde, en bol bulunduğu köpek balığı karaciğerinden elde edilmektedir.

MF59 adjuvanlı mevsimsel influenza aşısı (Fluad™) ruhsatlı olduğu 26 ülkede 45 milyon dozdan daha fazla dağıtım yapılmıştır ve kullanılmaktadır (39). Skalenin, şarbon aşılarında hipotetik varlığına ilişkin Körfez Savaşı sendromuna neden olan otoantikör ürettiğine dair etkileri konusunda yapılan spekülasyonlar klinik çalışmaların sonuçlarıyla desteklenmemektedir. Skalen çok zayıf bir immünojendir ve sağlıklı kişilerin serumlarında da çok düşük titrelerde anti-skalen antikörler bulunmaktadır. Ek olarak, skalen içeren aşılarda uygulanması ne anti-skalen antikörlerin varlığını ne de bu antikörlerin titrelerini artırmaktadır (30). MF59 adjuvanlı mevsimsel ve pandemik aşılarda uygulandığı ve 65 ya da üstü bireyleri de içeren 20.000'den fazla olgunun değerlendirildiği 64 çalışmanın sonuçlarına göre böylesi aşılarda güvenlik profilinin iyi olduğu ve adjuvansız eş değerlerine göre klinik yararlarının üstün olduğu saptanmıştır (39). Yine, sınırlı sayıda [n: 43] gebeyi içeren değerlendirmelerde MF59 adjuvanlı aşılarda gebelerde adjuvansız aşılara göre farklı bir gebelik sonucuna yol açmadığı saptanmıştır (47).

Skalen içeren bir başka adjuvan AS03'dür. AS03 %10'luk suda yağ (w/v) emülsiyonudur; skalen dışında yağda çözünür surfaktan olarak %5 DL-alpha-tocopherol (vitamin E) ve suda çözünür surfaktan olarak da %2 Tween 80 içerir (40). AS03 içerdiği alfa-tokoferol miktarına göre ikiye ayrılmaktadır: 11.86 mg tokoferol içereni AS03_A, 5.93 mg içereni de AS03_B olarak adlandırılır. AS03 adjuvanlı H5N1 ile ilgili yayınlanan çalışmalarda güvenli ve immünojenik olarak etkin sonuçlar bildirilmektedir (9, 24). Avrupa Tıbbi Ürünler Değerlendirme Ajansı (EMA, eskiden EMEA) Çekirdek Dosyadaki İşleme Göre ruhsatlandırılan Pandemik İnfluenza A (H1N1)v Aşısı (aşağıya bakınız) uygulaması (EMA/CPMP/VEG/4986/03) çerçevesinde ruhsatlandırılmıştır.

Skalen içeren üçüncü adjuvan AF03'dür. AF03 iki noniyonik surfaktanla birlikte %5 suda skalen içerir. H5N1 virusuna karşı AF03 adjuvanlı aşılarda erişkin insanlardaki klinik sonuçlarıyla farelerdeki deneysel sonuçları yayınlanmıştır (7, 27).

Topluca bakılacak olursa, skalen adjuvanlı aşilar antijen dozunda azaltmayı (*antigen sparing*) sağlamakta ve influenza bağışıklığı açısından yeterli immünojenliği oluşturmaktadırlar. Örneğin, adjuvansız aşilar her bir antijenden 15 mikrogram içeriyorken AS03 adjuvanlı aşı (Pandemrix™) 0.5 ml bir dozunda 3.75 mikrogram HA antijeni, 10.69 mg skalen, 11.86 mg DL-alfa-tokoferol ve 4.86 mg polisorbat içermektedir. MF59 adjuvanlı pandemik aşı (Focetria™) 0.5 ml bir dozunda 7.5 mikrogram HA antijeni 1.175 mg Tween 80 ve 1.75 mg sorbitan triolat içermektedir. AF03 adjuvanlı H5N1 aşısında ise HA antijen miktarı 1.9 mikrogram olarak bildirilmiştir.

