Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara, 45(1): 109-130, 2021
Doi: 10.33483/jfpau.800507

DERLEME MAKALE / REVIEW ARTICLE

ALT ÜNİTE BAZLI AŞILARIN PULMONER UYGULAMASINA GENEL BAKIŞ

AN OVERVIEW OF SUBUNIT-BASED VACCINES FOR PULMONARY ADMINISTRATION

Melike ONGUN[1,*], Başaran MUTLU AĞARDAN[1], Füsun ACARTÜRK[1]

[1]Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 06330, Etiler, Ankara, TÜRKİYE

ÖZ

Amaç: *Son yıllarda pulmoner bağışıklama parenteral aşılamaya ilişkin sorunları ortadan kaldırması, hem sistemik hem de mukozal bağışıklığı indüklemesi ile ilgi odağı olmuştur. Bu derlemede, inhale alt birim aşı çalışmaları ve gelişmeleri ele alınmıştır.*

Sonuç ve Tartışma: *Tüm patojen bazlı aşılara kıyasla daha güvenli olan alt birim aşılar, karmaşık yapılı patojenlerin neden olduğu hastalıklarda spesifik ve koruyucu bağışıklık yanıtı oluşturmaktadır. Bu aşıların, çeşitli taşıyıcı sistemler ve adjuvanlarla formüle edildiklerinde, solunum sisteminde hedeflenen bölgede spesifik immün yanıt oluşturduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Son yıllarda konu ile ilgili yapılan araştırmalar stabil, invazif olmayan, soğuk zincir gerektirmeyen, kitlesel aşılamaya uygun kuru toz inhale aşıların formülasyonlarının geliştirilmesi ve bu aşılara uygun tek kullanımlık cihaz tasarımı üzerine odaklanmaktadır.*

Anahtar kelimeler: *Alt birim aşı, inhale aşı, pulmoner bağışıklama*

ABSTRACT

Objective: *In recent years, pulmonary immunization has been the center of interest as it eliminates the problems related the parenteral vaccination and induces both systemic and mucosal immunity. In this review, the inhaled subunit vaccination studies and recent developments have been discussed.*

Result and Discussion: *Subunit vaccines, which are safer compared to whole pathogen-based vaccines, have provided a specific and protective immune response in diseases caused by complex pathogens. It has been shown that the formulations of these vaccines with carrier systems and adjuvants, obtain a specific immune response in the targeted area of the respiratory system. The recent studies focus on the formulation development of stable, non-invasive, dry powder inhaled vaccines that do not require cold chain storage and suitable for mass vaccination, also disposable devices which are suitable for this vaccines.*

Keywords: *subunit vaccine, inhalable vaccine, pulmonary immunization*

[*] **Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Melike Ongun
***e-posta / e-mail*:** melike.ongun@gazi.edu.tr

Gönderilme / Submitted: 26.09.2020 **Kabul / Accepted:** 19.12.2020

GİRİŞ

Aşı, hastalık etkeni virüs, bakteri vb. mikroorganizmaların hastalık yapma özelliklerinin ortadan kaldırılması ile geliştirilen biyolojik bir üründür. Vücudun savunma mekanizmasını uyararak kişinin hastalık etkenine karşı bağışıklık kazanıp dirençli hale gelmesini sağlar [1]. Ülkemizde ilk aşılama uygulaması, çiçek hastası bir kişinin cildindeki kabarcıklarından toplanan canlı çiçek virüsünün bir başkasına aktarılması yoluyla 18. yüzyılda yapılmıştır. Leydi Mary W. Montagu, Türkiye'de yaşarken, çiçek hastalığına karşı yapılan aşı uygulamalarını gözlemlemiştir. Batı ülkeleri, bu yöntemi Dr. Timoni ve Lady Mary W. Montagu'nun yazıları aracılığıyla öğrenmiştir. Ülkemiz bu tedavi yönteminin Batı'ya aktarılmasında, medeniyetler arasında bir köprü olarak kilit bir rol oynamıştır. Enfeksiyon riski taşıyan bu yöntem, ilk kez Edward Jenner (1789) tarafından daha güvenli ve bilimsel bir aşılama olarak geliştirilmiştir [2].

Bağışıklık sisteminin patojenlere karşı üç özelliği vardır; indüklenebilirlik, özgüllük ve hafıza özellikleri. Bu özellikler aşı tasarımı ve gelişiminde oldukça önemlidir. İndüklenebilirlik, pasif olan bağışık yanıtın ancak enfeksiyon veya aşılama ile hızlı ve etkili şekilde harekete geçeceğini ifade etmektedir. Özgüllük, bağışıklık sisteminin belirli patojenlere (veya aşılara) cevap verme yeteneğini ifade eder ve böylece bağışıklık yanıtının belirli bir enfeksiyonla savaşmak için ideal olmasını sağlar. Bağışıklık yanıtının hafıza bileşeni ise, bir enfeksiyona tekrar maruz kalındığında daha hızlı ve etkili şekilde tepki verilmesidir. Aşı çalışmalarında karşılaşılan temel sorunlar, patojenlerin karmaşık yapıları, patojenlerin yüksek mutasyon oranları ve doğru tipte bağışıklık yanıtı üretme yeteneği olarak üç ana sınıfa ayrılabilir. Çiçek hastalığı gibi canlı virüs aşılarının etkinliği yüksek olmasına rağmen taşıdığı riskler, araştırmacıları orijinal patojene benzer bir bağışık yanıt indükleyebilen, bulaşıcı organizmanın sadece bazı bölümlerini kullanarak aşı geliştirme çalışmalarına yönlendirmiştir. Bu derlemede, daha güvenli bir yaklaşım olarak görülen alt birim aşıların pulmoner uygulaması üzerine yapılan çalışmalar incelenmiştir.

Aşıların Sınıflandırılması

Aşılar, üretim teknolojilerine göre geleneksel ve biyoteknolojik aşılar olarak sınıflandırılabilir. Geleneksel olarak aşılar, canlı zayıflatılmış patojenler, tamamen inaktive edilmiş organizmalar veya inaktive edilmiş bakteriyel toksinlerden oluşmakta olup, genellikle yeterince immunojeniktirler. Tüm patojeni içeren geleneksel aşılar, uzun süreli koruyucu bağışıklık sağlamalarına rağmen hafif veya ölümcül etkilere neden olmaktadır. Güvenlik, aşı geliştirmede büyük bir sorun kaynağıdır. Geleneksel aşıların kullanımı, bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde hastalığa neden olabilirliği ve tekrar virülans kazanma riski nedeniyle sınırlıdır. Bu sınırlamalar doğrultusunda, aşı tasarımı için yeni stratejiler ortaya çıkmakta ve aşı gelişimi, canlı zayıflatılmış veya inaktive aşıların tam hücre temelli yaklaşımından daha

güvenli olan split ve alt birim aşı teknolojisine doğru ilerlemektedir. Split aşılar, tam patojenin daha küçük bileşenlere fiziksel olarak ayrılması ile elde edilir. Bu atılımlara önemli bir katkı, antijen üretimi problemini çözen rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesiyle sağlanmıştır. Ayrıca konjuge aşıların, alt birim aşıların ve replike edici olmayan rekombinant virüs benzeri partiküllerin (VLP'ler) geliştirilmesi, başarılı aşı geliştirme çalışmalarına büyük katkı sağlamıştır [3].

Canlı Zayıflatılmış (Atenüe) Aşılar

Geleneksel aşıların temeli canlı zayıflatılmış aşılara dayanmaktadır. Hastalığa neden olan patojenin laboratuvar koşullarında zayıflatılmasıyla elde edilen canlı zayıflatılmış aşılar, vücutta doğal enfeksiyon oluşumunu taklit etmeleri sayesinde etkili bir aşılama stratejisi oluşturur. Bu aşıların avantajı hem güçlü bir hücresel yanıt hem de antikor yanıt oluşturmalarıdır. Genellikle uzun süreli koruma sağladıkları için tek doz aşılama yeterli olmaktadır [4]. Virüs kaynaklı canlı ve zayıflatılmış aşı geliştirmek bakterilere kıyasla daha kolaydır. Çünkü virüsler daha az gene sahiptir ve bu nedenle viral özelliklerini kontrol etmek daha kolaydır. Tüberküloza karşı kullanılan BCG aşısı, suçiçeği, kızamık, kabakulak ve kızamıkçık karma (KKK) aşısı canlı zayıflatılmış aşılara örnek olarak verilebilir. Priorix ®, piyasada bulunan KKK aşısıdır. Aşı zayıflatılmış KKK virüsleri içerir [5].

İnaktive Edilmiş Aşılar

İnaktif aşılar patojenin kimyasal, ısı, radyasyon gibi işlemlerle inaktive edilmesiyle hazırlanırlar. Bu inaktivasyon mikroorganizmayı daha stabil hale getirmektedir. Ölü veya inaktive edilmiş aşıların zayıflatılmış aşılara göre temel avantajı daha güvenli olmalarıdır. Tekrar virülans kazanma riskleri azdır. Öte yandan ölü/inaktif aşılar, patojenik bileşenlerin yapısının korunması nedeniyle yeni alt birim aşılara kıyasla daha karmaşık veya daha büyük bir enflamatuar bağışıklık yanıtına yol açar. Ancak replikasyon özelliklerinin olmaması, vücuttan hızla uzaklaştırılmalarına ve canlı aşılara kıyasla etkinliklerinin azalmasına neden olur [6].

