

DÜNDEN BUGÜNE HERPES SİMPEKS VİRUS AŞI ÇALIŞMALARI

HERPES SIMPLEX VIRUS VACCINE STUDIES: FROM PAST TO PRESENT

Dürdal US*

ÖZET: Günümüzde Herpes simpleks virus (HSV) enfeksiyonlarının insidansındaki dramatik artış ve özellikle genital herpesin fiziksel ve psikososyal morbiditesinin yüksek olması, HSV aşılara gereksinim doğurmaktadır. Başarılı bir aşı için hedef alınması gereken en önemli özellikler, virusun nöronal yayılımı, latentlik oluşturmaya ve konakta özgül immün yanıt varlığına rağmen reaktif olabilmesidir. İdeal bir HSV aşı adayının hastalık gelişimini önlemesinin yanında viral salınımı da sınırlaması arzu edilmekte, bunun için de virüsü giriş kapılarında durdurarak “sterilize edici bir immün yanıt” oluşturmaya beklenmektedir. HSV aşılı ile ilgili ilk çalışmalar 1920’li yıllarda başlamış ve yaklaşık 85 yıllık zaman sürecinde başarılı bir aşının geliştirilmesi için büyük çabalar sarf edilmiştir. Çeşitli hayvan modellerinde alınan başarılı sonuçlar ümit verici olmasına rağmen insan çalışmaları aşının etkinliği konusunda hayal kırıklığı yaratmıştır. Bugüne dek üzerinde klinik değerlendirme yapılan HSV aşı stratejileri; canlı HSV’un otoinokülasyonu, inaktive tüm virus aşılı, canlı atenüe virus aşılı, modifiye canlı virus alt ünite aşılı, hücre kültürü kaynaklı alt ünite aşılı, rekombinant alt ünite (glikoprotein) aşılı, DISC (Disabled Infectious Single Cycle) virus aşılı, viral vektör ve çıplak DNA aşılıdır. Birçok klinik aşı çalışmasında, aşılanan kişilerde oldukça yüksek düzeyde özgül nötralizan antikor indüksiyonuna rağmen korumanın sağlanamaması, gerek enfeksiyondan korunmada gerekse tekrarların önlenmesinde HSV’lara karşı humoral immün yanıtın ziyade hücresel yanıtın önemi olduğunu ve aşının özellikle Th1 tipi yanıtı indüklemesi gerektiğini vurgulamaktadır. Yapılan klinik çalışmalardan en umut verici sonuç, adjuvanlı HSV-2 glikoprotein D rekombinant alt ünite aşısı (gD2-alum/MPL) ile alınmıştır. Bu aşı, erkeklerde ve seropozitif kadınlarda etkili olmamasına rağmen seronegatif kadınlarda genital hastalığı önlemede %74 etkili bulunmuştur. Günümüzde umut verici görünen bir diğer yaklaşım da genetik olarak modifiye edilmiş canlı virus aşılıdır. Bu çalışmalar arasında, nörovirülans geninin ($\gamma_{34.5}$) delesyonu ile elde edilen aşılı ve esansiyel genlerinden birisi (örn. *gH* geni) çıkarıldığı için replikasyonu tek turda sınırlanmış replikasyon defektif DISC virus aşılı yer almaktadır. Sonuç olarak, tüm çabalara rağmen günümüzde HSV profilaksisi ve immünoterapisi için lisans alabilmiş bir aşı ne yazık ki mevcut olmamakla birlikte çalışmalar tüm hızıyla devam etmektedir. Bu

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

derleme yazıda, HSV aşı çalışmalarının dünden bugüne tarihsel olarak gelişimi, yapılan preklinik ve klinik çalışmalar ve başarılı bir HSV aşısının geliştirilmesi için gerekli faktörler tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Herpes simplex virus (HSV), HSV aşıları, inaktive virus aşısı, gD2-alum/MPL aşısı, DISC virus aşısı, alt ünite aşısı, aşı çalışmaları.*

ABSTRACT: The dramatical increase in the prevalence of Herpes simplex virus (HSV) infections and the significant physical and psychosocial morbidity of HSV type 2 infections, generate the need for an efficacious HSV vaccine. The most important properties of HSVs that should be targeted for a successful vaccine are neuronal invasion, latency and reactivation in spite of specific host immune responses. The major expectation for an ideal HSV vaccine candidate is to induce sterilizing immunity, which must be effective at all portals of HSV entry; to prevent or reduce the symptomatic disease and to eliminate or at least to limit the asymptomatic viral shedding. The first vaccine studies have began in the 1920s and in the intervening eight decades there have been many attempts to develop an effective one. Although encouraging findings came from experiments in various animal models, human studies have been disappointing, unfortunately. The vaccine strategies that have undergone clinical evaluation until today included autoinoculation of live HSV, whole inactivated vaccines, attenuated live virus vaccines, modified live virus subunit vaccines, cell culture-derived subunit vaccines, recombinant subunit (glycoprotein) vaccines, DISC (Disabled Infectious Single Cycle) virus vaccines, viral vectors and naked DNA vaccines. In most of the clinical studies the failure of HSV vaccines in spite of inducing very high levels of specific neutralizing antibodies have emphasized that cell-mediated immune response, especially Th1 type immunity is important in preventing both primary disease and recurrences with HSV, rather than humoral response. The most hopeful result was obtained with HSV-2 gD and alum/MPL vaccine in clinical studies. This vaccine was found 74% effective in preventing genital disease in HSV seronegative women but was not effective in men or seropositive women. In recent years it is possible to genetically engineer HSV to produce a vaccine strain that is protective without causing human disease. An example for this strategy was the development of a live attenuated vaccine from which neurovirulence gene ($\gamma_{34.5}$) has been removed. Another promising one was the replication-defective DISC virus HSV vaccine which is derived from a virus with an essential gene (e.g. gH gene) deleted, so the replication has been limited only to a single cycle. As a result, intensive HSV vaccine trials are currently underway, although all the previous attempts to produce an effective vaccine for the prophylaxis and immunotherapy against HSV have been largely unsuccessful. In this review the history of HSV vaccine development together with the preclinical and clinical studies from past to present has been summarized and recent progress for an effective HSV vaccine together with the further improvements required for an immunogenic vaccine have been discussed.

Key words: *Herpes simplex virus (HSV), HSV vaccines, inactivated virion vaccine, gD2-alum/MPL vaccine, DISC virus vaccine, subunit vaccines, vaccine trials.*

GİRİŞ

Tüm dünyada yaygın olarak bulunan Herpes simpleks viruslarının (HSV) en önemli özelliği, latentlik oluşturmaları ve özgül konak immün yanıtının varlığına rağmen zaman zaman tekrarlarla seyreden enfeksiyonlara yol açmalarıdır¹. HSV tip 1 ve tip 2 tarafından oluşturulan enfeksiyonlar; mukoz membranlarda primer ve tekrarlayan lezyonlar (gingivostomatit, herpes labialis, genital herpes), keratokonjunktivit, neonatal herpes, herpes ensefaliti, immün kompromize konakta yaygın enfeksiyonlar ve eritema multiforme gibi çok çeşitli klinik semptomlarla karşımıza çıkmaktadır¹. Enfeksiyonların %20'sinin asemptomatik, %60'ının tanımlanamayan semptomatik ve ancak %20'sinin tanımlanabilen semptomatik şekilde geçirilmesi nedeniyle, HSV enfeksiyonlarının gerçek prevalansı hakkında net veriler yoktur; ancak 1999 yılı verilerine göre tüm dünyada HSV ile enfekte yaklaşık 86 milyon kişi olduğu belirtilmektedir^{1,2}. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde HSV-2 enfeksiyon prevalansında 1970'li yılların sonundan bu yana yaklaşık %30 oranında artış olduğu vurgulanmış ve son yıllarda sadece bu ülkede 500.000/yıl yeni genital herpes olgusunun ortaya çıktığı bildirilmiştir². Genital herpesin farklı toplumlarda saptanan insidansı %5-40 arasında değişmekle birlikte, bu oran "Cinsel Yolla Bulaşan Hastalıklar" (CYBH) kliniklerine başvuran hastalarda %30-80'ne ulaşmaktadır¹. HSV-1 içinse 5 yaşından küçük çocukların yaklaşık %20'sinde, genç erişkinlerin %50'sinde ve 50 yaşın üzerindekiilerin %80-90'ında seropozitifliğin olduğu bildirilmektedir^{1,2}.

HSV, nadiren görülen neonatal herpes ve ensefalit gibi enfeksiyonlar haricinde hayatı tehdit eden (emerging) hastalıklara neden olmadığı için, son yıllara kadar virusun eradikasyonu ile ilgili çalışmalar ihmal edilmiştir. Ancak son yıllarda, özellikle gelişmekte olan ülkelerde genital herpes lezyonlarının HIV bulaşında önemli risk faktörleri arasına girmesi ve herpes enfeksiyonlarında psiko-sosyal ve fiziksel morbiditenin yüksek oluşu bu görüşün değişmesine neden olmuştur.

HSV aşı çalışmaları yaklaşık 85 yıl önce başlamış olup halen devam etmektedir. Bu çalışmalar, canlı atenüe, inaktive ve alt ünite virus aşılı ile yapılmış ve son yıllarda da yeni teknolojilerle geliştirilen aşılar gündeme gelmiştir^{3,4}.

HSV aşı çalışmalarının amaç ve temellerinin anlaşılabilmesi için, virus yapısının ve konak immün yanıt mekanizmalarının iyi bilinmesi gereklidir.

VİRUSUN YAPISI, GENOMU ve GEN ÜRÜNLERİ

Herpes simpleks virus partikülü; çift iplikli viral DNA'yı içeren elektron-yoğun kor, 162 kapsomeri olan ikozahedral bir kapsid, kapsidi sıkıca çevreleyen amorf bir tegüment ve zarftan oluşmaktadır¹. HSV'un her iki tipinin de DNA'sı, birbirine kovalent olarak bağlı 2 komponentten (L: Long; S: Short) oluşur ve her komponent, uzun ters tekrar (inverted repeat; IR) bölgeleri olan özgün diziler (sırasıyla UL veya US) içermektedir. Bugün için HSV-1 ve -2 DNA'sının en az 84 farklı polipeptid kodladığı düşünülmektedir¹.