İnfluenza aşilarının üretimi için burada sıralananlar dışında birçok yeni adjuvan denenmektedir. Henüz ruhsatlandırma aşamasından uzak olan bu adjuvanlar arasında saponinler, lipozomlar, virozomlar, virus benzeri partiküller, immünostimulatuvar kompleksler (ISCOMs), biyodegradabl polimerler ve başka birçok adjuvan özellikli maddeler sayılabilir. (Kaynak 3’de gözden geçirilmiştir).

Öte yandan influenza viruslarında HA ve NA yüzey proteinlerinde sık rastlanılan mutasyonlar ve olası reasormanlar, yumurtada aşı üretiminin sınırlı olması, yumurta alerjisi sorunu, üretim sürecinin uzun ve zahmetli olması gibi nedenlerle günümüzdeki influenza aşilarının kullanımı önemli sınırlılıkları kalıtsal olarak taşımaktadır. Bu nedenle geniş ölçekli çapraz koruma sağlayacak ve influenza virus proteinlerinin korunmuş bölgeleri temelinde influenza aşı çalışmaları sürdürülmektedir. Böylesi aşilar için M2e proteininin, HA1 proteininin, HA2 proteininin ve NP proteininin korunmuş bölgelerini ya da bunların kombinasyonlarını temel alan yaklaşımlar söz konusudur (Kaynak 13’de gözden geçirilmiştir).

Aşı üretiminde hücre kültürlerinin kullanılması

İnfluenza aşilarının (mevsimsel ya da prepandemik/pandemik) üretimlerinin büyük bölümü, yukarıda da değinildiği gibi yumurtada üretime dayanmaktadır. Embriyonlu yumurta üretimi sınırlı olduğundan bu üretim yöntemiyle, özellikle bir pandemi durumunda hızlı ve büyük ölçekte aşı üretimi olanaklı olmamaktadır. Öte yandan, yumurtada üretimin kimi mutasyon/seleksiyon etkilere sahip olması ve sahadan elde edilen suşların çoğunluğunun giderek ortan şekilde hücre kültürü kaynaklı olması karşısında aşı testlerinin yumurtada üretilmiş *single radial immuno diffusion assay* (SRID) reagentlerine bağlı olması gibi nedenlerle DSÖ 1990’ların ortasından bu yana influenza virusu için farklı kültür sistemlerinin geliştirilmesini teşvik etmeye başlamıştır. Son yıllarda özellikle üç farklı memeli devamlı hücre kültürü sistemi (MDCK, PER.C6® ve Vero) üzerinde yoğunlaşmış ve bunlar influenza aşı üretimi için ruhsatlandırılmışlardır (32).

Günümüzde aşı üretiminde kullanılan ve üzerinde çalışılan devamlı hücre dizilerini iki grupta toplamak olanaklıdır. Birinci grupta Vero (African green monkey kidney) , MDCK (Madin-Darby canine kidney) ya da PBS-1 gibi konvansiyonel devamlı hücre dizileri ki bunlar farklı yüzeyler üzerinde (adherently) ya da suspansiyon kültürleri (MDCK33016) halinde üretilirler. Bilindiği gibi Vero hücreleri influenza dışında yıllardır polio, kuduz gibi başka enfeksiyonlara karşı aşilarla kullanılmaktadırlar (Kaynak 4’de gözden geçirilmiştir). İkinci grupta PER.C6®, AGE1.CR® ve EB14®/EB66® gibi ‘tasarımlanmış hücre dizileri’ (*designer cell lines*) yer alır ki bunlar ya belirli viral veya hücresele onkogenlerle ya da ölümsüzleştirici hücresele genlerle (örneğin, telomeraz) transforme edilmiş normal insan ya da hayvan hücrelerinden türetilmiş neoplastik hücrelerdir. Bu hücreler tercihli olarak serumsuz (proteinsiz) ortamda suspansiyonda üretilmeye adapte edilmişlerdir (Kaynak 19’da gözden geçirilmiştir).

