

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.014

## 免疫佐剂研发和临床转化的现状与发展趋势

刘洋<sup>1,2</sup>, 曹雪涛<sup>1</sup> (1. 中国医学科学院 基础医学研究所, 北京协和医学院 基础学院 免疫学系, 北京 100005; 2. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475000)

**[摘要]** 免疫佐剂是能增强或改变抗原特异性免疫应答从而辅助疫苗发挥作用的制剂。大多数人体自发性肿瘤的免疫原性较弱, 而免疫佐剂具有增强肿瘤抗原免疫原性、促进抗原提呈以及诱导机体产生抗肿瘤免疫应答等特性, 这对提高肿瘤生物治疗效果具有重要意义。根据功能与机制的不同, 可将佐剂分为免疫调节分子类、抗原递送系统类、免疫调节与抗原递送联合类三大类型。目前已有铝盐、乳剂、病毒颗粒、霍乱肠毒素和 CpG ODN 等佐剂获得批准用于人类疫苗或进入临床试验阶段, 但由于安全问题、不良反应等限制因素及新型现代疫苗迅猛发展的需要, 研发能与疫苗安全高效配伍应用的新型佐剂成为免疫临床转化研究的热点之一。本文归纳了免疫佐剂特性及其相关作用机制, 介绍了免疫佐剂研究与临床转化的现状及新进展, 讨论了该领域面临的挑战和可能的发展趋势。

**[关键词]** 免疫佐剂; 免疫应答; 作用机制; 固有免疫; 转化医学; 肿瘤免疫治疗

**[中图分类号]** R979.5; R730.51

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)02-0192-11

## Current status and future trends in basic and translational research on immunologic adjuvants

Liu Yang<sup>1,2</sup>, Cao Xuetao<sup>1</sup> (1. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Faculty of Immunology, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China; 2. College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475000, Henan, China)

**[Abstract]** Immunologic adjuvants are compounds that can help vaccines to enhance or change the antigen-specific immune response. The vast majority of human spontaneous tumors are weakly immunogenic or non-immunogenic. Adjuvants can enhance the immunogenicity of tumor antigens, promote antigen presentation, and induce anti-tumor immune response, thus having important implications in improving the efficacy of cancer biotherapy. Adjuvants can be classified according to their functional properties and the mechanisms underlying their functional activities into three types: immunomodulatory adjuvants, antigen-delivering adjuvants and adjuvants with immunomodulatory-antigen delivery functions. Aluminum, emulsion, virosome, cholera toxin, CpG ODN and other adjuvants have now been approved for combinational use with human vaccine(s) in clinics or clinical trials. Nevertheless, the currently available adjuvants are associated with some limitations such as suboptimal safety profiles and significant adverse effects, thus prompting for the development of novel types of safer and more efficient vaccines and adjuvants, which is becoming one of the hottest areas of translational research in immunotherapy. This review aims to summarize the characteristics of adjuvants and the mechanisms underlying their effects, present the recent advances and current status in the translational research of adjuvants, and discuss the challenges and possible trends in adjuvant development in the future.

**[Key words]** immunologic adjuvants; immune response; mechanism; innate immunity; translational medicine; tumor immunotherapy

[ Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 192-202 ]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目( No. 31270913 )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 31270913 )

**[作者简介]** 刘洋( 1990 - ), 女, 河南平顶山人, 北京协和医学院 2014 级直博生, 主要从事免疫学的研究。E-mail: liuyang2010bio@163.com

**[通信作者]** 曹雪涛( Cao Xuetao, corresponding author ), E-mail: caoxt@immunol.org

免疫佐剂( adjuvant )是指先于抗原或与抗原同时使用可以非特异地增强抗原免疫原性、增强机体的特异性免疫应答或改变免疫反应类型而本身并无抗原性的制剂。佐剂用于增强疫苗免疫作用的研究经历了从天然佐剂到人工设计佐剂的漫长过程。19世纪,狂犬病疫苗中的天然成分单链核糖核酸( single-stranded ribonucleic acid, ssRNA )可视为最早的佐剂,1926年 Glenny 首次明确提出铝盐( aluminum salt )具有佐剂活性,之后的弗氏佐剂( Freund's adjuvant )、脂多糖( lipopolysaccharide, LPS )等也逐步进入佐剂的行列。生物技术的迅速发展促进了多种含合理设计的重组抗原的新型疫苗研究,这些疫苗在理论上比传统减毒灭活疫苗更安全,但由于免疫原性较弱、分子较小等原因不能引起足够强度的免疫应答。因此,通过选择性地添加人工设计的分子和制剂<sup>[1]</sup>,研发能辅助疫苗诱导或增强体液与细胞免疫应答的安全有效的新型佐剂,把基础科研成果转化至临床应用,将成为当今肿瘤生物治疗研究的热点之一。

## 1 免疫佐剂的功能及其作用机制

“免疫佐剂”一词的含义因其功能和作用机制等方面的差异而有所不同。例如,一些特定的佐剂分子可以直接激活固有免疫受体。与此相反,递送系统( delivery system )由非免疫刺激物组成,它通过促进免疫系统中更有效的抗原提呈来发挥佐剂功能。此外还有同时包括递送系统和免疫刺激物成分的佐剂类型<sup>[2]</sup>。因此,广义上可将免疫佐剂分为三类:免疫调节分子( immunomodulatory molecule )类佐剂、抗原递送系统类佐剂以及前两种类型佐剂的联合系统( combination system )类佐剂。

### 1.1 免疫调节分子类佐剂

免疫调节分子的功能为:刺激相关免疫细胞的增殖和分化,诱导更快速的免疫反应和更广泛的应答类型,降低机体的免疫耐受,同时还能通过提高抗体滴度和细胞免疫应答水平来增强肿瘤免疫治疗效果<sup>[3-6]</sup>。该类佐剂包括固有免疫受体的配体、细胞因子( cytokine )、细菌外毒素( bacterial exotoxin )、皂苷( saponin )等,其中具有代表性的是单磷酸脂 A ( monophosphoryl lipid A, MPL )和 CpG 寡聚脱氧核苷酸( oligodeoxynucleotide, ODN )。MPL 用作人乳头瘤病毒( human papilloma virus, HPV )疫苗佐剂成分, CpG ODN 则为乙型肝炎疫苗( hepatitis B vaccine, HBV )的候选佐剂<sup>[7]</sup>。免疫调节分子类佐剂的主要作用机制是通过直接作用于免疫系统,调节或增强

抗原特异性免疫应答。例如,固有免疫受体的配体以能激活固有免疫应答的几种模式识别受体( pattern recognition receptor, PRR )为靶点,该类佐剂通过激活抗原提呈细胞( antigen-presenting cell, APC )的 PRR,活化下游信号通路,上调 APC 表达 MHC、B7 分子,诱导 APC 的成熟,并促进 IL-12 等细胞因子分泌,从而增强 APC 对 T 细胞的激活作用<sup>[8]</sup>。与之相关的 PRR 包括 Toll 样受体( Toll-like receptor, TLR )、NOD 样受体( NOD-like receptor, NLR )、C 型凝集素受体( C-type lectin receptor, CLR )和 RIG- I 样受体( RIG- I like receptor, RLR )等<sup>[9]</sup>。一些位于细胞表面的 TLR ( TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、和 TLR11 )或者位于核内体的 TLR ( TLR3、TLR7、TLR8、及 TLR9 )被相应佐剂激活后,将触发下游信号通路从而引起如核转录因子( nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B )等关键转录因子的激活<sup>[10]</sup>。这些转录因子进一步激活相应基因的表达,产生可诱导免疫应答的细胞因子和趋化因子,有助于激活如 Th1 和/或 Th2 类的特异性免疫应答。此外,该类佐剂也可以作用于胞质内 NLR 和 RLR 等其他 PRR,例如, NLR 的 NALP3 是炎性小体的一部分,可促进 caspase 1 的活化以及前炎性细胞因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的产生<sup>[11-12]</sup>,继而影响相应免疫应答,因此激活炎性小体也可能是该类佐剂的作用机制之一。关于皂苷等其他免疫调节分子的作用机制,目前尚未十分明确。