Enfeksiyon, virusun hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasıyla başlar, zarf ile plazma membranı arasında kaynaşma olur, kapsid nüklear porlardan çekirdeğe taşınır ve DNA nükleusta açığa çıkar. Nükleustaki viral replikasyonun temel safhaları; transkripsiyon, DNA sentezi, kapsid oluşması, DNA'nın paketlenmesi ve tomurcuklanmasıdır.

Virusun yüzey glikoproteinleri, hücreye tutunma ve penetrasyondan sorumludur. Viral zarf 11 glikoprotein (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM) içerir⁴. Bunlar arasında alt ünite aşısı olarak çalışılan en önemlileri gB (enfektivite için gerekli protein) ve gD (enfektivite için gerekli, nötralizan antikorların en kuvvetli indükleyicisi) glikoproteinleridir. Ayrıca gH (virusun hücreye girişinde gerekli, nötralizan antikor oluşumunu indükler) glikoproteini eksik olan bir mutant da, replikasyondan defektif bir aşı (DISC; Disabled Infectious Single Cycle) adayı olarak çalışılmıştır^{1,4}.

Viral gen ürünlerinin sentezi birbirini izleyen 3 safhada gerçekleşir. "Erken (α)" proteinler, virusun replikasyon döngüsünü düzenlerler ve enfekte hücre yüzeyinde antijenik peptid sunumunu önlerler. Daha sonra sentezlenen "erken (β)" proteinler (viral timidin kinaz ve viral DNA polimeraz), viral nükleik asid metabolizmasından sorumludur ve antiviral kemoterapinin temel hedefleridir. En son sentezlenen "geç (γ)" proteinler ise virionun yapısal komponentleridir¹. Viral proteinlerin fonksiyonları, translasyondan sonra geniş çapta modifiye edilmeleri ile belirlenir ve birçoğu çeşitli hücresel proteinlerle etkileşir.

Bir tegüment proteini olan "vhs" (virion host shutoff), enfeksiyonun erken safhasında hücresel ve viral RNA (viral RNA transkriptlerinin enfekte hücrede yoğun olarak birikimi viral gen ekspresyonunu bozar) degradasyonunu indükler. Enfeksiyondan hemen sonra oluşan "enfekte hücre proteini 27" (ICP27) ise, hücresel mRNA'nın fonksiyonel kesimini (splicing) bloke ederek "vhs"nin başlattığı hücresel protein sentezi inhibisyonu etkisini güçlendirir. Hücre apoptozunun önlenmesinde rol oynayan viral proteinler ise gD, gJ ve protein kinaz US3'tür¹. Virusun konak savunmasını etkisiz hale getiren bir diğer proteini de "deltagama1 34.5 (γ_1 34.5)"dir. Bu protein, enfekte hücrede protein sentezinin durdurulmasını önleyerek viral proteinlerin rahatlıkla sentez edilmesini sağlar. Viral protein ICP47 ise, bir antijenik peptid taşıyıcısına bağlanarak enfekte hücre yüzeyinde MHC sınıf I proteinleri ile viral antijen sunumunu, dolayısıyla da immün yanıtın oluşmasını önlemektedir. Son yıllarda tanımlanan ICP0 proteini ise viral replikasyonu inhibe eden hücresel proteinlerin yıkımına neden olmaktadır¹. Virusun diğer önemli gen ürünleri arasında; alfa genlerin ekspresyon düzeyini artıran α TIF (α -trans-inducing factor; VP16), viral gen ekspresyonu hem ilerleten hem de represe eden ICP4, geç genlerin ekspresyonunu kontrol eden ICP22 ve enfeksiyonun geç döneminde RNA'yı nükleustan sitoplazmaya taşıyan ICP27 proteinleri yer alır^{1,3}. Dolayısıyla bir HSV aşısı ile indüklenecek olan immünite, enfekte hücre içinde immün sistemden oldukça iyi kaçabilen ve hücreden hücreye yayılabilen bu virusun üstesinden gelebilmelidir.

VİRUSA KARŞI KONAĞIN İMMÜN YANITI

Virusun yapısal proteinlerine ve zarf glikoproteinlerine karşı büyük bir konak immün yanıtı oluşmaktadır. Özgül humoral yanıt primer enfeksiyonun 4-8. günlerinde ortaya çıkar². İlk oluşan IgM tipi antikorlarını uzun süre kalıcı olan IgG tipi antikorlar izler. Primer enfeksiyonda IgM pozitifliği %100 iken, bu oran primer olmayan enfeksiyonlarda %68'dir². IgA ise, primer enfeksiyonu olan hastalarda IgM düzeylerine benzer bir patern gösterir. Hücresel yanıtta ise,

epidermal enfeksiyonun olduğu bölgede viral antijenler, dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından $CD4^+$ T lenfositlerine sunulur. Bu hücrelerin sentezlediği gama interferon (IFN-g) gibi sitokinler, makrofaj ve NK aktivasyonuna yol açar ve virusun temizlenmesi sağlanır. HSV'a karşı primer immün yanıtta, $CD8^+$ T ve NK hücre aktivasyonu ile hücre lizisi, antikora bağımlı hücresel sitotoksiste (ADCC) ve alternatif/klasik yol kompleman aktivasyonu mekanizmaları rol oynamaktadır².

Tekrarlayan enfeksiyonlarda, HSV antijenlerinin Langerhans hücreleri tarafından alındığı ve MHC-II ile bellek $CD4^+$ T hücrelerine sunulduğu düşünülmektedir⁵. Langerhans hücreleri, kendileriyle birlikte sitokin üreten diğer hücrelerle (örn. keratinositler, bazal epidermal hücreler, infiltratif makrofajlar ve kendileri) uyum içinde çalışır ve Th1 yanıtını koordine eder. İmmün T hücrelerinin tekrar stimüle edilmesinden önce, ilk oluşan sitokin olan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α)'nın, makrofajlar, keratinositler ve/veya T lenfositleri üzerinde bulunduğu saptanması, tekrarlayan lezyonlardaki sekonder immün yanıtın bu şekilde başladığını göstermektedir⁵. Erken dönemde saptanan ve fibroblastlar tarafından yüksek titrelerde salgılanan IFN-beta da viral replikasyonun inhibisyonunda önemli rol oynar. Ancak yine de, tekrarlayan HSV enfeksiyonunda koruyucu immün yanıtın en önemli komponentleri makrofajlar ve T lenfositlerdir. $CD4^+$ T lenfositlerinin salgıladığı IFN-g, gerek enfekte keratinositlerde MHC-I ekspresyonunu artırarak $CD8^+$ hücre aracılı sitotoksisteyi, gerekse epidermal hücrelerde MHC-II antijenlerinin indüksiyonunu artırarak $CD4^+$ hücre aracılı sitotoksisteyi kolaylaştırmakta ve böylece Th1 yanıtının artmasına neden olmaktadır³. HSV'un $CD4^+$ T hücrelerince tanınan antijenlerinin predominant olarak geç viral proteinler olduğu düşünülmektedir¹. Sadece IFN-g ile stimüle keratinositler için geçerli olan $CD8^+$ T lenfosit sitotoksik yanıtında ise predominant olarak erken HSV proteinleri hedeflenmektedir⁵. Sekonder lezyonlarda humoral yanıt mekanizmaları üzerindeki çalışmalar ise, bu lezyonlarda B lenfositlerinin az miktarda bulunduğunu ve yeterli antikor yanıtı oluşmadığını göstermiştir^{2,3}.

Svensson ve arkadaşları⁶ (NEM), IFN-g üretiminde rol alan ve bir transkripsiyon faktörü olan T-bet'in, genital HSV-2 enfeksiyonunda hem doğal hem de kazanılmış immün yanıtta önemli olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar T-bet (+/+) farelerde aşıya karşı yanıtın T-bet (-/-) farelerden anlamlı olarak yüksek bulunduğunu ve bu etkinin T-bet eksikliği ile $CD4^+$ hücrelerinden IFN-g üretiminin azalmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir⁶.

HSV AŞILARININ HEDEFİ ve TEMELİ

Günümüzde etkili bir HSV aşısına şiddetle gereksinim vardır. Sadece ABD'de 100 milyondan fazla kişi HSV-1 ile en az 40-60 milyon kişi de HSV-2 ile enfektidir³. Ayrıca etkin ve özgül antiviral tedaviye rağmen yılda minimum 2.500 neonatal herpes ve 3.000 herpes simpleks ensefaliti olgusu ciddi morbidite ve mortalite ile ortaya çıkmaktadır^{1,3}. Dahası, HSV genital ülseratif hastalığa neden olduğundan HIV bulaş riskini artıran faktörler arasında önemli bir yere sahiptir.

Herpes simpleks virusların, insanda hastalık oluşturmalarını etkileyen ve aşı için hedef alınması gereken iki biyolojik özelliği vardır. Bunlardan birincisi virusun merkezi sinir sistemi (MSS)'ne yayılması ve buradaki replikasyonudur. Dolayısıyla

virusun MSS'ne yayılma ve replikasyon kapasitesini azaltan bir genin delesyonu aşı hedefi olabilir. Nörolojik yayılımı etkileyen mutasyonların glikoprotein genlerinde olduğu belirlenmiştir¹. Örneğin $\gamma_134.5$ gen delesyonu olan mutantların, hücre kültürlerinde iyi üremelerine rağmen virüslarının çok düşük olduğu saptanmıştır⁷. HSV'ların dikkate alınması gereken ikinci özellikleri de latentliktir. Enfekte nöronlarda virus üremesi son derece azdır ve hücrelerin çoğunda viral genom kişinin hayatı boyunca episomal olarak kalmaktadır. Ateş, fiziksel ve duygusal stres, ultraviyole ışınlarına maruziyet, doku hasarı ve immün baskılanma gibi birçok faktör ile konak immün yanıtının varlığına rağmen reaktivasyonlar ortaya çıkar. Virusun latent döneme geçmesi, latent olarak kalması ve reaktive olması ile ilgili mekanizmalar hakkında yeterince bilgi yoktur².

