

6. BCG'nin Saltanatı Bitiyor mu? Yeni Aşı Arayışları

Prof. Dr. Seyyal ROTA

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

İnsanlarda halen kullanılan, canlı attenüe ve lisans almış olan tek TB aşısı *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG) aşısının TB'den koruyuculuğu değişik düzeylerde. BCG'nin tam koruma sağlamaması ve bulaşın azalmasında oynadığı rolün yeterli olmaması, yeni ve daha etkili aşılar gereksinim duyulmasına neden olmaktadır. *Mtb*'den korunmada hücrel immünite, "eğitilmiş" immünite ve humoral immünite ile ilgili yeni bilgiler ortaya çıkmaktadır. Bu yeni bilgiler ışığında, profilaktik, temas sonrası ve terapötik aşılama amacı ile yeni aşı çalışmaları yürütülmektedir. Bu çalışmalarda, yeni antijenler ve adjuvanlar kullanılarak ve yeni aşı sistemleri geliştirilerek canlı attenüe aşılar, inaktive aşılar, alt birim aşıları, rekombinanat ve DNA aşıları üzerinde çalışılmaktadır. Ayrıca, bu aşıların kombine kullanımları, oral, intramusküler, intravenöz gibi farklı yollar ile uygulanarak immün sistemi etkin şekilde uyarabilmeleri ve istenilen düzeyde koruyuculuğun sağlanabilmesi için yeni stratejilerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır.

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*), tek bir enfeksiyöz ajan nedeni ile en çok ölüme neden olan bakteridir. 2017 yılında 10 milyon kişide tüberküloz (TB) geliştiği ve 1.6 milyon kişinin TB'den öldüğü tahmini olarak hesaplanmıştır (1). Dünya nüfusunun %23'ünde latent TB (LTB) enfeksiyonu olduğu ve hayatlarının bir evresinde TB gelişme riski taşıdığı bildirilmektedir (2). Endemik bölgelerde yaşayan 25 yaşın üzerindeki erişkinlerde LTB insidansının %60-70 olduğu ve bu toplumlarda TB epidemisinin devam ettiği belirtilmektedir (3). İlaçlara dirençli *Mtb* suşlarının gittikçe artması, tedavisi güç enfeksiyon olgu sayısının artmasına neden olmaktadır. 2017 yılında, 558.000 ilaca dirençli olgunun %82'sinin çok ilaca dirençli (ÇİD) olduğu ve 230.000 civarında ölümün ilaca dirençli TB nedeni ile gerçekleştiği hesaplanmıştır (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2019 yılında 10 milyon yeni TB

olgusu ve 1.4 milyon ölüm olduğunu tahmini olarak hesaplamıştır (4).

İnsanlarda halen kullanılan, canlı attenüe ve lisans almış tek TB aşısı olan *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin* (BCG) aşısı (5,6), 1960 yılından beri birçok ülkede TB morbidite ve mortalitesini azaltmak için kullanılmaktadır. Dünyada yaklaşık dört milyar kişinin aşı olduğu bildirilmektedir. Aşı, gelişmiş ülkelerde rutin uygulamada olmayıp sadece yüksek risk gruplarına uygulanmakta ve özellikle ÇİD-TB ile karşılaşmış, yeterli korunma önlemleri sağlanamayan özel gruplara, bazı askeri personele önerilmektedir (7).

BCG ile aşılama politikası, ülkelerin TB prevalansına bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. TB prevalansının orta ve yüksek olduğu ülkelerde yenidoğanların aşılanması DSÖ tarafından önerilmektedir. Çoğu ül-

kelerde ilk doz BCG, yenidoğan döneminde 0-3 ayda uygulanır, daha sonra ilkököl çağında yinelenir. Ancak tek dozun yeterli olduğu da öne sürülmektedir. Ülkemizde, çocuklara BCG aşısı doğumdan 0-3 ay sonra tek doz intradermal olarak uygulanmaktadır (6). Çoğu BCG aşılı, yaklaşık bir milyon çocuğun 2014 yılında TB olduğu ve 140.000 ölümün gerçekleştiği hesaplanmıştır. Bu nedenle BCG'nin tek başına çocuklarda da yeterli koruma sağlamadığı ve daha gelişmiş aşılamaya sistemlerine gereksinim olduğu bildirilmektedir (8). BCG, çocukluk dönemindeki menenjit, dissemine TB gibi ciddi klinik tablolardan koruma sağlamaktadır (9). BCG aşısının çocuklarda ölüm ve neonatal sepsis olgularında da azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (10,11). Bebekleri ve çocukları ciddi miyer ve meningeal TB'den koruyan BCG'nin koruyucu etkisi zamanla azalmakta ve erişkin dönemde enfeksiyon oranı artmaktadır (5). Aşılı olan kişilerin adolesan dönemde BCG ile tekrar aşılanması ile BCG'nin koruyuculuğunun artmadığı bildirilmiştir (12). Bazı klinik çalışmalarda BCG'nin koruyuculuğu %60-80 olarak bulunmakla birlikte, koruyucu etkisinin olmadığını belirtilen çalışmalar da vardır (13). Ülkemizde yapılan bir çalışmada aşının koruyuculuğu 20 yaş grubunda %80 olarak bulunmuştur (7). Bireyleri lepradan da koruduğu belirtilen BCG'nin pulmoner TB'ye karşı ise değişik düzeylerde koruma sağlayabildiği saptanmıştır (12). BCG'nin koruyuculuğu; aşılanma öncesi kişinin çevresel mikobakteriler ile sensitizasyonu, *Mtb* ile karşılaşmış olması, BCG'nin yeterli düzeyde CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtını uyaramaması, aşı hazırlanmasında kullanılan değişik suşlar, aşı suşunda oluşan fenotipik ve genotipik değişiklikler, aşı dozu ve uygulama yollarındaki farklılıklar gibi nedenler ile değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca, fakirlik, beslenme bozuklukları, konağın genetik farklılıkları, kişinin immün durumu, koenfeksiyonlar (CMV, HIV, helmintler) gibi kişisel faktörler de koruyuculuğu etkileyebilmektedir (5,7,13).

Erişkinlerde BCG aşısının TB'den koruyuculuğu konusunda değişik veriler bulunmaktadır. Çocuklarda ise, immünizasyon için daha etkili bir aşı bulunana kadar BCG'nin kullanılması konusunda farklı görüşler vardır (14). Bazı çalışmalar, çocuklarda dokuzuncu aydan önce yapılan BCG aşısının daha ileri yaşlarda yapılan aşıya göre, çocukluk çağındaki diğer nedenler ile gelişen solunum yolu enfeksiyonlarından da morbidite ve mortalite açısından bir avantaj sağladığını göstermektedir (15). BCG aşısındaki fikir ayrılıkları aşının oluşturduğu immünitinin tam olarak açıklanamamasından kaynaklanmaktadır. Gelişmekte olan

ülkelerde, BCG'nin neonatal aşı olarak sadece TB'ye karşı değil, endemik olarak bulunan diğer enfeksiyöz ajanlara karşı da etki gösterdiği ve aynı anda uygulanan pediatrik aşılardan aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (14).

TB-dışı mikobakteriler (TDM), BCG ve *Mtb*'de bulunan bazı antijenlere sahiptir. TDM prevalansının düşük olduğu bölgelerde aşı koruyuculuğu fazla iken yüksek prevalansın olduğu bölgelerde bu koruyuculuğun az olduğu görülmektedir. Kişinin BCG ile aşılanmadan önce TDM ile karşılaşmış olması, aşı ile oluşacak immün yanıtı engellemektedir (6). TDM ile aşı öncesi karşılaşma sonucu oluşan immünitinin, BCG aşısının uygulanmasından sonra basillerin çoğalmasını engelleyerek aşının koruyuculuğunu azalttığı düşünülmektedir (3). Kişilerin BCG ile aşılanmadan önce TDM'ler ile karşılaşmaları sonucunda aşının koruyuculuğunun azalmasında iki hipotez ileri sürülmektedir:

Maskeleye hipotezi: Aşı ile immünizasyondan önce TDM ile karşılaşan kişilerde TB'ye karşı da belli bir düzeyde koruyucu immünite oluşur. Ancak bu kişilere daha sonra uygulanan BCG, daha önce TDM'ler ile karşılaşma sonucu gelişmiş olan immüniteli arttırmayacaktır. Yeni doğanlar, daha önce TDM'ler ile karşılaşmadıklarından sensitizasyon gelişmediği için birkaç ay içinde uygulanan BCG'nin etkisi maskelenmeyecek ve koruyucu olacaktır. Erişkinler ise TDM'ler ile daha önce karşılaştıkları için BCG aşısı etkili olmayacaktır. Bu nedenle erişkinlerde BCG'den daha etkili olabilecek yeni bir aşıya ihtiyaç vardır (16,17).

Engelleme hipotezi: BCG ile aşılanmadan önce TDM ile karşılaşan kişilerde mikobakterilerde ortak olarak bulunan antijenlere karşı oluşmuş immün yanıt nedeni ile BCG'nin replikasyonu engellenir. Bu hipoteze göre, yeni geliştirilecek olan aşı, kişinin önceden TDM ile karşılaşması nedeni ile bloke edilmemelidir. Yeni geliştirilecek aşılardan virus, rekombinant protein veya çıplak DNA gibi mikobakteri harici vektörler kullanılarak hazırlanması ile, kişilerde aşı öncesi sensitizasyonun etkisi engellenecek ve aşı ile etkili koruma sağlanabilecektir (16,17).

BCG'nin tam koruma sağlamaması ve bulaşın azalmasında oynadığı rolün yeterince açık olmaması, yeni ve daha etkili aşılar gereksinim duyulmasına neden olmaktadır (3). DSÖ, 2035 yılına kadar TB insidansını %90 ve TB nedeni ile olan ölümleri %95 azaltmak için bir yol haritası yayınlanmıştır. Hedef 2050 yılına kadar yıllık insidansı milyonda bir olgunun altına düşürebilmektir (13). Yukarıda bahsedilen

nedenler ve DSÖ'nün stratejisine uygun olarak, ayrıca ilaca dirençli suşlar ile gelişen olguların gittikçe artması da göz önüne alınarak, hastalığı önlemek ve tedavisinde de kullanabilmek amacı ile yeni aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (18).

BCG

Canlı attenüe bir aşı olan BCG, Calmette ve Guerin tarafından 100 yıl kadar önce pasajları yapılmış olan *M. bovis* suşudur. Calmette ve Guerin 1908-1921 yılları arasında virülen *M. bovis* suşunun 230 defa pasajını yapmışlar ve BCG'yi elde etmişlerdir. İnsanlara ilk uygulaması 1921 yılında oral olarak yapılmış, 1927 yılında ise intradermal olarak uygulanmıştır (12).

Genomik çalışmalarda, virülen *Mtb* ve *M. bovis* suşlarında bulunan delesyon bölgesi (RD) 10.7 kb'lık bir parça olup, dokuz adet açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir (16). BCG elde etmek için attenüe edilen *M. bovis* suşunun çeşitli genomik bölgelerinde (RD1-RD16, nRD18) delesyonlar oluşmuştur (6). RD1, ESX-1 diye adlandırılan bir sekresyon sistemini kodlar. ESX-1, *Mtb*'nin temel immünojenik proteinleri ESAT-6 ve CPF-10'u kodlamaktadır. Çalışmalarda, RD1 bölgesindeki delesyonun BCG virülansının kaybında esas faktör olduğu saptanmıştır (16). Görüldüğü gibi, BCG'de oluşan genetik delesyonlar ESAT-6 gibi virülans ile ilişkili birçok anahtar antijenlerin kayıplarına yol açmıştır. *Mtb* kompleksinde bulunan epitoplardan %23 kadarının BCG'de olmadığı bildirilmektedir (8). Delesyonlar haricinde dokuz antijende 15 epitopun sekanslarının da *Mtb*'den farklı olduğu saptanmıştır (19). Yıllar içinde, BCG'nin elde edilme işlemleri sırasında alt-suşları ortaya çıkmıştır. Bunlar BCG Russia (ATCC 35740), BCG Moreau/Rio de Janeiro, BCG Tokyo, BCG Sweden, BCG Birkhaug (ATCC 35731), BCG Danish1331 (ATCC 35733), BCG China, BCG Prague, BCG Glaxo (ATCC 35741), BCG Tice (ATCC 35743), BCG Frappier (ATCC35.735), BCG Connaught, BCG Phipps (ATCC 35744) ve BCG Pasteur 1173'tür. Bu suşlar TB'yi önlemek için aşı geliştirilmesinde bütün dünyada kullanılmaktadırlar. Bu suşların kullanılmasındaki temel endişe güvenli korumanın sağlanamamasıdır (6). Genomik farklılıklar aşı etkinliğinde de farklılıklara neden olmaktadır. Bu sakıncaları azaltmak için DSÖ'nün BCG Danish 1331, Tokyo 172-1 ve Russia BCG-1 referans suşlarından en çok BCG 1331 suşu çalışmalarda kullanılmaktadır (20). Halen BCG aşılarının üretimi dünyada 40'dan fazla üretici tarafından yapılmaktadır (16).