### 1.2 抗原递送系统类佐剂

递送系统类佐剂能够明显增强抗原的免疫原性和疫苗效果从而减少抗原及疫苗注射量,并通过控制物质释放等最优方式促进对疫苗抗原、免疫调节分子或两者混合物的更有效递送,增强抗原特异性免疫应答<sup>[1,13]</sup>。该类佐剂包括病毒颗粒( virosome )、乳剂( emulsion )、脂质体( liposome )和矿物盐( mineral salt ),其中免疫刺激复合物( immunostimulatory complex, ISCOM; ISCOM、ATRIX<sup>TM</sup> )是这类佐剂的主要代表。递送系统通过将抗原微粒化等方式改变疫苗抗原或免疫调节分子的物理性状,使之在体内缓慢释放以延长它们与免疫细胞作用时间<sup>[14]</sup>,使疫苗成分更易被 APC 有效摄取、加工处理及提呈<sup>[9]</sup>,最终增强免疫应答强度。APC 通过递送类佐剂摄取疫苗抗原的方式有:内吞作用,胞饮和膜融合<sup>[15]</sup>。

### 1.3 免疫调节与抗原递送联合系统类佐剂

现阶段研发的大多数佐剂类型都属于联合系统类佐剂,即同时具备免疫调节分子和抗原递送系统的特性与功能。联合系统佐剂的代表为 AS04( MPL 和铝盐联合制成 ),还有基于鲨烯的乳剂 MF59 和

AS03, 尽管后两者的具体作用机制目前还不完全明确, 但它们可加强多种免疫反应的现象说明其不仅仅是递送系统, 可能还具有免疫调节的作用<sup>[16-20]</sup>。例如, MF59 可通过诱导产生趋化因子将单核细胞和中性粒细胞募集在抗原注射免疫点<sup>[19-20]</sup>, 该活性依赖于 MyD88 和 ASC 信号通路<sup>[21-22]</sup>。值得一提的是, 一些佐剂也可能通过多种机制来发挥作用, 例如, 铝盐佐剂可影响抗原摄取、PRR 信号通路、炎性小体激活以及免疫细胞募集<sup>[23]</sup>等。探究免疫佐剂的生物学特性及作用机制, 有利于合理利用并开发新型疫苗佐剂。

三大类免疫佐剂的功能特性及作用机制见图 1。

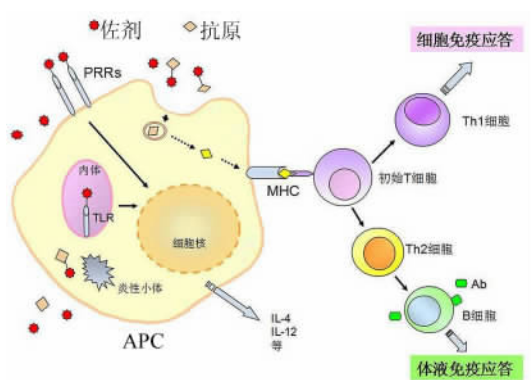


图 1 免疫佐剂的作用机制示意图

## 2 已成功临床转化的人用免疫佐剂

目前, 在美国、欧洲获得批准的人用疫苗佐剂包括铝盐、水包油乳剂 (MF59、AS03 和 AF03)、病毒颗粒、AS04 和霍乱肠毒素 (cholera toxin, CT) 等<sup>[2,24]</sup>, 现选取其中三种常用免疫佐剂作介绍。

### 2.1 铝盐

铝盐佐剂是历史最悠久、应用最广泛的一类优良佐剂, 指一系列建立于氢氧化铝、磷酸羟基铝或硫酸羟基铝基础上的非结晶铝盐凝胶。铝盐佐剂广泛用于多种疫苗, 如甲肝 (hepatitis A virus, HAV) 疫苗、HPV 疫苗、白喉-破伤风 (diphtheria-tetanus, DT) 联合疫苗、嗜血流感 B 疫苗和肺炎球菌缀合疫苗等<sup>[9]</sup>。目前常被用作佐剂的是氢氧化铝 (aluminum hydroxide) 和磷酸铝 (aluminum phosphate)<sup>[25]</sup>。铝盐佐剂的优势在于其能稳定抗原、提高抗体分泌水平、延长抗体维持时间、安全性好。铝盐的作用机制正处于不断探索中: 1931 年, Glenn 等<sup>[26]</sup>发现疫苗中被氢氧化铝吸附的抗原在注射部位有缓慢释放的效果, 并提出其作用机制为氢氧化铝的储存库效应

使抗原局部滞留缓释。2004 年, Rimaniol 等<sup>[27]</sup>研究表明氢氧化铝佐剂可激活固有免疫应答, 此外铝盐还可上调 MHCII 类分子表达并促进抗原提呈, 诱导 Th2 免疫应答<sup>[28]</sup>。随后的研究<sup>[11-12]</sup>证明, 铝盐能激活 NALP3 炎性复合体并提高促炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的分泌水平等。由此可见, 铝盐因种类较多而呈现多种免疫效果, 其具体作用机制仍需进一步明确。

### 2.2 MF59

MF59 是粒径小于 250 nm 的水包油乳剂, 成分为角鲨烯、Tween-80 和 Span-85。MF59 作为流感疫苗佐剂于 1997 年在欧洲获得认证, 是继铝盐后的另一个人用新型佐剂。其特点是安全、可激活 Th1/Th2 应答和高水平抗体应答, 具有更为平衡的免疫激活能力<sup>[29]</sup>。关于 MF59 的作用机制, 除上文提到的机制外<sup>[19,21]</sup>, 还可诱导中性粒细胞和单核细胞快速募集以将抗原提呈到淋巴结来诱导免疫应答<sup>[30]</sup>, 并能够上调细胞因子、趋化因子和其他固有免疫基因表达, 由此在疫苗注射部位产生免疫激活性的局部微环境<sup>[31]</sup>。此外, 以 MF59 为佐剂的 H5N1 流感疫苗, 可促进早期 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫应答<sup>[32]</sup>。临床数据<sup>[33]</sup>显示, 含 MF59<sup>TM</sup> 的流感疫苗 FludR 可诱导较高水平的抗体产生, 具有较好的安全性。与 MF59 性质相似的还有另一种水包油乳剂 AS03, 同样被欧盟批准作为人用佐剂在流感疫情紧急时使用<sup>[34]</sup>。