İyi bir aşı enfeksiyonu önlemede yeterli immün yanıt oluşumunu indüklemelidir. Bunun için de HSV enfeksiyonuna karşı korumada nasıl bir konak immün yanıtının (humoral ya da hücrel, lokal ya da sistemik, antikor bağımlı ya da bağımsız hücrel sitotoksiste) geçerli olduğunun saptanması şarttır. Eğer primer enfeksiyon önlenbilirse duyu gangliyonlarında kolonizasyon olmayacaktır ve dolayısıyla tekrarlar ya da bulaş için virus kaynağı ortadan kalkacaktır. İdeal bir aşı adayının şu özellikleri taşıması öngörülmektedir¹: a) primer klinik epizodları azaltmak, b) gangliyonlarda kolonizasyonu önlemek, c) tekrarların sıklığını veya şiddetini azaltmak, d) aktif olarak enfekte kişilerde ya da asemptomatik bireylerde virus salınımını azaltmak. HSV'lara karşı aşı geliştirilmesinde profilaktik ve terapötik olma özelliklerine göre stratejiler izlenmektedir.

Proflaktik HSV Aşılarından Beklentiler

Proflaktik bir aşının ideal amacı, "steril edici immünite"nin indüklenmesi, yani geniş ve uzun süreli immün yanıt oluşturma'nın yanı sıra HSV'ları tüm giriş kapılarında hücreleri enfekte etmeden önce durdurabilmesidir⁴. Böyle bir durumda, virus akut hastalık ve latentlik oluşturmada elimine edilebilir ve dolayısıyla hem primer hem de tekrarlayan enfeksiyonlar önlenmiş olur. Bunun aksi olarak aşı, "steril edici immünite" değil de "kısmi koruyucu immünite" oluştursa, o zaman teorik olarak aşılana kişiler doğal enfektif dozdan daha yüksek titrede virusla karşılaştığında enfekte olacaklardır⁴. Bu durumda latentlik tam olarak önlenmeyecek ve reaktivasyonlar devam edecektir. Sonuçta aşılana, titresi düşük bile olsa hala aralıklı virus salınımı riski altında olacaklardır. Hastalığın semptomlarını önleyen ancak reaktivasyonun doğal sürecini değiştirmeyen ya da asemptomatik virus salınımını durduramayan aşılar mahsurlu sonuçlar doğurabilir. Örneğin tanımlanmamış enfeksiyonu olan çok sayıda kişi bulaş için önemli bir kaynak teşkil edecektir. Ancak yine de böyle bir aşı, aşılama seropozitif kişilerin daha az enfeksiyöz olmasını, aşılama seronegatif kişilerin ise enfeksiyona daha az duyarlı olmasını sağlayabilir⁴.

Terapötik HSV Aşılarından Beklentiler

Terapötik aşının hedefi, tekrarların önlenmesi ya da en azından şiddetinin ve süresinin asgari düzeye indirilmesi ve asemptomatik virus salınımının önlenmesidir. Bunun için terapötik bir aşı, gangliyondaki virus reaktivasyonunu önlemeli ya da

sınırlandırmalı, sinirlerden çıktıktan sonra mukozal yüzeylere ulaşmadan virus replikasyonunu ve bulaşıcılığı azaltmalıdır⁴. Doğal primer enfeksiyon sonrasında oluşan immünite bu korumayı sağlayamadığından, kullanılacak aşının özgül konak immün yanıt mekanizmalarını çok daha şiddetli şekilde uyarması gereklidir ve bu mekanizmaların da proflaktik aşıda hedeflenen mekanizmalardan farklı olması beklenmektedir. Semptomatik tekrarlamaları önleyen ancak asemptomatik salınımı etkilemeyen bir aşı, virus bulaşının artmasına neden olabilir. Latent enfeksiyonu eradike etmeyen ancak virus salınımını azaltan bir aşı ise, tekrarlayan herpes öyküsü olan hamile kadınlarda vertikal geçiş riskini sınırlayabilir⁴.

Tekrarlayan HSV enfeksiyonlarında T lenfositleri ve IFN-g, lezyonların iyileşmesinde birlikte rol oynarlar. Sık orofasial herpes atağı geçiren hastalarda, HSV antikor düzeylerinin çok yüksek olduğu ancak IFN-g ve IL-2'nin düşük düzeylerde üretildiği gösterilmiştir⁸. Yapılan hayvan çalışmalarında da, genital HSV-2 reenfeksiyonuna karşı korumada CD4+ hücreleri ile IFN-g'nin, CD8+ ve antikor yanıtından daha etkili olduğu bildirilmiştir⁹. Dolayısıyla HSV'e karşı iyi bir terapötik aşının, Th1 yolunu indüklemek, Th2 yolunu baskılamak ve regülatör T lenfositlerini sınırlandırmak suretiyle özgül hücrel immüniteyi stimüle etmesi arzu edilmektedir^{3,10,11}. Bilindiği gibi doğal immünitede rolü olan CD25+ regülatör T hücreleri [T(reg)], konağın kendi antijenlerine karşı immün yanıtı baskılamasının yanı sıra aynı zamanda yabancı antijene özgül immüniteyi de baskılayabilmektedir¹¹.

HSV AŞI ÇALIŞMALARI

1920'lerde başlayan HSV aşı çalışmaları sonraki 80 yıl boyunca da büyük bir çabayla devam etmiş ve halen de devam etmektedir. Bu süre zarfında üzerinde çalışılan aşılar, canlı aşıdan alt ünite aşılara kadar değişmekte olup günümüzde de moleküler biyolojik yöntemlerin kullanıldığı aşılar bu geniş bir yelpazede yerini almıştır (Tablo I). Eski yıllarda yapılan çalışmaların sonuçlarının yorumlanmasında metodoloji hataları nedeniyle sıkıntı yaşanmış, ancak yakın zamandaki çalışmalar oldukça dikkatli ve titiz bir şekilde planlanmıştır. Yapılan çok sayıdaki araştırmalarda geliştirilen aşılar, gerek proflaktik amaçlı gerekse rekürent enfeksiyonlarda terapötik amaçlı olarak prelinik ve klinik olarak denenmişlerdir.

CANLI ATENÜE AŞILAR

Tekrarlayan herpes enfeksiyonlarına karşı korumada ilk çalışmalar, özgül olmayan canlı aşı uygulamaları olup, ilk kez 1920'lerde, çiçek aşısının açık klinik çalışmaları sırasında kullanılmıştır⁴. Bu yaklaşımın teorik temeli, HSV ve vaccinia'nın çapraz koruyucu immüniteyi uyarmasına dayanmaktadır, ki bu düşünce daha sonra terk edilmiştir. Bir diğer özgül olmayan immün yanıt uyarıcısı olarak BCG (Bacillus Calmette-Guerin)'nin kullanıldığı çift kör plasebo kontrollü çalışmalarda ise, bu aşı lezyonların şiddetini ve süresini azaltmada başarısız bulunmuş, hatta sekonder inokülasyonda aşılananların yarısında kütanöz granülomların oluşmasına neden olmuştur⁴. Sonraki yıllarda, enfekte başka bir kişiden ya da deneysel olarak enfekte edilmiş farelerden elde edilen otolog virus inokülasyonu ile yapılan canlı aşı çalışmaları, birçok hastada inokülasyon bölgesinde lezyon oluşturmaması üzerine

Tablo I: HSV-2 Aşılarında Araştırma-Geliştirme Çalışmaları^{2,12}

İsim ve Tip	Üretici Firma/Ülke	Mekanizma	Adjuvan	Safha
Rekombinant alt ünite aşısı	SmithKline Beecham	gD2	3d-MPL (MPL)	Faz III
	Chiron	gD2 ve gB2	MF59	Faz III
İnaktive virion (Skinner) aşısı	İngiltere	Virusla enfekte hücrelerin intraselüler alt ünitesi	?	Deneyysel modellerde etkili ancak insan çalışmaları başarısız
DISC	Glaxo Wellcome	gH geninden yoksun defektif virus	Yok	Faz I çalışmaları başarılı, klinik çalışmalar gerekli
	VRI, Inc./ ABD	?	?	Preklinik
GENEVAX® HSV DNA aşısı	Apollon / ABD	gD2 kodlama	Bupivikain	Faz I
Çıplak DNA	Pharmadigm	gD2 kodlama	1,25-D3, muhtemelen DHEA	Preklinik
	Merck/ ABD	gD2 kodlama	Yok	Preklinik
Heterokonjugat (rekombinant protein)	Cel-Sci	HSV peptitlerine bağlı T hücre ligandları	Yok	Preklinik
Vektör aşıları	?	gD2/Varicella zoster virus	?	Hayvanlarda orta düzeyde etkili, klinik çalışmalar gerekli
Genetik yolla atenuë edilmiş canlı virus aşıları	Aviron / ABD	RAV 9395	?	Deney hayvanlarında etkili, güvenliği test edilmeli
LEAPS (TM) (ligand-epitop antijen sunma sistemi)	?	ICP37 epitopu ve beta-2 mikroglobulin peptid dizisi	?	Preklinik
gD2 alt ünite aşısı	GSK/NIH	gD2 kodlama	AS04	Faz III (HSV seronegatif kadınlar)
Canlı atenuë ICP8 DISC virus aşısı	Xenova		Yok	Faz VII
Diğer canlı atenuë replikasyon kompetan virus aşıları	Avant; AuRix		Yok	Faz I; Faz II

DHEA: Dihidroepiandrosteron, DISC: Replikasyonu sınırlandırılmış –atenuë-canlı virus aşısı (Disabled Infectious Single Cycle), MPL: Monofosforil lipid A immün uyarıcı, 1.25-D3 = 1.25-dihidroksi vitamin D, MF-59 = Yağlı su.

immün sistem tarafından yeterince algılanmadığı düşünülerek terkedilmiştir¹. 1950-60'lı yıllarda, tekrarlayan enfeksiyonların tedavisi amacıyla kişilere kendi vesiküler sıvıları inoküle edilmiştir. Bu uygulama daha sonraki HSV reaktivasyon ataklarını önlememiş, hatta orijinal lezyon bölgelerinin yanı sıra enjeksiyon bölgelerinde de lezyonların ortaya çıkmasına yol açmıştır⁴.

