

SARS AŞI ÇALIŞMALARINDA SON GELİŞMELER

RECENT DEVELOPMENTS IN SARS VACCINE STUDIES

Emrah RUH¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (emrahr@yahoo.com)

ÖZET

Ciddi akut solunum yolu yetmezliği sendromu (SARS) dünya çapında sadece birkaç ay içerisinde binlerce enfeksiyona ve yüzlerce ölüme yol açmıştır. SARS koronavirüsü (SARS-CoV)'nun 2002-2003 salgınının öncesinden beri hayvanlardan insanlara geçmekte olduğunu gösteren kanıtlar, olası yeni bir pandeminin gerçekleşebileceğini belirtmektedir. Bu nedenle günümüzde SARS aşı çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Üzerinde çalışılan aşilar arasında; inaktive tüm virus aşiları, viral ve bakteriyel vektörler kullanılarak hazırlanan aşilar, rekombinant protein aşiları, alt ünite aşiları, DNA aşiları ve canlı-atenüe virus aşiları sayılabilir. Aşı çalışmalarında farklı hayvan modelleri kullanılmakla birlikte en uygun model, insanlardaki SARS patogeneze yönelik klinik belirtilerin, viral replikasyonun ve akciğer patolojisinin benzerliği nedeniyle gelinciklerdir. SARS'a yönelik çeşitli aşı yöntemlerinin güvenli ve immünojenik olduğuna dair birçok kanıt olmasına rağmen, aşılanmış hayvanlarda virusun uygulanması sonrası hala belirgin derecede hastalık görülmektedir. Daha da önemlisi, bazı çalışmalarda, SARS hastalığının aşıya bağlı şiddetlenmesi olasılığı da gösterilmiştir. Çalışmalardan elde edilen veriler, özellikle mukozal immünite, T hücre cevabı ve heterolog aşı kombinasyonlarına odaklanması gereken ileri aşı geliştirme çalışmalarına olan ihtiyaç konusunda önemli bilgiler vermektedir. Bu derleme yazıda, SARS aşı çalışmalarındaki gelişmeler son yıllara ait kaynaklar ışığında tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: SARS, koronavirus, aşı.

ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome (SARS) caused thousands of human infections worldwide and hundreds of deaths in just a few months. Evidence indicates that SARS coronavirus (SARS-CoV) has been circulating from animals to humans since before the 2002-2003 outbreak, suggesting that another pandemic may occur. This possibility has focused continuous action on SARS vaccine research. Inactivated vaccines, viral and bacterial vector vaccines, recombinant protein vaccines, subunit vaccines, DNA vaccines, and live-attenuated virus vaccines have been studied in different animal models. Although different animal models are used in vaccine studies, the most appropriate model for studying SARS is ferret since it develops the typical clinical signs, viral replication patterns and lung pathology compatible with that of SARS pathogenesis in humans. While there is much evidence that various vaccine strategies against SARS are safe and immunogenic, vaccinated animals still display significant disease upon challenge. Moreover, potential vaccine enhancement of SARS have also been shown in some studies. Data from the studies give an important information of the demand for further vaccine development rese-

arch, especially focusing on mucosal immunization, T-cell immunity and combinations of heterologous vaccines in prime-boost regimens. In this review article developments on SARS vaccines have been discussed under the light of recent literature.

Key words: SARS, coronavirus, vaccine.

GİRİŞ

Ciddi akut solunum yetmezliği sendromu (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS), 2002-2003 sonbahar-ilkbahar döneminde 32 ülkede 8098 kişinin enfekte olmasına, 774 kişinin ise ölümüne yol açan bir enfeksiyon olarak ortaya çıkmıştır. Bu durum, tüm dünyada seyahatlere önemli ölçüde kısıtlamalar getirmiş, aynı zamanda ekonomik açıdan da ciddi zararlara neden olmuştur¹. Dizi analizleri ve Koch postulatları doğrultusunda makak maymunlarının enfekte edilmesi sonucu SARS'ın etiyolojik etkeni, *Nidovirales* takımından ve *Coronaviridae* ailesinden olan yeni bir insan koronavirusu (CoV) olarak tanımlanmıştır². Serolojik bulgular, SARS ile ilişkili koronavirusun (SARS-CoV) söz konusu salgından önce birkaç yıl boyunca insan popülasyonuna zoonotik bulaş yoluyla geçtiğini ve bu bulaşın devam ettiğini ortaya koymuş; bu şekilde 2004 yılında birbirinden bağımsız en az dört tane laboratuvar bağlantısı gösterilemeyen olguyla sonuçlandırılmıştır^{2,3}. Uzun bir süredir insan popülasyonunun SARS-CoV bulaşına maruz kalışı, bu potansiyel tehlikeye karşı korunmaya yönelik aşılardan hazırlanması gerekliliğini gündeme getirmiştir. Çin misk kedisi, rakun ve yarasaya haricinde kedi, köpek, domuz, fare, gelincik, tilki, maymun ve sıçan gibi çok sayıda hayvanda replike olabildiği için SARS-CoV'un aslında bir zoonoz etkeni olduğu ileri sürülmektedir³.

SARS-CoV primer olarak solunum yolu enfeksiyonuna neden olduğu için en fazla solunum yollarında bulunmasına rağmen, diğer organ ve dokularda hatta dışkıda dahi saptanabilmiştir. Hastalığın inkübasyon dönemi 2-10 gün olup, bulaşıcılık ikinci haftada en üst düzeydedir. Hastalık, ateş, titreme, halsizlik, solunum güçlüğü, öksürük, ishal ve pnömoni ile karakterizedir. Yaygın alveoler hasar ve özellikle makrofajlardan oluşan enflamatuvar hücre infiltratı SARS hastalarında görülen tipik bulgulardır. Çoğunlukla iki hafta süren ateş sonrası, solunum semptomları ve radyolojik değişiklikler gerilemektedir. Yüzeylerde altı güne kadar canlı kalabilmesine rağmen SARS-CoV bulaşının temelinde damlacık yoluyla yayılımın olduğu düşünülmektedir. SARS hastalarının çoğunluğunu yetişkinler oluşturmakla birlikte, 15 yaş ve altındaki çocuklarda da birkaç olgu bildirilmiştir. Bütün olgular arasındaki ölüm oranı ise yaklaşık %10 olarak ifade edilmektedir³.