### 2.3 MPL

MPL 为革兰阴性沙门菌脂多糖 (LPS) 脱毒形式的提取物, 于 1997 年在欧洲获得认证, 成为首个人用强效 Th1 佐剂。MPL 是一种 TLR4 激动剂, 具有 PRR 介导的免疫刺激活性<sup>[35]</sup>, 已转化应用于最新上市的 HBV、疱疹病毒 (HSV) 疫苗以及 HPV 疫苗<sup>[36-37]</sup>中。MPL 通常与铝盐联合使用 (AS04), 能增强保护性抗体反应; 同时可激活 DC 的抗原提呈功能, 增强细胞因子 IL-12 及 IFN- $\gamma$  的分泌, 由此诱导 Th1 类免疫应答<sup>[38]</sup>。MPL 相对于 LPS 等佐剂具有明显的低毒性, 仅激活 TRIF-TRAM 一条信号通路可能是其低毒性的原因<sup>[39]</sup>。此外有研究<sup>[40-41]</sup>报道, MPL 的不同组装方式能明显影响其诱导的免疫应答类型, 如水相 MPL 易诱导体液免疫, 而油相 MPL 更易激活 T 细胞免疫应答。

## 3 新型免疫佐剂研究进展

### 3.1 PRR 激动剂

3.1.1 TLR 激动剂 TLR 是调节宿主天然和获得性免疫应答的重要病原识别受体, CpG 基序、LPS 等

病原相关分子模式( pathogen associated molecular pattern, PAMP)可作为 TLR 激动剂,通过 TLR 信号途径活化免疫系统。该类佐剂因具有安全性好、有效性高等优点而受到重视,一些新型佐剂也相继问世。CpG ODN 是人工合成的含有非甲基化 CpG 基序的寡聚脱氧核糖核酸,为 TLR9 的激动剂<sup>[42]</sup>。CpG 的发现和鉴定以及具有相似功能的 ODN 序列的合成,开创了 CpG 佐剂的新领域。TLR9 是胞内识别特异性 DNA 序列的 PRR,介导细菌和病毒 DNA 引发的固有免疫应答<sup>[43]</sup>。CpG ODN 可通过 TLR9 介导的信号级联反应,直接活化 DC 和 B 细胞,并通过诱导产生细胞因子和趋化因子来间接活化 NK 细胞和 T 细胞,将体内的免疫环境向 Th1 型免疫反应转化<sup>[44]</sup>,实现增强固有免疫和获得性免疫的双重效果。根据结构的不同可将 CpG ODN 分为 3 大类<sup>[45]</sup>,分别作用于不同的 APC: A 类可活化 pDC 和 NK 细胞,诱导生成大量的 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ; B 类通过直接活化 B 细胞,诱导 Th1 型 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答; C 类总体效应与 B 类 CpG ODN 相似。此外, CpG ODN 能显著提高淋巴细胞表面分子 CD80 与 CD86 的阳性表达率<sup>[46]</sup>,这为活化 T 细胞提供必要的共刺激信号。

3.1.2 NLR 激动剂 NLR 是识别胞内细菌等病原体感染的 PRR,其识别的配体主要是细菌来源肽聚糖( peptidoglycan )和胞壁酰二肽( muramyl dipeptide, MDP )<sup>[47]</sup>。MDP 是构成细菌细胞成分的最小单位,具有注射局部反应轻微、可抵抗生物降解等优点,常作为 NOD2 受体激动剂以其衍生物形式应用于疫苗佐剂<sup>[48]</sup>。MDP 不同形式的衍生物对免疫系统表现出不同效应:当以可溶性递送系统递送抗原时,MDP 增强体液免疫应答;将 MDP 与脂质体或与甘油混合使用则可诱导强烈细胞免疫<sup>[49]</sup>。最近的研究<sup>[50]</sup>表明,MDP 能够诱导机体产生细胞因子,一些基于 MDP 的合成类似物如胞壁酰三肽和磷脂酰乙醇胺均具有类似的 Th1 佐剂作用。

### 3.2 抗原递送系统

3.2.1 脂质体 脂质体( liposome )是由脂质双分子层组成的闭合囊泡球形微粒,其粒径尺寸从几微米到 100 nm,是一种功能较强的运载工具。Allison 等<sup>[51]</sup>发现,以脂质体为佐剂制成的白喉类毒素疫苗可产生比空白对照抗原高 4~6 倍的免疫应答强度。脂质体作为递送系统的作用机制是通过与巨噬细胞的细胞膜融合将疫苗抗原蛋白质递送入细胞质内,增强巨噬细胞的吞噬作用和抗原提呈作用,经 MHC I 类途径激活 CD8<sup>+</sup> T 细胞<sup>[52]</sup>。脂质体除了可作为

递送载体也能起到诱导免疫的作用,其佐剂效力与脂质双分子层的数量、电荷、成分、制备方法等有关<sup>[53]</sup>。脂质体能够增加循环抗体滴度、增强免疫记忆,起到增强体液免疫应答和细胞免疫应答的作用<sup>[54]</sup>。脂质体可在体内经生物途径降解、能根据疫苗需要改变所带电荷、安全无毒(甚至可降低抗原毒性)、缓释抗原<sup>[55]</sup>的优点使其具有良好的前景。

3.2.2 免疫刺激复合物 免疫刺激复合物( immunostimulating complex, ISCOM )是由抗原、磷脂、胆固醇、皂苷 Quil-A 组成的粒径 40 nm 的脂质微粒,是当前研究较多的一种免疫佐剂。其中有疏水性长尾的抗原能与 ISCOM 相结合形成较大的抗原聚集体,表现出很强的免疫诱导作用。ISCOM 能延长抗原的存留时间,使疫苗抗原易被 APC 摄取,并能产生高滴度、持久作用的抗体和较强的 Th 以及 CTL 免疫应答,激活机体的黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫应答<sup>[42,56-57]</sup>,这对预防通过黏膜致病的病原微生物具有特别重要的意义。以 ISCOM 为免疫佐剂的流感病毒疫苗正处于 II 期临床试验阶段<sup>[58]</sup>。目前应用较多的是无抗原微粒的混合物 ISCOMATRIX 与可溶性抗原制备的疫苗,其保留了 ISCOM 可增强 APC 内吞作用的优点,也能在黏膜免疫后诱导产生免疫应答抗体 IgA<sup>[59]</sup>。

3.2.3 病毒样颗粒 病毒样颗粒( viral like particle, VLP )是由一种或多种病毒结构蛋白经自我装配形成的粒径为 20~120 nm、不含病毒核酸的颗粒状复合物。其作用机制在于使疫苗抗原成分通过多聚化形成大小适中的非可溶性颗粒,而 100 nm 的颗粒大小最接近于固有免疫识别配体 PAMP,易被巨噬细胞等 APC 摄取、处理和提呈,从而有效诱导体液免疫应答与细胞免疫应答<sup>[60-61]</sup>; VLP 同时也可以诱导黏膜免疫<sup>[62]</sup>。目前已获批准应用的有基于乙肝病毒表面抗原 HBsAg 的 VLP 乙肝疫苗<sup>[63]</sup>和 HPV 疫苗<sup>[64]</sup>,均表现出多聚特征和较强的免疫原性。一项新近的研究<sup>[65]</sup>表明,以 VLP 为佐剂应用于流感疫苗能诱导较强的 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫应答。

### 3.3 细胞因子

细胞因子种类繁多,不同细胞因子的作用效果和机制各不相同<sup>[66-69]</sup>,其中,IL-12、IL-15、IL-18 以及 IFN- $\gamma$  能增强 Th1 型免疫应答; IL-4、IL-10 能增强 Th2 型免疫应答;粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子( granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF )和 IL-2 能同时增强体液和细胞免疫反应。