Canlı atenuë aşılar, immün yanıtı stimüle edebilmek için primer enfeksiyon oluştururlar, ancak arzu edilen gangliyonlarda latentlikten sonra reaktif olmamalarıdır⁴. Bu özelliğin sağlanabilmesi için ise atenuasyonun son derece stabil olması gereklidir, aksi halde genetik rekombinasyonla virülan forma dönüşme riski ortaya çıkabilir.

Bu tip aşılar için, canlı virusun avirulan suşu doğrudan kullanılabilceği gibi, HSV epitoplarını (özellikle *gB* ve *gD* gen ürünleri) eksprese eden vaccinia ve adenovirus gibi vektörlerin kullanılması da söz konusudur¹. Bir diğer alternatif de, HSV'nin kendisinin, genetik mühendislik yöntemleriyle hastalık oluşturmaksızın koruma sağlayacak bir aşı suşu haline getirilmesidir. Bu son yaklaşım özellikle ilgi çekicidir, zira hücre kültürlerinde ya da hayvanlarda seri pasajlarla virülansı azaltılan virusların konağa verildikten sonra virulan forma dönüşme riskini ortadan kaldıracaktır. Bu amaçla prototip olarak rekombinant bir HSV aşısı geliştirilmiş ve R7020 olarak adlandırılmıştır¹³. Bu canlı atenüe aşı, bir HSV-1 suşunun timidin kinaz (TK) gen kısmının çıkarılması ve onun yerine HSV-2 genomunda G, D, I ve E glikoproteinlerini kodlayan parça ile birlikte L komponentinin yakınındaki genler ve iç ters tekrarlayan bölgelerin yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur. *gD* dizisi immünojenik olması nedeniyle, *gG* dizisi ise immünizasyon başarısını saptamada bir belirleyici olması nedeniyle kullanılmıştır. Genetik olarak dizayn edilen bu virusa daha sonra TK genini kodlayan bir HSV-1 DNA parçası alfa-4 gen promotoruna kaynaştırmak suretiyle geri eklenmiştir¹³. Hayvan çalışmalarında, bu modifiye virusun oldukça stabil olduğu, düşük düzeyde latentlik oluşturduğu ve hayvanları vahşi tip virusa karşı koruduğu bildirilmiş, ancak yapılan ilk klinik çalışmalarda, aşı zayıf immünojenik özellik göstermiş ve immün yanıtın oluşabilmesi için 10⁵ pfu dozlarında seri uygulamalar yapılması gerekmiştir¹⁴. Oldukça yüksek olan bu doz, HSV-1 seropozitif kişiler tarafından iyi tolere edilememiş ve ciddi yan etkilerin ortaya çıkması nedeniyle çalışmalar durdurulmuştur. R7020'in başarısızlığı, araştırmacıları immünojenitesi daha fazla olan bir yapının geliştirilmesine ya da HSV antijenlerini konak immün sistemine sunacak farklı yaklaşımlara yöneltmiştir.

İNAKTİVE TÜM VİRUS AŞILARI

Uzun yıllar boyunca birçok farklı hayvan modelinde yapılan inaktive virus aşısı çalışmalarında başarılı sonuçlar bildirilmekle birlikte klinik çalışmalarda plasebo grubu kullanılmadığından aşı başarısı objektif olarak değerlendirilememiştir¹. Diğer taraftan enfekte hayvan dokularının fenolle muamelesi ile hazırlanan ilk inaktive virus aşıları tıbbi yönden ilgi görmemiştir. Fenol inaktivasyonu, daha sonraları yerini doku kültürlerinden saflaştırılan virusun ultraviyole ile inaktive edilmesi yöntemine bırakmıştır.

1930'larda, tekrarlayan HSV enfeksiyonunun tedavisi için inaktive aşı ile yapılan ilk klinik çalışmada, HSV ile enfekte tavşan beyni süspansiyonu formalinle inaktive edilerek 14 gönüllüye mükerrer olarak enjekte edilmiş ve aşılananların 13'ü tekrarlar arasındaki sürenin uzadığını ifade etmişlerdir⁴. Plasebo kontrollü olmadığından bu çalışmanın sonuçları tartışmalıdır. 1950 yılında tarafından yapılan tek bir prospektif çalışmada, on çocuğa aşı, on çocuğa ise plasebo uygulanmış, ancak takip sırasında her iki grupta da aynı oranda HSV stomatiti gelişmiştir¹. Sonraki 20 yıl içinde inaktive virus aşısı ile yapılan birçok çalışmada amniyotik ya da allantoik sıvı, koryoallantoik membran, civciv fibroblast, koyun veya tavşan böbrek hücre kültürlerinden elde edilen viral antijenlerin formalin, ısı ya da ultraviyole ile inaktivasyonu sonucu hazırlanan aşılar denenmiş, ancak

ne yazık ki oldukça çelişkili sonuçlar elde edilmiştir¹. Örneğin 1960'ların başında inaktive tüm virus aşısı ile yapılan ilk plasebo kontrollü çalışmada, aşılananların %70'inde, plasebo alanların ise %76'sında benzer oranlarda tekrarların azaldığı saptanmış ve bu sonuç plasebo etkisinin önemini ortaya konmuştur¹⁵. 1982'de yayınlanan bir çalışmada da, formalinle inaktive aşı ile aşılanan 2.000'den fazla hastanın %65-80'inde iyileşme olduğu belirtilmişse de, çalışma subjektif olduğu için bu sonuç tartışmalıdır¹⁶.

Lupidon Aşıları

1970'li yılların ikinci yarısından itibaren araştırılan Lupidon aşılarının etkinliğinin Famvir ya da Valtrex'in idame dozu ile benzer olduğu ifade edilmektedir². 1975 yılında yayınlanan kontrollü olmayan bir çalışmada, ısı ile inaktive HSV-1 (Lupidon H) ve HSV-2 (Lupidon G) tüm virus aşılarının, 1.059 katılımcının %81'inde önemli iyileşmeler sağladığı bildirilmiştir¹⁷. Lupidon aşıları ile ilgili 1977 yılında yayınlanan bir çalışmada ise, ısıyla inaktive tüm virus aşısı kullanılmış ve iyileşme oranları aşılanan 34 kişi için %82, plasebo grubu olan 60 kişi için %30 olarak rapor edilmiştir¹⁸. 1995 yılında dokuz İtalyan üniversite kliniğinde gerçekleştirilen plasebo kontrollü çalışmada, Lupidon aşılarının hem orofasial hem genital herpesi olan kişilerde tekrarlar üzerinde istatistiksel olarak önemli etkileri olduğu bildirilmiştir¹⁹. Ancak çalışmada bazı eksikliklerin ve metodoloji hatalarının olması sonuçların güvenilirliğini etkilemektedir. Bu aşı bazı Avrupa ve Güney Amerika ülkelerinde ticari olarak temin edilebilmektedir.

Bulgar Aşısı

İnaktive tüm virus aşısı ile ilgili olarak en umut verici bulgular Bulgar aşısı ile alınmıştır. Bulgaristan'da 1975'den beri 20.000'den fazla kişi bu aşı ile aşılanmıştır²⁰. Oftalmik herpesi olan 1.500'den fazla kişinin immünizasyonu sonunda iyileşme süresinde, tekrarların sayısında ve görme harabiyeti gelişme riskinde önemli azalmalar saptanmıştır. Diğer tip herpes enfeksiyonu olan 14.000'den fazla hastanın ise %95'inde, iyileşme süresi ve tekrarların sıklığında azalma ile karakterize yüksek terapötik etki sağlanmıştır²⁰. Bulgaristanda terapötik amaçla 30 yıldır kullanılmakta olan formalinle inaktive F.HSV-2V(PRK) aşısı, 2000 yılında yayınlanan bir çalışmada İngiltere'de genital herpes riski olan 55 kişiye uygulanmış ve genital herpesi %5.4 oranında azalttığı ve ciddi yan etkilerinin olmadığı izlenmiştir²¹.

ALT ÜNİTE AŞILARI

Bu aşılar, viral DNA'nın ortadan kaldırılarak hücrel transformasyon riskinin elimine edilmesi, daha kuvvetli immün yanıt için antijen konsantrasyonunun artırılması ve canlı virus kontaminasyonu olasılığının azaltılması amacıyla geliştirilmişlerdir¹. Virusun bazı komponentlerini içeren bu aşılar, deterjan ekstraksiyonu, DNaz muamelesi ve afinite kromatografisi gibi çeşitli yöntemlerle hazırlanmaktadır. Bunların en önemli dezavantajları; emek yoğun ve pahalı olmaları, elde edilen ürünün sınırlı miktarda olması, çoğaltılması ve standardizasyonudur⁴.

Hayvan çalışmalarında, tüm virus zarfından elde edilen ve viral DNA içermeyen glikoprotein aşılarının immünojenik olduğu ve etkili bir nötralizan antikor düzeyi oluşturduğu saptanmıştır^{22,23}. Aşılanan hayvanlarda morbidite ve mortalitenin azalması, alt ünite aşılarının belirli bir düzeyde koruma sağladığını düşündürmüştü, ancak bunun için çoklu enjeksiyonların yapılmasının ve adjuvan kullanılmasının gerekli olduğu bildirilmiştir.

HSV-2 zarf glikoproteinleri ve alum içeren bir aşı ile yapılan kör olmayan bir çalışmada, aşılanan 59 kişinin tekrarlayan enfeksiyonlarının sıklık ve şiddetinde 33 kontrole göre oldukça önemli azalmalar saptanmıştır²⁴. Ancak bu çalışmada kontrol grubundaki kişiler aşılanmadıklarını bildikleri için plasebo etkisi sağlanamamıştır. Ayrıca aşılanan grup genital herpesi olan kişilerden oluşurken, kontrol grubu orofasial herpesi olan kişilerden oluşmaktadır²⁴. Tekrarlayan herpes tedavisi için alum absorbe HSV-1 glikoprotein aşısı üzerinde yapılan ve metodolojik şartların sağlandığı bir başka çalışmada, tekrarlamaların sıklığındaki azalma ile karakterize etki aşılananlarda %43, plasebo grubunda %35 olarak benzer bulunmuştur²⁵. Dahası bu aşı minimal immünojenite göstermiş ve çok düşük düzeyde humoral yanıt oluşturmuştur.