SARS-CoV enfeksiyonuna karşı onaylanmış özgül bir antiviral ilacın olmaması nedeniyle, özellikle risk grubunu oluşturan kişilerde hastalığı önlemeye yönelik en uygun yolun aşılama olduğu ileri sürülmektedir. Başarılı bir SARS aşısının sağlık çalışanlarının, laboratuvar personelinin ve diğer riskli bireylerin korunması amacıyla profilaktik olarak kullanılması gerektiği belirtilmektedir. Günümüzde, insan CoV'larının hiçbirisi için onaylı bir aşı bulunmamakla birlikte, tavuk, sığır, köpek, kedi ve domuz CoV'larına yönelik aşılardan üretilmiştir³.

SARS-CoV'un 29.7 kb uzunluğundaki pozitif iplikçikli RNA genomu, yaklaşık olarak 14 açık okuma penceresi (open reading frame; ORF) içermektedir. Bu ORF bölgeleri aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları için hedef olan proteinleri kodlamaktadır. CoV'lar hedef hücrelere, reseptöre bağlı endositoz yolu ile girmektedir. Bu olay virionun yüzeyinde çıkıntı olarak bulunan ve koronavirüsler tipik "taç" görünümünü veren "spike" (S) glikoproteinini tarafından gerçekleştirilmektedir. Virusun hücreye tutunmasında ve viral zarfın füzyonunda önemli rol oynadığı için S proteini esas olarak viral tutunma proteini olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle aşı çalışmaları için esas olan bir hedef antijendir. Reseptör-S proteini ilişkisi CoV türünün özgüllüğü ve doku tropizmi için önemli bir belirleyicidir. Anjiyotensin-dönüştürücü enzim 2 (angiotensin-converting enzyme 2; ACE 2) ve CD209L, SRS-CoV için fonksiyonel olan reseptörler olarak tanımlanmış olsalar da, ACE 2 yolu ile hücre içerisine girişin daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, S proteininin reseptör bağlayıcı kangalı çok önemli bir nötralizasyon belirleyicisidir³.

Çalışılan SARS-CoV aşılı arasında; inaktive tüm virus aşılı, virusun bazı genlerini eksprese eden viral veya bakteriyel vektörler, rekombinant viral proteinler ve DNA aşılı gösterilebilir. Bugüne kadar, canlı-atenüe CoV, ölü CoV, DNA aşılı ve viral vektör aşılı hayvan CoV'larına karşı aşılama yönelik kullanılmışlar ve bu çalışmalardan başarılı sonuçlar elde edilmiştir³.

İNAKTİVE VİRUS AŞILARI

Kolay hazırlanmalarına ek olarak, immün sistemin enfeksiyon sırasında karşılaştığı antijenik yapıları içermeleri nedeniyle inaktive virus aşılı her zaman ilgi çekici olmuştur. Bu aşılı, yüzeylerinde immün tanımaya yönelik çoklu proteinleri içermeleri ise diğer önemli avantajlarıdır. Yapılan çalışmalarda, virusun en az 8 farklı proteinine karşı oluşan antikorlar, hastaların konvalesan dönem serumlarında saptanmıştır. Ayrıca S, matriks (M) ve zarf (E) proteinlerine ek olarak, diğer dört ORF'nin de (3a, 6, 7a ve 7b) yapısal proteinler kodladığı doğrulanmıştır³. Bu veriler, koruyucu antikorların hedefleri olabilecek çoklu epitoplara ve proteinlerin bulunduğu işaret etmektedir. Bir çalışmada, inaktive SARS-CoV ile aşılana farelerde S, nükleokapsid (N), M ve 3CL de dahil olmak üzere bir dizi proteine karşı antikor oluştuğu saptanmıştır⁴. Antikor cevabını başarılı şekilde indükleyebilmesine rağmen, inaktive aşılıın üretim aşamasında karşılaşılan bazı zorluklar vardır. Bunlar, biyogüvenlik 3 seviyesinde patojenin yüksek miktarlarda üretilmesi ve başarılı bir inaktivasyonun gerçekleşmesindeki güçlüktür. Bu nedenle, kimyasal maddeler ile (formalin, beta-propiolakton gibi) yapılan inaktivasyona alternatif olarak SARS-CoV'un UV ile de başarılı bir şekilde inaktive edilebildiği bildirilmiştir⁵.

Bazı laboratuvarlar inaktive tüm virus aşısı geliştirme çalışmalarını devam ettirmiş ve SARS-CoV nötralizan antikorunu indüklediklerini belirtmişlerdir³. Buna rağmen canlı SARS-CoV'a karşı etkinliğin gösterildiği çalışmaların sayısı çok azdır. See ve arkadaşları⁶, beta-propiolakton ile inaktive ederek hazırladıkları bir tüm virus aşısını (Tor-2), S ve N proteinlerini eksprese eden adenovirus vektör aşısı ile immünojenite ve etkinlik açısından karşılaştırmışlar; bu şekilde, permisif bir fare modelinde canlı SARS-CoV'a karşı koruyuculuğu değerlendirmişlerdir. Çalışmada, alum adjuvantın varlığında veya yokluğunda,

kontrol grubundaki farelere kıyasla inaktive tüm virus aşısının, yüksek seviyelerde nötralizan antikoları indükleyerek ve solunum yollarında virus yükünü azaltarak SARS-CoV'a karşı koruma sağladığı bildirilmiştir⁶. Bir diğer çalışmada ise, fare hepatit virusunun E, M ve N proteinleri ile SARS-CoV S proteininin ko-ekspresyonu sonucunda CoV-benzeri partiküller geliştirilmiş, bu şekilde inaktive tüm virus aşısı taklit edilmiştir⁷. Bu yöntemin, nötralizan antikoları indüklediği ve farelerin akciğerlerinde SARS-CoV replikasyonuna karşı koruma sağladığı belirtilmiş, ancak inaktive tüm virus aşısı ile doğrudan bir deneysel karşılaştırma yapılmamıştır⁷.