3.3.1 白细胞介素( interleukin, IL ) 最早用作佐剂的是 IL-1,它可增强机体对抗原的初次和二次免

疫应答,增加 IL-2 产量及抗原特异性 Th 细胞活性,还可促进 B 细胞增殖<sup>[70]</sup>。IL-2 对自然杀伤(natural killer, NK)细胞或淋巴因子激活的杀伤(lymphokine-activated killer, LAK)细胞具有多种促进作用,能抑制 Th2 型细胞发育,选择性增强 Th1 型细胞分化增殖,促进 IFN- $\gamma$  分泌,诱导 Th2 型细胞应答向 Th1 型转变,产生特异性细胞免疫应答<sup>[71-73]</sup>。除了通过以上增强机体免疫应答的方式发挥作用,IL-2 也可通过调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)把机体的免疫应答控制在合理范围内<sup>[74]</sup>。在临床转化试验<sup>[75]</sup>中,晚期黑素瘤患者接受含 IL-2 的 gp100 多肽疫苗注射,可显著提高临床反应并延长生存期。另一种佐剂效应明显的白介素是 IL-12,它可激活 NK 细胞的杀伤功能并刺激其分泌 IFN- $\gamma$ ,诱导 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,增强疫苗裂解活性<sup>[76]</sup>。最新研究<sup>[77]</sup>表明,以 IL-12 为佐剂的疫苗治疗携带 HBV 的小鼠模型,可有效逆转肝脏引起的全身免疫耐受。在一项临床试验<sup>[78]</sup>中,含 IL-12p70 的疫苗能有效诱导 Tc1 型免疫反应(T-cytotoxic 1 immunity),说明 IL-12 对诱导 1 型抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫应答的肿瘤生物治疗有重要作用。

**3.3.2 干扰素(interferon, IFN)** IFN 的功能主要为抗病毒、免疫调节、抑制细胞分裂及抗肿瘤等<sup>[79]</sup>,其中作为佐剂应用较多的是 IFN- $\gamma$ 。IFN- $\gamma$  能够抑制 Th2 类细胞增殖却诱导 Th1 类细胞免疫应答,还能增强 B 细胞和 NK 细胞的活性<sup>[80]</sup>。Benevides 等<sup>[81]</sup>用 IFN- $\gamma$  佐剂联合弓形虫可溶性速殖子抗原(soluble tachyzoite antigen, STAg)免疫小鼠可诱导黏膜部位产生高水平、长时间的 sIgA 和 IgG 抗体免疫应答。一项最新的临床试验<sup>[82]</sup>表明,IFN- $\gamma$  可通过调控抗病毒的 NK 细胞应答抑制 HCV 病毒复制,预示其在肝炎疫苗研发中的潜力。

**3.3.3 GM-CSF** GM-CSF 是研究最为广泛的细胞因子类佐剂。GM-CSF 能诱导 APC 的分化、成熟以及表达 MHC II 类分子和 B7 共刺激因子,提高 APC 抗原提呈能力,增强初级免疫应答;同时它能促进免疫细胞识别肿瘤相关抗原,引起系统性抗肿瘤反应<sup>[83]</sup>。Tsemg 等<sup>[84]</sup>首次将 GM-CSF 用于黑素瘤疫苗免疫佐剂,发现 GM-CSF 相对其他细胞因子可产生更持久有效的抗肿瘤效果。Peter 等<sup>[85]</sup>将 GM-CSF 用作流感疫苗的黏膜免疫佐剂也取得了理想的效果。GM-CSF 修饰的肿瘤细胞作为疫苗可有效激活抗肿瘤免疫应答,目前正处于临床试验阶段<sup>[86]</sup>。

细胞因子的特性以及多种免疫调节功能让其相对其他类型免疫佐剂具有独特优势。例如,细胞因

子作为佐剂既可以使用其重组蛋白,也可以使用表达该细胞因子的重组质粒,使其在 DNA 疫苗与黏膜免疫的研究与临床转化中拥有广阔空间。

### 3.4 热激蛋白

热激蛋白(heat shock protein, HSP)是固有免疫系统和适应性免疫系统的有效刺激物,可作为佐剂增强疫苗效果。在小鼠模型中,肿瘤细胞膜 HSP70<sup>[87]</sup>、DC-肿瘤融合细胞来源的 HSP70 肽复合物<sup>[88]</sup>等能有效诱导抗肿瘤免疫反应并延长荷瘤小鼠生存期;在黑素瘤和结直肠癌的临床 I 期和 II 期试验中,自体 HSP 肽疫苗能增强免疫应答表现出良好的治疗效果<sup>[89-90]</sup>。HSP 的作用机制之一是它作为一种损伤相关分子模式(damage-associated molecular pattern, DAMP)能经 TLR 信号转导途径激活固有免疫系统<sup>[91]</sup>,通过 CD91 或其他受体与 APC 作用,诱导体液免疫和 T 细胞免疫应答<sup>[92]</sup>。现将部分目前已获批准或正在研发的免疫佐剂归纳于表 1。

### 3.5 免疫佐剂研究存在的不足与面临的挑战

现有的佐剂虽具有明显的疫苗增效作用,但也存在一些不足之处,使新型佐剂的研究面临一定挑战。例如,已获批准的人用铝盐佐剂仅能诱导体液免疫应答,其刺激产生的 IgE 抗体有增加超敏反应的危险;生产制备方面,铝盐不能冻干且制备的凝胶质量难以控制<sup>[25]</sup>。乳剂可产生注射部位的炎症反应、肉芽肿、溃疡等不良反应<sup>[55]</sup>。脂质体则可能在注射部位引起疼痛,并且因稳定性低、成本高的缺点使其不宜大批量生产<sup>[53]</sup>。CpG ODN 在体内不稳定且在以往动物模型实验中可诱发自身免疫性疾病<sup>[44]</sup>。大多数细胞因子的体内半衰期较短且其活性易受内环境、水解酶等因素影响,使用大剂量细胞因子还可导致发热、炎症等不良反应,比如 IL-12 有明显的剂量相关性<sup>[93]</sup>。以上常规佐剂存在的局限性,使得能够安全高效地与疫苗配伍应用的新型免疫佐剂的研发成为亟待解决的问题。

## 4 免疫佐剂研发趋势

在新型佐剂的开发与临床转化研究过程中,要考虑影响疫苗免疫活性及稳定性的许多因素,包括固有免疫及其调节分子、给药途径、佐剂的物理化学特性等。

### 4.1 基于固有免疫分子机制的佐剂研发

固有免疫系统不仅是抗感染的第一道防线,更重要的是,它通过一系列 PRR 来识别病原体 PAMP,同时通过固有免疫细胞 DC 等加工提呈抗原,上调 APC 的 MHC 和共刺激分子表达,有效活化

抗原特异性 T 细胞,启动抗感染的适应性免疫应答<sup>[94]</sup>。现阶段研究的大多数新型佐剂通过固有免疫系统的 PRR 发挥作用,其中,TLR 依赖的信号通路是免疫系统识别自我和非我的最重要作用机制之一<sup>[8]</sup>。目前已鉴定出 10 种人类 TLR 家族成员,各自识别包括细菌提取物 LPS、病毒 DNA 与 RNA、细

菌未甲基化的 CpG 基序等在内的不同 PAMP<sup>[95-96]</sup>。TLR 在识别相应配体后,形成二聚体并激活下游信号级联反应,这一过程涉及多种信号分子( MyD88、TIRF、IRAK、TAK1、TAB、TAB2 和 TRAF6 等),最终使 NF- $\kappa$ B 进入细胞核并调控其靶基因的表达<sup>[97]</sup>,由此激活相应的适应性免疫应答。