BCG aşısı, organ transplantasyonu yapılacak olanlara, gebelere, HIV ile enfekte kişilere, malign hastalığa

gü olanlara, kortikosteroid, kemoterapi, radyasyon tedavisi gören bireyler gibi immün sistemi baskı altında olanlara yapılmamalıdır. HIV pozitif aneden doğan bebeklere yapılan BCG aşısından sonra yaygın BCG enfeksiyonu oldukça nadir görülmektedir. Aşıdan sonra tekrarlanan TDT (tüberkülin deri testi), BCG rapelleri ve *Mtb* ile karşılaşmalar TDT yanıtını arttırır (21). BCG aşılansından sonra oluşan TDT pozitifliği ile aktif hastalık gelişimine karşı korunma arasında bir ilişki olmadığı da vurgulanmaktadır (7). Ayrıca, BCG temastan önce engelleyici veya profilaktik bir aşıdır ve temas sonrası aktif ve LTb'ye karşı terapötik bir etkisi olmadığı belirtilmektedir (21).

Aşının üretim ve etki mekanizmasındaki özellikleri yanı sıra, aşının uygulanmasında bireyin yaşı da önemlidir. Konağın enfeksiyon durumu, aşının göreceli etkinliği ve koruma süresi optimal aşı uygulama yaşını saptamada önemli rol oynamaktadır (18). TB hastaları ile yakın temasta olan beş yaşından büyük çocukların temastan önce yapılan BCG aşılması sonucunda %50'nin üstünde koruyuculuk sağlandığı bildirilmiştir. Ancak temas sayısı ve süresi arttıkça ve yaş ilerledikçe koruyuculuğun gittikçe azaldığı, otuzlu yaşların sonlarına doğru koruyuculuğun kaybolduğu bildirilmektedir (22).

BCG Tekrar Aşılama

Güney Afrika'da 12-17 yaşlar arasında QFT (Quantiferon) negatif adolesanlarda yapılan bir çalışma, BCG aşısının tekrarlanmasını yeniden gündeme getirmiştir. BCG aşısının tekrarlandığı çalışmada, aşının etkinliği %45.4 olarak bildirilmiştir (23). Ancak HIV pozitif bireylerde, immünsüpresif tedavi alanlarda ve hamilelerde BCG uygulamasının kontrendike olduğunu göz önüne almak gerekmektedir. Düşük maliyetli, güvenli ve ulaşılabilir bir aşı olması nedenleri ile BCG tekrar aşısı global TB epidemisinin kontrolünde kullanılabilir önemli bir strateji olarak görülmektedir (16,18,23,24). İmmünsüpresif olan bireylerdeki dissemine BCG hastalığı oluşma riski, HIV ve TB'nin koendemik olduğu bölgelerde BCG aşısının tekrarlanmasına engel teşkil edebilir (2). BCG tekrarı ve alt birim kuvvetlendirici aşı stratejisi, sinerjik etki ile aşının daha etkili olmasını sağlayabilir. Bu etki gösterilebilirse, BCG ve alt birim aşı kombinasyonu yeni bir aşılama stratejisi olabilir (25).

Aşı veya TB enfeksiyonundan sonra oluşan koruyuculuğu özgül ve kesin olarak ölçülebilen serolojik bir test olmadığından, bağışıklık süresi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmalarda, aşıdan 15-20 yıl sonra bağışıklığın kaybolduğu bildirilmektedir (7). Ancak

retrospektif bir çalışmada, yeni doğanlara uygulanan BCG'nin koruyuculuğunun 30 yıla kadar %50 olduğu ve 50 yıla kadar da sürebildiği bildirilmiştir (5).

TB VE BCG İMMÜN MEKANİZMALARI

Mtb gibi hücre içi patojenler ile oluşan enfeksiyonların kontrolünde hücrel immünite önemlidir ve BCG aşısının hücrel immüniteyi artırarak TB'den korunmayı sağladığı düşünülmektedir (26).

Mtb içeren aerosoller inhale edildikten sonra makrofajlar tarafından fagosite edilir. Fagozom-lizozom füzyonunun engellenmesi bakterinin alveolar makrofaj içinde varlığını devam ettirmesine neden olur, hücrel immün yanıt aktive olur. Sonuçta makrofaj, lenfosit ve epiteliyal hücreler gibi komponentleri içeren granüloma oluşur. Bu oluşum, bakteri replikasyonunu kontrol edebilir ve hastalığın latent aşamasını indükler (27). Enfeksiyondan hemen sonra sitotoksik doğal öldürücü hücreler "Natural Killer (NK)" saptanır. NK hücreleri başlıca IFN- γ olmak üzere diğer proinflamatuvar (TNF- α) ve immün baskılayıcı (IL-10) sitokinleri ve kemokinleri salgılayarak nötrofillerin göçünü sağlar (28). İmmün baskılayıcı IL-10, akciğerlerdeki bakterinin kontrol altına alınmasını sınırlar. BCG aşısı ile IL-10 reseptör sinyali engellenerek, IL-17 ve IFN- γ yanıtları artar ve *Mtb*'nin kontrolü sağlanmış olur. Dolayısı ile, aşı ile IL-10 bloke edilerek TB aşısı ile sağlanan koruyuculuk artırılabilir (19). NK hücrelerinin IFN- γ salgılaması sonucu dentritik hücreler aktive olurlar ve T hücrelerinin Th1 fenotipine değişimlerini stimüle ederler. NK hücreleri aynı zamanda, enfekte hücrelerin apoptozisini indüklerler, proliferer olurlar ve akciğerlere göç ederler. Diğer sitokinler ile birlikte IFN- γ üretirerek *Mtb*'ye özgül immün yanıt oluşmasına katkıda bulunurlar (28). Hafıza T hücreleri ve IL-12, IL-8, IFN- γ , TNF- α , TGF- β sitokinleri TB'ye karşı gelişen immün yanıtta aktive olurlar. Ancak bu sitokinlerin immün yanıt ile ilişkileri bilinmesine rağmen, *Mtb* enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğunu gösteren kabul görmüş bir immün belirteç yoktur (21).

Mtb enfeksiyonuna karşı gelişen koruyucu immünite karmaşıktır. *Mtb*'ye karşı etkili sterilize edici immüniteyi hangi antijenlerin, hangi immün hücrelerin ve mekanizmaların sağlayabildiği tam olarak belli değildir. Ancak CD4+, CD8+ T ve $\gamma\delta$ + T hücreleri de dahil olmak üzere, hücrel immünite mekanizmalarının makrofajlarda bulunan mikobakterileri öldürme kapasiteleri olduğu ispatlanmıştır (5). *Mtb*, MHCII aracılığı ile esas olarak CD4+ T hücrelerine (Th1, Th2, Th17 ve T regülator hücrelerine (Tregs)) sunulur.

MHCII molekülleri bu hücrelerin kazanılmış immüniteyi aktive etmelerini sağlar. Th1 ve Th17 hücreleri TB enfeksiyonunda anahtar rol oynayan efektör CD4+ T hücreleridir (13). Uzun süreli hafıza immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynayan CD4+ T hücreleri, T merkezi hafıza hücrelerine TCM (CM subset) diferansiye olarak sekonder lenf organlarına ve lenfoid doku içeren bronkuslara yerleşir. Yeni aşı geliştirilmesinde hedef hücrelerden biridir (16).

İnsan ve farelerde yapılan çalışmalarda, yardımcı Th1 hücrelerinin temel olarak CD4+, CD8+ T ve ayrıca Th17 hücrelerinin de TB'den korunmada rol oynadıkları gösterilmiştir. Th1 hücreleri *Mtb* dahil hücre içi patojenlerin kontrolünde önemlidir. Th1 hücrelerinden salınan IFN- γ ve TNF- α , *Mtb* ile enfekte olmuş makrofajları etkileyerek bakterinin öldürülmesine yardımcı olurlar (13,16). Makrofaj aktivasyonunda ve *Mtb*'ye dirençte rol oynayan IFN- γ , CD4+ T hücreleri tarafından üretilen bir anahtar sitokindir (26). Deneysel çalışmalar CD4+ T hücreleri ve IFN- γ 'nin *Mtb*'nin kontrolündeki önemini göstermekle birlikte, IFN- γ yapımı CD4+ T hücre aracılıklı koruyucu immünitede etkili olan tek mekanizma değildir (19). Th1 hücrelerinin IFN- γ ve TNF- α salgılayarak makrofajları aktive etmesinde reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri, lizozomal enzimler ve otofaji rol oynar. Ancak akciğerlerde IFN- γ yanıtının artması konağa, patojene verdiği çok daha fazla zarar vermektedir (13). IFN- γ reseptör mutasyonları olan bireylerde TB'ye artmış duyarlılık görülmektedir (26).

Th17 hücreleri, IL-17, IL-17F, IL-21 ve IL-22 gibi bazı efektör sitokinler salgırlar (13). Th17 hücrelerinden salınan IL-17, konağın TB'den korunmasında anahtar rol oynar (29). İmmün hücrelerin enfeksiyon bölgesine göçünü indükte eden proinflamatuvar sitokin IL-17, IL-23 ile indükte edilir. TB'ye karşı etkili immünite sağlamak için, Th1 ve Th17 yanıtı birbirlerini karşılıklı düzenlemektedirler. Aşılansmış deney hayvanlarında Th-17'nin kaybı, koruyucu hafıza Th1 yanıtının gelişmesine engel olur. Aşı ile indüklenen korunmada hem IL-23 hem IL-17 rol oynarlar, ancak akciğerlerin primer korunmasında rolleri yoktur (16). Diğer taraftan Th2 hücreleri IL-4 oluşturarak ve Tregs, Th1 ve Th17'nin koruyucu yanıtlarını inhibe ederek TB'nin ilerlemesini kolaylaştırırlar (29).

TB enfeksiyonu veya aşılardan sonra miyeloid ve NK hücreleri gibi doğal bağışıklık hücrelerinde görülen uzun ömürlü modifikasyonlar sonucunda, TB harici diğer enfeksiyonlara karşı da kazanılmış bağışıklıktan bağımsız olarak koruma sağlandığı gösterilmiştir. Bu duruma "eğitilmiş immünite" de-

nilmektedir (14-16,30). Diğer bir deyiş ile “eğitilmiş immünite” ile doğal bağışıklık hücreleri, kazanılmış bağışıklıktan bağımsız olarak, TB harici fungus, bakteri (*Salmonella*, *Shigella*), parazit (*plasmodium*) ve virüs (solunum virüsleri) gibi çeşitli patojenler ile oluşan enfeksiyonlara karşı da koruma sağlamaktadırlar (10,14-16,30).

Eğitilmiş immünite, immün hücrelerin epigenetik ve metabolik programlanmaları ile patojenlere karşı daha güçlü bir yanıt oluşturmaları ve kazanılmış immünite yanıtını aktive etmeleri ile sağlanır. Dolayısı ile, eğitilmiş immünite patojene özgül olmayan bir koruma sağlayabilir. BCG aşısının, mikobakteriye karşı geliştirdiği özgül immün yanıt haricinde uzun süreli doğal immün yanıt oluşturduğu, hematopoietik kök hücrelerini modifiye ederek epigenetik değişikliğe uğrayan makrofajlar ile *Mtb* enfeksiyonlarına karşı daha iyi koruma sağladığı bildirilmektedir. Epidemiyolojik veriler ve eğitilmiş immünite bilgilerimiz ışığı altında, solunum yolu viral enfeksiyonlarına karşı gözlenen uzun süreli korunma BCG aşısı ile ilişkilendirilmiştir (26,31). Bilhassa attenüe canlı aşılar eğitilmiş immüniteyi indüklerler (4).