Birçok fare modelinde belirgin bir klinik tablo oluşturulamaması, araştırmacıları, etkinliğin değerlendirilebilmesi için SARS'ın daha virulan olduğu bir konağı seçmeye zorlamıştır. Bu nedenle inaktive SARS-CoV aşısı, klinik semptomların ve belirgin akciğer patolojisinin görüldüğü gelinciklerde de test edilmiştir⁸. Formalinle inaktive edilmiş SARS-CoV Urbani suşunun adjuvan olmadan uygulandığı bir çalışmada, bazı nötralizan antikoların indüklendiği ve virusun daha erken temizlendiği görülmüş, ancak gelinciklerde sadece hafif bir koruma gerçekleştiği belirtilmiştir⁹. Virusun uygulanmasından 23 gün sonra akciğer dokuları incelendiğinde, kontrol grubu ve aşılanmış hayvanlar arasında anlamlı değişiklikler saptanmamıştır. Ancak, aşılamaya bağlı indüklenen değişikliklerin gösterilmesi açısından, bu zamanın çok geç olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, bu aşının yeterli immün cevabı oluşturamadığı yorumunu da yapmışlardır. See ve arkadaşları⁸ bir diğer çalışmalarında ise, beta-propiolakton ile inaktive ettikleri tüm virus aşısını adenovirus vektörü kullanılarak hazırlanan S ve N aşılarıyla gelincik modelinde karşılaştırmıştır. Bu çalışma sonucunda, her iki aşının nötralizan antikor cevabını indüklediği, üst solunum yollarında virusun yayılımını, replikasyonunu ve alt solunum yollarına ilerlemesini azalttığı belirtilmiştir. Bu aşıların aynı zamanda timustaki hemorajiyi, pnömoninin şiddetini ve akciğer epitellerindeki hasarı da azalttığı, ancak yüksek nötralizan antikor titrelerine rağmen, test edilen bütün aşılarla ve uygulama şekillerinde tam korumanın gerçekleşmediği belirtilmiştir⁸. Zhou ve arkadaşları¹⁰, formaldehid ile inaktive edilmiş SARS-CoV kullanılarak Rhesus maymunlarını aşılamışlar; bu aşının hem güvenli hem de nötralizan antikoları indükleyebildiği için immünojenik olduğunu ifade etmişlerdir.

Öte yandan, SARS aşısının etkinliği konusunda sadece antikor seviyesinin değil, T lenfosit yanıtının da dikkate alınması gerektiği düşünülmüştür. Endojen antijen üretimi, güçlü bir T lenfosit cevabı oluşturduğu için, See ve arkadaşları⁶ çalışmalarında SARS-CoV'a özgül IFN-gama salgılayan T hücre cevabını da araştırmışlardır. Burada, bir grup fare inaktive aşı ile, diğer grup fare ise adenovirus vektörü kullanılarak hazırlanan S ve N aşıları ile aşılanmıştır. Araştırmacılar, T hücre cevabının her iki grup farede de benzer olduğunu, bu nedenle, inaktive virus aşısının indüklediği T hücre cevabının, vektör aşılarıdaki ile eşit olabileceğini belirtmişlerdir⁶.

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalardan olumlu sonuçlar alan araştırmacılar, inaktive SARS-CoV aşısı için faz I deneylerine başlamışlardır. Lin ve arkadaşları¹¹, beta-propiolakton ile inaktive edilen SARS-CoV aşısını 36 kişiye uygulamışlar; bu aşının güvenli ve

iyi tolere edilebilir olduğunu ve nötralizan antikorları indükleyebildiğini belirtmişlerdir. Ancak bu çalışmada, doğal bir enfeksiyon olmadığı için etkinlik konusunda bir veri elde edilmemiştir¹¹.

Bütün bu veriler inaktive aşılardan güvenli olduğunu ve SARS-CoV'a özgül nötralizan antikorları indüklediğini, hatta T lenfositleri dahi aktive edebildiğini göstermektedir. Ancak, koruyucu etkinliğe ilişkin güçlü bir kanıt hala yoktur.

REKOMBİNANT VEKTÖR AŞILARI

Hücreleri enfekte edip vücutta persistan kalabilmeleri ve antijen sunan hücreleri doğrudan enfekte edebilmelerinin yanı sıra, viral proteinlerin tek başına güçlü adjuvan aktivitesi olması nedeniyle, rekombinant virus aşılı B ve T hücrelere bağlı gelişen immün cevabın indüklenmesinde etkilidir. Rekombinant viruslar, adeta bir hücre içi patojen gibi, yabancı hedef proteini konak hücrenin sitoplazmasında eksprese ederler. Böylece, endojen antijen konak hücrede işlendikten sonra, MHC sınıf I yolu ile eksprese edilip CD8+ T lenfositlerine sunulma ve sitotoksik T hücrelerinin uyarılması için uygun hale getirilmiş olur. Sonuç olarak, rekombinant viruslar, enfekte hücrelerin yok edilmesinde esas olan hücre immünitenin aktive olmasına yol açarlar. Bugüne kadar birçok virus, SARS-CoV'a karşı hem güçlü bir hücre immünitenin hem de nötralizan antikorların indüklenmesi amacıyla SARS-CoV proteinlerinin ekspresyonu için kullanılmıştır³.

Adenovirus Vektör Aşılı

Özellikle replikasyon yönünden defektif mutantların insanlarda patojenite oluşturmaları, oral veya nazal olarak uygulandığında mukozal immünite oluşturmaları ve adenovirusların genomlarının iyi tanımlanmış olması adenovirus vektör aşılıların avantajları arasında gösterilebilir. Buna rağmen, bu virusların klonlama kapasitelerinin sınırlı olması, konak sayısının kısıtlı olmasından dolayı hayvan testlerinin kolay uygulanamaması ve insan popülasyonunun büyük bir kısmının enfeksiyonlar nedeniyle bu vektöre karşı bağışık olması da adenovirus vektörlerinin dezavantajları arasındadır. Bu son sayılan dezavantajın, farklı bir vektör (DNA aşısı gibi) kullanılarak yapılabilecek heterolog kombinasyonlar ile önlenebileceği belirtilmektedir³.