表 1 部分已获批准或正在研发的免疫佐剂

佐剂名称	类型	机制/受体	免疫应答类型	研究现状
铝盐 (如氢氧化铝,磷酸铝)	DS	Nalp3, ITAM, 抗原递送	抗体, Th2	已获批准
乳剂 (如 MF59, AS03, SE)	DS	募集免疫细胞, ASC, 抗原摄取	抗体, Th1, Th2	已获批准
病毒颗粒	DS	抗原递送	抗体, Th1, Th2	已获批准
双链 RNA 类似物 (如 poly( I:C ))	IM	TLR3	抗体, Th1, CD8 <sup>+</sup> T 细胞	I 期临床
脂质 A 类似物 (如 MPL, E6020)	IM	TLR4	抗体, Th1	已获批准
皂苷 (如 QS21)	IM	未知	抗体, Th1, Th2, CD8 <sup>+</sup> T 细胞	III 期临床
鞭毛蛋白	IM	TLR5	抗体, Th1, Th2	I 期临床
CpG ODN	IM	TLR9	抗体, Th1, CD8 <sup>+</sup> T 细胞	III 期临床
AS04( MPL + 铝盐 )	C	TLR4	抗体, Th1	已获批准
AS15( MPL + QS21 + CpG + 脂质体 )	C	TLR4 和 TLR9	抗体, Th1, CD8 <sup>+</sup> T 细胞	III 期临床
ISCOMs( 皂苷 + 磷脂等 )	C	未知	抗体, Th1, Th2, CD8 <sup>+</sup> T 细胞	II 期临床

DS:递送系统类佐剂 IM:免疫调节分子类佐剂 C:联合类佐剂

既往的研究<sup>[98]</sup>表明,适应性免疫应答的类型和强弱决定于固有免疫细胞最初识别危险信号的本质。因此,对固有免疫系统的分子机制进行探索可能为新型免疫佐剂的研发提供重要信息。未来的研究可通过分析固有免疫的免疫原,寻找或合成相应的免疫激动剂,有效激活 APC 来调控固有免疫类型,进而调控适应性免疫即疫苗免疫应答的方向和强度。例如,对 TLR 生物学知识的积累和功能性检测的实现有利于研发新型 TLR 激动剂,此外也可以开发现阶段应用较少的其他 PRR 激动剂,即包括 RLR 和 NLR 等在内的新型免疫佐剂。

#### 4.2 细胞类佐剂 DC

DC 是目前所知的功能最强且唯一能激活初始 T 细胞( naive T cell )的专职性 APC。DC 在免疫系

统中处于中心地位,可视为连接固有免疫和适应性免疫应答的重要“桥梁”。Steinman 也因发现 DC 及其在获得性免疫中的作用而获得 2011 年诺贝尔生理学或医学奖。如今,以 DC 为基础的疫苗成为肿瘤生物治疗领域备受关注的热点之一<sup>[99]</sup>。人体血液及表皮中的各种 DC 亚群可表达丰富的 PRR,能有效摄取、加工处理抗原并将其提呈到 T 细胞,刺激不同效应 T 细胞的增殖和细胞因子的分泌,由此诱导不同类型适应性免疫应答<sup>[100-101]</sup>。传统的髓样 DC( myeloid DC )可激活 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫及抗体免疫应答<sup>[102]</sup>。例如,新鉴定出的 BDCA3<sup>+</sup> CD141<sup>+</sup> 髓样 DC 可通过 MHC I 类分子对外来抗原进行交叉提呈诱导较强的 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫应答<sup>[103]</sup>。而浆细胞样树突状细胞( plasmacytoid



DC)可产生大量 I 型干扰素,这可能对其诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫等有重要作用<sup>[104-105]</sup>。以 DC 为基础的疫苗在肿瘤治疗研究方面取得一些成果。我国免疫学家曹雪涛院士上世纪 90 年代的研究结果<sup>[106]</sup>表明,DC 可作为有效的抗原递送佐剂用于诱导抗肿瘤免疫反应,其领衔的第二军医大学医学免疫学国家重点实验室自主研发的我国首个晚期癌症的 DC 治疗性疫苗已获国家食品药品监督管理局(SFDA)正式批准并进入 II 期临床研究。在最新的临床转化试验中, Jurjen 等<sup>[107]</sup>给转移性黑色素瘤患者注射负载肿瘤抗原肽的 DC 疫苗,可诱导抗原特异性的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫应答,起到抗肿瘤作用。

DC 的特性及其在免疫系统中的重要作用可将其视为最有效的天然免疫佐剂,也应成为新型佐剂研发的趋势之一。相信随着对 DC 生物学特性的进一步探究、DC 各亚群功能及对免疫应答分子调控机制的明确,以及 DC 功能受肿瘤微环境影响的了解等,将有利于提高以 DC 为佐剂疫苗的免疫治疗策略。

#### 4.3 复合佐剂

单独使用一种佐剂的疫苗有时难以诱导理想的免疫反应,将不同佐剂联合应用可使其在发挥各自优点的同时又互相促进,产生显著增强免疫应答的效果。因此,复合佐剂应成为现阶段新型佐剂研发与转化应用的另一关注点。复合佐剂是指将两种或多种不同机制的佐剂协同作用,以进一步增强/调节抗原特异性免疫应答,发挥最大的佐剂效应<sup>[108]</sup>。复合佐剂可有多种组合方式,其中,将递送系统与免疫刺激物的结合可设计出更有效的免疫佐剂。例如,水包油乳剂与 PRR 激动剂联合使用,可提高免疫应答水平,引起全身免疫反应。Wack 等<sup>[109]</sup>用 TLR9 配体 CpG 与氢氧化铝或 MF59 联合制成的流感疫苗免疫小鼠,比单独使用一种佐剂产生更高的抗体滴度并调节免疫应答向 Th1 型转化。前文提到的由 MPL 与氢氧化铝联合制成的 AS04 佐剂用于人的疫苗接种,可比单独使用氢氧化铝显著提高抗-HPV 抗体滴度<sup>[110]</sup>。由 MPL 与 QS-21 制得的复合佐剂 AS02 可同时诱导较强的体液免疫和 Th1 型细胞免疫应答,在疟疾、HPV、HBV、结核病以及艾滋病多种疫苗的研究中已进入临床试验阶段<sup>[111]</sup>。然而,不同佐剂联合应用的免疫效果不同,且同一复合佐剂与不同抗原配伍使用时所需剂量、配比也有所差异。此外还可采用以上几种复合佐剂之外的联合应用方式,例如将具免疫增强效应的细胞因子与不

同免疫激动剂结合来获得最佳的免疫活化效果。这些均预示着复合佐剂具有较广阔的研究空间。

#### 4.4 黏膜佐剂

包括 HIV 在内的大多数病原体是通过黏膜途径感染宿主,黏膜免疫系统可视为机体抵抗感染的第一道防线,但是现有的疫苗中仅少数经口服、滴鼻等黏膜途径给药,主要是由于缺少安全、有效的免疫佐剂<sup>[112]</sup>。因此,具有黏膜免疫作用的佐剂的研发将成为一个非常活跃的领域。现有的一些免疫佐剂具有诱导黏膜免疫的能力,可用于黏膜疫苗的开发:霍乱毒素可通过诱导抗原特异性 Th2 型免疫反应支持全身 IgG1、IgG2b、IgE 和黏膜分泌型 IgA(sIgA) 应答的出现;大肠杆菌不耐热肠毒素(heat-labile enterotoxin, LT)可诱导 Th1 型和 Th2 型免疫应答并产生 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和黏膜 sIgA,两者可作为目前最有效的黏膜佐剂<sup>[113]</sup>。前面提到的 ISCOM、细胞因子等免疫佐剂能在疫苗黏膜免疫后增强局部和全身抗体免疫应答,刺激产生黏膜免疫<sup>[60,85]</sup>。此外,一些研究结果表明,维生素 A 代谢物视黄酸经黏膜免疫可诱导肠道 T 细胞归巢并增强 IgA 应答<sup>[114]</sup>,维生素 B 代谢物可激活一种特定的黏膜相关的 T 细胞群体<sup>[115]</sup>,显示出维生素代谢物作为黏膜佐剂的良好发展潜力。