BCG gibi mikobakteriler, birçok patojeni tanıyan reseptörler ile etkileşime girerek muhtemelen konak üzerinde oluşturdukları pro- ve antiinflamatuvar etkileri ile heterolog koruma kapasitesi indükler ve TB harici hastalıklarda da etkilerini gösterebilirler (14). Buna örnek olarak, hem üst hem alt solunum yolu enfeksiyonlarının BCG aşıları kişilerde daha az görüldüğü ve BCG aşısını uygulayan ülkelere göre önemli oranda düşük olduğu belirtilmiştir (32). Eğitilmiş immüniteyi indükleyerek koronavirüs hastalığının şiddetinin azaltılabileceği hipotezi üzerine bazı ülkelerde randomize kontrollü çalışmalar yapılması planlanmıştır (24). Mesane kanseri, melanom gibi hastalıkların tedavisi eğitilmiş immünite prensibine dayanılarak yapılmaktadır (10,14,15,30). Çeşitli çalışmalarda BCG aşısının TB dışındaki çocukluk lösemisi, allerjik astım gibi hastalıklardan koruma ve tip 1 diyabet tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (24).

CD8+ T hücrelerinin TB immünitesinde önemsiz olduğu görüşünden artık uzaklaşmakta ve aşı geliştirmede CD8+ T ve B hücrelerinin de göz önüne alınması gerekmektedir. CD8+ T hücreleri MHCI molekülleri tarafından sunulan antijenleri tanırlar. Salgıladıkları sitokin, sitotoksik ve direkt antimikrobiyal etkileri ile *Mtb* enfeksiyonunu kontrol ederler. BCG aşısının intradermal uygulanması sonucu bazı mikobakteri

aşılara karşı IgG ve IgM antikor sentezlerinin indüklendiği gözlenmiştir. Ayrıca, bu antikorların bazılarının *Mtb* enfeksiyonuna karşı fagozomal füzyonu hızlandırma ve diğer bazı mekanizmalar ile hem hücresel hem humoral immüniteyi arttırabilecekleri bildirilmektedir (13). Özellikle hücre duvarı komponentlerine karşı oluşan salgısal IgA, *Mtb*'nin epitelyal hücreler ve makrofajlara bağlanmasını inhibe ederek korunmaya katkıda bulunabilir (5).

TB immünolojisindeki halen elde olan bilgiler ile çoğu yeni aşılar hücresel immüniteyi ve ilave olarak humoral immüniteyi de uyuracak şekilde tasarlanmaktadır (5).

YENİ AŞILAR

Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı günümüze kadar 200 civarında aşı adayları ile değişik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar halen kullanılmakta olan BCG aşısından daha etkin, immünojen ve güvenilir bir TB aşısı elde etmek amacı ile yapılmaktadır. Yeni aşılardan, kolay uygulanabilir, ucuz ve güvenli olmaları dışında, immünojen olmaları, yenidoğan ve çocuklarda etkili olmaları (tüberkülin reaktivitesine yol açmadan), primer enfeksiyon, reenfeksiyon ve reaktivasyonu, akciğer ve akciğer dışı ve dissemine TB'yi önleyebilmeleri amaçlanmaktadır. Bunun dışında, TDM ile enfekte ve BCG aşıları temaslılarda yeterli bağışıklık yanıtı oluşturabilmesi, immün yetmezlikli ve malnutrisyonlu hastalarda da güvenli bir şekilde kullanılabilmesi ve etkin olması gibi çeşitli özellikleri taşımaları beklenmektedir (3). Bu nedenler ile TB aşısı geliştirme çalışmaları profilaksi, terapi ve temas sonrası aşılama gibi birden fazla hedefe yönelik yapılmaktadır (25).

Profilaktik aşılama: *Mtb* enfeksiyonunu veya klinik hastalığı önlemek için uygulanan aşıdır. Bu aşılardan, *Mtb* ile ilk karşılaşmadan önce yeni doğanlarda uygulanan BCG gibi ilk aşı veya daha sonra uygulanacak olan güçlendirici aşılardır (14,16,21).

Temas sonrası aşılama: *Mtb* ile enfekte kişilerde, aktif hastalık gelişmesini önlemek için uygulanan aşılardır. Hedef grup BCG ile aşılanmış LTb'li kişilerdir. LTb'li kişilerin aşılama programına alınması büyük bir avantaj sağlayacağından aşılara latentlik ile ilişkili antijenler (örneğin; DosR regulonda ekspres edilen) eklenmektedir. Reaktivasyonu engellemek amacı ile geliştirilmiştir (14,16,21). İlk ve güçlendirici aşılardan birçoğu temas sonrası güçlendirici olarak uygulanmak üzere geliştirilmektedir. Bu aşılardan, enfeksiyon sonucu oluşan immün yanıtı arttırma ve destekleyebilme özellikleri kullanılmaktadır (25).

Terapötik aşılama: *Mtb* ile enfekte olmuş kişilere ve aktif hastalığı olan kişilere rekürens önlemek için, antibiyotik tedavisi ile birlikte veya antibiyotik tedavisinden sonra uygulanan aşılar (13,16,25). DSÖ 2018 yılı TB Raporu'na göre terapötik TB aşılarının; tedavi oranlarını yükseltmesi, tedavi süresini kısaltması, kullanılacak ilaç sayısını azaltması, rekürens insidansını azaltması, tekrar aşılarının en az sayıda yapılması gibi özelliklere sahip olması hedeflenmektedir (33).

Yukarıda bahsi geçen bilgiler ışığında, aşı geliştirme çalışmalarında hastanın kliniği, yaşı, immün durumu, aşıda kullanılacak antijenler, TB immünolojisi gibi dikkate alınması gereken pek çok konu vardır. Ayrıca, TB'de hastalık gelişimi ilk enfeksiyondan yıllar sonra gerçekleşebileceği için aşı çalışmaları, aktif, latent, çocuklar gibi çeşitli gruplarda çalışılması gereken, yüksek maliyetli ve takibi yıllar alan bir süreç gerektirir (18).

TB enfeksiyonu asemptomatik evreden semptomatik evreye kadar değişik aşamalardan geçerek gelişmektedir. Hastada enfekte akciğer lezyonları ile lenf nodülleri eşzamanlı olmadan ve birbirlerinden bağımsız olarak gelişirler. Bu nedenle, aynı hastada kalsifiye granülom, bakteri yükü fazla olan kazeöz, nekrotik lezyonlar gibi çeşitli evrelere ait patolojiler saptanabilir (25). Dolayısı ile, insan vücudundaki mikobakteriler farklı antijenlerin eksprese edildiği değişik metabolik aktivite aşamalarındaki replike olan ve dormant bakteriler dahil olmak üzere çeşitli bakterileri içerir (5).

Granülomlar içinde replikasyonu azalmış ve metabolizması yavaşlamış olan *Mtb*'nin devamlı bulunması, enfeksiyonun kronikleşmesi ile ilişkilidir. Aşı çalışmaları, bakterinin hayat döngüsündeki farklı evrelerinde eksprese edilen değişik antijenleri hedef olarak yapılmaktadır. Çalışmalarda granülom oluşumu ve kronik enfeksiyon için kobaylar uygun modelleri oluştururken, fareler immün mekanizmaları takip ve açıklama için kullanılmaktadır. Ancak bazı deney hayvanlarında latent enfeksiyon gelişmesi aşı çalışmalarında kısıtlılık oluşmaktadır (14).

Antijenler

Mtb genomunun sekans çalışmaları aşı adayları olarak kullanılacak yeni antijenlerin bulunmasına neden olmuştur (16). Aşı geliştirme sürecinde, aşı içeriğinde bulunacak en iyi antijenlerin nasıl seçileceği ve kaç antijenin aşıya dahil edileceği gibi henüz tam yanıtı bulunamamış kritik sorular bulunmaktadır (25). Antijen araştırmalarının komplike olma neden-

lerinden biri, *Mtb* enfeksiyonunun kronik ve latent/persistan fazlara geçebilme özelliğinin olmasıdır. İnsan vücudundaki mikobakteriler, farklı metabolik aktivite aşamalarında olan, dolayısı ile farklı antijenlerin eksprese edildiği bakterilerden oluşur (5). *Mtb*, çoğu $\alpha\beta$ tip T hücre reseptörleri tarafından tanınan epitopları içeren yaklaşık 4000 kadar protein eksprese eder (5,34). Örnek olarak, antijenlere spesifik T hücre yanıtları incelendiğinde, ESAT-6 (enfeksiyon süresinde yüksek düzeyde ve devamlı eksprese edilir) ve Ag85B antijenlerinin (esas olarak enfeksiyonun erken döneminde eksprese edilir) farklı ekspresyon profillerinin immün yanıt kalitesinde belirgin olarak etkin olduğu gösterilmiştir (25). ESAT-6 içeren bir aşı, LTB enfeksiyonu olan kişilere uygulandığında sınırlı fonksiyonel kapasiteye sahip CD4+ T hücrelerinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, aşıların LTB enfeksiyonu olan kişilerde etkinliğinin az olduğunu göstermektedir (19). Yapılan çalışmalarda, enfeksiyonun veya hastalığın belirli evrelerinde devamlı antijenik uyarının olmasının, T hücre fonksiyonlarının etkinliğinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Bu sonuç, LTB enfeksiyonu veya aktif TB enfeksiyonu olan kişilere uygulanacak olan TB aşısının tasarlanmasında dikkate alınmalıdır (19). Dolayısı ile, TB aşılarının geniş bir yelpazede immünite sağlayabilmeleri için, *Mtb*'nin farklı metabolik evrelerinde eksprese edilen antijenleri içermeleri sağlanmalıdır (5,14).

Alt birim aşılarında kullanılan antijenler, aktif TB'de ve latent enfeksiyonlarda eksprese edilen antijenlerden seçilmişlerdir. Antijenlerin çoğu ESAT-6, MPT64, Ag85B ve Ag85A gibi sekrete edilen proteinler ve ısı şok proteinleri (hsp) gibi hücre duvarı proteinleridir. Bir çalışmada, *Escherichia coli*'de *Mtb* proteinleri eksprese ve purifiye edilmiş, insan örneklerinde humoral ve hücrel immün yanıtları araştırılmış, sonuçta yüksek immünojeniteye sahip aşı adayları olacak dört adet protein (Rv0232, Rv1031, Rv1198 ve Rv2016) tanımlanmıştır (5).

Mtb hücre duvarı, bilhassa T hücrelerini CD1-aracılıklı antijen sunumu ile aktive eden, özellikle glikolipidler olmak üzere fazla miktarda lipid içerir. Bu yapılar da alternatif antijen olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikolik asid, glukoz monomikolat, mannozil-fosfatidilinozitol temelli glikolipidler gibi çeşitli lipidler gecikmiş tip hipersensitivite yanıtını uyandırabilirler ve mikobakteri enfeksiyonlarına karşı koruyucu immünitede rol oynarlar. İmmünojenitesi en güçlü olan lipidlerin tanımlanarak aşı üretiminde kullanılması önerilmektedir (5).

LipY lipaz bir hücre duvarı proteini olup aynı zamanda virülans faktörü olarak da hareket etmektedir. İmmün sistem hücreleri ile de etkileşime giren alt birim LipY ile immünizasyonda, mikobakteri lipazına karşı bir immün yanıt oluşabilir. Hayvan deneylerinden alınan sonuçlar üzerine önemli bir antijen olan LipY ve benzeri lipolitik enzimlerin, BCG aşısına eklenmesi veya yeni terapötik aşı adaylarında değerlendirilmesi önerilmektedir (35).

Adjuvanlar

Adjuvanlar, yapıları, uygulanma sistemleri ve doğal bağışıklığı tetikleyebilme özelliklerine göre gruplandırılırlar. Halen kullanılan adjuvanlar alüminyum bazlı bileşiklerdir ve humoral immüniteyi etkiler ancak hücrel immüniteyi etkilemezler. Protein temelli alt birim aşılarında hücrel Th1-tip immün yanıtı indükleyebilecek yeni adjuvanlara gereksinim olduğu düşünülmektedir (5,30). Örnek olarak, AS01 adjuvanı lipozom, AS02 adjuvanı ise yağ-su emülsiyonu içinde formüle edilmiştir. Her iki formülasyon da etkili ve devamlı antikor yanıtı oluştururken, AS01 daha yüksek düzeyde antijene özgül Th1 yanıtını indüklemektedir. Dolayısı ile, aşının sahip olması istenen özelliğe göre adjuvan seçiminin önemi ortaya çıkmaktadır (30). Adjuvan seçimi uyarılan immün yanıtın sadece şiddetini değil kalitesini de etkilemektedir (34). Hem sitokinlerin fonksiyonunu arttıran, hem de Th1 immün yanıt süresini uzatabilen adjuvanların seçimi TB immünolojisi açısından önemlidir (33).