Alt ünite aşılarının başarısı, virusun koruyucu immünite oluşturan antijenlerinin iyi tanımlanmış olmasına bağlıdır. Bu amaçla viral zarf glikoproteinleri iyi bir hedef teşkil etmektedir. Zira HSV suşları arasında majör yüzey proteinleri çok küçük farklılıklar gösterir; örneğin gD çok iyi korunmuş bir yapı olup suşlar arasındaki benzerlik %98'den fazladır⁴. Daha da önemlisi gD, nötralizan antikorlar, ADCC ve virusa özgül T hücre yanıtlarının hedefidir. Hücresel ve humoral immün yanıtı tetikleyen diğer glikoproteinler ise gB, gC ve gE'dir. HSV'a karşı oluşan nötralizan antikorların predominant olarak gB ve gD'ye karşı olduğu ve bu glikoproteinlere karşı monoklonal antikorların fare ve kobayları deneysel HSV enfeksiyonundan koruduğu gösterilmiştir⁴. Dolayısıyla gB ve gD, alt ünite aşılarında en sık tercih edilen glikoproteinler olmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen bir ya da iki glikoprotein adjuvanlarla birlikte verilmesi üzerinde odaklanmıştır⁴.

Bugüne dek birçok insan alt ünite aşı çalışmaları yapılmıştır. Bunlardan ilki Merck Sharp & Dohme (New Jersey, USA) tarafından geliştirilen ve zarf glikoproteinlerinin saflaştırılmasıyla hazırlanan bir aşıdır²⁶. Genital herpesi olan hastaların cinsel eşlerinde yapılan ve 1990 yılında yayınlanan faz II-A çalışmasında, aşı grubunda gelişen herpes enfeksiyonu oranının plasebo grubu ile benzer olması aşının yararlı olmadığını göstermiştir²⁶. Daha sonraki yıllarda geliştirilen alt ünite aşıları ve klinik çalışmalarda alınan sonuçlar ise aşağıda ayrı ayrı ele alınmaktadır.

gD2-alum Aşısı

İlk geliştirilen terapötik amaçlı rekombinant glikoprotein aşısı, alum ile absorbe edilmiş 20 µg gD2 içeren bir aşıdır²⁷. Bu aşı faz I çalışmalarda o güne dek yapılmış tüm aşılarından çok daha yüksek düzeyde özgül antikor oluşturmıştır. HSV-1 ya da -2 primer enfeksiyonu olan ve olmayan 24 kişi aşılanmış ve seronegatif kişilerde saptanan en yüksek antikor titreleri, seropozitif kişilerin önceki titrelerinden çok

daha yüksek bulunmuştur. HSV-2 seropozitif kişilerde ise, enzim immunoassay (EIA) ile saptanan antikor titrelerinde 6-10 kat, nötralizan antikor titrelerinde ise 6-7 kat artış belirlenmiştir²⁷. Bu başarılı sonuç çift kör plasebo kontrollü bir çalışmaya öncülük etmiş; tekrarlayan genital herpesi olan ve tekrar sayısı yılda 4-14 olan 98 kişinin dahil edildiği bir çalışmada, 0. ve 2. aylarda aşılanan hastalar ile sadece alum uygulanan kontroller bir yıl boyunca izlenmiştir²⁸. Aşılananlarda kontrollere göre aylık tekrar sayısında %24, kültürle kanıtlanmış tekrar sayısında ise %36 azalma olduğu rapor edilmiştir. Aşı ayrıca, gD2'e özgül EIA titrelerinde 7 kat, nötralizan antikor titrelerinde ise 4 kat artışa neden olmuştur²⁸.

gD2gB2-MF59 Aşısı

Hayvan çalışmalarında, gD2 ve gB2 kombinasyonunun daha yüksek immünojenik etki gösterdiğinin belirlenmesi ve MF59'un alum'dan daha immünojenik olduğunun saptanması üzerine geliştirilen gD2gB2-MF59 aşısı terapötik etkinliği yönünden araştırılmıştır²⁹. Düşük antijen dozları (10'ar µg gB2 ve gD2) kullanılarak geliştirilen bu aşı ile HSV-2 seronegatif kişilerin aşılanması sonucu, gD2-alum aşısı ile elde edildenden çok daha yüksek antikor titreleri elde edilmiş ve doğal HSV-2 enfeksiyonu geçiren kişilerden daha yüksek nötralizan antikor titrelerine ulaşılmıştır²⁹.

gD2gB2-MF59 aşısı, tekrarlayan genital herpesi olan 202 kişi üzerinde yapılan çift kör plasebo kontrollü bir başka çalışmada da denenmiştir³⁰. Katılımcıların yarısına 0, 2 ve 12. aylarda aşı ve 14. ayda sadece MF59 uygulanırken, diğer yarısına 0 ve 2. ayda plasebo, 12 ve 14. aylarda da aşı uygulanmıştır. Katılımcıların 18 ay boyunca izlendiği bu çalışmada; aşının aylık genital herpes tekrar sayısında ve virus salınımının süresinde anlamlı bir düşüşe neden olmadığı, buna karşın diğer klinik parametrelerde (semptomların süresi, yeni lezyon oluşumu ve lezyonların iyileşme süresi) önemli ölçüde azalmalara neden olduğu belirlenmiştir³⁰. Yine de bu aşının tekrarlama oranında olumlu bir etkisinin olmaması, üretici firmanın çalışmaları durdurmasına yol açmıştır.

gD2gB2-MF59 aşısının tekrarlama oranı üzerindeki etkisinin gD2-alum aşısından düşük olması, kullanılan antijen miktarının optimal dozdan daha düşük (gD2-alum aşısında 100 µg, gD2gB2-MF59 aşısında 10'ar µg glikoprotein) olmasına bağlanmaktadır⁴. Bu durum, terapötik HSV aşılarının geliştirilmesinde antijen ve adjuvan seçimi kadar kullanılan antijen dozunun da önemli olduğunu göstermektedir.

Chiron Corporation tarafından geliştirilen gD2gB2-MF59 aşısı, profilaktik amaçlı olarak da denenmiş, ancak yapılan randomize, çift kör ve plasebo kontrollü iki çalışmada da etkili bulunmamıştır³¹. Bu çalışmaların birisi, HSV-2 ile enfekte 531 kişinin seronegatif eşlerini, diğeri ise CYBH kliniklerine başvuran ve HSV-2 enfeksiyon riski yüksek olan 1.862 kişiyi içermektedir. Her iki çalışmada da gönüllülere 0, 1 ve 6. aylarda intramusküler (IM) olarak aşı ya da plasebo uygulanmış ve bir yıl izlem yapılmıştır³¹. Çalışmaların ilk 5 ayında aşılananlarda HSV-2 ile enfekte olma oranı plasebo grubundan %50 daha az bulunmuştur. Ancak bu etkinin geçici olduğu ve bir yıl sonundaki toplam etkinliğin %9 olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ilginç olarak, kadınlarda saptanan etkinlik oranının

(%26) erkeklerden (%4) anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlenmiş, ancak aşının semptomatik hastalık şiddetini azaltmada başarısız olduğu izlenmiştir³¹. Bu aşının sağladığı korumanın uzun süreli olmaması ve klinik seyri değiştirmemesi üzerine çalışmalar yine durdurulmuştur.

gD2-Alum MPL Aşısı

GlaxoSmithKline tarafından profilaktik amaçlı geliştirilen ve gD2-alum kombinasyonuna potent bir adjuvan olan MPL (3-de-O-acylated monophosphoryl lipid A)'nin de eklendiği aşının, faz I çalışmalarda gD2-alum aşısından çok daha iyi tolere edildiği ve daha üstün hücrel ve humoral immünite oluşturduğu saptanmıştır^{4,10}. Bu aşı çift kör, randomize ve plasebo kontrollü iki çalışmada değerlendirilmiştir³². Birinci çalışmada 57 merkezde 847 HSV-1/2 seronegatif kişi, ikinci çalışmada ise 61 merkezde HSV-2 ile enfekte kişilerin eşleri olan seronegatif 2.491 kişi aşılanmıştır. Aşı, 0, 1 ve 6. aylarda IM olarak uygulanmış ve 19 ay izlem yapılmıştır. Sonuçta birinci çalışmada HSV-1 ve -2 seronegatif erkek ve kadınlarda aşının etkinliği (hastalıktan koruma) %38, ikinci çalışmada HSV-2 seronegatif kadınlarda %42 olmak üzere birbirine benzer bulunmuştur³². Bu çalışmalarda gD2-alum MPL aşısı, HSV-1/2 seronegatif kadınlarda semptomatik genital HSV-2 hastalığını önlemede %73-74 etkili olmuş, ancak erkeklerde ve HSV-1 seropozitif kadınlarda başarısı gösterilememiştir. Faz I çalışmaları sonunda aşının güvenli olduğu, iyi tolere edildiği ve gD'ye özgül nötralizan antikor yanıtıyla birlikte Th1 tipi hücrel yanıtı da indüklediği belirlenmiştir³². Bu aşının değerlendirildiği 2005 yılında yayınlanan geniş, çok merkezli, çift kör, randomize ve plasebo kontrollü bir çalışmada da, gD2-alum MPL aşısının indüklediği HSV gD antikor düzeylerinin doğal enfeksiyonda olduğundan çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir³³.

GlaxoSmithKline aşısının etkinliği kısmen de olsa Chiron aşısından daha iyi gibi görünmektedir. Bu firmaların aşıları arasındaki en büyük farkın kullanılan adjuvanların formülasyonu (sırasıyla MPL ve MF59) olduğu düşünülürse, adjuvan seçiminin koruyucu immün yanıt üzerindeki etkisinin ne denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır⁴. gD alt ünite aşısında adjuvan olarak GPI-0100 (yarı sentetik Quillaja Saponin analogu)'ün denendiği bir çalışmada, HSV-1 kütanöz inokülasyonu yapılmadan önce gD/GPI-0100 ile aşılanmış farelerde mortalite oranı, lezyon skorları ve virus titrelerinde önemli ölçüde azalma olduğu saptanmıştır. GPI-0100'ün koruyuculuğu ayrıca kobay genital HSV-2 modelinde araştırılmış ve GPI-0100 içeren ve içermeyen gD aşısı ile aşılanan hayvanlarda, enfeksiyon oranı ve virus salınımlarında değişiklik olmamasına rağmen lezyon skorları ile klinik hastalıkta önemli azalmalar saptanmıştır³⁴.