以黏膜佐剂为基础的疫苗具有可诱导局部及全身免疫应答、摄入方便、依从性好等优点,但同时也存在易导致免疫耐受的问题<sup>[116]</sup>。未来应通过对黏膜佐剂作用机制及其免疫增强效果的进一步探究,设计可诱导安全有效黏膜免疫应答的佐剂,这对预防通过黏膜的致病微生物具有重要意义。

#### 4.5 纳米佐剂

一些研究表明,佐剂的颗粒大小和表面特性可能会影响 APC 对疫苗抗原的摄取、淋巴细胞的转运、免疫应答强度等免疫系统功能<sup>[14,117-119]</sup>,进而可影响佐剂辅助疫苗抗原诱导免疫应答的能力。纳米佐剂是指由粒径在纳米级的超微粒子材料制成的免疫佐剂,因其比表面积大、表面活性中心多等独特的性质<sup>[118]</sup>而在新型疫苗的研发中备受关注。Li 等<sup>[120]</sup>实验结果显示,用 230 nm 直径的脂质纳米颗粒装载卵清蛋白抗原(ovalbumin antigen, OVA)比 708 nm 直径的颗粒更易被 DC 和巨噬细胞摄取,还可更有效地迁至淋巴结并诱导更强的 IgG 抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞免疫应答。将常规佐剂制成纳米佐剂也能显著提高或改善其诱导免疫应答的能力。一项新的研究<sup>[121]</sup>结果显示,用铝盐制成纳米复合物不仅可以保持其刺激抗体产生的能力,还能

促进细胞免疫应答,这弥补了传统铝盐佐剂不能诱导 Th1 型免疫反应的不足。随着纳米技术的进一步发展以及对佐剂物理特性与免疫应答关系的深入剖析,将有利于研发具有最适粒径大小的纳米佐剂以辅助疫苗在疾病预防与治疗中更好地发挥作用。

## 5 结 语

随着对固有免疫系统研究的深入,许多利于佐剂研发的新的潜在靶点将被不断发现;与此同时,新型佐剂正朝着 DC 佐剂、复合佐剂、黏膜佐剂和纳米佐剂等多元化趋势发展。

在免疫佐剂的研发与临床转化过程中也面临一些挑战,除了佐剂本身存在的一些不足之外,安全问题也令人担忧。一些免疫刺激剂在有效诱导免疫应答的同时也可能产生自身免疫性疾病等不良反应。另一个不容忽视的问题是日前缺乏合适的动物模型来预测佐剂的安全性,这将延缓佐剂临床转化的时间。其主要原因是不同物种的 TLR 类型、分布以及免疫学机制有所不同,适用于动物模型的佐剂含油量较高且有复杂的细菌提取物,通常不符合安全质量标准,这些可能会给人用疫苗免疫佐剂的研发带来负面影响。此外,许多佐剂在产品开发阶段由于制造工艺复杂、稳定性差、缺乏有效性、产生高度免疫耐受等因素而失败。

理想的免疫佐剂应具有广谱安全、无不良反应、可有效激活体液与细胞免疫应答等特点,同时还应便于生产和使用。相信随着对各种病原体抗原成分的进一步认识以及对抗感染免疫机制的探索,免疫佐剂的研究也将更具有目标性。将转化医学与系统生物学应用于动物和人类佐剂研究,有助于理解佐剂活性,进而利于发展和优化佐剂成分。对于佐剂潜在的安全问题,可通过建立合理可靠的动物模型以及严格的临床、售后测试标准来预测免疫毒性发生的可能性,并全面评估疫苗佐剂的安全性。未来也应深入研究佐剂的特性和作用机制,全面了解其对免疫系统的影响,这对推动新型高效佐剂的研发及临床转化应用具有重要意义。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants [ J ]. *Immunity*, 2007, 27( 5 ): 687-690.
- [ 2 ] Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines [ J ]. *Nat Med*, 2013, 19( 12 ): 1597-1608.
- [ 3 ] Wiley SR, Raman VS, Desbien A, et al. Targeting TLRs expands the antibody repertoire in response to a malaria vaccine [ J ]. *Sci Transl Med*, 2011, 3( 93 ): 93ra69.
- [ 4 ] Khurana S, Verma N, Yewdell JW, et al. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines [ J ]. *Sci Transl Med*, 2011, 3( 85 ): 85ra48.
- [ 5 ] Galli G, Hancock K, Hoshler K, et al. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106( 19 ): 7962-7967.
- [ 6 ] Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 83-117.
- [ 7 ] Eng NF, Bhardwaj N, Mulligan R, et al. The potential of 1018 ISS adjuvant in hepatitis B vaccines [ J ]. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9( 8 ): 1661-1672.
- [ 8 ] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune Recognition [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20:197-216 .
- [ 9 ] 曹雪涛. 免疫学前沿进展 [ M ]. 第 2 版,北京:人民卫生出版社, 2011: 199-221;815-821.
- [ 10 ] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693-733.
- [ 11 ] Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants [ J ]. *Nature*, 2008, 453( 7198 ): 1122-1126.
- [ 12 ] Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 $\beta$  and IL-18 release [ J ]. *J Immunol*, 2007, 178( 8 ): 5271-5276.
- [ 13 ] Fili L, Cardilicchia E, Maggi E, et al. Perspectives in vaccine adjuvants for allergen-specific immunotherapy [ J ]. *Immunol Lett*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.011>.
- [ 14 ] Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10( 11 ): 787-796.
- [ 15 ] Dey AK, Srivastava IK. Novel adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens [ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10( 2 ): 227-251.
- [ 16 ] Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, et al. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions [ J ]. *Vaccine*, 2011, 29( 51 ): 9563-9572.
- [ 17 ] Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, et al. Adjuvant system AS03 containing  $\alpha$ -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity [ J ]. *Vaccine*, 2011, 29( 13 ): 2461-2473.
- [ 18 ] Mosca F, Tritto E, Muzzi A, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105( 30 ): 10501-10506.
- [ 19 ] Seubert A, Monaci E, Pizza M, et al. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells [ J ]. *J Immunol*, 2008, 180( 8 ): 5402-5412.
- [ 20 ] O' Hagan DT, Ott GS, De Gregorio E, et al. The mechanism of action of MF59-an innately attractive adjuvant formulation [ J ].