Yeni adjuvan arayışları devam etmektedir. Nişasta ve kitosan bu adjuvanlara örnek olarak verilebilir. Nişasta, çözünür ve biyolojik olarak uyumlu bir karbohidrattır. Glukan yapısındadır ve *Mtb*'nin hücre duvar yapısında bulunan glukan ile benzerlik göstermektedir. İntranasal uygulandığında, nişasta mikropartikülleri solunum yolunda bulunan glukan reseptörleri tarafından tanınırlar ve bakteri ile olan etkileşimi taklit ederek spesifik immün yanıt oluştururlar. Kitosan ise D-glukozamin ve N-asetil glukozaminden oluşan polisakkarid bir adjuvandır. Düşük toksisiteli, biyolojik olarak uyumlu ve çözünür bir moleküldür. Mukozaya adezyon yapan, hücreler arasına penetre olabilen, hücre tarafından kolay alınan, antijenin kontrollü salınımını sağlayan ve özelleşmiş hücrelere sunulmasını arttıran özellikleri vardır. İnflamasyonları aktive ederek, bilhassa IL-1 β ve IL-18 gibi proinflatuvar sitokinlerin salınmasına ve sonucunda Th1, Th2 ve Th17 yanıtlarının aktivasyonuna neden olur (27).

AŞI TÜRLERİ

TB aşıları profilaktik, temas sonrası ve terapötik aşılar olarak gruplandırılabilir gibi, biyokimyasal formlarına göre canlı attenüe, inaktive, alt birim, rekombinant ve DNA aşıları olarak da gruplandırılabilirler (21).

Canlı Attenüe Aşılar

Canlı aşılar geniş bir antijen yelpazesine sahiptirler. Doğal enfeksiyon ile oluşan immün yanıtı çok benzer bir immün yanıt oluşturması nedeni ile uzun süreli bir koruma sağlarlar (5,36,37). İmmün yetmezlikli kişilerde uygulanması genellikle kontrendikedir. BCG'nin aşılamadan sonra 16 ay kadar antijenik uyarı yaptığı ancak akciğer dokusunda kuvvetli hafıza yanıt oluşturmadığı gözlenmiştir (36). Virülans ile ilişkili genlerin delesyonu yapılarak attenüe *Mtb* aşısı geliştirilebilir. Bu suşlar hastalık oluşturan *Mtb* suşlarında bulunan antijenlerin hemen hemen hepsine sahiptirler (25).

Canlı attenüe aşılar ilk olarak bebeklerde BCG'nin yerine kullanılmak üzere, profilaktik ve birinci aşı olması düşüncesi ile geliştirilmiştir. Ancak halen, adolesan ve erişkinlerde temas sonrası aşı olarak değerlendirilmektedir. Canlı aşılar birçok antijene kompleks ve farklı immün yanıt oluştururlar. Bu özellikleri ile sınırlı sayıda antijene immün yanıt oluşturan alt birim aşılarına göre üstündürler. Ancak BCG'de bildirilen, NTM'ler ile daha önceden oluşmuş immünolojik duyarlılık nedeni ile interferans gelişebilir (16,25).

Canlı attenüe aşılarının, inaktive aşılarla göre geniş yelpazede bir immün yanıt oluşturmaları yanında, düşük maliyet, kolay nakliye ve kolay uygulanabilirlik gibi avantajları da mevcuttur (13). Canlı attenüe aşıların geniş kapsamlı antijen repertuarları ve doğal enfeksiyona olan benzerlikleri olmasına rağmen (5) virülanslarını geri kazanabilme potansiyelleri ve immün sistemi baskılanmış hastalarda komplikasyonlar oluşturabilmeleri gibi bazı sakıncaları da mevcuttur (Tablo 1) (13,37).

MTBVAC

Mtb'nin virülans ile ilişkili genleri çıkarılıp attenüe edilerek, farklı canlı attenüe aşılar elde edilebilir (5). MTBVAC, *Mtb*'nin attenüe *phoP*-*fadD26*-delesyon mutantıdır (25). *phoP*, *Mtb* MT103 suşunun makrofajlarda üremesi için gerekli olup, ESAT-6 gibi virülans faktörlerini regüle edebilen transkripsiyon faktörlerini kodlar. *fadD26* ise *Mtb* hücre duvarının ana bileşeni olan fitosterol dimikokerosatın sentezi için gereklidir. Fitosterol dimikokerosat aynı zamanda

Mtb'yi konak savunmalarından koruyan bir virülans faktörüdür (13). Faz 1 çalışmalarında MTBVAC'ın BCG kadar immünojen olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda klinik çalışmalarına başlanmış olan ilk (25) ve faz 3 aşamasına gelmiş tek canlı attenüe aşıdır. (21). Aşının ilk hedef grubu yeni doğanlar olup, BCG yerine kullanılması düşünülmektedir. İkinci hedef grup ise, güçlendirici aşı olarak uygulanmak üzere adolesan ve yetişkin grubudur. İlk klinik çalışmalar bütün dozlarda güvenilirliğin BCG ile benzer olduğunu ve ciddi yan etki oluşturmadığını göstermiştir. Klinik çalışmalar halen devam etmektedir (13). Ayrıca, MTBVAC bir vektör olarak kullanılarak ikili aşı olan TB-HIV aşısı yapılmıştır. TB-HIV ikili aşısı MTBVAC.HIVA^{2auxo} olarak adlandırılmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında, ikili aşının koruyuculuğu MTBVAC'ın koruyuculuğuna benzer ve güvenilirliği ise BCG ve MTBVAC aşılarna göre daha iyi bulunmuştur. Bu nedenler ile ciddi enfeksiyon riski altında olan immünsüprese kişiler için ümit verici olduğu bildirilmiştir (21).

Inaktive Aşılar

İnaktive aşılar, *Mtb* enfeksiyonunu önlemede ve TB tedavisinde uzun süre kullanılmıştır. Bu tür aşılar, inaktive edilmiş bütün bakteri veya fiziksel/kimyasal yöntemler ile elde edilmiş bakteri fragmanlarını içerirler (13). *Mtb*'nin birden fazla antijenine immün yanıt oluştururlar (16). Bu aşılar hücre dışı patojen enfeksiyonlarına karşı korunmayı humoral ve Th1-tip hücrel immün yanıtı indükleyerek sağlarlar. TB kontrolünde iyi bir immünoterapötik etkisi vardır. Bu aşıların, kuvvetli olmayan koruyucu etkileri, sitotoksik T lenfosit yanıtını uyaramamaları, immün yanıt süresinin kısa olması, yüksek doz ve birden fazla enjeksiyon gereksinimi gibi kısıtlılıkları mevcuttur. Ancak güvenli olmaları, üretim ve uygulama avantajları nedenleri ile bu tür aşılar hızla geliştirilmiştir (Tablo 1) (13,21).

Utilins/Mycobacterium phlei F.U.36: Isı ile inaktive edilmiş *M. phlei* aşısıdır. T lenfositlerini uyarır ve IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ , makrofaj aktive edici faktör (MAF), migrasyon inhibe edici faktör (MIF) ve makrofaj sitotoksitesite faktörü (MCF) gibi sitokinler salgılar. Bu sitokinler, patojenleri ortadan kaldırmak için makrofajları, NK hücrelerini ve B lenfositlerini aktive ederler. Günümüzde Utilins'in pulmoner TB'de gösterdiği terapötik etkinin dışında astım, atopik dermatit, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tekrarlayan solunum sistemi enfeksiyonları, malign plöral effüzyon, verruka vulgaris olgularında da terapötik etkisinin olduğu gösterilmiştir (13).

Vaccae™: İnsanlarda patojen olmayan *M.vaccae*, ineklerden izole edilip inaktive edilmiş ve 1990 yılında pulmoner TB kemoterapisine yardımcı olarak kullanılmaya başlanmıştır (13,33). 1999 yılında üretilmiş ve klinikte TB adjuvan tedavisinde kullanılmıştır. Isı ile inaktive edilmiş olan *M. vaccae* (MV veya SRL-172) ile faz 3 çalışmaları yapılmıştır (13,16,21,33). Aktif TB olgularında ilaç ile tedavi süresini kısaltmak için terapötik aşı olarak kullanılan Vaccae™ ile (16,21) LTB hastalarında da immüno profilaktik etkisi nedeni ile iyi sonuçlar alınabileceği öngörülmektedir. Fagositozu kolaylaştırarak, iki yönlü immüno lojik reaksiyonları düzenleyerek ve patolojik hasarı azaltarak etkisini oluşturan (38) Vaccae™ DSÖ tarafından TB immünoterapisinde önerilmektedir (13,33).

Mycobacterium smegmatis aşısı: Non patojen bir mikobakteri olan *M. smegmatis* ile hazırlanmış inaktive bir aşıdır (21). *Mtb* ile 2000'den fazla homolog gen ve benzer hücre duvarı yapısı vardır. Ayrıca, patojen mikobakterilere ve BCG'ye göre makrofajlardan daha fazla sitokin salınımını indükleyebilir. MHCI moleküllerini arttırarak, dentritik hücrelerin olgunlaşmasını ve yine MHCI yolağı ile daha etkin bir şekilde mikobakteri antijenlerinin sunulmasını sağlar (13). Deneysel bir çalışmada fare akciğerinde bakteri yükünü çok düşürdüğü saptanmıştır (37). Yapılan faz çalışmalarında gönüllülerde hafif yan etkilerin görüldüğü, fakat bütün gönüllülerin aşığı tolere edebildikleri ve kuvvetli pozitif PPD reaksiyonu verdikleri bildirilmiştir (13).

MIP/Mw: *M. indicus pranii* (MIP) veya *M.w* non-patojen bir NTM'dir. Isı ile inaktive edilerek hazırlanan MIP aşısı lepra tedavisinde kullanılmakta iken farelerde TB enfeksiyonunu engellediği görülmüştür. MIP tedavisi ile NF- κ B aktive olmakta ve enfekte makrofajlarda proinflatuvar sitokin ve NO oluşumunu arttırarak koruyucu immün yanıt gelişimine neden olmaktadır (13). Çok sayıda yapılan deneysel çalışmalarda terapötik etkisi gösterilmiştir (33). Profilaktik aşı olarak kullanabilmesi için de çalışmalara başlandığı bildirilmektedir (39). Çok merkezli faz 3 çalışmaları yapılmış ve MIP'in güvenli olduğu, yan etkilerinin olmadığı ve mikobakterilerin ortamdaki temizlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (13). Solunum yolu mukozasından yapılan MIP aşı uygulamasının parenteral aşılama göre daha iyi bir immüno lojik yanıt oluşturduğu da belirtilmiştir (33).

RUTI®: *Mtb*'nin hücre duvarından hazırlanmış liposomal bir aşıdır (16). Hem aktif olarak çoğalan hem de

latent durumdaki basillerde bulunan antijenlere karşı kuvvetli humoral ve hücrel immün yanıt gelişmesini sağlar. Antibiyotik tedavisi ile birlikte immünoterapötik aşı olarak kullanım için üretilmiştir (16,18,21). RUTI ile yapılan bir çalışmada, mikobakteri üreme inhibisyon (MGIA) testinde mikobakteri sayısında azalma saptanmıştır (21). RUTI'nin, kemoterapisi tamamlanmış, ilaca dirençli TB li olgularda temas sonrası subkütan aşı olarak uygulanma çalışmaları yapılmaktadır (33). Aşının geliştirilerek LTb hastalarında da kullanılabilmesi düşünülmektedir (13).

DAR-901: Isı ile inaktive edilmiş NTM olan *M. obuense*'den hazırlanmış bir lipozomal aşıdır. Th1 immün yanıtını indükte etmektedir. Ayrıca, *Mtb* yükünü ve akciğerde patolojik lezyonları azaltır, yapısal ve çoğalma ile ilişkili antijenlere karşı hızlı ve kuvvetli özgül immünite gelişmesine neden olur (13). DAR-901 hem terapötik hem profilaktik aşı olarak geliştirilmiştir (16). Çalışmalarda DAR-901 aşı adayının hücrel ve humoral immün yanıtı indüklediği ve homolog BCG tekrar aşısına göre daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir (13). Ayrıca, yapılan bir faz 3 çalışmasında, DAR-901'in endemik ülkelerde, yetişkinlerde ve çocuklarda TB'yi önleyebilen etkili bir BCG güçlendirici aşı olarak kullanılacak potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (40).