MDCK hücrelerinde üretilen ilk split influenza aşısı (Influvac[®]TC, Solvay Pharmaceutical) 2001'de Hollanda'da, Vero hücrelerinde üretilmiş ilk tüm viriyon influenza aşısı (Influject[®], Baxter Vaccines) 2002 yılında yine Hollanda'da ve bir İsviçre şirketi olan Crucell tarafından geliştirilmiş PER.C6 hücre dizisi teknoloji platformu da 2003 yılında ruhsatlandırılmış, influenza aşısı üretimi için Sanofi Pasteur'e ruhsat devri yapmıştır (12). Günümüzde Baxter Vaccines'in Vero hücre platformlarında üretilmiş pandemik aşısı (Celvapan[®]) ve Novartis Vaccines'in MDCK hücre platformlarında üretilmiş mevsimsel aşısı (Optaflu[®]) mevcuttur. Her iki aşıya ilişkin klinik çalışmalar yayınlanmaktadır. Optaflu 2007 yılından itibaren Avrupa Birliğinde kullanım için ruhsatlandırılmış ve sınırlı sayıda klinik veriler elde edilmeye başlanmıştır (Kaynak 12 ve 19'da gözden geçirilmiştir). Celvapan ise 2009 yılında EMEA tarafından Çekirdek Dosyadaki İşleme Göre ruhsatlandırılan Pandemik İnfluenza A (H1N1)v Aşıları (aşağıya bakınız) uygulaması çerçevesinde ruhsatlandırılmıştır. Vero hücre platformlarında üretilen H5N1 virusları ile prototip prepandemik aşılar için sonuçlar yayınlanmaktadır (14, 15). Yakınlarda PER.C6 platformlarında üretilmiş H7 influenza viruslarıyla üretilmiş bir aşıya ilişkin faz I klinik sonuçlar bildirilmiştir (11).

Topluca değerlendirildiğinde, tümüyle yumurtadan bağımsız olmaları, aşı üretim sürecini kısaltmaları (12 haftaya kadar indirmeleri), dolayısıyla yeni ortaya çıkmış suşların aşı üretimine dahil edilebilmesi, büyük ölçekli üretim yapılabilmesi, kapalı sistem üretim teknolojisi nedeniyle kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminasyondan uzak olmaları, yumurtada üretilmiş suşlarla yapılan aşılarla karşılaştırılabilir immünojeniteye ve çapraz koruyuculuğa sahip olmaları, yine yumurtada üretilmiş suşlarla yapılan aşılarla karşılaştırılabilir yan etkilerin dışında bilinen önemli yan etkileri olmaması gibi özellikleriyle hücre kültürü temelli influenza aşıları gelecekte yaygınlaşmaya aday gibi görünmektedirler. Öte yandan, influenza aşı üretim tesislerinin büyük çoğunluğunun yumurta temelli tasarımlanmış olması ve yüksek üretim ölçekli hücre dizisi temelli üretim tesislerine yatırım yapmanın büyük maliyetler gerektirmesi, hangi hücre dizilerinin hangi influenza suşları için en uygun suşlar olduğunun bilinmemesi, hücre üretim platformlarındaki süreçlerin optimize edilmesi gibi birçok sorun bu beklentilerin önündeki engeller olarak ortaya çıkmaktadır. Nitekim bunların etkisi influenza A (H1N1) 2009 aşı çalışmaları sırasında görülmüş, pilot çalışmalarda başarılı gibi görülen kimi sonuçlar kitlesel üretimi sınırlayan faktörler yüzünden başarısızlığa ya da gecikmeye yol açmışlardır.

İnfluenza aşıları ruhsatlandırma süreci

Yukarıda da değinildiği gibi, influenza aşılarının üretimi, genel olarak, dolaşımdaki influenza viruslarından salgın nedeni olabilecek en iyi aday virusun seçimi, aşı üretiminde kullanılacak uygun tohum virusların geliştirilmesi ve suş değişikliğine duyarlı yöntemlerle antijen içeriğinin test edilmesi gibi karmaşık süreçleri içermektedir. Aşı üretiminde zorlayıcı bir başka unsur da aşı üretim süresidir.