Yapılan çalışmalarda, SARS proteinlerini kodlayan adenovirus vektörlerinin immünojenik olduğu, nötralizan antikor oluşumunu ve T hücre cevabını indüklediği bildirilmiştir^{12,13}. Adenovirus vektör aşılıların SARS-CoV'a karşı koruyuculuğu ilk kez fareler üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. See ve arkadaşları⁶, SARS-CoV S ve N proteinlerini eksprese eden rekombinant adenovirus vektörlerini kombine halde intranazal (IN) ve intramusküler (IM) olarak farelere uygulamışlar; aşının yüksek düzeyde nötralizan antikorun yanında N proteinine karşı IFN-gama salınımını indüklediğini ve ayrıca farelerin akciğerlerindeki virus yükünü önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır⁶. Çalışmada, nötralizan antikorların indüklenmesinde IM aşılamanın daha etkili olduğu, IgA'yı sadece IN uygulamanın indüklediği, ayrıca nazal ve akciğer dokularında (nazal sekresyonlarda 1000 kat) SARS-CoV replikasyonunun bloke edilmesinde IN aşılamanın daha etkili olduğu görülmüştür. Bu bulgu, rekombinant adenovirus N ve S proteinlerinin IN olarak uygulanma-

sının güçlü bir koruyucu mukozal immüniteyi indükleyebileceğini göstermektedir. Araştırmacılar aynı çalışmada rekombinant S ve N aşılarını inaktive SARS-CoV aşısıyla karşılaştırmışlardır. Kombine S ve N aşısı inaktive aşı ile aynı seviyelerde anti-N IFN-gama salgılayan hücreleri indüklemiş, ancak inaktive aşı daha yüksek seviyede nötralizan antikolar oluşturmuştur. Ayrıca, akciğerlerdeki virus titresi ve RNA miktarı dikkate alındığında, inaktive aşının akciğerlerde daha üstün bir koruma sağladığı görülmüştür⁶. Aynı araştırmacılar diğer bir çalışmada ise, ateş ve akciğer hasarı da dahil birçok klinik semptomun gözlenebildiği bir gelincik modelinde bu aşıları test etmişlerdir⁸. Bu çalışma sonucunda, hem inaktive aşının hem de rekombinant S ve N kombinasyonunun nötralizan antikor cevaplarını indüklediği ve solunum yollarındaki viral replikasyonun yanı sıra, timus ve akciğerlerdeki doku hasarını da azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada, IN olarak uygulanan rekombinant S ve N aşısı zayıf bir nötralizan antikor cevabı ortaya çıkarmasına rağmen akciğerlerdeki replikasyon ve hasara karşı en iyi korumayı sağlamıştır⁸. Bu durum, bir aşının koruyucu etkinliğinin gösterilmesi için serum nötralizan antikolarının tek başına yeterli bir ölçüt olmadığına işaret etmektedir. Ayrıca, bazı aşılarda yüksek titrelerde nötralizan antikoları indüklemesine rağmen, koruyuculuğun hiçbir zaman tam olmaması, SARS'a karşı yeterli bir korumanın sağlanması için aşılarda kombine halde kullanılmasının gerekli olabileceğini göstermektedir.

Kobinger ve arkadaşları¹⁴, SARS-CoV S proteinini eksprese eden insan ve şempanze adenovirusları ile oluşturduğu heterolog kombinasyonunu gelincik modeli kullanarak test etmiştir. Bu şekilde ikinci aşılama süresince, ilk adenovirus vektörü aşılamaına karşı olan immün cevabın interferensinden de kaçınılmıştır. Çalışmada, bu aşılama yönteminin gelinciklerdeki viral yükü ve pnömoninin şiddetini azalttığı, ayrıca Rhesus makaklarında da immünojenik olduğu gösterilmiştir¹⁴.

Poksvirus Vektörleri

Üretilmelerinin kolaylığı, stabil oluşları, büyük genleri kodlayabilme kapasiteleri ve sitoplazmik gen ekspresyonu gibi özelliklerin yanı sıra, uzun süreli hücre ve humoral immüniteyi indükleyebilmeleri nedeniyle poksvirus rekombinantları aşı vektörü olarak her zaman ilgi çekmiştir³. Bir çalışmada, SARS-CoV S proteinini kodlayan, replikasyon yönünden defektif bir poksvirus vektörü olan modifiye vaccinia Ankara (MVA) suşu kullanılmıştır. Bu vektör farelere IN ve IM olarak uygulanmış, bu şekilde nötralizan antikoların indüklendiği ve solunum yollarındaki viral replikasyonun azaldığı görülmüştür¹⁵. Czub ve arkadaşlarının¹⁶, MVA rekombinant aşısını gelincik modeline uyguladıkları bir çalışmada ise, aşılama sonrası belirgin derecede gelişen bir karaciğer patolojisi gözlemlenmiştir. Bu sonuç, SARS-CoV aşısı çalışmalarında karaciğer patolojisinin gözden kaçırılmaması gereken bir konu olduğuna işaret ederken, MVA vektörü kullanan diğer çalışmada aşılamaa bağlı gelişen bir karaciğer hasarı bildirilmemiştir¹⁵.

Rekombinant Platform Aşıları

SARS-CoV aşı çalışmalarında, bazı viral ve bakteriyel vektörler SARS-CoV proteinlerinin ekspresyonu için kullanılmıştır. Adenovirus haricinde, parainfluenza virus, adeno-asosiy-

virus, Newcastle hastalığı virusu, veziküler stomatit virusu, kızamık virusu ve kuduz virüsü SARS aşı çalışmalarında kullanılan viral vektörlere örnek olarak verilebilir. Bu viral vektörlere ek olarak *Salmonella*, bakteriyel vektör olarak SARS aşı çalışmalarında kullanılmıştır. Bütün bu çalışmalarda, bu vektörlerin değişik hayvan modellerinde hümmoral ve hümmresel immüniteyi indüklediği bildirilmiştir. Ancak diğer birçok aşı çalışmasında olduğu gibi, bu çalışmalarda da test edilen aşuların etkinliğine ilişkin güçlü bir bulgu elde edilmiştir³.