Skinner Aşısı

İngiltere'de G.R.Skinner tarafından geliştirilen bu aşı 15 yıldır denenmektedir². Skinner aşısı intraselüler alt ünite aşısı olup mevcut rekombinant alt ünite aşılarından daha üstün avantajlara sahiptir. Tek tek viral proteinlerden ziyade bu aşıda virusla enfekte hücreler kullanılmaktadır. Patentli bir yöntemle bütün viral partiküllerin ve DNA'nın ekstraksiyonu sağlanmakta ve enfekte hücreler hemen bütün antijenik

protein ve glikoproteinleri içermektedir³⁵. Bu nedenle bu aşının immünojenitesi de oldukça yüksektir. Bu aşının 2.000'den fazla kişiye uygulanması sonunda ciddi bir yan etki bildirilmemiş, önemli bir terapötik etkiye sahip olduğu izlenmiş ve yüksek riskli eşlerde 12 yıl boyunca yapılan izlemlerde başarısızlık oranının %2'den daha az olduğu görülmüştür^{35,36}.

Skinner [NFU.Ac.HSV-1(S-)MRC] aşısı, formalin inaktivasyonu ve deterjan ekstraksiyonu ile hazırlanmış 300 mg karışık HSV-1 glikoproteinlerinden oluşmaktadır⁴. Kontrollü olmayan bir seri çalışmada aşının profilaktik ve terapötik etkinliği olduğu iddia edilmesine rağmen, çift kör plasebo kontrollü çalışmalarda aşı kendini kanıtlayamamıştır². Sık genital herpes atağı olan 316 kişi ile yapılan çift kör plasebo kontrollü bir çalışmada tedavi için denenen aşı; 0, 1 ve 2 aylarda uygulanmış ve son dozdan sonraki 3-6 ay içinde kadınlardaki aylık tekrar sayısını anlamlı olarak azalttığı rapor edilmiştir³⁷. Aşılanan kişilerde plaseboya göre HSV-1 nötralizan antikor titrelerinde önemli yükselmeler saptanmış ve HSV-1'e karşı artmış lenfosit proliferasyon yanıtı izlenmiştir. Lenfosit transformasyon yanıtındaki bu artış aşılanan erkeklerle sınırlı kalmış ve plasebo ile karşılaştırıldığında değil, sadece aşılama öncesi düzeylerle karşılaştırma yapıldığında istatistiksel önem belirlenmiştir³⁷. Dolayısıyla Skinner aşısı da istikrarlı bir etkinlik ya da immünojenite gösterememiştir.

YİNE YENİ YENİDEN CANLI AŞILAR

Canlı aşılarda genel olarak inaktive ya da alt ünite aşılara tercih edilmesinin nedeni, daha geniş spektrumlu (hem hücresel hem humoral), daha yüksek düzeyde ve daha uzun süreli immün yanıt oluşturmalarıdır¹. Teknolojik ilerlemelere paralel olarak son 15 yılda, atenüasyon için virusun bazı genlerinin delesyona uğratılması ile canlı aşı geliştirme yöntemleri oldukça yaygın uygulama alanı bulmuştur. Özellikle de γ34.5 geninin nörovirülanstan sorumlu olduğunun belirlenmesi, bu genin delesyonu ile umut verici bir aşının geliştirilebileceğini düşündürmüştür⁷. Bu genden yoksun HSV-1 mutanları oldukça atenüe bir özellik taşımaktadır; ancak aynı durum HSV-2 mutanları için geçerli değildir¹. Dolayısıyla HSV-2'nin daha iyi atenüe edilebilmesi için başka birtakım genlerinin daha çıkarılması gereklidir ki, bu genlerin eksikliği virusun yeterince yüksek düzeyde replike olamamasına yol açabilir. Bir diğer sorun da, bu tip delesyon mutantlarının ikinci bir mutasyonla tamamen olmasa da genin bir kısmını yeniden kazanarak vahşi suşun virülansına benzer hale gelebilme olasılığıdır.

1990'lı yılların başında bir viral genin çıkarılmasıyla elde edilen replikasyonu defektif virus aşısının geliştirilmesi, DISC (Disabled Infectious Single Cycle) aşıları için öncü olmuştur^{38,39}. DISC aşıları esansiyel genlerinden birisi çıkarılmış virüslerden oluşmaktadır ve replikasyonları tek döngü ile sınırlıdır¹. Modifiye edilmiş virus konak hücreyi enfekte ettiğinde, replikasyon döngüsü, eksik olan gen ürününün gerekli olduğu safhada durmaktadır. Eğer bu ürün döngüdeki geç proteinlerden biri ise virusun birçok komponenti sentezlenmiş olacaktır, ancak enfeksiyöz virus oluşamayacaktır. İnokülasyondan sonra, DISC virüsü yapısal proteinlerinin büyük bir kısmını sentezleyebildiğinden, alt ünite aşılarında kullanılan glikoproteinlerin yanı sıra diğer proteinlerin de hepsine karşı da immün yanıt oluşacaktır. Bu

aşıların bir diğer özelliği, tek bir replikasyon sonunda oluşan antijenlerin MHC sınıf I molekülleriyle birlikte hücre yüzeyinde sunulabilmesi ve iyi bir hücresel yanıt uyarımı yapabilmesidir⁴. Bu nedenlerden dolayı DISC aşıları, HSV aşı çalışmaları sürecinde oldukça büyük heyecan uyandırmıştır.

DISC Aşıları

Bu aşının ilk örneği, *gH* geni çıkarılmış HSV-2 virusundan oluşan TA-HSV-2 aşısıdır^{4,38}. *gH* gen ürünü hücreye girişte rol oynamaktadır. İlk inokülasyonda aşının hücreleri enfekte edebilmesi için, aşı *gH* proteinini içeren hücrelerle birlikte verilmektedir. Enjeksiyondan sonra modifiye virus hücreleri enfekte eder ve tek döngülük replikasyonunu tamamlar. Bunun sonunda bir araya toplanmış ve hücreden salınmış ancak enfeksiyöz olmayan progeni virionlar, hücresel ve humoral yanıt uyarımına yol açar. Kobay ve fare modeli çalışmalarında TA-HSV-2 aşısının immünojenik ve koruyucu olduğu saptanmıştır^{39,40}. Preklinik çalışmalardan sonra aşı, HSV seronegatif kişilerde yapılan klinik çalışmalarla test edilmiş ve iyi tolere edilebilir ve oldukça immünojenik bulunmuştur. Buna karşın bir faz II klinik çalışmada başarısızlık elde edilmiştir⁴¹. Yılda en az altı genital herpes tekrarı olan HSV-2 seropozitif immünokompetan gönüllülerde yapılan çok merkezli ve plasebo kontrollü bu çalışmada, aşı üç farklı dozda (0 ve 8.hafta; 0, 4 ve 8.hafta; 0, 2, 4 ve 8.hafta olmak üzere) uygulanmış, ancak gerek bu gruplar arasında gerekse bu gruplarla plasebo grubu arasında tekrarların ortaya çıkış süresi, sayısı ve diğer herhangi bir klinik parametrede düzelme ile ilgili fark bulunamamıştır. Ayrıca asemptomatik virus salınımını azaltacağı umulan aşı, böyle bir etki de göstermemiştir⁴¹.

Denenen diğer DISC aşıları olan *ICP27* ya da *ICP8* gen delesyonlu virus aşı adaylarının, konakta yayılamamakla birlikte geniş spektrumlu bir immün yanıt oluşturdıkları ve hayvan modellerinde hem hücresel hem de humoral yanıtı stimüle ettikleri gösterilmiştir¹.

Hoshino ve arkadaşlarının⁴² çalışmasında, esansiyel UL5 ve UL29 genleri çıkarılmış replikasyon defektif HSV-2 suşu içeren dl5-29 aşısı, fare ve kobay modellerinde rekombinant gD2 ve gD2 eksprese eden plazmid aşıları ile profilaktik/terapötik etkinlikleri ve immünojenisiteri açısından karşılaştırılmıştır. dl5-29 ve gD2 aşılarının gerek akut ve tekrarlayan hastalığı azaltmada gerekse latent virus yükünü azaltmada oldukça etkili olduğu saptanmış, dl5-29'un gD2'ye göre daha yüksek nötralizan antikor düzeyleri oluşturduğu ve özgül CD8+ T hücre yanıtını daha hızlı indüklediği görülmüştür. Araştırmacılar, bu nedenlerden dolayı dl5-29 aşısının erken dönem insan çalışmaları için seçilecek en uygun aşı adayı olduğu vurgulamışlardır⁴².

Parker ve arkadaşları⁴³, canlı atenüe aşı adayı olarak genetik yolla modifiye edilmiş ve IL-12 ya da GM-CSF eksprese eden kondisyonel replikasyon HSV mutantları geliştirmişler ve sitokin eksprese eden mutant HSV aşısının fare modelinde iyi bir koruyucu immün yanıt oluşturduğunu ve oldukça güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Mori ve arkadaşlarının⁴⁴ çalışmasında ise, nöroinvasifliği ve trigeminal yayılımı olmayan defektif bir klon olan HSV-1 HF klon 10 (HF10) ile intranazal olarak aşılanan farelerin daha sonra intranazal ve intravajinal yolla verilen letal HSV-1

ve 2 enfeksiyonlarından korunduğu saptanmıştır. Oldukça atenüe bir suş olan bu klonun, genlerindeki çoklu defektler nedeniyle virülan forma dönememesi de, ona iyi bir aşı adayı olma özelliği kazandırmaktadır.