DNA Aşıları

DNA aşıları geleneksel aşılara kıyasla birçok avantaja sahip yeni nesil aşılardır. DNA aşılaması ya da genetik aşılama olarak adlandırılan bu yöntemin temel prensibi, protein veya peptit formunda antijen enjekte etmek yerine konakçı hücreleri, antijeni kodlayan plazmid DNA (pDNA) ile transfekte ederek bağışık yanıt oluşturmaktır. DNA aşılaması ile konakçı hücreler, DNA tarafından kodlanan proteini (antijen) üretir ve bu özel proteine karşı bağışıklık indüklenir. DNA aşıları genellikle kas içi (im) ve intradermal (id) yolla uygulanır. Kas içi uygulama ile daha yüksek antijen ekspresyonu elde edilmesine rağmen, bu uygulama yolu intradermal uygulamaya göre daha az immunojeniktir. Bunun nedeni kas dokusunda antijen sunan hücre sıklığının deriye göre daha az olmasıdır. Bu intradermal

uygulamalarda gen tabancası, elektroporasyon, jet enjeksiyon, ultrason ve mikroiğne yöntemleri kullanılmaktadır. Nispeten düşük maliyetlerle kolay üretilebilir olmaları ve hem hücresel hem humoral yanıt oluşturabilmeleri önemli avantajlarındandır. İntraselüler patojenlere (virüs gibi) ve kansere karşı hücresel bağışıklık oluşturma yeteneğine sahiptirler. DNA aşıları vektör sistemine dayanan aşılara kıyasla avantajlıdır. Çünkü vektör sistemine dayanan aşılarda vektöre ait bağışıklık gelişebilmektedir. Bu durum esas olarak ilgili antijene karşı oluşan bağışıklık yanıtta azalmaya neden olabilir. Modifiye virüs Ankara (MVA) ve adenovirüs aşılamada kullanılan vektörlere örnektir. MVA, çiçek aşısında kullanılmış ve şu anda bulaşıcı hastalık ve kanser aşılarında rekombinant viral vektör olarak kullanılmak amacıyla geliştirilen zayıflatılmış bir türevdir. MVA, bir veya daha fazla yabancı antijeni kodlayabilme özelliğiyle çok değerlikli bir aşı işlevi görebilir. Vektör, intrinsik adjuvan özelliklere sahip olup humoral ve hücresel immün yanıtı indükler [7]. DNA aşıları ise sadece çıplak DNA'dan oluşur. Bazı durumlarda sentetik taşıyıcılarla formüle edilmelerine rağmen asla başka antijen içermezler [8]. DNA aşılaması sadece istenen bağışıklık yanıtına özgü proteinlerin üretilmesini sağlar. Böylece vektöre özgü bağışık yanıt veya istenmeyen etkiler görülmez. Ayrıca pDNA oda sıcaklığında oldukça stabildir, bu sayede DNA aşılarının saklanması için soğuk zincir gerekliliği ortadan kalkar. Şu ana kadar hiçbir DNA aşısı insan kullanımı için onaylanmamıştır. Veteriner kullanımı için onaylı ve kayıtlı bazı DNA aşıları bulunmaktadır [9].

Alt Birim Aşılar

Alt birim aşılar hastalığa neden olan bakteri, virüs ve parazitlerin bileşenlerinin kullanıldığı ve bu etkenlere karşı edinsel (özgül) bağışıklık sağlayan aşılardır [10]. Antijen olarak adlandırılan bu patojen bileşenleri genellikle spesifik protein ya da sentetik peptitlerdir. Son yıllarda peptit ve protein yapıda antijen içeren birçok aşı klinik çalışmalarla test edilmiştir. Bu aşıların bazıları dünya çapında ticari olarak bulunmaktadır. Alt birim aşılar, tüm organizmayı içeren aşılara kıyasla çok daha güvenli olup, fiziksel ve kimyasal özellikleri daha iyi tanımlanmıştır. Bu aşılar yüksek oranda saflaştırılmış antijenler içermelerine rağmen, antijenin tanınması için gerekli olan patojenle ilişkili moleküler modellerin (PAMP) eksikliği ve boyutlarının küçük olması zayıf immunojeniteye neden olur [11]. Bu nedenle, formülasyonlarına immün yanıtı uyarmak ya da artırmak amacıyla adjuvanlar dahil edilir. Alt birim aşılar immunojenite, güvenlik ve stabilite gibi çeşitli hususlar doğrultusunda geliştirilmiştir. Bu aşıların tasarımında en önemli nokta, aşılama ile indüklenen bağışıklık yanıtlarının nicel ve nitel özelliğidir. Bağışıklık yanıtının koruyuculuk oluşturacak düzeyde ve spesifik olması amaçlanmaktadır. Alt birim aşıların oluşturduğu bağışıklık yanıtını etkileyen temel faktörler; immunojenlerin doğası ve dozu, formülasyonda kullanılan adjuvan veya taşıyıcılar, immunizasyon programı, uygulama yolu, aşının uygulandığı konağın bağışıklık durumudur. Diğer faktörler ise alt birim aşı tasarımı ve formülasyon optimizasyonu ile ilişkilidir.

Bakteriyel alt birim aşıların iki tipi bulunmaktadır. İlk tip, hastalığa neden olan bakteriyel toksinlere karşı üretilen toksoid aşılarıdır. Toksinler, formaldehit uygulanması gibi kimyasal yöntemlerle detoksifiye edilerek toksoidlere dönüştürülürler. Toksoidin toksine benzerliği, bağışıklık sisteminin anti-toksoid antikorlarını üretmesiyle doğal toksinleri nötralize etmesini sağlar. Difteri, tetanoz ve boğmaca hastalıklarına karşı yaygın olarak kullanılan toksoid aşılar, bu tür aşıların en bilinen örneğidir. İkinci bakteriyel alt birim aşı tipi, kapsüllü bakterilerin kapsüler polisakkaritlerinden üretilen aşılardır. *Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis ve Haemophilus influenzae tip b* (Hib) enfeksiyonlarına karşı aşılar bu gruba örnektir. Bu tip aşıların bir çeşidi de konjuge aşılardır. Konjuge aşılar, bir antijenin (genellikle bakteri polisakkaritleri) taşıyıcı proteine kimyasal olarak bağlanması ile oluşur. Bu aşılar polisakkarit aşılarıyla elde edilen immün yanıtı artırmak için geliştirilmiş daha etkili aşılardır. Virus alt birim aşıları ise virüslerin yapısının parçalanarak, çeşitli viral bileşenlerin karışımından hazırlanan split viral aşılardır [6].

Alt Birim Aşılarda Adjuvanların Rolü

Aşı tasarımı ve gelişiminde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri, yüksek derecede saflaştırılmış rekombinant proteinlerine dayanan birçok yeni alt birim aşının zayıf immunojeniteye sahip olması ve koruyucu bağışıklık için yetersiz yanıt oluşturmasıdır. Bu durum adjuvan kullanımı gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Aşı adjuvanı, bir antijene karşı immün yanıtı kuvvetlendiren ve/veya istenen immün yanıtı düzenleyen bileşen olarak tanımlanır. Adjuvan terimi, Latince yardımcı olmak anlamına gelen *adjuvare* kelimesinden türetilmiştir. Alüminyum uzun yıllar boyunca tek onaylı adjuvan olarak kullanılmıştır. Alüminyum tuzları (Alum) küçük çocuklar, yaşlılar, hamile kadınları da içermek üzere farklı popülasyonlarda kabul edilebilir güvenlik profiline sahiptir. Zamanla aşılarda adjuvan olarak sadece alüminyum tuzlarının kullanımının daha güçlü ve gelişmiş bağışıklık gerektiren bazı karmaşık patojenlere (Herpes virüsü, *Malaria plasmodium*, İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü-HIV, *Mycobacterium tuberculosis* gibi) karşı yetersiz kaldığı öne sürülmüştür [12]. Son yıllarda, alt birim aşılar için yeni etkili adjuvanların keşfiyle önemli ilerlemeler kaydedilmiştir ve bunlardan birkaçı onaylanmış lisanslı aşı bileşenleri olarak piyasada bulunmaktadır (Tablo 1). Spesifik hastalığa karşı hücresel veya mukozal bağışıklığı veya bunların kombinasyonlarını uyarabilen etkili ve güvenli adjuvanlara ilgi artmaktadır [13].