ALT ÜNİTE AŞILARI

Saflaştırılmış antijenden oluşan alt ünite aşuları, güvenli olmaları ve kolay hazırlanmalarını nedeniyle avantajlı olmalarına rağmen bazı durumlarda koruyucu etkinlik gösterememektedir. Özellikle ekzojen olarak üretilen proteinler, MHC sınıf II yoluyla sunuldukları için genellikle güçlü sitotoksik T hümmre cevabı oluşturmazlar. CoV S proteinleri koruyucu immün cevapları oluşturan determinantları içerdiği için alt ünite aşularının geliştirilmesinde de tercih edilmektedir. Bu nedenle, hümmre reseptörlerine bağlanmadan sorumlu olan SARS-CoV S glikoproteinini hem aşı hem de tedavi yönünden ilgi uyandıran bir hedeftir. S proteininin amino ucuna bağlanan bir insan monoklonal antikörünün, SARS-CoV'u güçlü bir şekilde nötrale etmesi ve reseptör bağlanmasını bloke ederek sinsiya oluşumunu inhibe etmesi, S proteininin hedef olarak kullanılması yaklaşımını desteklemiştir⁵. Daha da önemli olarak, fareler ve Afrika yeşil maymunları üzerinde yapılan çalışmalarda, S proteininin serum nötralizan antikörlerin indüklenmesine ve SARS-CoV'a karşı koruyucu bağışıklığın oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir^{15,17}. Öte yandan, diğer bazı proteinlerin de virion yüzeyinde eksprese edilmesi ve bu proteinlerin SARS'lı hastaların konvalesan serumlarında saptanabilen antikör oluşumuna neden olmaları, koruyucu bağışıklığın indüklenmesinde bu proteinlerin de yararlı olabileceğini işaret etmiştir. Örneğin, M proteinlerine karşı oluşan antikörlerin nötralizan aktiviteleri olduğu, ayrıca SARS-CoV S proteininin CD4+ ve CD8+ T hümmre cevaplarını oluşturabildiği de gösterilmiştir³.

Diğer hayvan CoV aşularına yönelik çalışmalar, CoV N proteininin de aşı geliştirilmesi için bir antijen adayı olabileceğini göstermiştir. CoV N proteinlerine karşı oluşan antikörlerin in vitro olarak virüsü nötrale edici etkisi bulunmamasına rağmen, hümmresel immünitenin indüklenmesine neden olduğu için, bu proteinin in vivo olarak koruma sağlayabileceğine ilişkin kanıtlar vardır. Şöyle ki, bu proteinin, CoV'a özgül CD8+ T hümmrelerinin oluşmasına neden olduğu ve hayvanlarda enfeksiyon sonrası koruma sağladığı gösterilmiştir. Eksprese edilen SARS-CoV N proteini, antijene özgül T hümmre cevaplarının indüklemesinden dolayı bir aşı adayı olarak gösterilmiş, ancak bu aşuların oluşturduğu in vivo korumaya ilişkin herhangi bir çalışma yapılmamıştır^{18,19}.

DNA AŞILARI

Birçok patojen için, aşılama sonrası hem hümmoral hem de hümmresel bağışıklığın oluşması arzu edilir. Genellikle hümmresel immüniteyi etkili bir şekilde indükleyenler ise sadece canlı-rekombinant veya atenüe aşılardır. Patojenlerden elde edilen proteinleri kodlayan plazmid DNA'ların oluşturduğu DNA aşularının, hümmoral ve hümmresel bağışıklığı indükle-

diği gösterilmiştir. Bu sistemde hücrel bağışıklığın indüklenmesinin nedeni canlı virusların etkilerinin taklit edilmesidir. Çünkü antijenik proteinler endojen olarak üretilmekte ve MHC sınıf I tarafından sunulmaktadır ki, bu şekilde CD8+ T hücre cevapları indüklenmektedir. Buna ek olarak, stabil, basit, kolay ve güvenli olması nedeniyle DNA aşılarının canlı aşılarla iyi alternatifler olduğu düşünülmektedir. Hümorale ve hücrel immün cevap oluşturabilen S, M ve N proteinleri de dahil bazı SARS-CoV proteinleri, DNA aşısı adayları olarak gösterilmiştir³.

Yang ve arkadaşlarının¹⁷ yaptıkları bir çalışmada, S proteinini eksprese eden bir DNA aşısı hem T hücre hem de nötralizan antikor cevaplarını indüklemiş ve akciğerlerde SARS-CoV replikasyonunu azaltmıştır. Daha önemli olarak bu çalışma, koruyuculuğun S genine karşı oluşan antikorlar ile ilişkisi olduğunu; T hücrelerine bağlı olmadığını göstermiştir¹⁷. Çok epitoplulu DNA aşısı yönteminin kullanıldığı bir çalışmada, farelerde S (437-459) ve M (1-20) olmak üzere iki epitopa karşı antikor cevaplarının indüklendiği ve bu antikorların SARS-CoV'un enfektivitesini in vitro olarak nötralize ettiği gösterilmiş, ancak koruyuculuk değerlendirilmemiştir²⁰. Bir başka çalışmada da, N-DNA ile aşılınmış farelerde N'ye özgül antikor üretildiği ve sitotoksik T lenfosit aktivitesinin indüklendiği; ancak geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun olduğu görülmüştür²¹. Gupta ve arkadaşları²², MHC sınıf II sunumunun artırılmasını amaçladıkları çalışmalarında, eksprese edilen SARS-CoV N proteinini LAMP (lysosome-associated membrane protein)'a bağlandığında, bellek cevaplarının arttığı görülmüştür. Kim ve arkadaşlarının²³ çalışmalarında ise, MHC sınıf I sunumunun artırılması için N proteinini kalretiküline bağlandığında, N proteinine özgül hümorale ve hücrel immün cevapların olduğu, ayrıca N proteinini eksprese eden vaccinia virusunun titresinin de anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar, böyle bir cevabın aynı zamanda SARS-CoV ile enfekte hücreleri de hedef alabileceğini göstermektedir. Diğer bir çalışma grubu ise S, M ve N-DNA aşılarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, ilginç olarak M proteininin en güçlü T hücre cevabını oluşturduğunu bildirmişlerdir²⁴.

Hayvan modellerinde yapılan DNA aşısı çalışmalardan olumlu sonuçlar alınması ve inaktive aşılar için faz I çalışmalarına başlanmasının ardından, DNA aşıları da faz I çalışmalarında test edilmiştir. Martin ve arkadaşları²⁵, S proteinini kodlayan DNA aşısını 10 sağlıklı kişiye uygulamış ve aşının iyi tolere edildiğini, hücrel immün cevap ve nötralizan antikor oluşumunu indüklediğini bildirmişlerdir²⁵. DNA aşıları ile ilgili elde edilen olumlu verilere rağmen etkinliğe yönelik güçlü bir bulgu bildirilmemiştir. Etkinliğin artırılması amacıyla heterolog yöntemlerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda, DNA aşılamanın proteinler, inaktive aşılar veya viral vektörler ile birlikte uygulanabileceği belirtilmektedir. Bu uygulamalar, daha güçlü immün cevap oluşturmakta ve ayrıca immün cevabın tipini (örneğin Th1/Th2) de belirleyebilmektedir. Özetle, SARS için DNA aşıları umut vaat edici olsa da, iyi bir hayvan modelinde koruyuculuğun gösterilmesine ihtiyaç vardır³.