İnaktif influenza aşıları için tohum viruslar, ABD'de DSÖ ve VRBPAC (Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee) önerileri çerçevesinde aşı üreticilerinin kendileri tarafından hazırlanır ve CBER (Center for Biologics Evaluation & Research) tarafından onaylanır, Japonya'da DSÖ ve bir uzmanlar grubunun önerileri çerçevesinde, NIID (National Institute of Infectious Diseases) ve aşı üreticilerinin işbirliğiyle yapılan testlerden sonra Ulusal Otorite Genel Direktörü tarafından karar verilen aday virustan NIID'de hazırlanır ve tüm üreticiler aynı tohum virusu kullanırlar. AB'de aday virus üreticilerle kimi referans laboratuvarlarında (regulatory laboratories) yapılan çalışmalardan sonra belirlenir ve her üretici, AB kararı temelinde kendi tohum virusunu kendisi üretir. Avustralya'da ise TGA (Therapeutics Goods Administration) tarafından toplanan

Australian Influenza Vaccine Committee aşı üretiminde kullanılacak özgül (aday) virusları ve reasortanları DSÖ önerileri ve epidemiyolojik, antijenik, genetik ve serolojik veriler ışığında onaylar. Aşı üretiminde gerekli reagentleri TGA üretir. Üreticiler onaylanmış bir laboratuvar onaylanmış aday virusları alıp tohum virusları geliştirirler ve bunların aşılarda kullanılması yine TGA onayını gerektirir (32).

İnfluenza aşıları suş değişiklikleri nedeniyle her yıl değişmek ve influenza mevsiminde hazır olmak zorunda olduğundan ruhsatlandırmada kimi özellikler kendini göstermektedir. Tohum virusların onaylanması sonrasında bu viruslardan üretilen aşı örneklerinin kalite ve güvenlikleri dosyalar halinde onay kuruluşlarına sunulur. Aşı suşları yumurtada (ya da hücre substratlarında) verimlilikleri yanında düzenleyici kuruluşların (örneğin, DSÖ'nün) prototip suşlarıyla antijenik ve genetik benzerlikleri bakımından karşılaştırılır. Aşı üretim tesisleri, üretim süreçleri gözlemciler tarafından yeniden denetlenir. Sadece AB'de aşıların yeniden ruhsatlandırılması için küçük çapta klinik deneyler gerekmektedir. Bu klinik çalışmalar 18-60 arası sağlıklı en az 50 erişkin ile 60 yaş üzerinde yine en az 50 sağlıklı bireyi kapsar. Değerlendirmelerde kullanılan serolojik testler geometrik ortalama antikor titresinde artış, önceden belirlenmiş aşı yanıtı düzeyine ulaşan bireylerin oranı (serolojik yanıt oranı) ve aşılama sonrası serolojik korunmuş (40 ve üzeri HI titresi) bireylerin oranlarının saptanmasıdır. ABD ruhsatlandırma süreci herhangi bir klinik çalışmayı gerektirmez. (ABD için Code of Federal Regulations web sayfasından ve FDA web sayfasından Bioterrorism Act of 2002 başlığında; AB için EMA web sayfasından – CPMP/BWP/214/96 – ayrıntılara ulaşılabilir).

Prepandemik ve pandemik aşıların ruhsatlandırma süreçleri de temelde benzer özellikleri taşımakla birlikte kimi zorunlu ayrıcalıkları içermektedir. İster mevsimsel ister prepandemik/pandemik olsun influenza aşıları aynı üretim tesislerinde ve benzer süreçlerle üretilirler. Pandemi aşılar hızlı onay işlemine (*Fast-track approval*) gereksinim duyarlar. Avrupa'da EMA bu süreç için "Çekirdek Dosya" yaklaşımını benimsemiştir. Bu yaklaşım, pandemi öncesinde "prototip" ya da "mock-up" (maket) aşıların hızlı bir değerlendirilmelerinin yapılmasına olanak tanır. Böylesi aday aşılar kullanılan aday viruslar DSÖ ile EMA'nın onaylarından geçmiş viruslardır. Değerlendirmeler prelinik, üretim süreçlerine ve kaliteye yönelik verilere ek olarak belli ölçülerde bu uygun virus suşlarıyla yapılmış klinik çalışmaları da içerir. ABD'de ise herhangi bir klinik çalışmaya gerek yoktur ve ruhsatlandırma süreci kesinlikler içermekten çok esnek bir yapı göstermektedir. Daha sonra pandemi ortaya çıktığında üretim için tohum virus/ lar belirlendikten ve geliştirildikten sonra bu değişiklik çekirdek dosyaya ilave edilerek ruhsat başvurusu gerçekleştirilir (Ayrıntılar için EMA web sayfasından 5 Nisan 2004 tarihli EMEA/CPMP/VEG/4986/03 belgesine ve ABD için FDA web sayfasından "Guidance for Industry. Clinical Data Needed to Support the Licensure of Pandemic Influenza Vaccines" adlı belgeye başvurulabilir). H5N1 için aday suşlarla yürütülen prepandemik klinik çalışmalar ve aday aşılar hakkındaki bildirilen son durum için IFPMA (International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations) web sayfasından bilgi edinilebilir. Adjuvanlar, ayrı bir antite olarak değil, özgül bir aşının bileşenleri olarak ruhsatlandırılırlar (patentle karıştırılmamalıdır); influenza aşıları için ruhsatlandırılmış adjuvanlara yukarıda değinilmiştir.