PREPS Aşısı

İngiltere’de bir araştırmacı grubu (Medical Research Council, Glasgow) tarafından, herpesvirusların üretildiği kültür vasatlarında enfeksiyondan yaklaşık üç saat sonra enfeksiyöz viral partiküllerin yanı sıra viral DNA ve kapsid içermeyen yani enfeksiyöz olmayan virus partiküllerinin (Light particle) de bulunduğu gösterilmiştir⁴⁵. Sadece tegüment ve zarf proteinlerinden oluşan bu defektif partiküller bütün alfa-herpesviruslar tarafından oluşturulmakta ve konak hücreye normal mekanizmalarla absorbe ve penetre olmaktadır. Bu bulgu, HSV aşı geliştirme çalışmalarına yeni bir yaklaşım getirmiştir. Ancak bu amaç için, üretme vasatında bulunan enfeksiyöz olan ve olmayan partiküllerin birbirlerinden ayrıştırılması ve L partiküllerinin saflaştırılması gereklidir. Bu amaçla geliştirilen bir yöntemde [PREPS: pre-(viral DNA replication) enveloped particles], enfeksiyöz virionlar etkili bir şekilde elimine edilmektedir⁴⁶. PREPS yöntemi ile virionlar viral DNA içermeyen L partiküllerinden DNA replikasyonu öncesinde ayrıştırılmaktadır. Dolayısıyla gerek L-partiküllerinin gerekse PREPS’in, orijin aldığı parental herpesvirus için aşı olarak kullanılabilmesi olası görünmektedir. Optimistik olarak düşünüldüğünde, PREPS etkili bir HSV aşısı olabilir ve ayrıca diğer immünojenler için taşıyıcı vektör olarak da kullanılabilir. Bu durumda yabancı proteinler, uygun bir promotor kontrolünde virus genomu tarafından sentez ettirilir, bu proteinler PREPS içine girer ve salındığı kültür vasatından saflaştırılabilir. PREPS, 10.000 partikül/hücre dozuna kadar alıcı hücre için toksik değildir ve hücreye virülan enfeksiyonlardaki düzeylere benzer miktarda protein taşıyabilir. Dahası, ne PREPS ne de L-partikülleri, normal hücresel antijen işleme yolağını bozan HSV-1 US-12 gen proteinini eksprese etmemektedir. Bütün bu özellikler PREPS ve L-partiküllerinin immünizasyon için yeni, güvenli ve çok yönlü bir araç olabileceğini düşündürmektedir. Bu teknolojinin patentini 2012 yılına kadar elinde bulunduran Henderson Morley firması, bu amaçla yoğun araştırmalar içindedir⁴⁶.

DNA AŞILARI

HSV aşılarına diğer bir yaklaşım ise çıplak DNA’nın kullanılmasıdır. Bu şekilde hem MHC sınıf I hem de sınıf II sunumunun artışı sağlanmakta ve daha etkin bir immün yanıt ortaya çıkmaktadır. Bu uygulama için en çok ilgi çeken genler ICP27 ve HSV-2 gD-2 genleridir¹.

HSV DNA aşıları ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda; gB, gC, gD ve gE’yi kodlayan plazmid DNA’sı kullanılmış ve hayvan deneylerinde humoral ve hücrel immün yanıt indüksiyonu araştırılmıştır⁴⁷. gB ve/veya gD’yi eksprese eden plazmidlerle immünizasyon sonrası kobay modellerinde HSV-1 ve -2’nin vahşi suşları ile enfeksiyona karşı belirgin bir profilaksi sağlanmış, HSV-2 gD DNA aşısının hayvanları genital herpes ve letal hastalığa karşı koruduğu belirlenmiştir⁴⁷. Bir başka çalışmada da, HSV-2 gD ve gB’yi kodlayan plazmidlerle yapılan kombine aşılanmanın sadece gD2 DNA aşısından daha yüksek koruyuculuğu olduğu gösterilmiştir⁴⁸.

Plazmid DNA aşılarında, tüm *gD* geninin ekspresyonu ile Th1 yanıtı (CD4+ ve CD8+ aktivasyonu), buna karşın sadece salgısal *gD* gen parçasının ekspresyonu ile Th2 yanıtı (yüksek antikor titreleri) olduğu gösterilmiştir⁴⁷. *gD* DNA aşısının Th1 tipi koruyucu sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtı, IL-8 ve/veya RANTES genlerini kodlayan cDNA koeneksiyonu ile artırılabilir⁴⁹. Dolayısıyla HSV için geliştirilecek DNA aşılarında, bir viral gen ile birlikte sitokin ve/veya kemokin genlerinin de kullanılması, hem hücresel yanıtın gelişmesini hem de bu yanıtın arzu edildiği gibi Th1 yönünde olmasını sağlayabilir. Yapılan çalışmalarda HSV glikoprotein genleri ile birlikte adjuvan amaçlı diğer sitokin DNA'ları (IL-12, IL-18, g-IFN, GM-CSF) da kullanılmış ve gerek mukozal immünitenin gerekse Th1 hücre proliferatif yanıtının indüklenmesinde oldukça etkili oldukları saptanmıştır^{47,50}. Toka ve arkadaşlarının¹¹ HSV gB-DNA aşısı ile yaptıkları çalışmada, T(reg) eksikliğinde aşıya karşı bellek CD8+ T hücre yanıtının çok daha iyi olduğu ortaya konmuş ve bu etkinin diğer tip HSV aşısı ile de olduğu saptanırsa aşı etkinliğinin artırılması için T(reg) hücre aktivitesinin sınırlandırılması gerektiği ifade edilmiştir.

Genetik mühendislik yöntemlerine dayanan ve umut vaat eden HSV aşılarının başarılı olup olamayacağı önümüzdeki birkaç yıl içinde açıklığa kavuşacaktır.

HSV AŞILARININ BAŞARISINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Bilindiği gibi birçok virus aşısının başarısı (etkili koruma sağlaması), virusun yayılımını önleyen nötralizan antikorların üretimini indüklemesine bağlıdır. Bu durum lisans almış birçok başarılı virus aşısı (kızamık, kabakulak, polio, kuduz, influenza, hepatit A, hepatit B) için geçerlidir. Ancak ne yazık ki HSV aşısı için aynı strateji başarılı olamamıştır. Farklı özellikteki HSV aşısı ile yapılan çok sayıda prelinik ve klinik çalışmada, doğal enfeksiyon sırasında oluşandan bile daha yüksek düzeyde nötralizan antikor titrelerine ulaşılmasına rağmen, bu antikorlar aşılananlarda gerek enfeksiyondan korunmada gerekse tekrarların önlenmesinde yarar sağlayamamışlardır^{27,29,31,32,33,37,51}. Bu veriler HSV enfeksiyonlarından korunmada humoral immün yanıtın yeterli olmadığını bir kez daha vurgulamaktadır. Corey ve arkadaşlarının³¹ yaptığı gD2gB2-MF59 aşısı çalışmalarında “aşılanmış ve enfekte olmamış” kişiler ile “aşılanmış ancak enfekte olmuş” kişiler arasındaki serum HSV-2 antikor düzeyleri arasında bir fark bulunmaması, genital HSV-2 enfeksiyonuna karşı korunmada nötralizan antikor varlığından daha önemli başka immün yanıt mekanizmalarının olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla HSV-2 enfeksiyonunda özellikle hücresel ve mukozal yanıt üzerinde daha ileri çalışmalar yapılmadan ve aşıda hedeflenecek koruyucu determinantlar belirlenmeden yeni bir aşı adayından başarı beklemek mümkün görünmemektedir.

Yukarıda adı geçen ve etkinliği iyi bilinen virus aşısı aslında “sterilize edici immünite” oluşturmamakta yani virusun konak dokusundaki ilk replikasyonunu önlememektedirler. Bu aşının koruyuculuğu, virusun vücuda girişinden sonra yayılımının etkili bir şekilde durdurulması şeklindedir⁵¹. Oysa durum HSV için farklıdır; zira mukozal yüzeylerden giren HSV nöronları enfekte etmekte ve latent enfeksiyon oluşturmaktadır. İmmünokompetan konakta viremi olmamakta ancak periyodik olarak lokal HSV-2 reaktivasyonu sonucu genital hastalık ortaya

çıkılmaktadır. İşte HSV'nin diğer viruslardan farklı olan bölgesel enfeksiyon oluşturma ve latent kalma özelliği, serum antikorlarının korumada etkinlik göstermesine izin vermemektedir⁵¹.

HSV aşılarının başarısını etkileyen bir diğer faktör ise uygun hayvan modellerinin olmamasıdır. Genellikle fare ve kobaylar ile yapılan çalışmalarda, oluşturulan letal HSV-2 hastalığı ile insanlardaki genital herpes için birtakım öngörülerin elde edilmesi mümkün değildir. Yapılan insan çalışmalarında değişik sonuçlar alınmakla birlikte etkinliğin sağlanabildiğine dair ipuçları elde edilmiştir. Bu çalışmalardan çıkarılması gereken bazı dersler de vardır. Örneğin, enfeksiyon için yüksek risk taşıyan seronegatif kişiler, aşı çalışmalarında ele alınması gereken ideal bir popülasyondur. Aşıların fazla etkilemediği bir grup ise sık tekrarları olan kişilerdir. Dolayısıyla aşılama kişinin virusla karşılaşmasından önce uygulanmalıdır.

HSV aşılarının etkili olabilmesi için hücresel ve humoral yanıtın yanında mukozal yanıtı da indüklemesi arzu edilmektedir. Zira primer enfeksiyon ancak bu şekilde önlenilebilecektir. Mukozal immünitenin oluşabilmesi için aşının veriliş yolu değiştirilmelidir. Oysa tüm insan çalışmalarında gerek profilaktik gerekse terapötik aşılar IM veya subkütanöz yolla uygulanmıştır. Buna karşın farelerde yapılan çalışmalar, sistemik immünizasyondan ziyade mukozal inokülasyonun daha uzun süreli ve etkili bir immünite oluşturduğunu göstermektedir^{1,4}. CpG oligodeoksinükleotidlerinin adjuvan olarak kullanıldığı gB DNA aşısının intranazal yolla uygulanması ile IgA yanıtında çok önemli bir artış saptandığı rapor edilmiştir⁴⁷. HSV enfeksiyonlarında, virusun trigeminal gangliyonlardan temizlenmesinde CD4+ ve CD8+ T lenfosit yanıtlarının büyük önemi vardır, ancak genital herpsten korunmada lokal IgA yanıtının da rolü olduğu bilinmektedir.