Adjuvanlar, etki mekanizmalarına göre taşıyıcı sistemler ve immunpotensiyatör gruplar olarak sınıflandırılabilirler. Adjuvanlar taşıyıcı sistem olarak, antijenlerin antijen sunan hücrelere (APC) bozunmaya uğramadan iletilmesini sağlarlar. Adjuvan ve taşıyıcı sistemler aşı geliştirme alanında artık birbiri ile bütünleşmiş terimlerdir. Taşıyıcı sistemler, genellikle partiküler formda olup, antijen sunan hücreler için doğal bir hedef olan patojenlere benzer boyutta ve şekilde oldukları için patojenleri taklit niteliğindedirler. Yapılan klinik öncesi pek çok çalışmada lipozom, emülsiyon, virüs benzeri partikül,

virozom, immün uyarıcı kompleksler (ISCOM), polimer bazlı partiküler sistemler adjuvan olarak kullanılmıştır. Bozkır ve Hayta, yaptıkları çalışmada Hemaglütinin antijeni (influenza virüsü yüzey antijeni) içeren çoklu emülsiyon formülasyonu geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu emülsiyon formülasyonu 3 ay boyunca stabilitesini korumuş ve sıçanlarda geleneksel aşıdan daha etkili bir immün yanıt oluşturmuştur. Yapılan karakterizasyon ve immunizasyon çalışmaları sonucunda çoklu emülsiyon sistemlerinin etkili bir adjuvan olabileceği gösterilmiştir [14]. Yapılan bir diğer çalışmada Sayın ve arkadaşları, mukozal aşılamada immunojenitenin artırılmasında kitozanı adjuvan/taşıyıcı sistem olarak kullanmışlardır. Kitozan biyobozunur, biyouyumlu ve düşük toksisite özelliklerine sahip hem adjuvan hem taşıyıcı sistem olarak kullanılabilen bir biyopolimerdir. Bu çalışmada nanopartikülleri ve dispersiyonları hazırlanarak mukozal immün yanıtı artırdığı gözlenmiştir. Bu çalışma negatif yüklü kitozan türevi olan Mono-N-karboksimetil kitozan (MCC) nanopartiküllerinin mukozal immunizasyon sağlamak amacıyla taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı ilk çalışmadır [15]. Lipozomlar taşıyıcı sistem olarak protein yapısındaki maddelerin parçalanmasını önleme, aşıların mukozal membrandan geçişini artırma ve antijenlerin hücrelere optimum düzeyde sunulmasını sağlama gibi üstünlüklere sahiptir. Kaplan ve Çelebi, nazal yoldan uygulanmak üzere antijen ovalbumin (OVA) içeren lipozom-jel aşı formülasyonları geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, formülasyonlarının 7 ay boyunca stabilitesinin ve antijen yapısal bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Ayrıca jellerin mekanik ve mukoadhezif özelliklerinin nazal mukozaya uygun olduğu gösterilmiştir. Jel-lipozom formülasyonlarının nazal yoldan uygulanacak aşılar için uygun taşıyıcı sistemler olduğu sonucuna ulaşılmıştır [16]. Antijenler, taşıyıcı sisteme yüzeye adsorpsiyon veya enkapsülasyon yoluyla dahil olurlar. Taşıyıcı sistemler; antijenin stabilizasyonunda, APC'lere hedeflendirilmesinde, hücre içine alınmasının kontrolünde, bağışıklık sistemi hücrelerine maruziyet süresinin uzatılmasında rol oynarlar. Ayrıca, immün yanıtı artırıcı özelliklere sahip olabilirler veya adjuvanlarla kombine edilerek istenilen profilde özelleştirilebilirler.

Adjuvanlar immün yanıtı artırmak için; depo etkisi, sitokinlerin ve kemokinlerin up-regülasyonu, enjeksiyon bölgesinde hücresel iyileştirme, antijen alımının ve APC'lere sunumunun artırılması, APC'lerin aktivasyonu ve sonrasındaolgunlaşarak lenf nodlarına göç etmesi, enflamasyon aktivasyonu gibi mekanizmalardan yararlanır [17]. İmmün yanıtı artırıcı bileşikler doğal tanınma reseptörleri aracılığıyla (PPRs) antijen sunan hücrelerle etkileşime girerek doğal bağışıklık sisteminin aktifleşmesini sağlarlar. Yani immün yanıtı artıran bu bileşikler doğal immün reseptör ligandlarıdır. Doğal tanınma reseptörleri membran proteinleri olarak adlandırılırlar. Toll benzeri reseptörler (TLR), NOD benzeri reseptörler (NLR), C tipi lektin reseptörleri (CLP), RIG-I (retinoik aside bağlı gen-I) benzeri reseptörler (RLR) bunlara örnektir. Bu doğal tanınma reseptörleri sitokin salımını tetikleyen patojen ilişkili moleküler modelleri (PAMP) tanırlar [4]. Lipopolisakkarit (endotoksin), peptidoglikan (bakterilerin hücre duvarı), lipoproteinler (bakteri kapsüllü), bakteriyel flagellin, RNA, bakteriyel

DNA'da metillenmemiş CpG motifleri patojen ilişkili moleküler modellere örnektirler [18,19]. TLR agonistleri ise sıklıkla kullanılan güçlü aşı adjuvanlarıdır. Monofosforil lipit A (MPL), aşı uygulamalarında en çok çalışılan TLR agonistidir. MPL, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritlerden elde edilir [20].

Tablo1. İnsanlarda kullanımı onaylanmış adjuvanlar

Adjuvant adı	Taşıyıcı sistem	Aşının ticari adı	Kullanıldığı hastalık	İmmun yanıt tipi	Referans
Alüminyum hidroksit/fosfat	Mineral tuzu	Various	Difteri, tetanoz, hepatit vb.	Th2 Tfh IgG1/IgE ↑	[21]
MF59	Yağ/su emülsiyonu	Fluad	Influenza, kuş gribi	Polifonksiyonel IgG1/IgG2a ↑ Th1/Th2 Tfh	[21]
AS03	Yağ/su emülsiyonu	Arepanrix	Influenza	Th1/Th2 IgG1/IgG2a ↑	[22]
AS04	MPL + Alum	Fendrix	Hepatit B	Th1/Th2	[23]
Virüs benzeri partikül (VLP) + Alum		Gardasil	HPV	Th2 IgG↑	[24]
VLP + MPL + Alum		Cervarix	HPV	Th1/Th2 IgG↑	[24]

MPL: Monofosforil lipid A; VLP: Virus benzeri partikül; HPV: İnsan papilloma virusü; Tfh: Foliküler yardımcı T hücreleri

Mukozal Aşı Uygulamaları

Aşıların veriliş yolu, elde edilen bağışıklık yanıtının tipini ve şiddetini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Aşı uygulama yolları şu şekilde sınıflandırılabilir [25]:

- Parenteral yol: İntramusküler (kas içi), subkütan (deri altı), intradermal (deri içi), intraperitonal (karın içi boşluk) uygulamalar
- Mukozal yol: Oral, nazal, pulmoner, vajinal, rektal uygulamalar
- Deri yolu
- Diğer yollar: Oküler, sublingual uygulamalar

Mukozal aşı çalışmaları, parenteral olmayan aşı uygulamaları arasında dikkat çekmektedir. Çoğu patojen insan konağına solunum, sindirim ve genital sistemlerin mukozasından girer. Enfeksiyon ve bulaşmanın meydana geldiği yerde mukozal bağışıklık oluşturmak avantajlı bir durumdur. Mukozal aşılamanın ağrıya neden olan enjeksiyon uygulaması gerekliliğini ortadan kaldırması, kitlesel aşılamaya uygun olması ve parenteral uygulamaya kıyasla daha az sistemik yan etki oluşturması gibi avantajları vardır. Hem mukozal bölgede hem de sistemik seviyede koruyucu bağışıklık sağlamak için mukozal bölgelerin hedeflenmesi ilgi odağı olmuştur. Son on yılda, yüksek immunojeniteye sahip uygun antijenlerin, mukozal uygulama yollarının (oral, nazal, pulmoner ve vajinal), immün uyarıcı adjuvan moleküllerin ve taşıyıcıların seçilmesiyle yeni mukozal aşı adaylarının geliştirilmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Mukozal immünizasyonla, genellikle parenteral uygulamadan farklı olarak IgA salımı daha fazladır [26]. Muttil ve arkadaşları, difteri CRM-197antijeni (CrmAg) yüklenmiş poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülleri geliştirmişlerdir. L-lösin ile püskürtülerek kurutma işlemine tabi tutulan formalin ile muamele edilmiş ve muamele edilmemiş CrmAg nanopartikülleri kobaylara parenteral ve pulmoner yolla uygulanmıştır. İntramusküler yoldan aşılamada en yüksek serum IgG antikor titresi elde edilirken, pulmoner uygulamada en yüksek IgA titresi elde edilmiştir. Bu çalışma, difteriye karşı korunmada kuru toz aşıları ile pulmoner immünizasyonun, solunum yolunda yüksek bir mukozal bağışıklık yanıt ve sistemik dolaşımda yeterli nötralize edici antikor oluşumu ile sağlandığını göstermiştir [27]. Ballester ve arkadaşları, yeni anti-tüberküloz aşılarının geliştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada, inhale aşının konvansiyonel intradermal uygulanan aşıya kıyasla daha iyi koruma sağladığını göstermişlerdir. Özellikle, NP-Ag85B ve Th1'i uyarıcı bir adjuvan olan oligonükleotid CpG kullanılarak yapılan pulmoner yoldan aşılama, pulmoner bağışıklık yanıtını değiştirerek *Mycobacterium tuberculosis*'e (Mtb) karşı koruma sağlamıştır [28]. Aerosollerin en umut verici çalışmaları paranteral yolla uygulanmayan kızamık aşısı üzerinedir ve etkinliklerinin enjekte edilen aşı ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu düşünülmektedir. Wongh-Chew ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, aerosolize kızamık aşısının, 9 aylık ve daha büyük çocuklara uygulandığında subkütan aşıya eşit derecede veya daha fazla immunojenik olduğu sonucuna ulaşılmıştır [29]. Tüm bu avantajlara rağmen mukozal aşılama, yeterli sistemik bağışık yanıt ortaya çıkaramayabilir, çünkü mukozal dokularda bulunan birçok enzim, aşı immunojenlerinin yapısını kolayca bozabilir. Bu nedenle, geliştirilen taşıyıcı sistemlerin hedef bölgeye ulaşana kadar taşıdıkları antijenin yapısını koruyabilmesi ve stabilitesi hayati önem taşır.