CANLI ATENÜE AŞILAR

En uzun ömürlü ve koruyuculuğu en yüksek olan aşılar, atenüe patojen veya bu patojenle yakın ilişkili olan avirülan canlı viruslardan (variola'ya karşı koruma sağlayan vaccinia virus aşısı gibi) hazırlanan aşılardır. Konakta oluşturdukları persistansın yanı sıra, endojen

protein üretimi ve etkili MHC sınıf I sunumuna bağlı güçlü sitotoksik T hücre cevabı oluşturmalarından ötürü bu aşuların etkinliği daha fazladır. Atenüasyona neden olan nokta mutasyonlarının geri dönerek virulans oluşturabilmesi, ayrıca atenüe oral polioviruslarda olduğu gibi delesyon yolu ile atenüe edilen mutantların çevrede doğal olarak bulunan viruslar ile rekombinasyona girerek tekrar virulans kazanabilmesi atenüe aşuların dezavantajları olarak sayılabilir. Bu güvenlik sorunu nedeniyle, sağlık açısından ciddi tehdit oluşturan bir hastalığa yönelik güçlü bir kanıt olmadıkça atenüe aşuların onayının alınması çoğunlukla zordur. SARS için bu tür sorunlar ile henüz karşılaşılmamış olsa da, bazı ilginç atenüe mutantlar geliştirilmiştir. Örneğin; küçük E geni bulunmayan rekombinant SARS-CoV'dan oluşan bir canlı atenüe aşının immünojenite ve koruyucu etkinliği çalışılmıştır²⁶. E geninin delesyonu, in vitro ve in vivo olarak virus titrelerinin ve viral morfogenezin azalmasına neden olduğu için, virusu atenüe etmektedir³. Lamirande ve arkadaşları²⁶, bu delesyon mutanı ile aşılanan hamsterlerin yüksek seviyelerde serum nötralizan antikorlar oluşturduğunu göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca, gerek hamsterlerde ortaya çıkan klinik belirtilerin, gerekse homolog (SARS-CoV, Urbani) ve heterolog (GD03) suşların solunum yollarındaki replikasyonunun azaldığı görülmüş; bu nedenle, yapısal E geninin delesyonunun, canlı atenüe bir SARS-CoV aşısı geliştirilmesinde ilk basamak olabileceği belirtilmiştir²⁶. Yapılan çeşitli çalışmalarda da, SARS-CoV genomunun yeniden düzenlenmesine yönelik yaklaşımlar denenmiş ve atenüe virus suşlarının elde edilebilmesi için çeşitli gen delesyonları üzerinde etkinlik araştırmaları ile umut verici sonuçlar alınmıştır^{27,28}.

SARS AŞILARINDA KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ

Makaklar, Afrika yeşil maymunları, gelincikler, fareler, hamsterler ve Çin misk kedileri SARS için kullanılmış hayvan modelleridir³. Fare modelinde, SARS hastalığı sırasında insanlarda görülen klinik belirtiler ve ciddi bir tablo oluşmamaktadır. Bu nedenle, kullanılan fareler immün süpresif veya yaşlı olmadığı sürece, etkinliğin bu modelde testi tartışmalı bir konudur. Daha iyi sonuçlar alınması amacıyla farelere uyarlanmış SARS ve insan ACE2 transgenik fareleri kullanılmış olmasına rağmen, her iki modelde de belirgin sorunlarla karşılaşmıştır. Benzer şekilde, hamsterlerde de SARS-CoV enfeksiyonunun klinik belirtileri oluşmamaktadır. Öte yandan, influenza virusu ile ilgili çalışmalarda geniş ölçüde kullanılmış olan gelinciklerde akciğer patolojisi ve virus atılımı görülmüş ve gelinciklerin SARS-CoV enfeksiyonuna karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir³. Gelincikler üzerinde yapılan bir çalışmada, SARS-CoV Toronto 2 suşunun IN olarak uygulanmasının ardından klinik belirtiler görülmemesine rağmen, faringeal sürüntü örneklerinde viral RNA'nın saptanabildiği belirtilmiştir¹⁶. Buna ek olarak, insanlardaki SARS patogenezine yönelik klinik belirtilerin, viral replikasyonun ve akciğer patolojisinin gösterilmesi için gelinciklerin en iyi modellerden biri olduğu sonucuna varılmıştır^{6,14}. Gelinciklerin kullanıldığı bir çalışmada, SARS-CoV uygulanmasının ardından enfeksiyonun klinik belirtilerinin (ateş yükselmesi, nazal akıntı ve hapsirik) görüldüğü bildirilmiştir⁸. Bugüne kadar hiçbir hayvan modelinde, insan SARS-CoV enfeksiyonunda en sık görülen (> %99) belirti olan ateş ortaya çıkmamıştır. Dolayısıyla gelincikler, SARS-CoV için iyi bir modeldir; üst ve alt solunum yollarında replikasyonun gerçekleşmesine, klinik hastalığın gelişmesine, üst solunum yoldan virusun atılmasına ve ciddi akciğer patolojisi gelişimine yol açmaktadır. Sonuç

olarak gelincikler kemirgen olmayan, diğer primatlara göre ekonomik açıdan daha uygun olan ve daha kolay çalışılabilen bir modeldir. Bu modelin başlıca dezavantajı ise, gelinciklerin immün sisteminin iyi tanımlanmamış olması, bu nedenle de çalışmalarda kullanılan reaktiflerin ve kitlerin kısıtlı olmasıdır³.

AŞININ GÜVENİLİRLİĞİ

Aşı çalışmalarında en büyük korku, üretilen aşının etkili olmamasından çok, hastalığı daha fazla şiddetlendirmesidir. CoV aşılarının geçmişine bakıldığında, kedi CoV'larında hastalığı şiddetlendirici etki yaptığı görülmektedir^{29,30}. Bu konuda en fazla kabul gören yaklaşım, virusun hücreye girişinin "antikora bağımlı artış" mekanizması ile artmasıdır. Bu durumun, insan B hücre kültürlerinde SARS-CoV S proteini uygulandığı zaman gerçekleştiği gösterilmiş; ancak S proteini ile aşılana ya da anti-S antikor verilen hayvanlarda viral yükün artmadığı ve hastalığın şiddetlenmediği bildirilmiştir^{17,31}.