Alt Birim Aşları

TB alt birim aşları, genellikle *Mtb*'den izole ve purifiye edilmiş proteinler, polipeptidler, mikolik asitler gibi bazı immün aktif yapılar içerirler (13). *Mtb* 4000 kadar protein eksprese ettiği için immün hedef olabilecek çok fazla seçenek bulunmaktadır (21). Alt birim aşlarında bulunan antijenler esas olarak, hayvan veya insan çalışmalarında immün dominant olmalarına göre ve aktif TB hastalarında ve LTb enfeksiyonlu kişilerde farklı ekspresyon profilleri oluşturan farklı antijenlerden seçilirler. Çoğu ESAT-6, MPT64, Ag85B, Ag85A gibi sekrete edilen ve hücre duvarı proteinlerinden olan hsp gibi antijenlerdir (5). Yüksek immünojenite gösteren Rv1031, Rv1198, Rv2016, Rv3874, Rv3875, Rv2031c, Rv3620, PPE39 proteinleri de kullanılabilir (21).

Aşı, adjuvan yardımı ile immün koruma veya immünoterapi etkisi yapabilmektedir (21). Çoğu aşı adayları, çoğalma defekti olan viral vektörlerden elde edilmiş veya purifiye protein/adjuvan kombinasyonu olarak uygulanırlar (37). TB alt birim aşları, genellikle profilaktik olarak, ayrıca önceden BCG aşısı yapılmış veya *Mtb* ile enfekte olmuş bireylerde temas sonrası aşı olarak geliştirilmişlerdir. BCG aşıları kişilerde ko-

runmayı arttırmak veya BCG aşısının etki süresini uzatmak amacı ile, *Mtb* ile enfekte kişilerde ise aktif TB enfeksiyon gelişmesini veya tekrarlayan enfeksiyonu önlemek amacı ile kullanılır (16,25,37).

Alt birim aşlarının T hücrelerinde devamlı immün hafıza oluşturabilmesi önemli bir avantajdır. Ancak BCG ile karşılaştırıldığında immünojenitesinin daha kısa süreli olması, hafıza immünojenitesinin zayıf olması ve adjuvanlara gereksinim duyması gibi kısıklılıkları vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bazı ilerlemeler kaydedilmeye başlanmıştır. Birden fazla protein içeren karışımlar, kimerik protein veya dominant antijenlerin epitop-tandem proteinleri, tek protein alt birim aşlarına göre daha kuvvetli bir CD4+ T hücre yanıtını indüklerler. Ayrıca, TB alt birim aşlarının immünojenite ve koruyucu etkilerini arttırmak için lipozomlar, emülsiyonlar ve virosomlar gibi yeni adjuvan veya dağıtım sistemleri geliştirilmiştir. TB alt birim aşlarının düşük maliyet, kolay hazırlanma, yüksek saflık ve güvenilirliği de diğer avantajlarıdır (Tablo 1) (13).

AEC/BC02: AEC/BC02 aşısı rekombinant füzyon proteini Ag85B-ESAT6-CFP10 (AEC) ve bir adjuvandan (BC02) oluşmuştur. Deney hayvanlarında antjene özgül uzun süreli hücrel immün yanıt, terapötik etki ve tip I hipersensitiviteyi indüklediği gösterilmiştir (13). Faz 1 çalışmalarının 2019 yılında tamamlandığı bildirilmektedir (21,39).

BCG polisakkarid ve nükleik asid enjeksiyonu (BCG-PSN): BCG'den hazırlanmış polisakkarid ve nükleik asid içeren bir immün modulatördür (21). Retikuloendotelial sistemi stimüle eder, monositler ve makrofajlar aktive olarak hücrel ve humoral immünite regüle edilir, böylece TB enfeksiyonuna karşı korunmayı sağlar. BCG-PSN, Çin'de TB'de adjuvan kemoterapisi olarak kullanılmaktadır. Kronik bronşit, soğuk algınlığı, astma olgularında da yıllardır kullanılmaktadır. Ancak uzun tedavi döngüleri, nodül oluşumu, döküntü ve hafif ateş yükselmesine neden olması gibi istenmeyen sonuçları vardır (13). Preklinik çalışmaları devam etmektedir (21).

Mtb72F: Mtb72F iki adet immünojenik proteine (Mtb32 ve Mtb39) sahiptir. AS01E veya AS02A adjuvanları ile birlikte kullanılır. Mtb72F aşısının deney hayvanlarında ayrı ayrı Mtb32 veya Mtb39 uygulamalarına kıyasla daha iyi immün yanıt oluşturduğu gözlenmiştir (13). Aşı güçlendirici, profilaktik ve temas sonrası aşısı olarak kullanılmaktadır (25). Çalışmalarda M72/AS01E aşısının hem humoral hem hücrel immün yanıtı uyardığı ve üç yıla kadar etkin

olduğu görülmüştür (16). Sağlıklı PPD pozitif bireylerde, T hücre proliferasyonu ve IFN- γ sekresyonunu stimüle eder. Yapılan klinik çalışmalarda, aşının CD8+ T hücre yanıtından ziyade kuvvetli CD4+ T hücre yanıtını indüklediği görülmüştür (13).

Kenya, Güney Afrika ve Zambia'da *Mtb* ile enfekte olmuş erişkinlerde M72/AS01E aşısı ile yapılan faz 2b çalışma sonuçlarına göre, LTb'li HIV-negatif bireylerde 2.3 yıllık takipten sonra doğrulanmış pulmoner TB'ye karşı etkinliği %54'dür. Hastalığın pulmoner TB'ye ilerlemesini birkaç yıl geciktirebilmektedir (18,41). Bir çalışmada, aşının erkeklerde (%75.2) kadınlara göre (%27.4) ve 25 yaş altındaki kişilerde (%84.4) 25 yaşından büyük olanlara (%10.2) göre daha etkin olduğu gösterilmiştir (42). Ayrıca, aşının etkinliğinin 25 yaşın altındaki kadınlarda erkeklere göre daha az olduğu bildirilmiştir (18). *Mtb* ile enfekte bireylere temas sonrası olarak uygulandığında, hastalığın ilerlemesini %50'nin üzerinde engellemesi nedeni ile önceden bakteri ile teması olan kişilere uygulanabileceği bildirilmiştir (17).

H1:IC31, H1:CAF01, H1:LTK63: Hibrid 1 (H1) *Mtb* enfeksiyonunun akut fazında sekrete edilen Ag85B ve ESAT-6 füzyon proteinlerinden oluşmuştur. H1, BCG aşısının etkinliğini arttırmak için geliştirilmiştir, LTb enfeksiyonunun reaktivasyonunu önlemez. H1'in koruyucu etkisini geliştirmek için IC31, CAF01, LTK63 gibi çeşitli adjuvanlar ile kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (13). Yapılan çalışmalarda, H1:IC31 aşısının Th1-sitokin eksprese eden CD4+ T hücre hafıza yanıtını daha fazla indüklediği (21), HIV ile enfekte erişkinlerde de güvenilir olduğu ve antijene özgül CD4+ T hücrelerini indüklediği gösterilmiştir (8).

H1:CAF01 aşısının yüksek düzeylerde IL-2 ve TNF- α salınmasını indükleyen güvenilir bir aşı olduğu bildirilmiştir. H1:LTK63 aşısının ise nazal uygulandığı klinik çalışmada, aşılardan 44 ve 60 gün sonra iki kişide periferik yüz felci gelişmesi üzerine çalışma sonlandırılmıştır (13).

H4:IC31 (AERAS-404): Aşı Ag85B, TB10.4 (H4) proteinleri ve IC31 adjuvanından oluşmuştur (13, 25). Faz 1 klinik çalışmalarda, IFN- γ ve multifonksiyonel CD4+ Th1 yanıtını uyardığı ve kabul edilebilir düzeyde güvenli olduğu görülmüştür. Faz 2 çalışmalarında 15 μ g dozun optimal immün yanıtı indüklediği saptanmıştır (13). Neonatal BCG aşısı yapılmış, kuantiferon negatif adolesanlarda yapılan çalışmada, hem H4:IC31 aşısı uygulanan grup hem de BCG tekrar aşılması yapılan grupta başlangıç QFT konver-

siyonunun engellenmediği gözlenmiştir. BCG tekrar aşılmasının sürekli QFT konversiyon oranını düşürmede (%45.4), H4:IC31 aşısına göre (%30.5) daha etkin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma BCG tekrarına ilgiyi yeniden gündeme getirmiştir (23).

H56:IC31 (AERAS-456): Aşı, Ag85B, ESAT-6, LTb ile ilişkili Rv2660c antijenlerini ve IC31 adjuvanını içermektedir (25). Aşının hem aktif, çoğalan hem de dormant basillere karşı Th1 immünesini indüklediği gösterilmiştir (33,41). Profilaktik, temas sonrası ve terapötik olarak kullanılması amaçlanmıştır (25). Deney hayvanlarında doğal ve kazanılmış immüneyi indüklemektedir (21). Aşı, hayvan deneylerinde temas sonrası olarak uygulandığında, reaktivasyonu engellemekte ve bakteri yükünü belirgin şekilde azaltabilmektedir. Klinik çalışmalarda aşının güvenli olduğu ve antijene özgül IgG yanıtını ve Th1-sitokin eksprese eden CD4+ T hücrelerini indüklediği gözlenmiştir (13). Aşının faz çalışmaları devam etmektedir (13, 41).

ID93CGLA-SE: Aşı *Mtb*'nin virülans ile ilişkili üç antijenini (Rv2608, Rv3619 ve Rv3620), latentlik ile ilişkili bir antijenini (Rv1813) ve GLA-SE adjuvanını içermektedir. Aşı CD4+ T hücrelerini stimüle ederek yüksek düzeyde Th1-sitokin salgılanmasına neden olur, BCG aşı ve aşısız deney hayvanlarında TB'ye karşı koruma sağlar. ID93CGLA-SE aşısının W-Beijing suşu (*Mtb* HN878) ile oluşan enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabileceği bildirilmektedir. Bu korumayı da bakteri yükünü ve akciğer harabiyetini azaltarak, uzun süreli Th1 immünesini indükleyerek yapabildiği düşünülmektedir. Klinik çalışmalar aşının kabul edilebilir güvenlikte olduğunu göstermekte olup, çalışmalar halen devam etmektedir (13,41). Ayrıca, terapötik aşı olarak intramuskuler uygulama ile primatlarda tedavide etkili bulunmuştur (33).

Rekombinant Aşılar

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen aşılar rekombinant aşılar olarak adlandırılır (43). *Mtb*'ye ait bir antijeni kodlayan DNA parçasının çıkarılması, bakteri, maya, memeli hücresi gibi bir vektöre transferi ve gen ürünü antijenik proteinin ekspresyonunun sağlanmasıdır. Sonuçta vektör, antijeni fazla miktarda üretir (21). Rekombinant aşılar, *Mtb* antijenlerini eksprese edecek organizmalara göre: mikobakteriyal (*M. bovis*, *M. vaccae*, *M. smegmatis*, BCG), bakteriyal (*Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Streptococcus mitis*) ve viral (*Vaccinia virus Ankara*, *Adenovirus*, *Sendaivirus*, *Influenza virus*) aşılar olarak gruplandırılmışlardır (13,21).

Vektörler, konakta *Mtb* koruyucu antijenleri, sitokinler [örneğin; IFN- γ , IL-2, IL-15, IL-18, Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)] veya apoptotik faktörlerin (Bcl-2 protein ailesi BAX geni) eksprese edilmesini sağlar. Bu canlı aşular adjuvan ve taşıyıcı fonksiyonların yanında eksojen antijen özelliğe de sahiptirler. Tek doz uygulama ile TB'ye karşı spesifik, kuvvetli ve persistan humoral ve hücrel immün yanıtı indüklerler (Tablo 1) (13).