Akciğer Bağışıklık Sistemi

Solunum sistemi anatomik olarak burun, ağız boşluğu ve boğazı içeren üst kısım ile trake ve akciğerlerden oluşan alt kısım olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Bu iki kısım glottis adı verilen akciğerler ve ağız arasında birincil kapak olarak bilinen açıklık ile ayrılır [30]. Solunum sisteminde iletken hava yolları boyunca, kalın bir mukus tabakası ile kaplanmış silyalı epitel hücreleri bulunmaktadır.[31]. Solunum yollarında mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattı mukosililer klirenstir. İstilacı mikroorganizmaların yanı sıra diğer partiküller de mukus ile ağızdan atılırlar ya da yutulurlar. Mukus ayrıca lizozim, laktoferrin, defensinler ve yüzey aktif madde gibi bir dizi antimikrobiyal madde içerir [32]. Mikroorganizmalara karşı solunum yollarındaki bir sonraki savunma hattı hücresel bileşenler, epitel hücreleri ve özellikle alveoler makrofajlardan oluşur [30].

Hava yollarının epitel hücreleri, mikroorganizmaların varlığını algılayabilecek TLR gibi bir dizi tanıma reseptörü eksprese eder. Buna cevap olarak bir dizi proinflamatuar kemokin ve sitokinlerin yanı sıra defensinler üretebilir, böylece nötrofiller ve doğal öldürücü (NK) hücreler indüklenirler. Alveoler makrofajlar, akciğerlerdeki en büyük lökosit popülasyonunu oluşturur. Çok aktif olarak alveoler boşluğa ulaşan her türlü parçacığı fagosite ederler. Akciğerin doğal bağışıklık yanıtından sorumludurlar. Adaptif immün yanıtların uyarılmasına katkıda bulunmazlar [33].

Solunum sisteminin adaptif bağışıklık mekanizması, T-yardımcı (Th) hücrelerinin ve sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) CD4 +, CD8 + gibi çeşitli alt sınıflarının genel antikorlarını içerir. İmmünoglobulin A (IgA) ile immünoglobulin G (IgG) solunum yollarında bulunan yaygın ve önemli antikor alt tipleridir [34]. Solunum sistemindeki antikorlar lokal B hücreleri tarafından üretilir. Alternatif olarak, kemik iliğinde uzun ömürlü plazma hücreleri tarafından üretilen antikorlar, serumdan transudasyon ile alt hava yollarına ulaşabilir. Sağlıklı konağın solunum yollarında az miktarda lokal T hücresi bulunur. T hücreleri birincil enfeksiyondan sonra akciğer parankimasında 6-7 günde ortaya çıkmaya başlar, enfeksiyondan 10 gün sonra sayıları zirveye ulaşır ve sonrasında azalmaya başlar. Ancak sınırlı sayıda hafıza T hücresi kalır. Daha sonra akciğerde azalan hafıza T hücreleri, dolaşımdan alınan T-hücreleri ile desteklenir. Hafıza T hücreleri tekrar enfekte olma durumunda çok hızlı yanıt vererek enfeksiyonun erken evresinde virüs replikasyonunu sınırlar [35].

Antijenin aktive edilmiş dendritik hücreler (DC'ler) tarafından T hücrelerine sunulması, bağışıklık yanıtının başlatılmasında önemli bir adımdır. Submukozal dokuda veya hava yolunda, alveoler lümende solunum yolu boyunca farklı DC popülasyonları bulunur. Solunan antijenler veya antijen partikülleri, alveoler epitelyuma yayılmış dendritik hücre ağıyla karşılaşır ve alveoler sıvıdan hücreye alınırlar. Daha sonra antijenler işlenir ve antijenik peptit parçaları, T hücresi reseptörleri tarafından tanınmak üzere MHC (Büyük Doku Uyum Kompleksi) sınıf I ve II yollarıyla T hücrelerine sunulur. Bu antijen sunumu ve T hücre aktivasyonu lenf nodunda gerçekleşir. DC'lerin lenf düğümlerine göçünde, dendritik hücreler 'olgunlaşmamış' durumdan (antijen alımı için yüksek kapasite, T hücresi

aktivasyonu için düşük kapasite) 'olgun' hale (antijen alımı için düşük kapasite, T hücresi aktivasyonu için yüksek kapasite) dönüşürler. DC'ler saf T hücrelerinin çeşitli spesifik efektör/hafıza T hücresi popülasyonlarına farklılaşmasını başlatır [36].

Pulmoner Uygulamada Aşı Tasarımı

Akciğer, geniş yüzey alanı (80 m^2), yoğun damarlanma ağı, hemen etki istenen durumlarda hızlı emilim sağlaması, ince alveoler epitele barsaklara kıyasla daha az enzimatik aktiviteye ve çözünen madde değişimi için yüksek kapasiteye sahip olması gibi özellikleri ile hem lokal hem de sistemik aşıların uygulaması için ideal bir seçenektir [37]. Akciğerde, alveoler makrofajlar (AM'ler), dendritik hücreler ve B hücreleri gibi antijen sunan hücrelerin yüksek yoğunlukta bulunması, hem mukozal hem de sistemik olarak güçlü ve spesifik bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için önemli bir hedefi temsil ederler [38]. Özellikle, solunum yollarının farklı bölmelerindeki DC'lerin hedeflenmesi, DC popülasyonlarının bölgesel farklılıkları ve işlevleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Mukoza dokularındaki immün indükleyici bölgelere mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) denir. Bronş ile ilişkili lenfoid doku (BALT) son zamanlarda solunum yolu dendritik hücre ve T hücre etkileşimleri için etkili bir bölge olarak tanımlanmıştır. BALT, solunum yolu enfeksiyonuyla indüklenir ve iBALT olarak adlandırılır. Optimum pulmoner aşı tasarımında iBALT'ın uyarılmasının avantajlı olabileceği, antijen alımının makrofajlar yerine dendritik hücreler tarafından sağlanması ve geliştirilen formülasyonların dendritik hücreleri uygun şekilde aktive etmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır [36,39].

Pulmoner aşı tasarımda bir diğer önemli faktör ise partikül büyüklüğüdür. Akciğerde pasif hedefleme, inhalasyon yoluyla uygulanan formülasyonların önemli bir parametresi olan aerosol damlacıklarının veya partiküllerinin büyüklüklerine bağlı birikimi ile gerçekleştirilir. Partikül büyüklüğü sadece farklı solunum yolu bölmelerinde birikmeyi değil, aynı zamanda bir antijenin ve taşıyıcısının akciğer doku bileşenleri ve bağışıklık hücreleriyle nasıl etkileşime gireceğini de belirler. Ayrıca, antijenin akciğer parankimasına, kan dolaşımına, lenfatik sisteme ve spesifik APC popülasyonuna translokasyon etkinliğini, hızını ve yönünü belirler. Alt ünite aşıların akciğerlere başarılı bir şekilde iletilebilmesi için, aşı içeren uygun boyut aralığındaki toz partikül veya damlacık aerosolü, ağız yoluyla solunmalıdır. Toz partiküller veya damlacıklar çok küçük olduğunda nefes yoluyla dışarı atılacaktır. Diğer taraftan, partiküller çok büyük olduğunda, trakenin üst kısmını, boğazın arkasındaki keskin kıvrımı geçemezler. Aerodinamik partikül büyüklüğünün 1 ile 5 μm arasında olmasının pulmoner uygulama için ideal olduğu düşünülmektedir. İnhalasyon manevrası doğru yapıldığında, bu büyüklük aralığındaki partiküllerin çoğunun akciğerlerde birikeceği öngörülmektedir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda inhale aşı uygulamasıyla optimal immün yanıt eldesi için akciğerlerin hangi bölümünün hedeflenmesi gerektiği açık olmamakla birlikte, derin akciğer iletiminin optimum immün yanıta neden olduğu bildirilmiştir [40,41].

Geleneksel aşı hazırlamada kullanılan antijenlerin boyutları değişiklik gösterir. En küçük antijenler (<10 nm), daha büyük partiküller veya agregatlar oluşturmak için sıklıkla adjuvanlarla kombine edilen protein veya viral alt birim antijen aşılardır. Virüs benzeri partiküller (VLP) ve nanopartiküller gibi supramoleküler partikül antijenleri daha büyüktür ve antijen boyutları 100-200 nm'dir. Mikropartiküller, lipozomlar, yağ içinde su emülsiyonları (Freund adjuvanı), su içinde yağ emülsiyonları (MF59 adjuvanı), mineral tuzları (şap) ile formüle edilmiş antijenler ve tüm patojen aşıları ise en büyükleridir (100 nm - 20 μm) [42]. Antijen büyüklüğü de antijen sunan hücreler tarafından alımda önemli belirleyici faktördür. Tam hücre aşıları, virozomlar ve VLP'ler gibi partikül antijenleri veya lipozomlar ve mikropartiküller gibi partiküler adjuvanlar ile formüle edilmiş antijenler, yüklü, hidrofobik veya reseptör ile etkileşebilen büyük yüzeylere sahiptir. DC'ler tarafından antijen alımı makro-pinositoz, reseptör aracılı endositoz ve/veya fagositoz ile gerçekleşir [36].