Şimdiye kadar yapılmış SARS aşısı çalışmalarında aşıya bağlı indüklenmiş olası patolojileri bildiren sadece iki çalışma vardır. Czub ve arkadaşları¹⁶, SARS-CoV S proteinini eksprese eden poksivirus vektörü MVA ile aşılana gelinciklerde, virusun uygulanmasının ardından diğer gruplara kıyasla karaciğer patolojisinde artış görüldüğünü bildirmiştir. Karaciğer patolojisindeki bu artış, diğer herhangi bir SARS-CoV aşısı sonrası görülmemiştir. See ve arkadaşlarının⁸ S ve N proteinlerini gelincik modelinde test ettikleri çalışmalarında, aşılama gruplarında aşılama yapılmamış olanlara kıyasla patolojide bir artış görülmediği bildirilmiştir. Benzer şekilde, inaktive virus aşısı ile aşılama ve virus uygulanmasının ardından üç hafta boyunca takip edilmiş gelincikler ile yapılmış bir çalışmada da, aşıya bağlı olarak hastalığın şiddetlenmediği bildirilmiştir⁹. Aşılardaki güvenlik konusunu gündeme getiren diğer bir çalışmada ise, Venezuela at ensefaliti virusu replikon partiküllerinde eksprese edilen N proteinleri ile yapılan aşılamanın SARS-CoV uygulanan farelerin akciğerlerinde eozinofillerin infiltrasyonunu ve hasarı artırdığı belirtilmiştir³². Böyle bir durum diğer çalışmalarda görülmemiştir. Ayrıca, adenovirusta eksprese edilen S ve N protein kombinasyonunun kullanıldığı iki çalışmada da, farelerde veya gelinciklerde eozinofil infiltrasyonu bildirilmemiştir^{6,8}. Her aşı ve antijenik kombinasyonun güvenlik ve etkinlik açısından değerlendirilmesi gerekirken birlikte, şimdiye kadar yapılmış SARS-CoV aşısı denemeleri dikkate alındığında, hastalığın aşı ile şiddetlenmesi konusu için özel bir neden oluşturmadığı görülmektedir. Böyle bir durum bildirildiğinde, herhangi bir antijenden çok, belirli bir ekspresyon sistemine yoğunlaşılması gerekmektedir. Çalışmaların büyük bir çoğunluğunda, virulan patojenin uygulanmasının ardından sağlık üzerinde herhangi bir olumsuz etki olmaksızın immün yanıt oluşturulmaktadır³.

AŞININ KORUYUCULUĞU

SARS hastalarının konvalesan dönem serumlarında yüksek titrelerde nötralizan antikorlar saptanmakta ve bu antikorların SARS pnömonisinde görülen antikorlar ile benzerlik gösterdiği ifade edilmektedir³³. Buna ek olarak bazı hayvan modellerinde, SARS-CoV anti-S antikorlarının ve tüm virusa karşı oluşan antikorların hastalığı önlediği ya da viral replikasyonu azalttığı gösterilmiştir³. Buna karşın bir çalışmada, inaktive SARS ve alum

aşısının diğer aşılara (adenovirus vektörü) kıyasla 15 kat daha yüksek serum nötralizan antikor titresi indüklemesine rağmen, bu aşının gelinciklerde SARS-CoV'a karşı daha iyi bir koruma sağlamadığı gösterilmiştir⁸. Bu veriler, SARS'ın çalışıldığı kemirgen modellerine ilişkin önemli bilgiler vermekte, ayrıca güçlü nötralizan antikorların indüksiyonunun, belirgin klinik belirtilerin ve akciğer hasarının görüldüğü uygun bir hayvan modelindeki koruyucu etkinliği ile eşit olmadığını göstermektedir. Bir antikorun virus enfeksiyonunu nötralize etme yeteneği, ölçülebilecek en kolay aktivite olmasına karşın, antikorun antiviral savunmadaki tek önemli fonksiyonu değildir. Bu duruma verilebilecek en önemli örnek, poksviruslardaki en koruyucu antijenlerden olan A33R'nin oluşturduğu koruyucu antikorların nötralizan olmamasıdır³.

Bazı çalışmalarda IN aşılamanın diğer yollara kıyasla daha üstün bir koruma sağlayabileceği bildirilmiştir. Bir çalışmada, S proteini protollin adjuvanı ile birlikte farelere IN ve IM olarak uygulanmış; her iki uygulama sonucunda nötralizan IgG serum seviyesi benzer olmasına rağmen, IN uygulamanın akciğerde virusun replikasyonuna karşı daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir³⁴. Bu durumun, sadece IN olarak aşılanan hayvanlarda saptanan IgA indüksiyonuna bağlı geliştiği düşünülmektedir. See ve arkadaşları^{6,8} da yaptıkları çalışmalarda fare ve gelinciklerde benzer sonuçlar bulmuşlar; IN uygulamanın IM uygulamaya göre daha güçlü koruma sağladığını rapor etmişlerdir. Bu veriler SARS'a karşı korumada mukozal immünitenin önemini vurgulamaktadır.

SARS'a karşı koruyuculuk konusunda T lenfosit cevabının değerlendirilmesi sorunlu olmuştur. Kemirgenler uygun bir hastalık modeli olmayabilir. Buna ek olarak, diğer modellerin değerlendirilmesi de, T hücre cevaplarının ölçülmesine yönelik uygun reaktif ve kitlerin kısıtlı olmasından ötürü zordur. SARS hastalığına karşı korumada humoral ve hücreli immünitenin rolünün belirlenmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Wang ve arkadaşlarının²⁴ S-, M- ve N-DNA aşılarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, M en güçlü T hücre cevabını oluşturmuş, Yang ve arkadaşları³⁵ ise, SARS hastalığını geçirmiş kişilerde M antijenine karşı uzun ömürlü CD4 ve CD8 bellek hücre cevabı oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu veriler, sonraki araştırmaların, diğer viral proteinlerin yanı sıra M antijeninin de potansiyel etkinliğinin değerlendirilmesine yönlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