Rekombinant mikobakteriyal aşular:

rBCG30: *M. bovis* BCG, bilinen en kuvvetli immün adjuvanlardan olup, emniyetli, stabil olması ve persistan non-spesifik immün stimülasyon sağlaması nedenleri ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Rekombinant BCG (rBCG) aşuları birinci aşı olarak düzenlenmişlerdir (13). Mevcut olan antijenlerini veya yeni *Mtb* antijenlerini daha fazla eksprese etmeleri amacı ile BCG'ye yeni genler dahil edilir veya T hücre immünesini arttırmak için BCG modifiye edilir. Bu şekilde oluşturulan rekombinant BCG suşlarının, kazanılmış immüneyi indükleyerek koruyucu immüneyi oluşturabilecekleri düşünülmektedir. Pediatrik aşı olarak BCG'nin kullanılmasına devam edilirken, BCG'yi güçlendirme amacı ile yeni aşı çalışmaları yapılmaktadır (14). rBCG30 (BCG Tice veya Conn parental suşu) *Mtb*'nin proteini olan Ag85B'yi fazla eksprese etmektedir. Hayvanlarda TB'ye karşı yüksek koruma sağlayan ilk rBCG aşısıdır. Faz I çalışmaları tamamlanmış, sağlıklı bireylerde immünojenitesi gösterilmiş, ciddi bir yan etkisi gözlenmemiştir. Ancak antibiyotik direnç geni saptandığı için çalışmalar durdurulmuştur (13).

VPM1002 (rBCG Δ ureC::hly): Bu aşıda, üreaz C geni, *Listeria monocytogenes*'de bulunan fagozomal membranı perfore eden listeriolizin O (LLO) kodlayan gen (hly) ile değiştirilmiştir. Dolayısı ile VPM1002, LLO salgılayarak mikobakteriyal antijenleri ve DNA'yı sitozole yönlendirir. Sonuçta, antijene özgül CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin yapımı artar ve otofaji, inflamazom aktivasyonu ve apoptoz indüklenir (13,44). Çalışmalarda VPM1002 aşısının immün yetmezlikli fare, kobay, tavşan ve insan harici primatlarda Th1- ve Th17-sitokin yanıtlarını indükleyebildiği ve BCG'den daha etkili ve güvenli olduğu gösterilmiştir (5,13). Birçok antijene immün yanıt uyandırabildiği için, sınırlı sayıda antijene immün yanıt oluşturan alt birim aşularına göre daha avantajlıdır. Ancak bu tür canlı aşular BCG'de belirtilmiş olduğu gibi önceden NTM ile karşılaşmış bireylerde interferansa neden olabilirler (25). Hindistan'da

balgamda ARB pozitif olan pulmoner TB hastalarından ev halkına bulaşım engellenebilmesi amacı ile VPM1002 ve Immunovac/MIP ile aşı çalışmaları yapılmaktadır (39).

BCG aşısının yerini alması amacı ile ve ayrıca TB tedavisinden sonra aktif TB'nin rekürrensini önlemek için immünoterapötik olarak tasarlanmıştır ve geliştirilmekte olan aşı adaylarından en çok çalışılanıdır (18,25). Ayrıca, bu aşı BCG'ye alternatif olarak mesane kanseri immünoterapisinde kullanılmıştır. Sonuçlar aşının IFN- γ üreten multifonksiyonel T hücreleri veya antikor üreten B hücrelerini stimüle edebildiği-ne işaret etmektedir (13).

AERAS-422 (rBCG::Ag85A-Ag85B-Rv3407): *Mtb*'nin üç immüno-dominant antijenini (Ag85A, Ag85B, ve Rv3407) kodlayan bir plazmid içermektedir. Ayrıca, *Clostridium perfringens*'in perfringolysin O (PFO) proteinini kodlayan pfo geninin bir modifikasyonunu da taşımaktadır. Aşı, insan CD8+ T hücrelerinde iyi bir immün yanıt oluşturmaktadır. Ancak iki yetişkin gönüllüde çok ağırlı zona gelişince AERAS-422 aşısının çalışmaları durdurulmuştur. Zona gelişiminin hastalarda latent fazda bulunan *herpes zoster* virüsünün PfoA lizozimi ile aktivasyonu sonucu gelişmiş olabileceği görüşüne varılmıştır (13).

M. smegmatis: Rekombinant aşı vektörü olarak düzenlenmiş ve Ag85C-MPT51-HspX, Ag85B epitoplari, *esx-3*, ESAT-6-CFP10, Ag85B-ESAT-6 gibi *Mtb*'ye özgül antijenik proteinleri eksprese ederler (13,28), *M. smegmatis*, *Mtb*'ye göre inflamatuvar sitokinlerin nötrofillerden daha fazla salınmasına neden olur (28). Hayvanlarda immünojenik ve koruyucu özellik göstermişler, fare ve sığırlarda zararlı etki oluşturmamışlardır (13).

M. vaccae: Bir diğer aşıda *M. vaccae*, rekombinant aşı vektörü olarak kullanılmış ve bu aşıda *Mtb*'ye özgül MPT64 proteini eksprese edilmiştir. Farelerde yüksek titrede özgül IgG ve Th1-sitokin yapımını ve sitotoksik T lenfosit etkisini indüklediği ve sonuçta TB'ye karşı ideal koruma sağladığı gösterilmiştir (13).

Rekombinant bakteriyal aşular: Başka bakteriler ile de rekombinant aşı çalışmaları yapılmaktadır. Pnz8149-ag85a/NZ3900 aşısı *Mtb* Ag85A antijenini eksprese eden canlı bir rekombinant *Lactococcus lactis* aşısıdır (21). Farelerde intragastrik yoldan uygulanan aşı lokal mukozal immüneyi indükleyerek daha yüksek düzeyde özgül SIgA salgılanmasına neden olmuştur (13). Bu aşı çalışması henüz prelinik aşamadır (21).

Başka bir aşı ise *Mtb* protein Ag85B eksprese eden rekombinant *Streptococcus mitis* aşısıdır. Deney hayvanlarında oral kolonizasyon sonucunda oral ve sistemik anti-Ag85B spesifik IgA ve IgG antikorları saptanmıştır (13).

Rekombinant Viral Aşılari

Viral vektörler, antijen kodlayan genleri konak hücreye sokarlar. Bu tür aşılari, immün yanıt oluşturmak için *Mtb*'nin özel antijenlerini kodlayan gen parçalarını içerirler. Rekombinant viral vektör temelli canlı vektör aşılari, antijenden bağımsız olarak CD4+ ve CD8+ Th1-immün yanıtı indükleyerek efektör T hücrelerini uyaran ve en fazla immünojen olan aşılari arasındadır (5,16). Viral bazlı aşılari, antijenlerin hücre içinde üretilip doğal immün sistemin uyarılmasını sağlarlar. İmmün yanıtı arttıran kuvvetlendirici aşı olarak da kullanılabilirler. Kuvvetli immün yanıt uyarmaları için adjuvanlara gereksinimleri yoktur. Profilaktik ve temas sonrası aşısı olarak üretilmektedirler. Viral vektörlü aşı uygulamalarında vektöre karşı immünite gelişebildiği için sonraki uygulamalarda yeterli etkiyi oluşturamayabilirler (16).

Yeni viral vektör aşılari aynı zamanda hem çoğalan hem de dormant bakterilerin antijenlerini içermeleri nedeni ile, daha geniş ve farklı evrelerdeki antijenlere özgül immün yanıtı uyarırlar (5). Genetik mühendisliği kullanılarak yapılan diğer aşılari oranla daha büyük gen parçalarını taşıyabilirler. Ayrıca, güvenli olmaları, kolay üretilibilmeleri yanı sıra fiyat açısından da avantajlıdır. Buna karşılık, virüs kullanılan rekombinant aşılari, virüslerin virülanslarını geri kazanabilmeleri, virusa karşı immünite oluşabilmesi gibi nedenler ile sonraki uygulamalarda istenilen sonuçların alınamayabilir (16). Bunların yanında, adjuvan protein aşılari oranla daha az merkezi hafıza T hücresi (TCM) indüksiyonu yapmaları (5) ve taşıdıkları yabancı gen ekspresyonundaki kararsızlık gibi istenmeyen durumları da içermektedirler (13,16,21).

Viral vektör aşı geliştirilmesi aşamasında birkaç aday bulunmaktadır. Aşılarda vektör olarak; attenüe, replikasyon defektli poxvirus grubundan modifiye *vacinia Ankara virusu* (MVA), insan/şempanzeye özgül *adenovirus*, *sitomegalovirus*, *H1N1 influenza virusu* (18) ve *Sendai virus* (13) kullanılmaktadır.

MVA85A (AERAS-485): Aşı, *Mtb* 85A antijenini eksprese eden bir rekombinant MVA suşudur. Hayvan deneylerinde humoral ve hücrel immün yanıtları stimüle edebilmektedir (38). Kuvvetli CD4+ T hücre yanıtı uyandıran güvenli ve uygulanabilir bir aşı olduğu bildirilmiştir. BCG ile aşılanmış iki

aylık bebeklerde yapılan bir çalışmanın sonuçları, MVA85A aşısının iyi tolere edilebilen ve ılımlı immünojenik olduğuna işaret etmektedir. Ancak yan etkiler ve güçlendirilmiş immünizasyon açısından uygulamadan iki yıl sonra BCG+CMVA85A ile immünize edilmiş grup ile, sadece BCG ile immünize edilmiş grup arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Yalnız BCG ile immünize edilmiş grupta korunma daha iyi olup, 10-15 yıl sürmekte iken, MVA85A aşısı ile güçlendirilmiş koruma etkisi yeni doğanlarda iki yıllık sürede gözlenememiştir. Aşının sadece tek inokülasyonda etkin olduğu, bebeklerde tekrar aşılamaya uygun olmadığı, yetişkinlerden farklı bir immün yanıt oluştuğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir (13). MVA85A'nın insanlarda yeni enfeksiyonları da engelleyemediği ayrıca hayvan deneylerinde aşının IFN- γ üreten CD4+ T hücrelerini arttırdığı ancak koruma oluşturmadığı gösterilmiştir (19).

ChAdOx1.85A: ChAdOx1.85A *Mtb* protein Ag85A eksprese eden bir *simian adenovirus* aşısıdır. Hayvan deneylerinde immün yanıtı arttırdığı gözlenmiştir (13). CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtını akciğerler ve dalakta arttırdığı gözlenmiştir. Ancak farelerde aerosol TB enfeksiyonuna karşı korumada yetersiz kalmıştır. Güçlendirici olarak MVA85A aşısı uygulandığında BCG aşısının immünojenitesini ve koruyucu etkisini arttırdığı gözlemlendiği için, kombine ChAdOx1.85A ve MVA85A aşılari mukozal yoldan uygulanarak çalışmalar yapılmaktadır (38).

Ad35/AERAS-402: AERAS-402 replikasyon defektli rekombinant *adenovirus* (rAd) tip 35 aşısıdır. Bu aşı, füzyon proteini Ag85A, Ag85B ve TB10.4.'ü eksprese etmektedir. Klinik çalışmalarda ilk aşı olarak BCG uygulamasından sonra AERAS-402 uygulanmış, CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtlarının arttığı sonucuna varılmıştır. Pulmoner TB tedavisi görmüş yetişkinlerde yapılan bir klinik çalışmada ise kuvvetli CD8+ ve orta düzeyde CD4+ T hücre yanıtı uyardığı saptanmıştır (13).

Ad5Ag85A: İnsan *adenovirus* serotip 5 aşısı olup, mikobakteriyal Ag85A antijenini eksprese etmektedir. Klinik çalışmalara başlanılmış olup, HIV-negatif bireylerde güvenli, iyi tolere edilebilen ve immünojen olduğu görülmüştür (39). BCG aşıli kişilerde kuvvetli multifonksiyonel T hücre yanıtı gözlenmiştir (38). Profilaktik olarak hem parenteral hem solunum mukozası yolundan uygulanan çalışmalar yapılmıştır. Faz 1 çalışmaları devam etmektedir (39).

TB/FLU-04L: TB/FLU-04L, *Mtb* Ag85A ve ESAT-6 antijenlerini eksprese eden canlı rekombinant *inf-*

luenza A virus aşısıdır. BCG'den sonra uygulanacak güçlendirici aşı olarak düzenlenmiştir. Fare deneylerinde intranazal uygulama ile BCG'nin koruyucu etkisini attırdığı gözlenmiştir (13). 28-50 yaş arasında yapılan faz 1 çalışmalarda, sublingual ve intranazal uygulamaların güvenli ve tolere edilebilir olduğu bildirilmiştir (39).