Foged ve arkadaşları, antijenin hem partikül boyutunun hem de yüzey yükünün, insan DC'leri tarafından alımının belirlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, DC'ler tarafından optimal alım için tercih edilen partikül boyutunun 0.5 μm (çap) olduğu kabul edilmiştir. Pozitif yüzey yüküne sahip olduklarında, büyük partiküllerin (~ 1 μm) alımının büyük ölçüde arttığı gösterilmiştir [38].

Pulmoner Aşılamada Kullanılan Cihaz ve Formülasyonlar

Etkili bir pulmoner aşılama; formülasyonun akciğerde hedeflenen bölgede birikimine, formülasyonun uygulanacağı cihaz ve hedeflenen popülasyon ile uyumuna bağlıdır. Formülasyonun hedef bölgede birikmesinde, bölgeye özgü partikül büyüklüğüne sahip partiküllerin üretilmesi ve doğru nefes tekniği ile doğru dozda inhale edilmesi yani inhalasyon manevrasının doğru yapılması en önemli faktörlerdendir. Astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), kistik fibrözis gibi akciğer hastalıklarında lokal etkili tedavi yaklaşımları uzun yıllardır çalışılmaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş üç tip geleneksel inhalasyon cihazı bulunmaktadır. Bunlar kuru toz inhalerler, nebulizatörler (jet, ultrasonik) ve basınçlı ölçülü doz inhalerlerdir. [43]. İnhalasyon cihazları tek dozlu ve çok dozlu olarak veya tek kullanımlık ve tekrar kullanılabilir inhalerler olarak sınıflandırılabilir. Solunum yolu enfeksiyonlarında etkili aşılar genellikle uzun sürelerle, sık uygulama gerektirmeksizin uygulanır. Takviye dozları ise ilk aşılamadan 3 ila 6 ay sonra uygulanmaktadır. Bu nedenle tekrar kullanılabilir ve çoklu doz cihazların pulmoner aşılama için uygun olmadığı düşünülmektedir. Çok kullanımlık cihazlar kitlesel aşılama programları için kullanılabilir, ancak hastalıkların kişiler arasında bulaşını önlemek için her kullanımdan sonra detaylı bir şekilde temizlenmesi gerekir. Çok kullanımlık cihazlar, aşının kontaminasyonunu önleyebilecek tek kullanımlık ara yüzey ile de kullanılabilir [44]. Bu üç cihazın pulmoner aşılamada birbirlerine kıyasla avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Alt birim aşıların pulmoner uygulamasında formülasyon ve cihaz tasarımı çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmalar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Nebulizatörler

Nebulizatörler sulu çözeltilerin veya süspansiyonların aerosol olarak uygulanmasına olanak sağlayan cihazlardır. Temel olarak, ultrasonik ve jet nebulizatörler olmak üzere iki klasik nebulizatör türü vardır. Ultrasonik nebulizatörler, çözeltiyi küçük damlacıklara dağıtmak için yüksek frekanslı dalgalar kullanır. Bu dalgalar, salınımlı bir piezo elemanından sulu çözeltiye veya süspansiyona yüksek frekanslı darbeler uygulanarak üretilir. Jet nebulizatörrlerde, aerosol üretmek için iki akışkanlı bir başlık kullanır. Kompresör veya basınçla oluşan hava, damlacıkların oluştuğu iki kanalı geçer. Boyut dağılımını daraltıp 1-5 μm gibi istenen aralığa ayarlamak için, büyük parçacıkları sıvı haznesine geri toplayan bir bölme başlık üzerine yerleştirilir [44].

Nebulizasyon, alt birim aşılar da dahil olmak üzere aşıların pulmoner uygulanmasına yönelik klinik çalışmaların çoğunda kullanılır. Bunun temel nedeni basit formülasyon gerekliliği ve neredeyse tüm sıvı ürünler için kullanılacak nebülizatörlerin mevcut olmasıdır. Her ne kadar nebülizasyon birçok çalışmada kullanılsa da bu tür cihazların toplu aşılama programlarında kullanımını sınırlayan birkaç dezavantajı vardır. Hem ultrasonik hem de jet nebulizatörlerin ürettiği aerosol, soluk alıp verme ile uygulanır. Her inhalasyonda, nebulizatörün çıkış hızına bağlı olarak dozajın sadece küçük bir kısmı akciğerlerde birikir. Bu nedenle, tam doz solunma 10-15 dakika kadar sürebilir. Bu durum yaşlılar ve küçük çocuklar gibi bazı hedef popülasyonlar için sorun oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün aşı programları özellikle çocuklara odaklanmaktadır. 6 ila 12 aylıktan küçük bebekler sadece burundan nefes alırlar ve çocuklar 4 ile 6 yaşından itibaren verilen inhalasyon talimatına uyabilir. Küçük çocuklar için her iki tipteki nebulizatör de burnu ve ağzı kaplayan bir yüz maskesi ile uygulanabilir [45]. Meksikalı çocuklarda kızamık aşısının pulmoner uygulamasına ilişkin çalışmada, "Classical Mexican Device" olarak adlandırılan bir jet nebulizatör kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, liyofilize kızamık aşısı sulandırılmış ve uygulama sonuna kadar kırılmış buz üzerine tutulmuştur. Çocuklara aşı uygularken bir yüz maskesi yoluyla solunan aerosolün üretilmesi için bir güç kaynağına bağlı olan kompresör kullanılmıştır. Maskenin kontaminasyonunu önlemek için tek kullanımlık bir kağıt koni tercih edilmiştir [46].

İlaç çözeltisinin fizikokimyasal özellikleri, jet basıncı ve inhalasyon manevrası gibi birçok değişken nebulizatörden çıkan damlacık büyüklüğü dağılımını ve çıkış hızını etkileyebilir. Avrupa Farmakopesi'ne göre inhale edilebilir sıvı formülasyonlar, 3 ile 8.5 pH aralığında, tercihen steril ve izotonik olmalıdır [47]. Saklama sırasında steriliteyi korumak için koruyucu maddeler eklenebilir. Uzun uygulama süresi, nebulizatör kabındaki büyük kalıntı hacmi ve böylece artan doz ihtiyacı nebulizatörlerin dezavantajlarındandır. Ultrasonik nebulizatörlerde uygulanan yüksek frekanslı darbeler ve artan sıcaklığın, protein yapısında bozulma ve agregasyona neden olabildiği gösterilmiştir [48]. Çoğu antijen, protein veya peptit yapısına sahip olduğundan, ultrasonik nebulizatörlerin aşı uygulamalarında uygun olmadığı düşünülmektedir. Çoğu nebulizatör, tek kullanımlık olacak şekilde tasarlanmış olsa da

tekrar kullanılabilir cihazlardır. Bu nedenle, düzenli olarak temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi gerektiğinden, farklı hastalar tarafından kullanılacağı durumlarda tercih edilmezler. Çeşitli tek kullanımlık jet nebulizatörler mevcut olsa da bunların hepsi damlacık büyüklüğü dağılımı ve çıkış hızı açısından yeniden kullanılabilir cihazlar kadar etkili olmayabilir ve yine de basınçlı temiz bir hava sistemi gerektirirler. Ayrıca güç kaynağı da gerektirmesi taşınabilirlik sorunu yaratır ve uygulama alanlarını hastaneler ile sınırlar [44].

Basınçlı Ölçülü Doz İnhalerler (ÖDİ)

Basınçlı ölçülü doz inhaler, ölçülü valf, aktüatör (aktive edici kısım), süspansiyon veya çözeltiyi içeren basınçlı taşıyıcı kap ve ağızlıktan oluşur. Taşıyıcı kap, basınç altında bir itici gaz içinde çözünmüş veya süspande edilmiş aşı içerir. Kap aşağı doğru bastırıldığında belirli miktarda formülasyon dışarı çıkar. İtici gazın hızlı bir şekilde genleşmesi, aşı formülasyonunu küçük, solunabilir parçacıklara dağılmasını sağlar. ÖDİ'ler tasarımları nedeniyle çok dozlu cihazlardır. Aerosol, ÖDİ'den yüksek hızda (5 m/s) salınır. Bu nedenle, dozun salınması ve solunması aynı anda olmalıdır. Solunum geciktiğinde, tüm doz ağzın arka kısmında kalabilir. Dozu akciğerlere uygun şekilde uygulamak için, iyi el-akciğer koordinasyonu gereklidir [45]. ÖDİ şeklinde tasarlanan aşı formülasyonları itici gaz ve antijenden oluşur. Günümüzde itici gaz olarak hidrofloroalkan kullanımına izin verilmiştir. Antijen itici gaz içinde süspanse edildiğinde, antijenin çökme veya asılı kalmasına bağlı doz dalgalanmaları oluşabilmektedir. Bu nedenle, kutu kullanılmadan önce iyice çalkalanmalı ve süspansiyon fiziksel olarak stabil olmalıdır. Diğer bir seçenek ise yüzey aktif maddeler veya yardımcı çözücüler kullanarak antijeni itici gaz içinde çözmektir [49]. ÖDİ'ler için aşı formülasyonlarının geliştirilmesindeki temel zorluk, proteinin itici gaz içerisindeki bütünlüğü ve stabilitesidir. İtici gazın hidrofobik yapısı, protein bazlı antijenlerin denatürasyonuna neden olabilir. Aşıların pulmoner uygulaması için ÖDİ'ler kullanılarak yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Her ne kadar ucuz ve taşınabilir olsalar da stabil aşı formülasyonları geliştirmenin zorlukları onları bu uygulama için daha az uygun kılmaktadır. Ayrıca, yanlış el-akciğer koordinasyonu durumunda yanlış dozlamaya sebebiyet verebilecekleri için kullanımları verimli değildir [44].