Sonuç

Pandemi tehdidi ve pandemi tanımlanması durumları da dahil olmak üzere influenza salgınlarını önlemenin bir yolu olarak influenza aşıları 60 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır.

İnfluenza aşısı üretimi oldukça karmaşık ve zaman baskısı altında yapılan bir üretimdir. Dünya ölçeğinde DSÖ eşgüdümlü çabalara karşın aşılarla başarı elde etmek her zaman olası olmamaktadır. Bir doğal biyolojik şans eseri olarak influenza A (H1N1) 2009 salgınının göreceli hafif hastalıkla seyretmesi, H5N1 virusunun da insan toplumunda yerleşme olanağı bulamaması her iki virusa karşı geliştirilen ve klinik uygulamaları yapılan aşılar konusunda deneyim kazanılmasını ve geleceğin pandemileri için hazırlıklarda bir adım daha ileri geçilmesini sağlamıştır. Hem prepandemik H5N1 aşıları hem de influenza A (H1N1) 2009 virusu aşılarının kısa erimli sonuçları mevsimsel influenza aşılarından daha büyük bir risk taşımadıkları yönünde verileri ortaya çıkarmıştır. Uzun erimli istenmeyen etkiler yönünden ayrıntılı ve titiz izlemlerin sürdürülmesi bir zorunluluktur.

KAYNAKLAR

1. Ansaldi F, Canepa P, Parodi V, Bacilieri S, Orsi A, Compagnino F, Icardi G, Durando P. Adjuvanted seasonal influenza vaccines and perpetual viral metamorphosis: the importance of cross-protection. *Vaccine* 2009; 27: 3345-3348
2. Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Rio MD, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res* 2009; 40: 643-654
3. Atmar RL, Keitel WA. Adjuvants for pandemic influenza vaccines. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2009; 333: 323-344
4. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 607-618
5. Boni MF. Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* 2008; 26S: C8-C14
6. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008; 26S: D49-D53
7. Caillet C, Piras F, Bernard M-C, de Montfort A, Boudet F, Vogel FR, Hoffenbach A, Moste C, Kusters I. AF03-adjuvanted and non-adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccines induce strong antibody responses in seasonal influenza vaccine-primed and unprimed mice. *Vaccine* 2010; doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.050
8. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007; 25: 6852-6862
9. Chu D W-S, Hwang S-J, Lim FS, Oh HML, Thongvharoen, Yang P-C, Bock HL, Dramé M, Gillard P, Hutagalung Y, Tang H, Teoh YL, Ballou RW, H5N1 Flu Study Group for Hong kong, Singapore, Taiwan and Thailand. Immunogenicity and tolerability of an AS03_A-adjuvanted prepandemic influenza vaccine: a phase III study in a large population of Asian adults. *Vaccine* 2009; 27: 7428-7435
10. Collin N, de Radiguès X, the WHO H1N1 Vaccine Task Force. Vaccine production capacity for seasonal and pandemic (H1N1) 2009 influenza. *Vaccine* 2009; 27: 5184-5186
11. Cox RJ, Madhun AS, Hauge S, Sjursen H, Major D, Kuhne M, Höschler K, Saville M, Vogel FR, Barclay W, Donatelli I, Zambon M, Wood J, Haaheim LR. A phase I trial of a PER.C6₀ cell grown influenza H7 virus vaccine. *Vaccine* 2009; 27: 1889-1897