SONUÇ

Günümüzde potansiyel antijenler ile aşılama yollarının aydınlatılmasına ve SARS aşılarının tasarlanmasına yönelik geliştirilen birçok yöntem tamamlanmıştır. Buna rağmen, koruyuculuk ile klinik belirtiler ve akciğer hasarına karşı koruma sağlayan immün cevapların oluşumu arasında ne tür bağların olduğu tam olarak açıklanamamıştır. Çalışmaların sonuçları, koruyucu bir SARS aşısının geliştirilebileceğine ilişkin umut verirken, ciddi hastalığa duyarlı olan memelilerdeki (gelincikler ve insanlar gibi) koruyuculuğun, fare modellerinin öne sürdüğünden daha zor olabileceğine dikkat çekmektedir. Bugüne kadar elde edilmiş veriler, etkinliği en yüksek olan aşılama yönteminin, farklı yönlerden koruyuculuk sağladığı için, IN ve sistemik aşılamanın heterolog bir kombinasyonu olabileceğini göstermektedir. Önümüzdeki birkaç yıl içerisinde, heterolog aşı kombinasyonlarının daha geniş ölçüde uygulanmasının yanı sıra, bugüne kadar yete-

rince değerlendirilmemiş T hücre cevabının SARS hastalığındaki rolünün aydınlatılması ve diğer SARS-CoV proteinlerinin de aşı çalışmalarına dahil edilmesi ile SARS aşılarının koruyuculuğu artırılabacaktır. Bu şekilde, olası bir pandemiye yönelik güçlü ve etkili bir aşı hazırlanmış olacaktır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Annex Table 2. Deaths by cause, sex and mortality stratum. www.who.int/whr/2004/en/09_annexes_en.pdf
2. Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, et al. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003; 423: 240.
3. Roper RL, Rehm KE. SARS vaccines: where are we? *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 887-98.
4. Xiong S, Wang YF, Zhang MY, et al. Immunogenicity of SARS inactivated vaccine in BALB/c mice. *Immunol Lett* 2004; 95: 139-43.
5. Tsunetsugu-Yokota Y. Large-scale preparation of UV-inactivated SARS coronavirus virions for vaccine antigen. *Methods Mol Biol* 2008; 454: 1-8.
6. See RH, Zakhartchouk AN, Petric M, et al. Comparative evaluation of two severe acute respiratory syndrome (SARS) vaccine candidates in mice challenged with SARS coronavirus. *J Gen Virol* 2006; 87: 641-50.
7. Lokugamage KG, Yoshikawa-Iwata N, Ito N, et al. Chimeric coronavirus-like particles carrying severe acute respiratory syndrome coronavirus (SCoV) S protein protect mice against challenge with SCoV. *Vaccine* 2008; 26: 797-808.
8. See RH, Petric M, Lawrence DJ, et al. Severe acute respiratory syndrome vaccine efficacy in ferrets: whole killed virus and adenovirus-vectored vaccines. *J Gen Virol* 2008; 89: 2136-46.
9. Darnell ME, Plant EP, Watanabe H, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in vaccinated ferrets. *J Infect Dis* 2007; 196: 1329-38.
10. Zhou J, Wang W, Zhong Q, et al. Immunogenicity, safety, and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine* 2005; 23: 3202-9.
11. Lin JT, Zhang JS, Su N, et al. Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antivir Ther* 2007; 12: 1107-13.
12. Gao W, Tamin A, Soloff A, et al. Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet* 2003; 362: 1895-6.
13. Zakhartchouk AN, Viswanathan S, Mahony JB, Gaudie J, Babiuk LA. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein expressed by an adenovirus vector is phosphorylated and immunogenic in mice. *J Gen Virol* 2005; 86: 211-5.
14. Kobinger GP, Figueredo JM, Rowe T, et al. Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine* 2007; 25: 5220-31.
15. Bisht H, Roberts A, Vogel L, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6641-6.
16. Czub M, Weingartl H, Czub S, He R, Cao J. Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets. *Vaccine* 2005; 23: 2273-9.
17. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004; 428: 561-4.
18. Stohlman SA, Bergmann CC, van der Veen RC, Hinton DR. Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J Virol* 1995; 69: 684-94.
19. Seo SH, Wang L, Smith R, Collisson EW. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J Virol* 1997; 71: 7889-94.

20. Wang X, Xu W, Tong D, et al. A chimeric multi-epitope DNA vaccine elicited specific antibody response against severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus which attenuated the virulence of SARS-CoV in vitro. *Immunol Lett* 2008; 119: 71-7.
21. Zhao P, Cao J, Zhao LJ, et al. Immune responses against SARS-coronavirus nucleocapsid protein induced by DNA vaccine. *Virology* 2005; 331: 128-35.
22. Gupta V, Tabiin TM, Sun K, et al. SARS coronavirus nucleocapsid immunodominant T-cell epitope cluster is common to both exogenous recombinant and endogenous DNA-encoded immunogens. *Virology* 2006; 347: 127-39.
23. Kim TW, Lee JH, Hung CF, et al. Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2004; 78: 4638-45.
24. Wang Z, Yuan Z, Matsumoto M, Hengge UR, Chang YF. Immune responses with DNA vaccines encoded different gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 130-5.
25. Martin JE, Louder MK, Holman LA, et al. A SARS DNA vaccine induces neutralizing antibody and cellular immune responses in healthy adults in a phase I clinical trial. *Vaccine* 2008; 26: 6338-43.
26. Lamirande EW, DeDiego ML, Roberts A, et al. A live attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus is immunogenic and efficacious in golden Syrian hamsters. *J Virol* 2008; 82: 7721-4.
27. Züst R, Cervantes-Barragan L, Kuri T, et al. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog* 2007; 3:109.
28. de Haan CA, Masters PS, Shen X, Weiss S, Rottier PJ. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 2002; 296: 177-89.
29. Olsen CW. A review of feline infectious peritonitis virus: molecular biology, immunopathogenesis, clinical aspects, and vaccination. *Vet Microbiol* 1993; 36: 1-37.
30. Weiss RC, Scott FW. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1981; 4: 175-89.
31. Kam YW, Kien F, Roberts A, et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells in vitro. *Vaccine* 2007; 25: 729-40.
32. Deming D, Sheahan T, Heise M, et al. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants. *PLoS Med* 2006; 3: e525.
33. Tan YJ, Goh PY, Fielding BC, et al. Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 362-71.
34. Hu MC, Jones T, Kenney RT, et al. Intranasal protollin-formulated recombinant SARS S-protein elicits respiratory and serum neutralizing antibodies and protection in mice. *Vaccine* 2007; 25: 6334-40.
35. Yang L, Peng H, Zhu Z, et al. Persistent memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses in recovered severe acute respiratory syndrome (SARS) patients to SARS coronavirus M antigen. *J Gen Virol* 2007; 88: 2740-8.