Kuru Toz İnhalerler (KTİ)

Kuru toz inhaler aşı formülasyonu, cihazın tasarımıyla uyumlu fizikokimyasal özellikleri olan, hedeflenen bölgeye uygun aerodinamik partikül büyüklüğü dağılımına sahip ve aerosole dönüştürülebilen toz formülasyonunu ifade eder. KTİ'nin aşıların pulmoner uygulamasında diğer cihazlara kıyasla daha uygun olduğu düşünülmektedir. Çünkü KTİ'ler genellikle nebulizatörler ve ölçülü doz sıvı inhalerlere kıyasla daha az karmaşık ve daha ucuzdur, dolayısıyla tek kullanımlık cihazlar olarak kullanımları mümkün olup soğuk zincir gerekliliğini ortadan kaldırırlar. Bunlara ek

olarak, tozlar, sıvı formülasyonlara kıyasla genellikle daha immunojenik ve stabil olma avantajına da sahiptir. Amorij ve arkadaşları, püskürtmeli-dondurarak kurutma yöntemiyle influenza alt birim aşısı hazırlamışlardır. Fareler üzerinde yapılan çalışmada, hazırladıkları kuru toz formülasyonun pulmoner uygulaması, alt ünite aşının sulu çözeltisinin pulmoner uygulaması ile karşılaştırılmıştır. Kuru toz aerosollerin aerodinamik partikül büyüklüğü, sıvı aerosol içindeki damlacıklardan daha küçük bulunmuştur (sırasıyla 5.3 ve 25 μm). Sonuçlarda kuru toz aşının uygulandığı grupta serum IgG titreleri ve lokal IgA titrelerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İmmün yanıttaki farkın, aerodinamik partikül büyüklüğünün ve cihaz farkının bir sonucu olarak birikme bölgesine bağlı olabileceği ifade edilmiştir [50].

Kuru toz aşı formülasyonundaki küçük parçacıklar birbirlerini Van der Waals kuvvetleri ile çeker ve akciğerlerde birikmeyecek kadar büyük aglomeratların oluşumuna neden olurlar. Bu nedenle KTİ, bu aglomeratları parçalamak ve tasarlanan boyutta toz partikülleri oluşturmak için bir dağılma mekanizmasına sahip olmalıdır. KTİ'lerin çoğu pasif cihazlardır. İnhalasyon manevrası ile cihaz aktive olarak oluşan aglomeratlar dağılır. Tek bir inhalasyon manevrası ile çalıştırıldığı için uygulama süresi kısadır [44,51].

Kuru toz aşı formülasyonları geliştirilirken antijenler sulu çözelti halinde hazırlanırlar. Sonrasında püskürterek kurutma, püskürtmeli-dondurarak kurutma ve süperkritik akışkanla kurutma gibi işlemlerden geçirilerek kuru toz haline getirilirler. Alt birim aşılar, protein yapıları nedeniyle sert kurutma koşullarında kolayca bozunabilecek nitelikte moleküllerdir. Bu nedenle kurutma sırasında antijenin immunojenitesini korumak için stabilize edici yardımcı maddeler kullanılmalıdır. Protein yapılı ilaç etkin maddelerini stabilize etmek için genellikle şeker türevleri (inülin, trehaloz, dekstran) kullanılır. Dondurarak kurutma işleminin aksine, püskürterek kurutma, suda veya tuzlu suda kolayca dağılabilen daha düzgün bir şekilde kurutulmuş, pulmoner uygulama için ideal ince tozların eldesine olanak sağlar. Daha da önemlisi, kuru toz aşılar akciğer parankimasında iltihaplanma olmaksızın pulmoner bölgelere güvenle uygulanabilir [52]. Saluja ve arkadaşları, influenza alt ünite aşısını püskürterek kurutma ve püskürtmeli-dondurarak kurutma yöntemleriyle stabilizan olarak inulin kullanarak geliştirmiştir. İki yöntemle hazırlanan formülasyonlar fizikokimyasal ve immunojenite özellikleri açısından karşılaştırılmış ve her iki formülasyonunun da, pulmoner uygulamadan sonra immün yanıt oluşturduğu ve bu yanıtın aşının intramüsküler uygulamasına göre çok daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen toz partiküllerin dondurarak kurutma yöntemine kıyasla daha küçük boyutta ve non-poröz yapıda olduğu belirtilmiştir [53].

Tablo 2. Alt ünite aşıların pulmoner uygulama çalışmaları

Antijen	Formülasyon	Hazırlanma Yöntemi	Uygulama şekli	Uygulanan hayvan türü	Referans
Antijen 85B (*Mycobacterium tuberculosis*)	Antijen içeren PLGA mikropartikülleri	Püskürterek kurutma	Toz olarak Insufflator aracılığıyla	Kobay	[56]
Antijen 85B (*Mycobacterium tuberculosis*)	Antijen nanopartikül konjugatı	Emülsiyon polimerizasyonu,	Sıvı formda; Konjugat PBS içinde disperse edilmiş	Fare	[28]
F1 ve V alt ünite aşısı (*Yersinia pestis*)	Antijen içeren PLLA mikropartikülleri	Emülsifikasyon	Sıvı formda; Mikropartiküller PBS içinde süspande edilmiş	Fare	[57]
HBsAg (Hepatitis B)	Antijen içeren PLGA/PEG nanopartikülleri	Emülsifikasyon ve püskürterek kurutma	Toz olarak Insufflator aracılığıyla	Kobay	[58]
HBsAg (Hepatitis B)	Antijen içeren PLGA mikropartikülleri	Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma	Sıvı formda; partiküller PBS içinde disperse edilmiş	Sıçan	[59]
HBsAg (Hepatitis B)	Antijen içeren PLA/PLGA nanopartikülleri	Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma	Sıvı formda; partiküller PBS içinde disperse edilmiş	Sıçan	[60]
Influenza alt ünite aşısı (H3N2)	İnülin ile antijen enkapsülasyonu	Püskürterek kurutma-dondurma	Toz olarak Insufflator aracılığıyla	Fare	[61]
Influenza alt ünite aşısı (H3N2)	İnülin ile antijen enkapsülasyonu	Püskürterek kurutma	Toz olarak Insufflator aracılığıyla	Fare	[53]
Influenza alt ünite aşısı	ISCOMATRIX (adjuvan)	Antijen enkapsülasyonu	Sıvı formda; bronoskop ile uygulama	Koyun	[62]
MVA85A (*Mycobacterium tuberculosis*)	Antijenin PBS içinde süspansiyonu	-	Sıvı formda; Titreşimli ağ nebulizatörü ile	Maymun	[63]
Difteri toksoidi	Kitozan ve dekstran mikropartiküllerine antijen enkapsülasyonu	Püskürterek kurutma-dondurma	Toz olarak Insufflator aracılığıyla	Kobay	[64]
Influenza alt ünite aşısı (H1N1)	Lipid mikropartiküllerde antijen enkapsülasyonu	Püskürterek kurutma	Toz olarak Insufflator aracılığıyla	Sıçan	[65]

Nebulizatör ile uygulanması öngörülen sıvı aşı formülasyonları, raf ömrünü arttırmak ve soğuk zincir gerekliliğini ortadan kaldırmak için üretimden sonra şeker varlığında kurutularak kullanımdan önce sulandırılacak şekilde tasarlanabilir. Yapılan bir çalışmada inhale Tüberküloz aşı formülasyonu geliştirmek amacıyla alt birim aşı antijeni H56'nın katyonik lipozom formülasyonu (H56/CAF01) hazırlanmış ve püskürterek kurutma yöntemiyle kuru toz partikülleri elde edilmiştir. Rekonstitüye edilerek uygulanan bu formülasyonun, püskürterek kurutma işlemi uygulanmamış formülasyon ile benzer hücresel ve humoral bağışıklık yanıt oluşturduğu sonucu elde edilmiştir. Çalışmada püskürterek kurutma yönteminin elde edilen kuru toz formülasyonun fizikokimyasal özelliklerinde ve oluşturduğu immün yanıtta değişikliğe neden olmadığı sonucuna varılmıştır [54].