- Vaccine, 2012, 30(29): 4341-4348.
- [ 21 ] Seubert A, Calabro S, Santini L, et al. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88 [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(27): 11169-11174.
- [ 22 ] Ellebedy AH, Lupfer C, Ghoneim HE, et al. Inflammasome-independent role of the apoptosis-associated speck-like protein containing CARD ( ASC ) in the adjuvant effect of MF59 [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(7): 2927-2932.
- [ 23 ] Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium [ J ]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(4): 287-293.
- [ 24 ] Reed SG, Bertholet S, Coler RN, et al. New horizons in adjuvants for vaccine development [ J ]. Trends Immunol, 2009, 30(1): 23-32.
- [ 25 ] Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect [ J ]. Vaccine, 2004, 22(27/28): 3658-3668.
- [ 26 ] Glenn AT, Buttle GA H, Stevens MF. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: Toxoid precipitated with alum [ J ]. J Pathol Bacteriol, 1931, 34(2): 267-287.
- [ 27 ] Rimaniol AC, Gras G, Capel F, et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type [ J ]. Vaccine, 2004, 22(23/24): 3127-3135.
- [ 28 ] Ghimire TR, Benson RA, Garside P, et al. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro [ J ]. Immunol Lett, 2012, 147(1/2): 55-62.
- [ 29 ] O' Hagan DT, Ott GS, Nest GV, et al. The history of MF59(®) adjuvant: A phoenix that arose from the ashes [ J ]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(1): 13-30.
- [ 30 ] Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes [ J ]. Vaccine, 2011, 29(9): 1812-1823.
- [ 31 ] DT O' Hagan. MF59 is a safe and potent vaccine adjuvant that enhances protection against influenza virus infection [ J ]. Expert Rev Vaccines, 2007, 6(5): 699-710.
- [ 32 ] Galli G, Medini D, Borgogni E, et al. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4<sup>+</sup> T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(10): 3877-3882.
- [ 33 ] Schultze V, D'Agosto V, Wack A, et al. Safety of MF59 adjuvant [ J ]. Vaccine, 2008, 26(26): 3209-3222.
- [ 34 ] Geert LR. Prepandemic H5N1 influenza vaccine adjuvanted with AS03: A review of the pre-clinical and clinical data [ J ]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 8(9): 1057-1071.
- [ 35 ] Garçon N, Segal L, Tavares F, et al. The safety evaluation of adjuvants during vaccine development: The AS04 experience [ J ]. Vaccine, 2011, 29(27): 4453-4459.
- [ 36 ] Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system [ J ]. Expert Rev Vaccines, 2007, 6(2): 133-140.
- [ 37 ] Casella CR, Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant [ J ]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(20): 3231-3240.
- [ 38 ] Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, et al. AS04, an aluminium salt-and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immuneresponse leading to enhanced adaptive immunity [ J ]. J Immunol, 2009, 183(10): 6186-6197.
- [ 39 ] Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants [ J ]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(6): 500-513.
- [ 40 ] Bojang KA, Olodude F, Pinder M, et al. Safety and immunogenicity of RTS, S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children [ J ]. Vaccine, 2005, 23(32): 4148-4157.
- [ 41 ] Pichyangkul S, Gettayacamin M, Miller RS, et al. Pre-clinical evaluation of the malaria vaccine candidate P. falciparum MSP1 (42) formulated with novel adjuvants or with alum [ J ]. Vaccine, 2004, 22(29-30): 3831-3840.
- [ 42 ] Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, et al. New adjuvants for human vaccines [ J ]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(3): 411-416.
- [ 43 ] Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work [ J ]. Immunity, 2010, 33(4): 492-503.
- [ 44 ] Bode C, Zhao G, Steinhagen F, et al. CpG DNA as a vaccine adjuvant [ J ]. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(4): 499-511.
- [ 45 ] Liu Y, Luo X, Yang C, et al. Three CpG oligodeoxynucleotide classes differentially enhance antigen-specific humoral and cellular immune responses in mice [ J ]. Vaccine, 2011, 29(34): 5778-5784.
- [ 46 ] Zang X, He P, Hu Z, et al. Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine [ J ]. Virol J, 2011, 8: 78.
- [ 47 ] Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease [ J ]. Immunity, 2007, 27(4): 549-559.
- [ 48 ] Sabbah A, Chang TH, Harnack R, et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2 [ J ]. Nat Immunol, 2009, 10(10): 1073-1080.
- [ 49 ] Jakopin Ž. Murabutide revisited: A review of its pleiotropic biological effects [ J ]. Curr Med Chem, 2013, 20(16): 2068-2079.
- [ 50 ] Hedl M, Abraham C. Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages [ J ]. J Biol Chem, 2011, 286(30): 26440-26449.
- [ 51 ] Allison AC, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants [ J ]. Nature, 1974, 252(5480): 252.
- [ 52 ] Guy B, Pascal N, Franeon A, et al. Design, characterization and preclinical efficacy of a cationic lipid adjuvant for influenza split vaccine [ J ]. Vaccine, 2001, 19(13/14): 1794-1805.
- [ 53 ] Henriksen-Lacey M, Christensen D, Bramwell VW, et al. Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response [ J ]. J Control Release, 2010, 145(2): 102-108.