CMV-6Ag: Aşı 6 veya 9 TB antijeni içermekte olup, aşılandıktan bir yıl sonra makak maymunlarında oluşturulan deneysel enfeksiyona karşı %41 koruyucu olduğu gösterilmiştir. Koruyucu etki mekanizması henüz tam olarak bilinmemekle birlikte (18), muhtemel etki mekanizması diğer pek çok aşından farklı olarak, devam eden antijen ekspresyonu sonucu akciğerler dahil olmak üzere bütün organlarda bulunan efektör T hücrelerini indükleyerek devamlı yerine konulması şeklinde açıklanabilmektedir. Çoğu T-hücre hedefli aşılar uzun süreli merkezi hafıza T hücresi yanıtını indüklerler (45). *Sitomegalovirüs* temelli, RhCMV/TB olarak adlandırılmış yeni bir aşının CD4+ ve CD8+ hafıza T hücre yanıtlarını indükleyebileceği ve hem pulmoner hem ekstrapulmoner TB olgularında *Mtb* yükünü azaltabileceği bildirilmiştir (13).

DNA Aşıları

DNA aşıları, bir patojenden elde edilmiş antijenik proteinleri kodlayan DNA plazmidini içerirler (43). Plazmidler, enfekte ettikleri konak hücresinde mikrobiyal antijenleri eksprese ederler, humoral ve hücrel immün yanıt oluşmasını indüklerler (46). Genel olarak, TB DNA aşılarının *Mtb* koruyucu antijenlerini eksprese ettikleri ve MHCI veya MHCII molekülleri tarafından tanınarak koruma sağlayacakları kabul edilmektedir (12,13,46). Bu temele göre, DNA aşıları özgül sitotoksik T lenfosit yanıtını stimüle ederek enfekte hücreleri öldürür ve hücre içi patojeni ortadan kaldırır (13). DNA aşılarının spesifik IgG düzeylerini arttırarak kuvvetli bir immün yanıt oluşturduğu belirtilmektedir. Ag85B ve MPT64 antijenlerini kodlayan divalen DNA aşısının, BCG'den daha fazla humoral ve Th1 hücrel yanıtını uyardığı gösterilmiştir (47). Mikobakteri antijenlerini kodlayan plazmid DNA ile immünizasyon sonucu, farelerde saptanan güçlü Th2 yanıtı, artmış IL-2 ve IFN- γ düzeyleri immün yanıt oluştuğunun bir göstergesidir. DNA aşıları birden fazla antijeni, immünomodülatör sitokinleri kodlayabilirler ve bu özellikleri ile daha etkin hale gelirler (47). IFN- γ veya IL-12'yi kodlayan genlerin birlikte kullanılması ile DNA aşılarının etkinliğinin daha da artacağı öne sürülmektedir (13).

En sık kullanılan antijenler, proteinler: Ag85A, Ag85B, hsp65, hspX, ESAT-6, CFP-10'dur (46,47). Klinik öncesi çalışmalar, DNA aşılarının immünojenitesi, koruyuculuğu ve terapötik etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmalarda kullanılan DNA aşıları; hsp65 DNA aşısı, hsp70 DNA aşısı, ag85a DNA aşısı, ag85b DNA aşısı, ag85a/TB10.4 kimerik DNA aşısı, fosfat-spesifik transport sistem (pstS) DNA aşısı, mpt64 DNA aşısı, ve pIRES-IL-21-ag85a-esat-6 DNA aşılarıdır (46).

ESAT-6 ve CFP-10, doğal ve kazanılmış bağışıklığı stimüle eden virülans ile ilgili antijenlerdir. ESAT-6'nın inaktive edilmesi *Mtb*'nin virülansını belirgin olarak azaltır. ESAT-6, hsp70, Ag85A kodlayan çoklu epitop DNA aşısının farelerde artmış IgG düzeyine ve IFN- γ stimülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (47). Bir diğer çalışmada, enfeksiyonun latent, akut ve kronik evrelerinde CD4+ ve CD8+ T hücreleri tarafından eksprese edilen immüno dominant antijenler kullanılarak çoklu epitop DNA aşısı ve BCG aşısının birlikte kullanılması ile IFN- γ and TNF- α salınımının arttığını göstermişlerdir. Bu verilerin ileride TB ye karşı koruyuculuğu arttırmada etkin olabileceğini öne sürülmüştür (48).

Farelerde yapılan bir deneysel çalışmada, Ag85B-ESAT-6-HspX kodlayan bir DNA aşısının yüksek immünoite ve daha iyi bir koruyuculuk geliştirdiği gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan bazı çalışmalarda hspX yüksek düzeyde IFN- γ salınımını indüklemiştir. Ayrıca, LTB'li hastalarda hspX antijenine karşı anti-kor sentezlendiği görülmüştür. Nanopartikül temelli, ESAT-6 içeren DNA aşısının farelerde artmış T hücresi yanıtına, ayrıca artmış immünojenik ve koruyucu etkiye neden olduğu gösterilmiştir (46).

Adjuvan olarak; alum, polisakkaridler, yağ emülsiyonları, lipozomlar ve polimer temelli nanopartiküller, ayrıca sitokin ve kemokin başta olmak üzere çeşitli moleküller kullanılmaktadır (46). VR 1020, pmTOR-KD gibi plazmidler de kullanılmaktadır (47). Katyonik lipozom içinde uygulanan hsp65 DNA aşısının etkinliği intranazal uygulamada intramüsküler uygulamaya göre daha etkin bulunmuştur (49). Beş adet antijen epitopu (MTB10.4, ESAT-6, Ag85B, PPE25, PE19) içeren nanopartikül DNA aşı adayının farelere intranazal uygulandığı başka bir çalışmada, akciğerlerde kuvvetli hücrel ve IgA yanıtının indüklendiği gösterilmiştir. Bu aşı pulmoner TB'ye karşı korunmayı attırmıştır (46). DNA aşılarının etkileri, muhtemelen DNA aşılarının uyardığı immün yanıt sonucu \dot{C} İD *Mtb*'nin öldürülmesi nedeni ile \dot{C} İD *Mtb*'den etkilenmemektedir (13).

Günümüzde klinik çalışma aşamasında olan tek DNA aşısı GX-70 aşısıdır. Dört antijen plazmidi içermektedir fakat aşı hakkında detaylı bilgi yoktur (13).

DNA aşılarının, güvenli olmaları, sadece hedef antijeni kodladığı için hastalık oluşturan forma dönmemeleleri, genelde vektöre karşı immünite oluşmaması, ilk ve kuvvetlendirici aşı olarak uygulanabilmeleri avantajlı yönleridir. Genellikle konak genomuna entegre olmadığı, otoimmünite veya antijen toleransının gelişmediği, yeni doğanlara da uygulanabilir olduğu bildirilmektedir. Ancak viral vektörlerin virüslarını geri kazanabilme potansiyeli, kuvvetli immünojenik reaksiyonlar, virusa karşı gelişebilecek immün yanıt gibi uygulamayı kısıtlayabilecek özellikleri mevcuttur. Bazı vektörler kullanıldığında, konak kromozomuna entegrasyon ve antijen toleransı gelişebilmektedir (46). DNA aşıları tarafından eksprese edilen mikroproteinler, aşılanmış bireylerde oluşturdukları immün yanıtı canlı aşılarla göre daha az uyarırlar. Bunun nedeni muhtemelen canlı aşılar kadar replike olamamalarıdır (13). DNA aşılarında antijen ve kombinasyonlarının optimize ve standardize edilmeleri, immün yanıt ve immünojenitesinin geliştirilmesi ve güvenilirliklerinin artırılması konularında çalışmalar yapılmalıdır (13,46).

TB DNA aşıları konvansiyonel aşılarla göre daha güvenli, etkili ve düşük maliyetlidir (13). Sadece vektör olan plazmide klonlandığı için üretimi kolay, hızlı, ucuzdur (46). Hedef olan patojenin üretilmesine gerek yoktur (47). Oda ısısında stabildir, "soğuk zincir"e gereksinim yoktur. Transmukozal, intramusküler, subkütan, intradermal gibi çeşitli uygulama yolları vardır. Uygulamada gen tabancası, enjeksiyon, mikroigne, elektroporasyon, bakteriler, viral vektörler, nanopartiküller, lipozomlar, virozomlar gibi farklı sistemler kullanılır (Tablo 1) (46).

AŞILARIN UYGULANMA YOLLARI

Yeni aşı çalışmaları, sadece aşı yapımında değil uygulanma yollarında da yeni bakış açılarını gündeme getirmiştir. Uygulama kolaylıkları, immün yanıt oluşturmada farklılıkların olabilme ihtimali gibi olasılıklar nedeni ile çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. İntravenöz, intradermal, oral ve solunum yolu gibi çeşitli aşı uygulamaları üzerinde çalışılmaktadır.

Bazı araştırmacılar, yeni aşı adaylarını denemek yerine BCG'nin yeni yollardan uygulanmasını araştırmaktadırlar. İnsan harici primat deneylerinde, intravenöz yoldan uygulanan BCG'nin intradermal uygulanan BCG'ye göre *Mtb* enfeksiyonuna karşı daha iyi koruduğunu bildirilmiştir. Ancak düşük ve orta gelirli top-

lumalarda yeni doğanlara intravenöz uygulama kolay görülmemektedir (16,42). İntravenöz ve intradermal uygulamalarda immün yanıtın kalitatif veya kantitatif olarak farklı indüklenip indüklenmediği henüz bilinmemektedir (42). BCG aşısının, intravenöz uygulanması sonucu, intradermal ve aerosol uygulamalara göre akciğerlerde çok daha fazla T hücre infiltrasyonu görülmektedir. Aşılanmadan altı ay sonra hayvanların *Mtb* ile karşılaşması sonucunda uzun ömürlü T hücrelerinin hâlâ görülebilmemesinin enfeksiyon ile hemen aktive olup, çok fazla efektör T hücrelerinin yapılmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu artışın intravenöz aşılama ile akciğerlere daha yüksek dozda BCG'nin ulaşabilmesine dayandırmışlardır (16).

İntramusküler adenoviral vektör aşılardan sonra MVA aşısının uygulanmasının umutlandırıcı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (5). Profilaktik aşılamada iyi sonuçlar elde edilen H56:IC31 ile terapötik amaç ile intramusküler uygulama çalışmaları da yapılmaktadır (33).

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalara göre aşının doğrudan solunum mukozasına uygulanması, doğal enfeksiyon yolunu taklit ettiği için intradermal veya intramusküler uygulamadan daha fazla koruyuculuk sağlayabilir. Akciğer parankimindeki antijene özgül T hücreleri korunmada önemli rol oynamaktadır. Solunum yolundan yapılacak uygulamanın parenteral immünizasyona üstün olup olmadığı araştırılmalıdır. Bir diğer uygulama yolu endobronkiyal uygulamadır. Primatlarda tekrarlanan düşük doz *Mtb* enfeksiyon modelinde, endobronkiyal BCG uygulamasının TB'ye karşı önemli derecede koruma sağladığı ve bakteriye özgül ESAT-6-CFP-10 protein stimülasyonu ve IFN- γ salgılandığı bildirilmiştir (42). Aşıların aerosol olarak uygulandığı çalışmalar da yapılmaktadır. Tek veya kombine uygulanabilecek aerosol aşıların kullanımları ile ilgili çalışmalar hız kazanmaktadır. Yakın zamanda insanlarda yapılan iki çalışmada, aerosol olarak yüksek doz BCG uygulanmasının iyi tolere edilebildiği, ayrıca aerosol MVA85A ve aerosol adenoviral vektör aşılarının birlikte uygulanmasının da planlandığı bildirilmiştir (5). Adenoviral vektörler, solunum yolu epiteline olan tropizimleri nedeni ile çalışmalarda intranazal yoldan da uygulanmaktadırlar (17,49).

Oral aşılama, komplians açısından kolaylık sağlamakta ve uzak mukozal bölgelerde immün yanıtı indükleyebilmesi açısından avantajlı bir yol olarak da görülmektedir. Ancak mide asiditesinden etkilenmesinin sağlanması ve tolerans gelişme riskine karşı adjuvan ilavesinin gerektiği bildirilmektedir (49).

Preklinik çalışmalarda yeni aşıların intratrakeal uygulamalarında serum IgA düzeylerinde artış göz-

lenmiştir. IgA düzeylerindeki artış *Mtb*'ye karşı artmış korunma ile ilişkili bulunmuştur. İntratrakeal aşılamaya göre havayollarında ve interstisyumda CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde daha fazla artışa neden olmuştur (36). Aşıların antijen sunan hücreler tarafından daha etkin bir şekilde alınabilmeleri için, lipozom, virüs benzeri partiküller ve nanopartiküllerin kullanılmaları gibi farklı uygulama yaklaşımları da bulunmaktadır (49).