Bugüne kadar pulmoner aşı uygulamasında KTİ teknolojisinin kullanıldığı klinik çalışma yayınlanmamış olmasına rağmen çok sayıda klinik öncesi araştırma yapılmıştır. Bir çalışmada, kuru toz kızamık aşısının uygulanması, Puffhaler (Aktiv-Dry) ve Solovent (BD Technologies) cihazları kullanılarak incelenmiştir. Çoğu KTİ'nin aksine hem Puffhaler hem de Solovent aktif cihazlardır. Her iki cihaz da yeniden kullanılabilir cihazlar olmalarına rağmen tek kullanımlık kullanıcı ara yüzüne sahiptir. Canlı zayıflatılmış kızamık virüsünün süperkritik akışkan kurutma ile üretilen kuru toz formülasyonu maymunlar üzerinde test edilmiştir [55]. Sonuçlar, her iki cihazın da immün yanıtın indüklenmesinde eşit derecede iyi performansa sahip olduğunu göstermiştir. KTİ kullanılarak yapılan klinik öncesi aşı çalışmalarının çoğunda, tozu deney hayvanlarının akciğerlerine uygulamak için bir Kuru Toz Insufflator™ kullanılmıştır. Başka bir prototip cihaz ise, tek kullanımlık bir inhaler olan üç plastik plaka ve alüminyum blisterden oluşan Twincer™'dır. Twincer™, basit bir tasarıma sahip olduğu için üretim maliyeti daha düşüktür. Saluja ve arkadaşları, influenza alt ünite aşısı üzerine yaptıkları çalışmada, uygun partikül büyüklüğünde pulmoner uygulama için Twincer™ kullanılabileceğini göstermişlerdir. Friebel ve Steckel, TwinCaps (Hovione), Conix One (3M) ve DirectHaler Pulmoner (Direct-Haler A/S) dahil olmak üzere tek kullanımlık KTİ'lere kapsamlı bir genel bakış açısı sunmuştur. Söz konusu cihazların, düşük maliyetleri sayesinde pulmoner aşılamada uygun bir alternatif olabilecekleri ifade edilmiştir [44].

SONUÇ VE TARTIŞMA

Birçok çalışmada gösterildiği gibi alt birim aşıların pulmoner uygulaması parenteral uygulamaya kıyasla iyi bir alternatif olabilir. Alt birim aşıların uygun taşıyıcı sistem ve immunpotensiyatör özellikteki adjuvanlar ile formülasyonu spesifik immün yanıt oluşturulmasında umut vadetmektedir. Literatürde optimum immün yanıt için derin akciğer birikiminin gerekliliği kabul edilmiş olsa da son zamanlarda yapılan çalışmalarda inhale edilen her antijen için bunun gerekli olmadığı tartışılmaktadır. Optimum yanıt için solunum sisteminin hangi kısmının ideal olduğu henüz aydınlatılmamıştır [39]. Optimum birikim bölgesinin, antijenin tipine ve solunum yolundaki spesifik

reseptörlerin, bağlanma bölgelerinin varlığına bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir [66]. Son zamanlarda kuru toz aşıların pulmoner uygulaması yüksek stabilite ve etkili immün yanıt özellikleriyle ilgi çekmekte olup devam eden klinik öncesi çalışmalar bulunmaktadır. Pulmoner aşı formülasyonları ile ilgili daha çok klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmakta olup, çalışmaların hedef patojene, bölgeye ve popülasyona özgü cihaz tasarımı ile paralel şekilde planlanmasının daha doğru sonuçların alınmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Web site. (2018). Retrieved 22 July, 2020, https://asi.saglik.gov.tr/genel-bilgiler/41-asi-turleri.html

2. Dinc, G., Ulman, Y.I. (2007). The introduction of variolation “A La Turca” to the West by Lady Mary Montagu and Turkey’s contribution to this. *Vaccine, 25 (21),* 4261-4265.

3. Rappuoli, R. (2007). Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nature Biotechnology, 25,* 1361-1366.

4. Clem, A.S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Disease, 3,* 73-78.

5. Wellington, K., Goa, K.L. (2003). Measles, mumps, rubella vaccine (PriorixTM; GSK-MMR): A review of its use in the prevention of measles, mumps and rubella. *Drugs, 63,* 2107-2126.

6. Kallerup, R.S., Foged, C. (2015). Classification of Vaccines. In: Foged C, Rades T, Perrie Y, Hook S, (Eds), Subunit Vaccine Delivery, (p.15). New York: Springer Science and Business Media.

7. Ferran, M.C., Skuse, G.R. (2017). Generation and Production of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) as Vaccine Vector. In: Pavot V, Sebastian S, Turner V. A, Matthews J, Gilbert C.S (Eds), Recombinant Virus Vaccines, (pp. 97-119). New York: Springer Science and Business Media.

8. Van den Berg, J.H., Nuijen, B., Schumacher N.T., Haanen, B.A.G.J., Storm, G., Beijnen, H.J., Hennink, E.W. (2010). Synthetic vehicles for DNA vaccination. *Journal of Drug Targeting, 18,* 1-14.

9. Bins, A.D., van den Berg, J.H., Oosterhuis, K., Haanen, J.B.A.G. (2013). Recent advances towards the clinical application of DNA vaccines. *Netherlands Journal of Medicine, 71,* 109-117.

10. Powell, M.F., Newman, M.J. (1994). İmmunological and formulation design considerations for subunit vaccines. In: Powell, M.F., Newman, M.J. (Eds), Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, (p.1). New York: Springer Science and Business Media.

11. Nevagi, R.J., Skwarczynski, M., Toth, I. (2019). Polymers for subunit vaccine delivery. *European Polymer Journal, 114,* 397-410.

12. O'Hagan, D.T., Friedland, L.R., Hanon, E., Didierlaurent, A.M. (2017). Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Current Opinion in Immunology, 47,* 93-102.

13. Foged, C. (2011). Subunit vaccines of the future: The need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Therapeutic Delivery, 2 (8),* 1057-1077.

14. Bozkır, A., Hayta, G. (2004). Preparation and evaluation of multiple emülsions water-in-oil-in-water (w/o/w) as deliver system for influenza virus antigens. *Journal of Drug Targeting, 12 (3),* 157-164.

15. Sayın, B., Somavarapu, S., Li, X.W., Thanou, M., Sesardic, D., Alpar, H.O., Şenel, S. (2008). Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC) and N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles for invasive vaccine delivery. *International Journal of Pharmaceutics, 363 (1-2),* 139-148.

16. Kaplan, M., Çelebi, N. (2014). Mukozal yoldan uygulanan aşı formülasyonlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

17. Awate, S., Babiuk, L.A., Mutwiri, G. (2013). Mechanisms of action of adjuvants. Frontiers in *Immunology, 4,* 114.

18. Gay, N.J., Gangloff, M. (2007). Structure and function of toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry, 76,* 141-165.

19. Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology, 1,* 135-145.

20. Casella, R.C., Mitchell, T.C. (2008). Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cellular and Molecular Life Sciences, 65 (20),* 3231-3240.

21. McKee, A.S., Marrack, P. (2017). Old and new adjuvants. *Current Opinion in Immunology, 47,* 44-51.

22. Del Giudice, G., Rappuoli, R., Didierlaurent, A.M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in Immunology, 39,* 14-21.

23. Garçon, N., Chomez, P., Van Mechelen, M. (2007). GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: Concepts, achievements and perspectives. *Expert Review of Vaccines, 6 (5),* 723-739.

24. Schiller, J.T., Castellsagué, X., Villa, L.L., Hildesheim, A. (2008). An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine, 26,* K53-K61.

25. Şenel, S., Derici M.K. (2019). Aşı: Akademik, Endüstriyel ve Resmi Otorite Yönüyle. In: A. Bozkır and B. Devrim (Eds), Aşı Uygulama Yolları, (p.53). Ankara: Hipokrat Yayınevi.

26. Zhang, L., Wang, W., Wang, S. (2015). Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. *Expert Review of Vaccines, 14 (11),* 1509-1523.

27. Muttil, P., Pulliam, B., Garcia-Contreras, L., Fallon, J.K., Wang, C., Hickey, A.J., Edwards, A.D. (2010). Pulmonary immunization of guinea pigs with diphtheria CRM-197 antigen as nanoparticle aggregate dry powders enhance local and systemic immune responses. An Official Journal of the *American Association of Pharmeceutical Scientists, 12 (4),* 699-707.

28. Ballester, M., Nembrini, C., Dhar, N., de Titta, A., Piano, C., Pasquier, M., Simeoni, E., van der Vlies, A.J., McKinney, D.J., Hubbell, J.A., Swartz, M.A. (2011). Nanoparticle conjugation and pulmonary delivery enhance the protective efficacy of Ag85B and CpG against tuberculosis. *Vaccine, 29 (40),* 6959-6966.

29. Wong-Chew, R.M., Islas-Romero, R., García-García, M.D.L., Beeler, J.A., Audet, S., Santos-Preciado, J.I., Gans, H., Lew-Yasukawa, L., Maldonado, A.Y., Arvin, M.A., Valdespino-Gómez. L.J. (2006). Immunogenicity of aerosol measles vaccine given as the primary measles immunization to nine-month-old Mexican children. *Vaccine, 24 (5),* 683-690.