12. Doroshenko A, Halperin SA. Trivalent MDCK cell culture-derived influenza vaccine OptafluÒ (Novartis Vaccines). *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 679-688
13. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. *Microb Infect* 2010; 12: 280-286
14. Erlich HJ, Müller M, Oh HML, Tambyah PA, Joukhadar C, Montomoli E, Fisher D, Berezuk G, Fritsch S, Löw-Baselli A, Vartian N, Bobrowsky R, Pavlova BG, Pöllabauer EM, Kistner O, Barrett PN, Baxter H5N1 Pandemic Influenza Vaccine Clinical Study Team. A clinical trial of a whole virus H5N1 vaccine derived from cell culture. *N Engl J Med* 2008; 358: 2573-2584
15. Erlich HJ, Müller M, Fritsch S, Zeitlinger M, Berezuk G, Löw-Baselli A, van der Velden MVW, Pöllabauer EM, Maritsch F, Pavlova BG, Tambyah PA, Oh HML, Montomoli E, Kistner O, Barrett PN. A cell culture (Vero)-derived H5N1 whole-virus vaccine induces cross-reactive memory responses. *J Infect Dis* 2009; 200: 1113-1118
16. Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ. Seasonal influenza vaccines. *Curr Topics Microbiol Immunol* 2009; 333: 43-82
17. Furuse Y, Suzuki A, Kishi M, Nukiwa N, Shimizu M, Sawayama R, Fuji N, Oshitani H. Occurrence of mixed populations of influenza A viruses that can be maintained through transmission in a single host and potential for reassortment. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 369-374
18. Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J Clin Virol* 2009; 45: 174-178
19. Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 1681-1692
20. Ghendon Y. Cold-adapted, live influenza vaccines developed in Russia. In “*Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ(Eds): Textbook of Influenza*”. Blackwell Science 1998; pp: 391-399
21. He C-Q, Xie Z-X, Han G-Z, Dong J-B, Wang D, Liu J-B, Ma L-Y, Tang X-F, Liu X-P, Pang Y-S, Li G-R. Homologous recombination as an evolutionary force in the avian influenza A virus. *Mol Biol Evol* 2009; 26: 177-187
22. Hensley SE, Yewdell JW. Que sera, sera: evolution of the swine H1N1 influenza A virus. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7: 763-768
23. Jennings LC, Monto AS, Chan PKS, Szucs TD, Nicholson KG. Stockpiling prepandemic influenza vaccines: a new cornerstone of pandemic preparedness plans. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 650-658
24. Langley JM, Frenette L, Ferguson L, Riff D, Sheldon E, Risi G, Johnson C, Li P, Kenney R, Innis B, Fries L. Safety and cross-reactive immunogenicity of candidate AS03-adjuvanted prepandemic H5N1 influenza vaccines: a randomized controlled phase 1/2 trial in adults. *J Infect Dis* 2010; 201: 1644-1653
25. Leroux-Roels I, Borkowski A, Vanwolleghem T, Dramé M, Clement F, Hons E, Devaster J-M, Leroux-Roels G. Antigen sparing and cross-reactive immunity with an adjuvanted