SONUÇ

Her yaş grubunun aktif ve latent fazlar dahil TB enfeksiyonunun bütün formlarına karşı etkin, kuvvetli, uzun süreli hücrel ve humoral immün yanıt oluşturan, güvenilir bir aşı üretilmesi gerekliliği ortaya konmuştur. Bunu başarabilmek için, *Mtb*'nin patogenezi ve immün korunma mekanizmalarının açıklığı kavuşturulması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu, konağın immün yanıtına ait elde edilen yeni veriler, yeni aşı çalışmalarının yoğun bir şekilde yürütülüyor olması koruyucu ve uzun süreli hafıza immün yanıtı oluşturabilecek aşıların geliştirilebileceği umidini vermektedir.

Başarılı bir aşılamaya için aşılamaya stratejileri de önemlidir. Aşıların kombine edilerek uygulanması ile yüksek etkinlik sağlayan ve uluslararası klinik uygulamaları başlatabilecek yeni bir aşılamaya stratejisi oluşturulabilir. Yeni aşıların geliştirilmesinde büyük sayıda gruplar ve uzun süreli takiplere gereksinim vardır. Yüksek TB prevalansı olan ve yaygın BCG uygulanan ülkelerde yeterli sayıda örnek bularak saha çalışması yapmak zordur. Bu nedenlerden dolayı ileride yapılacak çalışmalarda, yeni aşı tipleri ve uygulanma sıraları, uygulama aralıkları ve kaç sefer uygulama yapılacağı gibi noktalara da odaklanılmalıdır (13). Aşı uygulamalarının toplumun özelliklerine göre yapılmasının uygun olacağı belirtilmiştir. Yaşlı gruptaki TB olgularının çoğunun eski TB enfeksiyonunun reaktivasyonu sonucu geliştiği ve 60 yaş üstü kişilerin aşılanmasının TB insidansını azaltmada etkili yol olarak görüldüğü belirtilmiştir. En hızlı global epidemiyolojik etkinin de adolesan ve yetişkinleri aşılamakla ilişkili olduğu bildirilmiştir (18). Yeni antijenler, adjuvanlar, aşı kombinasyonları, teknolojik gelişmeler (nanopartiküller vb.) gibi çeşitli olanakların kullanılması, TB'yi önleyebilecek etkili aşıların üretilerek TB morbidite ve mortalitesini %90 ve %95 azaltma hedefine ulaşmaya katkıda sağlayacaktır. Ancak, TB'yi önleme ve tedavi maliyeti DSÖ'ye göre 2020 yılı için 12.3 milyar dolar olarak hesaplanmıştır. Harcamaların bu kadar fazla olmasının muhtemel en büyük nedeni ÇİD-TB ve HIV-TB koenfeksiyonlu hasta sayılarının gittikçe artması ve normal TB hastala-

rına göre harcamaların 10 kat kadar daha fazla olmasıdır. TB düşük gelirli toplum hastalığıdır, maliyetin yüksek olması da TB'ye karşı mücadelede gelişmekte olan ülkelerin engeli olarak karşımıza çıkmaktadır (13). TB aşı çalışmalarına 2017 yılında 74 milyon dolar bütçe ayrılmışken, sıtma aşı çalışmalarının bütçesi 174 milyon dolar, HIV aşısı çalışmalarının bütçesi ise 700 milyon dolardı. Yeni aşı geliştirme çalışmaları ve bunları ürün haline getirmek oldukça yüksek maliyetlidir. Maalesef fonlar yeterli olmadığından, mali kaynak bulmak gereksinimi ortaya çıkmaktadır (2).

2020 yılında zengin, fakir bütün ülkeleri etkisi altına alan Covid-19 pandemisinde şimdiye kadar görülmemiş kısa bir sürede ve hızla yeni aşıların üretilmeleri ve toplumlara uygulandığı göz önüne alındığında, Covid-19 tecrübelerinden faydalanarak genellikle henüz gelişmemiş ve sosyoekonomik düzeyi düşük toplumlar için çok önemli bir enfeksiyon olan TB'ye karşı da aşıların artık üretilebileceğini beklemek uzun vadeli bir hedef değildir. Bugünkü durumda BCG aşı uygulamasına devam edileceği ve en kısa süre içinde yeni aşıların kullanıma sunulacağı beklentisi artmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Olesen OF, Abdullah F, Coppens R, et al. New hope for tuberculosis vaccines. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:687-688.
2. Vekemans J, O'Brien KL, Farrar J. Tuberculosis vaccines: Rising opportunities. *PLoS Med*. 2019;16(4):e1002791.
3. Tezol Ö, Kuyucu N. BCG ve Yeni TB Aşıları. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2016;12:97-104.
4. Scriba TJ, Netea MG, Ginsberg AM. Key recent advances in TB vaccine development and understanding of protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*. 2020;50:101431.
5. Zhu B, Dockrell HM, Ottenhoff THM, et al. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. *Respirology*. 2018;23(4):359-368.
6. Koç NA. BCG Aşısı ve Yerine Gelecek Yeni Yaklaşımlar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2014;44:123-131.
7. Yüce A, Şener A: Akciğer TBu. İç:Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, ed. *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2017:810-27.
8. Dockrell HM. Towards new TB vaccines: What are the challenges?. *Pathog Dis*. 2016;74:ftw016.
9. Basu Roy R, Whittaker E, Seddon JA, Kampmann B. Tuberculosis susceptibility and protection in children. *Lancet Infect Dis*. 2019;19:e96-e108.
10. Kumar J, Meena J. Demystifying BCG Vaccine and COVID-19 Relationship. *Indian Pediatr*. 2020;57:588-589.
11. Behr MA, Divangahi M, Schurr E. Lessons From Bacille Calmette-Guérin for SARS-CoV-2 Vaccine Candidates. *J Infect Dis*. 2021;223:189-191.

6. BCG'nin Salтанatı Bitiyor mu? Yeni Aşı Arayışları

12. Bhargava S, Choubey S, Mishra S. Vaccines against tuberculosis: A review. *Indian J Tuberc.* 2016 Jan;63(1):13-8.
13. Gong W, Liang Y, Wu X. The current status, challenges, and future developments of new tuberculosis vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2018;14:1697-1716.
14. Izzo AA. Tuberculosis vaccines - perspectives from the NIH/NIAID Mycobacteria vaccine testing program. *Curr Opin Immunol.* 2017 Aug;47:78-84.
15. Redelman-Sidi G. Could BCG be used to protect against COVID-19? *Nat Rev Urol.* 2020;17:316-317.
16. Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci.* 2020; 252:117594.
17. Brazier B, McShane H. Towards new TB vaccines. *Seminars in Immunopathology (2020)* 42:315-331.
18. Stockdale L, Fletcher H. The Future of Vaccines for Tuberculosis. *Clin Chest Med.* 2019;40:849-856.
19. Ernst JD. Mechanisms of *M. tuberculosis* Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. *Cell Host Microbe.* 2018;24:34-42.
20. Borgers K, Ou JY, Zheng PX, et al. Reference genome and comparative genome analysis for the WHO reference strain for *Mycobacterium bovis* BCG Danish, the present tuberculosis vaccine. *BMC Genomics.* 2019;20:561.
21. Whitlow E, Mustafa AS, Hanif SNM. An Overview of the Development of New Vaccines for Tuberculosis. *Vaccines* 2020;8:586.
22. Syggelou A, Spyridis N, Benetatou K, et al. BCG Vaccine Protection against TB Infection among Children Older than 5 Years in Close Contact with an Infectious Adult TB Case. *J Clin Med.* 2020; 9: 3224.
23. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, et al. Prevention of *M. tuberculosis* Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. *N Engl J Med.* 2018;379:138.
24. Fritschi N, Curtis N, Ritz N. Bacille Calmette Guérin (BCG) and new TB vaccines: Specific, cross-mycobacterial and off-target effects. *Paediatr Respir Rev.* 2020; 36:57-64.
25. Andersen P, Scriba TJ. Moving tuberculosis vaccines from theory to practice. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:550-62.
26. Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020; 117:17720-6.
27. Franco AR, Peri F. Developing New Anti-Tuberculosis Vaccines: Focus on Adjuvants. *Cells.* 2021;10:78.
28. Junqueira-Kipnis AP, Trentini MM, Marques Neto LM, Kipnis A. Live Vaccines Have Different NK Cells and Neutrophils Requirements for the Development of a Protective Immune Response Against Tuberculosis. *Front Immunol.* 2020;11:741.
29. Ahmad S, Bhattacharya D, Kar S, et al. Curcumin Nanoparticles Enhance *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Efficacy by Modulating Host Immune Responses. *Infect Immun.* 2019;87:e00291-19.
30. Khader SA, Divangahi M, Hanekom W, et al. Targeting innate immunity for tuberculosis vaccination. *J Clin Invest.* 2019;129(9):3482-91.
31. O'Neill LAJ, Netea MG. BCG-induced trained immunity: can it offer protection against COVID-19? *Nat Rev Immunol.* 2020;20:335-337.
32. Yitbarek K, Abraham G, Girma T, et al. The effect of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccination in preventing severe infectious respiratory diseases other than TB: Implications for the COVID-19 pandemic. *Vaccine.* 2020;38:6374-80.
33. Afkhami S, Villela AD, D'Agostino MR, et al. Advancing Immunotherapeutic Vaccine Strategies Against Pulmonary Tuberculosis. *Front Immunol.* 2020;11:557809.
34. Li H, Javid B. Antibodies and tuberculosis: finally coming of age? *Nat Rev Immunol.* 2018;18:591-6.
35. Srivastava BS, Singh VK, Kashyap VK, et al. Commentary: Bettering BCG: a tough task for a TB vaccine? *Front Immunol.* 2019;10:2195.
36. Muruganandah V, Sathkumara HD, Pai S, et al. A systematic approach to simultaneously evaluate safety, immunogenicity, and efficacy of novel tuberculosis vaccination strategies. *Sci Adv.* 2020;6:eaaz1767.
37. Watt J, Liu J. Preclinical Progress of Subunit and Live Attenuated *Mycobacterium tuberculosis* Vaccines: A Review following the First in Human Efficacy Trial. *Pharmaceutics.* 2020;12:848.
38. Li J, Zhao A, Tang J, et al. Tuberculosis vaccine development: from classic to clinical candidates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39:1405-25.
39. Weerasuriya CK, Clark RA, White RG, Harris RC. New tuberculosis vaccines: advances in clinical development and modelling. *J Intern Med.* 2020;288:661-81.
40. Masonou U, Hokey DA, Lahey T, et al. CD4+ T cell cytokine responses to the DAR-901 booster vaccine in BCG-primed adults: A randomized, placebo-controlled trial. *PloS One.* 2019;14:e0217091.
41. Bellini C, Horváti K. Recent Advances in the Development of Protein- and Peptide-Based Subunit Vaccines against Tuberculosis. *Cells.* 2020;9:2673.
42. McShane H. Insights and challenges in tuberculosis vaccine development. *Lancet Respir Med* 2019;7: 810-9.
43. Aytar M, Başbülbül G. Rekombinant Aşılar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR* 2019;17:1-10.
44. Scriba TJ, Kaufmann SH, Henri Lambert P, et al. Vaccination Against Tuberculosis With Whole-Cell Mycobacterial Vaccines. *J Infect Dis.* 2016;214:659-64.
45. White RG, Hanekom WA, Vekemans J, Harris RC. The way forward for tuberculosis vaccines. *Lancet Respir Med.* 2019;7:204-6.
46. Sefidi-Heris Y, Jahangiri A, Mokhtarzadeh A, et al. Recent progress in the design of DNA vaccines against tuberculosis. *Drug Discov Today.* 2020;25:1971-87.
47. Mobed A. DNA Based Vaccines against Tuberculosis; Recent Progress and Discovery Research in Vaccine Development and Delivery System. *Iran J Immunol.* 2020; 17:255-74.
48. Maurya SK, Aqdas M, Das DK, et al. A multiple T cell epitope comprising DNA vaccine boosts the protective efficacy of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) against *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infect Dis.* 2020;20:677.
49. Stylianou E, Paul MJ, Reljic R, McShane H. Mucosal delivery of tuberculosis vaccines: A review of current approaches and challenges. *Expert Rev Vaccines.* 2019;18:1271-84.