Yoğun emek ve zaman harcanan HSV aşı çalışmalarından doğru verilerin alınabilmesi için gerek prelinik gerekse klinik çalışmaların son derece titiz ve dikkatli dizayn edilmesi gereklidir. Yakın zamana kadar HSV aşılarının etkinliğinin klinik değerlendirmesinde uygun metodolojinin düzenli olarak uygulanmaması ve çalışmaların plasebo kontrollü ve prospektif olmaması gibi nedenlerle birçok çalışmanın verileri tam olarak yorumlanamamaktadır. Bu nedenle günümüzdeki ve gelecekteki aşı çalışmalarının çift kör ve plasebo kontrollü olarak yapılması ve istatistiksel analizlerin doğru sonuç vermesi için çalışmalara yeterli sayıda gönüllünün dahil edilmesi gereklidir.

S O N U Ç

Herpes simpleks virusların immün yanıtı kaçıran yetenekleri ile latentlik oluşturma özellikleri, uzun yıllardır devam eden ve devam edecek gibi görünen HSV aşı çalışmalarının kesin başarıya ulaşmasını engellemektedir. Bugüne dek gerek profilaktik gerekse terapötik HSV aşılarının potansiyel yararlarını gösteren çok sayıda kontrollü çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında gD-2-alum-MPL aşısı, kullanımı sadece HSV-1 seronegatif kadınlarla sınırlı olabilecek bir profilaktik aşı adayı olarak görülmektedir. Terapötik HSV aşıları ile alınan sonuçlar ise genellikle başarısız olmuştur. Yapılan tüm çalışmalar, herpes enfeksiyonlarından korunmada ve tekrarların önlenmesinde humoral yanıtı ziyade hücresel yanıtın ve özellikle de

Th1 yolunun indüklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Gelecekte geliştirilecek bir HSV aşısının başarısı, indükleyeceği hücrel immün yanıtın kuvvetine bağlı olacaktır. Günümüzde canlı virus mutantları ya da DNA aşısı bu amaca uygun gibi görünmekte ve tüm hızıyla devam eden aşı çalışmaları, canlı atenüe aşı, replikasyon defektif HSV-2 suşlarından hazırlanan aşılar ve virusa özgül CD8+ T hücre yanıtını hedefleyen teknolojiler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Sonuç olarak, etkili ve başarılı aşılarda geliştirilmesi için, HSV'lara karşı korumada rol alan immün yanıt mekanizmalarının aydınlatılması öncelikli olmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 2002; 110: 145-51.
2. http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Herpes/HSV/vaccines.html
3. Aurelian L. Herpes simplex virus type 2 vaccines: new ground for optimism? *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 437-45.
4. Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic herpes simplex virus vaccines. *Herpes* 2004; 11 (Suppl 3): 161A-169A.
5. Mikloska Z, Cunningham AL. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLR-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J Gen Virol* 1998; 79: 353-61.
6. Svensson A, Nordstrom I, Sun JB, Eriksson K. Protective immunity to genital herpes simplex [correction of simplex] virus type 2 infection is mediated by T-bet. *J Immunol* 2005; 174: 6266-73.
7. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, Roizman B. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 1990; 250: 1262-6.
8. Spruance SL, Evans TG, McKeough MB, et al. Th1/Th2-like immunity and resistance to herpes simplex labialis. *Antiviral Res* 1995; 28: 39-55.
9. Milligan GN, Bernstein DI, Bourne N. T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2. *J Immunol* 1998; 160: 6093-100.
10. Koelle DM. Vaccines for herpes simplex virus infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7:136-41.
11. Toka FN, Suvas S, Rouse BT. CD4+ CD25+ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8+ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. *J Virol* 2004; 78: 13082-9.
12. www.who.int/vaccine_research/documents/en/Status_Table.pdf
13. Mocarski ES, Post LE, Roizman B. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell* 1980; 22: 243-55.
14. Whitley RJ. Prospects for vaccination against herpes simplex virus. *Pediatr Ann* 1993; 22: 726.
15. Kern AB, Schiff BL. Vaccine therapy in recurrent herpes simplex. *Arch Dermatol* 1964; 89: 844-5.
16. Dundarov S, Andonov P, Bakalov B, Nechev K, Tomov C. Immunotherapy with inactivated polyvalent herpes vaccines. *Dev Biol Stand* 1982; 52: 351-6.
17. Schmiersahl P, Rudiger G. Results of treatment with the Herpes simplex antigen Lupidon H, resp. Lupidon G. *Z Hautkr* 1975; 50: 105-12.
18. Weitgasser H. Controlled clinical study of the herpes antigens Lupidon H and Lupidon G. *Z Hautkr* 1977; 52: 625-8.
19. Mastrolorenzo A, Tiradritti L, Salimbeni L, Zuccati G. Multicentre clinical trial with herpes simplex virus vaccine in recurrent herpes infection. *Int J STD AIDS* 1995; 6: 431-5.

20. Dundarov S, Andonov P. Seventeen years of application of herpes vaccines in Bulgaria. *Acta Virol* 1994; 38: 205-8.
21. Skinner GR, Davies JA, Dundarov S, Andonov P. Prevention of herpes genitalis by the 'Bulgarian' vaccine F.HSV-2V(PRK): preliminary clinical evidence. *Croat Med J* 2000; 41: 378-83.
22. Meignier B, Jourdiier TM, Norrild B, Pereira L, Roizman B. Immunization of experimental animals with reconstituted glycoprotein mixtures of herpes simplex virus 1 and 2: protection against challenge with virulent virus. *J Infect Dis* 1987; 155: 921-30.
23. Stanberry LR, Myers MG, Stephanopoulos DE, Burke RL. Preinfection prophylaxis with herpes simplex virus glycoprotein immunogens: factors influencing efficacy. *J Gen Virol* 1989; 70: 3177-85.
24. Cappel R, Sprecher S, De Cuyper F, De Braekeleer J. Clinical efficacy of a herpes simplex subunit vaccine. *J Med Virol* 1985; 16: 137-45.
25. Kutinova L, Benda R, Kalos Z, et al. Placebo-controlled study with subunit herpes simplex virus vaccine in subjects suffering from frequent herpetic recurrences. *Vaccine* 1988; 6: 223-8.
26. Mertz GJ, Ashley R, Burke RL, et al. Double-blind, placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for a genital herpes infection. *J Infect Dis* 1990; 161: 653-60.
27. Straus SE, Savarese B, Tigges M, et al. Induction and enhancement of immune responses to herpes simplex virus type 2 in humans by use of a recombinant glycoprotein D vaccine. *J Infect Dis* 1993; 167: 1045-52.
28. Straus SE, Corey L, Burke RL, et al. Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* 1994; 343: 1460-3.
29. Langenberg AG, Burke RL, Adair SF, et al. A recombinant glycoprotein vaccine for herpes simplex virus type 2: safety and immunogenicity. *Ann Intern Med* 1995; 122: 889-98.
30. Straus SE, Wald A, Kost RG, et al. Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virus type 2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J Infect Dis* 1997; 176: 1129-34.
31. Corey L, Langenberg AG, Ashley R, et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA* 1999; 282: 331-40.
32. Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, et al. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* 2002; 347: 1652-61.
33. Bernstein DI, Aoki FY, Tying SK, et al. Safety and immunogenicity of glycoprotein D-adjuvant genital herpes vaccine. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1271-81.
34. Quenelle DC, Collins DJ, Marciani DJ, Kern ER. Effect of immunization with herpes simplex virus type-1 (HSV-1) glycoprotein D (gD) plus the immune enhancer GPI-0100 on infection with HSV-1 or HSV-2. *Vaccine* 2006; 24: 1515-22.
35. http://www.henderson-morley.com/main/intracellular_herpes_vaccine.html#intracellular
36. Vaccine table & PREPS --<http://www.henderson-morley.com/research/vaccine.html>
37. Skinner GR, Turyk ME, Benson CA, et al. The efficacy and safety of Skinner herpes simplex vaccine towards modulation of herpes genitalis; report of a prospective double-blind placebo controlled trial. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1997; 186: 31-6.
38. Forrester A, Farrell H, Wilkinson G, Kaye J, Davis-Poynter N, Minson T. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol* 1992; 66: 341-8.
39. McLean CS, Erturk M, Jennings R, et al. Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus type 2 using a genetically disabled HSV-1. *J Infect Dis* 1994; 170: 1100-9.

40. Da Costa XJ, Morrison LA, Knipe DM. Comparison of different forms of herpes simplex replication-defective mutant viruses as vaccines in a mouse model of HSV-2 genital infection. *Virology* 2001; 288: 256-63.
41. de Bruyn G, Vargas-Cortez M, Warren T, et al. A randomized controlled trial of a replication defective (gH deletion) herpes simplex virus vaccine for the treatment of recurrent genital herpes among immunocompetent subjects. *Vaccine* 2006; 24: 914-20.
42. Hoshino Y, Dalai SK, Wang K, et al. Comparative efficacy and immunogenicity of replication-defective, recombinant glycoprotein, and DNA vaccines for herpes simplex virus 2 infections in mice and guinea pigs. *J Virol* 2005; 79: 410-8.
43. Parker JN, Pfister LA, Quenelle D, et al. Genetically engineered herpes simplex viruses that express IL-12 or GM-CSF as vaccine candidates. *Vaccine* 2006; 24: 1644-52.
44. Mori I, Liu B, Goshima F, et al. HF10, an attenuated herpes simplex virus (HSV) type 1 clone, lacks neuroinvasiveness protects mice against lethal challenge with HSV types 1 and 2. *Microbes Infect* 2005; 7: 1492-500.
45. Pardoe I, Dargan D. PREPS and L-particles: a new approach to virus-like particle vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2002; 1: 427-32.
46. http://www.henderson-morley.com/main/preps_vaccine.html
47. Rajcani J, Mosko T, Rezuchova I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Rev Med Virol* 2005; 15: 303-25.
48. Lee HH, Cha SC, Jang DJ. Immunization with combined HSV-2 glycoproteins B2:D2 gene DNAs: protection against lethal intravaginal challenges in mice. *Virus Genes* 2002; 25: 179-88.
49. Sin J, Kim JJ, Pachuk C, et al. DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4(+) T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 in vivo. *J Virol* 2000; 74: 11173-80.
50. Lee S, Gierynska M, Eo SK, et al. Influence of DNA encoding cytokines on systemic and mucosal immunity following genetic vaccination against herpes simplex virus. *Microbes Infect* 2003; 5: 571-8.
51. Mascola JR. Herpes simplex virus vaccines- Why don't antibodies protect? *JAMA* 1999; 282: 379-80.