- rH5N1 prototype pandemic influenza vaccine: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 580-589
26. Leroux-Roels I, Leroux-Roels G. Current status and progress of pre-pandemic and pandemic influenza vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 401-423
 27. Levie K, Leroux-Roels I, Hoppenbrouwers K, Kervyn A-D, Vandermeulen C, Forgue S, Leroux-Roels G, Pichon S, Kusters I. An adjuvanted, low-dose, pandemic influenza A (H5N1) vaccine candidate is safe, immunogenic, and induces cross-reactive immune responses in healthy adults. *J Infect Dis* 2008; 198: 642-649
 28. Liang X-F, Wang H-Q, Wang J-Z, Fang H-H, Wu J, Zhu F-C, Li R-C, Xia S-L, Zhao Y-L, Li F-J, Yan S-H, Yin W-D, An K, Feng D-J, Cui X-L, Qi F-C, Ju C-J, Zhang Y-H, Guo Z-J, Chen P-Y, Chen Z, Yan K-M, Wang Y. Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010; 375: 56-66
 29. Lin T, Wang G, Li A, Zhang Q, Wu C, Zhang R, Cai Q, Song W, Yuen K-Y. The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. *Virology* 2009; 392: 73-81
 30. Lippi G, Targher G, Franchini M. Vaccination, squalene and anti-squalene antibodies: facts or fiction? *Eur J Intern Med* 2010; 21: 70-73
 31. Minor PD. Vaccines against seasonal and pandemic influenza and the implications of changes in substrates for virus production. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 560-565
 32. Minor PD, Engelhardt OG, Wood JM, Robertson JS, Blayer S, Colegate T, Fabry L, Heldens JGM, Kino Y, Kistner O, Kompier R, Makizumi K, Medema J, Mimori S, Ryan D, Schwartz R, Smith JSB, Sugawara K, Trusheim H, Tsai TF, Krause R. Current challenges in implementing cell-derived influenza vaccines: implications for production and regulation, July 2007, NIBSC, Potters Bar, UK. *Vaccine* 2009; 27: 2907-2913
 33. Monto AS, Ohmit SE. Seasonal influenza vaccines: evolutions and future trends. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 383-389
 34. Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit Care Med* 2010; 38[Suppl.]: e10-e20
 35. O'Hagan DT. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 699-710
 36. O'Hagan DT, De Gregorio E. The path to a successful vaccine adjuvant – ‘the long and winding road’. *Drug Discov Today* 2009; 14: 541-551
 37. Patridge J, Kieny MP, World Health Organization H1N1 influenza vaccine Task Force. Global production of seasonal and pandemic (H1N1) influenza vaccines in 2009-2010 and comparison with previous estimates and global action plan targets. *Vaccine* 2010; doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.083
 38. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 243-267

39. Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Cioppa GD. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. *Vaccine* 2009; 27: 6959-6965
40. Prieto-Lara E, Llanos-Méndez A. Safety and immunogenicity of prepandemic H5N1 influenza vaccines: a systematic review of the literature. *Vaccine* 2010; 28: 4328-4334
41. Rimmelzwaan GF, McElhaney JE. Correlates of protection: novel generations of influenza vaccines. *Vaccine* 2008; 26S: D41-D44
42. Russel CA, Jones TC, Barr IG, Cox NJ, Garten RJ, Gregory V, Gust ID, Hampson AW, Hay AJ, Hurt AC, de Jong JC, Kelso A, Klimov AI, Kageyama T, Komadina N, Lapedes AS, Lin YP, Mosterin A, Obuchi M, Odagiri T, Osterhouse ADME, Rimmelzwaan GF, Shaw MW, Skepner E, Stohr K, Tashiro M, Fouchier RAM, Smith DJ. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 2008; 26S: D31-D34
43. Settembre EC, Dormitzer PR, Rappuoli R. H1N1: can a pandemic cycle be broken? *Sci Transl Med* 2010; 2: 24ps14
44. Skowronski DM, Masaro C, Kwindt TL, Mak A, Petric M, Li Y, Sebastian R, Chong M, Tam T, De Serres G. Estimating vaccine effectiveness against laboratory-confirmed influenza using a sentinel physician network: Results from the 2005-2006 season of dual A and B vaccine mismatch in Canada. *Vaccine* 2007; 25: 2842-2851
45. Subbarao K, Murphy BR, Fauci AS. Development of effective vaccines against Pandemic influenza. *Immunity* 2006; 24: 5-9
46. Tosh PK, Jacobson RM, Poland GA. Influenza vaccines: From surveillance through production to protection. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 257-273
47. Tsai T, Kyaw MH, Novicki D, Nacci P, Rai S, Clemens R. Exposure to MF59-adjuvanted influenza vaccines during pregnancy – a retrospective analysis. *Vaccine* 2010; 28: 1877-1880
48. Vogel FR, Caillet C, Kusters IC, Haensler J. Emulsion-based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 483- 492
49. Wang C-C, Chen J-R, Tseng Y-C, Hsu C-H, Hung Y-F, Chen S-W, Chen C-M, Khoo K-H, Cheng T-J, Cheng Y-SE, Jan J-T, Wu C-Y, Ma C, Wong C-H. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *PNAS* 2009; 106: 18137-18142
50. Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannamüehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci* 2009; 98: 1278-1316.