- [ 54 ] Warren HS, Vogel FR, Chedid LA. Current status of immunological adjuvants [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 1986, 4: 369-388.
- [ 55 ] Fries LF, Gordon DM, Richards RL, et al. A safe and potent adjuvant strategy [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89( 1 ): 358-362.
- [ 56 ] Morein B, Sundquist B, Höglund S, et al. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses [ J ]. *Nature*, 1984, 308 ( 5958 ) : 457-460.
- [ 57 ] Sanders M T, Brown L E. ISCOM-based vaccine: The second decade [ J ]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83( 2 ): 119-128.
- [ 58 ] Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited [ J ]. *Vaccine*, 2007, 25( 19 ): 3752-3762.
- [ 59 ] Morein B, Hu KF, Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine [ J ]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56 ( 10 ): 1367-1382.
- [ 60 ] Sun HX, Xie Y, Ye YP. ISCOMs and ISCOMATRIX [ J ]. *Vaccine*, 2009, 27( 33 ): 4388-4401.
- [ 61 ] Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development [ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9 ( 10 ): 1149-1176.
- [ 62 ] Akahata W, Yang ZY, Andersen H, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection [ J ]. *Nat Med*, 2010, 16( 3 ): 334-338.
- [ 63 ] Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines [ J ]. *Nat Med*, 2005, 11 ( 4 Suppl ): S45-S53.
- [ 64 ] Da Villa G, Romanò L, Sepe A, et al. Impact of hepatitis B vaccination in a highly endemic area of south Italy and long-term duration of anti-HBs antibody in two cohorts of vaccinated individuals [ J ]. *Vaccine*, 2007, 25( 16 ): 3133-3136.
- [ 65 ] Buonaguro FM, Tornesello ML, Buonaguro L. Virus-like particle vaccines and adjuvants: The HPV paradigm [ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2009, 8( 10 ): 1379-1398.
- [ 66 ] Hemann EA, Kang SM, Legge KL. Protective CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity against influenza A virus infection following influenza virus-like particle vaccination [ J ]. *J Immunol*, 2013, 191( 5 ): 2486-2494.
- [ 67 ] Tato CM, Cua DJ. SnapShot: Cytokines I [ J ]. *Cell*, 2008, 132 ( 2 ): 324
- [ 68 ] Tato CM, Cua DJ. SnapShot: Cytokines II [ J ]. *Cell*, 2008, 132 ( 3 ): 500.
- [ 69 ] Tato CM, Cua DJ. SnapShot: Cytokines III [ J ]. *Cell*, 2008, 132 ( 5 ): 900.
- [ 70 ] Tato CM, Cua DJ. SnapShot: Cytokines IV [ J ]. *Cell*, 2008, 132 ( 6 ): 1062.
- [ 71 ] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 519-550.
- [ 72 ] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12( 3 ): 180-190.
- [ 73 ] Liao W, Lin JX, Wang L, et al. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages [ J ]. *Nat Immunol*, 2011, 12( 6 ): 551-559.
- [ 74 ] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [ J ]. *Immunity*, 2013, 38( 1 ):13-25.
- [ 75 ] Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, et al. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells [ J ]. *J Immunol*, 2007, 178( 7 ): 4022-4026.
- [ 76 ] Schwartzenuber DJ, Lawson DH, Richards JM, et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma [ J ]. *N Engl J Med*, 2011, 364( 22 ): 2119-2127.
- [ 77 ] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3( 2 ): 133-146.
- [ 78 ] Zeng Z, Kong X, Li F, et al. IL-12-based vaccination therapy reverses liver-induced systemic tolerance in a mouse model of hepatitis B virus carrier [ J ]. *J Immunol*, 2013, 191( 8 ): 4184-4193.
- [ 79 ] Carreno BM, Becker-Hapak M, Huang A, et al. IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity [ J ]. *J Clin Invest*, 2013, 123( 8 ): 3383-3394.
- [ 80 ] Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines [ J ]. *Oncoimmunology*, 2013, 2( 7 ): e24850.
- [ 81 ] Benevides L, Cardoso CR, Milanezi CM, et al. *Toxoplasma gondii* soluble tachyzoite antigen triggers protective mechanisms against fatal intestinal pathology in oral infection of C57BL/6 mice [ J ]. *PLoS One*, 2013, 8( 9 ): e75138.
- [ 82 ] Kokordelis P, Krämer B, Köner C, et al. An effective IFN-mediated inhibition of HCV replication by NK cells is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C in HIV( + ) patients [ J ]. *Hepatology*, 2014, 59( 3 ): 814-827.
- [ 83 ] Hamilton JA, Achuthan A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease [ J ]. *Trends Immunol*, 2013, 34( 2 ): 81-89.
- [ 84 ] Tsemg SH, Chan Y, Chang C, et al. Induction of T cell apoptosis in rats by genetically engineered glioma cells expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor and B7 [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11( 4 ): 1639-1649.
- [ 85 ] Peter T, Eric J, Debbie T, et al. GM-CSF increases mucosal and systemic immunogenicity of an H1N1 influenza DNA vaccine administered into the epidermis of non-human primates [ J ]. *PLoS One*, 2010, 5( 6 ): e11021.
- [ 86 ] Nemunaitis J, Senzer N, Olivares J, et al. Immune response and survival of refractory cancer patients who received TGF-β2 antisense /GM-CSF genemodified autologous tumor cell ( TAG ) vaccine [ J ]. *Gene Ther*, 2013, 20( 9 ): 875-879.
- [ 87 ] Chen X, Tao Q, Yu H, et al. Tumor cell membrane-bound heat shock protein 70 elicits antitumor immunity [ J ]. *Immunol Lett*, 2002, 84( 2 ): 81-87.
- [ 88 ] Gong J, Zhang Y, Durfee J, et al. A heat shock protein 70-based vaccine with enhanced immunogenicity for clinical use [ J ]. *J Immunol*, 2010, 184( 1 ): 488-496.
- [ 89 ] Belli F, Testori A, Rivoltini L, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: Clinical and immunologic findings [ J ]. *J Clin Oncol*, 2002, 20( 20 ): 4169-4180.

- [ 90 ] Pilla L, Patuzzo R, Rivoltini L, et al. A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon-alpha in metastatic melanoma patients [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55( 8 ): 958-968.
- [ 91 ] Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: The release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance [ J ]. *Immunity*, 2011, 34( 2 ): 209-223.
- [ 92 ] Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the innate and adaptive immune responses [ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 395-425.
- [ 93 ] Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, et al. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production [ J ]. *Blood*, 1997, 90( 7 ): 2541-2548.
- [ 94 ] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system [ J ]. *Science*, 2010, 327( 5963 ): 291-295.
- [ 95 ] Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses [ J ]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1283: 67-74.
- [ 96 ] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [ J ]. *Nature*, 2000, 408( 6813 ): 740-745.
- [ 97 ] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4( 7 ): 499-511.
- [ 98 ] Schenten D, Medzhitov R. The control of adaptive immune responses by the innate immune system [ J ]. *Adv Immunol*, 2011, 109: 87-124.
- [ 99 ] Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines [ J ]. *Immunity*, 2013, 39( 1 ): 38-48.
- [ 100 ] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells [ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 12( 4 ): 265-277.
- [ 101 ] Zhang M, Tang H, Guo Z, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells [ J ]. *Nat Immunol*, 2004, 5( 11 ): 1124-1133.
- [ 102 ] Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens [ J ]. *J Exp Med*, 2001, 194( 6 ): 863-869.
- [ 103 ] Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al. Human CD141<sup>+</sup>( BDCA-3 )<sup>+</sup> dendritic cells ( DCs ) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens [ J ]. *J Exp Med*, 2010, 207( 6 ): 1247-1260.
- [ 104 ] Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sørensen A, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I [ J ]. *Nat Immunol*, 2008, 9( 5 ): 551-557.
- [ 105 ] Jego G, Palucka AK, Blanck JP, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6 [ J ]. *Immunity*, 2003, 19( 2 ): 225-234.
- [ 106 ] Cao X, Zhang W, He L, et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity [ J ]. *J Immunol*, 1998, 161( 11 ): 6238-6244.
- [ 107 ] Tel J, Aarntzen EH, Baba T, et al. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients [ J ]. *Cancer Res*, 2013, 73( 3 ): 1063-1075.
- [ 108 ] Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvants-A brief overview [ J ]. *Immunol Lett*, 2010, 128( 1 ): 29-35.
- [ 109 ] Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenzavaccine in mice [ J ]. *Vaccine*, 2008, 26( 4 ): 552-561.
- [ 110 ] Brown J, Baisley K, Kavishe B, et al. Impact of malaria and helminth infections on immunogenicity of the human papillomavirus-16/18AS04-adjuvanted vaccine in Tanzania [ J ]. *Vaccine*, 2014, 32( 5 ): 611-617.
- [ 111 ] Garçon N, Van Mechelen M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems [ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10( 4 ): 471-486.
- [ 112 ] Neutra MR, Kozlowski PA. Mucosal vaccines: The promise and the challenge [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6( 2 ): 148-158.
- [ 113 ] Lawson LB, Norton EB, Clements JD. Defending the mucosa: Adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23( 3 ): 414-420.
- [ 114 ] Lencer WI, Von Andrian UH. Eliciting mucosal immunity [ J ]. *N Engl J Med*, 2011, 365( 12 ): 1151-1153.
- [ 115 ] Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells [ J ]. *Nature*, 2012, 491( 7426 ): 717-723.
- [ 116 ] Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations [ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12( 8 ): 592-605.
- [ 117 ] Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA. Materials engineering for immunomodulation [ J ]. *Nature*, 2009, 462( 7272 ): 449-460.
- [ 118 ] Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nano-microparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses [ J ]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9( 9 ): 1095-1107.
- [ 119 ] Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25( 10 ): 1159-1164.
- [ 120 ] Li X, Sloat BR, Yanasarn N, et al. Relationship between the size of nanoparticles and their adjuvant activity: Data from a study with an improved experimental design [ J ]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78( 1 ): 107-116.
- [ 121 ] Fakhrazadeh S, Kalanaky S, Hafizi M, et al. The new nano-complex, Hep-c, improves the immunogenicity of the hepatitis B vaccine [ J ]. *Vaccine*, 2013, 31( 22 ): 2591-2597.

[ 收稿日期 ] 2014 - 01 - 06

[ 修回日期 ] 2014 - 03 - 05

[ 本文编辑 ] 黄静怡