30. Sato, S., Kiyono, H. (2012). The mucosal immune system of the respiratory tract. *Current Opinion in Virology, 2 (3),* 225-232.

31. Yaghi, A., Dolovich, M. (2016). Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells, 5 (4),* 40.

32. Martin, T.R., Frevert, C.W. (2005). Innate immunity in the lungs. Proceedings of the American Thoracic Society, 2 (5), 403-411.

33. Guilliams, M., Lambrecht, B.N., Hammad, H. (2013). Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. *Mucosal Immunology, 6 (3),* 464-473.

34. Renegar, K.B., Small, P.A., Boykins, L.G., Wright, P.F. (2004). Role of IgA versus IgG in the Control of Influenza Viral Infection in the Murine Respiratory Tract. *The Journal of Immunology, 173 (3),* 1978-1986.

35. Kohlmeier, J.E., Woodland, D.L. (2009). Immunity to respiratory viruses. *Annual Review of Immunology, 27,* 61-82.

36. Blank, F., Stumbles, P., Von Garnier, C. (2011). Opportunities and challenges of the pulmonary route for vaccination. *Expert Opinion on Drug Delivery, 8,* 547-563.

37. Scheuch, G., Kohlhaeufl, J.M., Brand, P., Siekmeier, R. (2006). Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews, 58,* 996-1008.

38. Kunda, N.K., Somavarapu, S., Gordon, S.B., Hutcheon, G.A., Saleem, I.Y. (2013). Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. *Pharmaceutical Research, 30,* 325-341.

39. Marasini, N., Kaminskas, L.M. (2019). Subunit-based mucosal vaccine delivery systems for pulmonary delivery - Are they feasible? *Drug Development and Industrial Pharmacy, 45 (6),* 882-894.

40. Minne, A., Louahed, J., Mehauden, S., Baras, B., Renauld, J.C., Vanbever, R. (2007). The delivery site of a monovalent influenza vaccine within the respiratory tract impacts on the immune response. *Immunology, 122 (3),* 316-325.
41. Todoroff, J., Ucakar, B., Inglese, M., Vandermarliere, S., Fillee, C., Renauld, J.C., Huygen, K., Vanbever, R. (2013). Targeting the deep lungs, Poloxamer 407 and a CpG oligonucleotide optimize immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigen 85A following pulmonary delivery. European *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 84 (1),* 40-48.

42. Bachmann, F.M., Jennings, T.G. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology, 10,* 787-796.

43. Kesser, C.K., Geller, D.E. (2009). New aerosol delivery devices for cystic fibrosis. *Respiratory Care, 54 (6),* 767-768.

44. Tonnis, W.F., Lexmond, A.J., Frijlink, H.W., De Boer, A.H., Hinrichs, W.L.J. (2013). Devices and formulations for pulmonary vaccination. *Expert Opinion on Drug Delivery, 10 (10),* 1383-1397.

45. Kallerup, R.S., Foged, C. (2015). Pulmonary Administration of Subunit Vaccines. In: F.W. Tonnis, L.W.A. T. Huckriede, L.J.W. Hinrichs, W.H. Frijlink (Eds), Subunit Vaccine Delivery, (p.307). New York: Springer Science and Business Media.

46. Bennett, J. V., De Castro, J.F., Valdespino-Gomez, J.L., De Lourdes Garcia-Garcia, M., Islas-Romero, R., Echaniz-Aviles, G., Jimenez-Corona, A., Sepulveda-Amor, J. (2002). Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: *Randomized trials in Mexican schoolchildren. Bulletin of the World Health Organization, 80 (10),* 806-812.

47. Council of Europe, (2008). European Pharmacopoeia, 6th edn. Preparations for Inhalation (Ph Eur monograph 0671), (pp. 740–742). Strasbourg.

48. Khatri, L., Taylor, K.M.G., Craig, D.Q.M., Palin, K. (2001). An assessment of jet and ultrasonic nebulisers for the delivery of lactate dehydrogenase solutions. *International Journal of Pharmaceutics, 227,* 121-131.

49. Smyth, H.D.C. (2005). Propellant-driven metered-dose inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery, 2 (1),* 53-74.

50. Tonnis, W.F., Kersten, G.F., Frijlink, H.W., Hinrichs, W.L.J., De Boer, A.H., Amorij, J.P. (2012). Pulmonary vaccine delivery: A realistic approach? *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery, 25 (5),* 249-260.

51. Frijlink, H.W., De Boer, A.H. (2004). Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery, 1 (1),* 67-86.

52. Sou, T., Morton, D.A.V., Williamson, M., Meeusen, E.N., Kaminskas, L.M., Mclntosh, P.M. (2015). Spray-dried influenza antigen with trehalose and leucine produces an aerosolizable powder vaccine formulation that ınduces strong systemic and mucosal ımmunity after pulmonary administration. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery, 28 (5),* 361-371.

53. Saluja, V., Amorij, J.P., Kapteyn, J.C., de Boer, A.H., Frijlink H.W., Hinrichs, W.L.J. (2010). A comparison between spray drying and spray freeze drying to produce an influenza subunit vaccine powder for inhalation. *Journal of Controlled Release, 144 (2),* 127-133.

54. Thakur, A., Ingvarsson, P.T., Schmidt, S.T., Rose, F., Andersen, P., Christensen, D., Foged, C. (2018). Immunological and physical evaluation of the multistage tuberculosis subunit vaccine candidate H56/CAF01 formulated as a spray-dried powder. *Vaccine, 36 (23),* 3331-3339.

55. Lin, W.H., Griffin, D.E., Rota, P.A., Papania, M., Cape, P.S., Bennett, D., Quinn, B., Sievers, E.R., Shermer, C., Powell, K., Adams, J.R., Godin, S., Winston, S. (2011). Successful respiratory immunization with dry powder live-attenuated measles virus vaccine in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 (7),* 2987-2992.

56. Lu, D., Garcia-Contreras, L., Muttil, P., Padilla, D., Xu, D., Liu, J., Braunstein, M., McMurray, D.N., Hickey, A.J. (2010). Pulmonary immunization using antigen 85-b polymeric microparticles to boost tuberculosis immunity. A*n Official Journal of the American Association of Pharmeceutical Scientists, 12 (3),* 338-347.

57. Eyles, J.E., Williamson, E.D., Spiers, I.D., Alpar, H.O. (2000). Protection studies following bronchopulmonary and intramuscular immunisation with yersinia pestis F1 and V subunit vaccines coencapsulated in biodegradable microspheres. *Vaccine, 18 (28),* 3266-3271.

58. Muttil, P., Prego, C., Garcia-Contreras, L., Pulliam, B., Fallon, J.K., Wang, C., Hickey, J.A., Edwards, D. (2010). Immunization of guinea pigs with novel hepatitis B antigen as nanoparticle aggregate powders administered by the pulmonary route. *An Official Journal of the American Association of Pharmeceutical Scientists, 12,* 330-337.

59. Thomas, C., Gupta, V., Ahsan, F. (2010). Particle size influences the immune response produced by hepatitis B vaccine formulated in inhalable particles. *Pharmaceutical Research, An Official Journal of the American Association of Pharmeceutical Scientists, 27,* 905-919.

60. Thomas, C., Rawat, A., Hope-Weeks, L., Ahsan, F. (2011). Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Molecular Pharmaceutics, 8,* 405-415.

61. Amorij, J-P., Saluja, V., Petersen, H., Hinrichs, W.L.J., Huckriede, A., Frijlink, H.W. (2007). Pulmonary delivery of an inulin-stabilized influenza subunit vaccine prepared by spray-freeze drying induces systemic, mucosal humoral as well as cell-mediated immune responses in BALB/c mice. *Vaccine, 25 (52),* 8707-8717.

62. Wee, J.L.K., Scheerlinck, J-P.Y., Snibson, K.J., Edwards, S., Pearse, M., Quinn, C., Sutton, P. (2008). Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal Immunology, 1 (6) ,* 489-96.

63. White, A.D., Sibley, L., Dennis, M.J., Gooch, K., Betts, G., Edwards, N., Reyes-Sandoval, A., Carroll, M.W., Williams, A., Marsh, P.D. (2013). Evaluation of the safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine, MVA85A, delivered by aerosol to the lungs of macaques. *Clinical and Vaccine Immunology, 20 (5),* 663-72.

64. Amidi, M., Pellikaan, H.C., Hirschberg, H., Boer, H.A., Crommelin, J.A.D., Hennink, E.W., Kersten, G., Jiskoot, W. (2007). Diphtheria toxoid-containing microparticulate powder formulations for pulmonary vaccination: preparation, characterization and evaluation in guinea pigs. *Vaccine, 25,* 6818–6829.

65. Smith, D.J., Bot, S., Dellamary, L., Bot, A. (2003). Evaluation of novel aerosol formulations designed for mucosal vaccination against influenza virus. *Vaccine, 21,* 2805–2812.

66. Tomara, J., Tonnis W.F., Patil H.P., Boer A.H., Hagedoorna, P., Vanbeverb, R., Frijlink, H.W., Hinrichsa, L.J.W. (2019). Pulmonary immunization: deposition site is of minor relevance for influenza vaccination but deep lung deposition is crucial for hepatitis B vaccination. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 9 (6),* 1231-1240.