

· 双清论坛:重大疾病疫苗研究的关键科学问题 ·

## 免疫佐剂的发展现状与未来趋势

夏 贇<sup>1,3</sup> 武梦玉<sup>2</sup> 张永辉<sup>1,2\*</sup>

1. 首都医科大学 人脑保护高精尖创新中心,北京 100069
2. 清华大学 药学院,北京 100084
3. 清华大学 生命科学学院,北京 100084

**[摘要]** 疫苗是人类医学史上最伟大的发明之一,在传染病防治方面起着重要作用。疫苗一般由免疫原和佐剂组成,其中佐剂能够帮助机体对免疫原产生有效、持久的免疫应答,是疫苗中不可或缺的部分。但由于佐剂在设计、组份、机制等方面存在瓶颈,目前临床批准的佐剂种类较少,远不能满足疫苗发展的需求。本文综述了佐剂的历史、现状及未来发展趋势。其中,我们特别强调了佐剂新方向和免疫学新机制对佐剂发展的指导作用。

**[关键词]** 佐剂;疫苗;佐剂免疫学机制;佐剂发展趋势

20世纪以来,大规模疫苗接种成为预防传染性疾病的常规手段,也是世界上各个国家医疗卫生的重要国策,我国更是于2019年底正式实施《中华人民共和国疫苗管理法》,将疫苗管理上升到国家法律的层面,并明确提出大力支持疫苗的基础和应用研究。

疫苗接种是将疫苗制剂接种到人或动物体内,使接受方获得抵抗某一特定或相似疾病的能力。接种疫苗后,机体免疫系统会对外来物进行识别,并进行特异性抗体以及T细胞的筛选和制造,以产生对抗该病原或相似病原的抗体和T细胞,进而使疫苗接种者对该疾病具有较强的抵抗能力。

根据抗原的制作不同,疫苗可分为减毒疫苗、灭活疫苗、类毒素疫苗、亚单位疫苗以及基因工程疫苗。由于其良好的作用效果,减毒和灭活疫苗一直占据着疫苗市场主流地位,同时也因安全及制作工艺等问题,这两类疫苗的使用受到了限制。随着分子生物学及基因工程学的发展,类毒素疫苗、亚单位疫苗和基因工程疫苗应运而生。其中类毒素疫苗、亚单位疫苗是将病原微生物的一部分抗原人为地纯化出来,这些抗原引起的免疫反应能够诱导机体抵御病原微生物。由于这些疫苗没有核酸的存在,不会



**张永辉** 博士,清华大学药学院院长聘副教授、博士生导师,曾获青年千人计划、拜耳研究员奖,强生研究员奖等。主要研究方向:胆固醇代谢通路与免疫调节、新型疫苗佐剂的开发、抗疟疾药物的研发、 $\gamma\delta$ -T细胞在肿瘤治疗中的应用。



**夏贇** 清华大学生命学院博士研究生。

在体内复制,因此不会对人体造成危害,具有更高的安全性。同时这些疫苗因具有更好的稳定性且质控方便,越来越受到人们的青睐。但是在安全性提高的同时,这些疫苗也具有不能诱导机体产生较强的免疫反应等缺点。

一般而言,减毒活疫苗本身带有免疫刺激信号,足以引起获得性免疫应答。而类毒素疫苗和亚单位疫苗的抗原可能缺乏启动免疫应答的某些免疫信息以及消耗过快等因素,往往需要一些物质来增强或

收稿日期:2020-05-15;修回日期:2020-09-10

\* 通信作者,Email: zhangyonghui@tsinghua.edu.cn

本文受到国家自然科学基金重大项目(81991492)和北京市自然科学基金项目(Z190015)的资助。

调节免疫原性,这类物质就叫疫苗佐剂。

## 1 佐剂的发现和作用

佐剂一词来源于拉丁语中的 *adiuvare*,是帮助、辅助之意。佐剂的使用已经有近百年的时间。1926年,Glenny 发现硫酸铝钾(明矾)对白喉毒素的免疫原性具有增强效果;1932年,铝佐剂被批准用于白喉疫苗,从此揭开了佐剂应用的序幕。到目前为止,佐剂的发展已接近百年,被批准使用的含有佐剂的疫苗已超过三十种<sup>[1]</sup>。佐剂的主要作用有:(1)增加机体对于疫苗的反应,特别是增加抗体的产生,来增强疫苗接种人群对于特定疾病的抵御;(2)改善由于年龄(包括婴儿和老人)、疾病(如 HIV 患者)或其他原因导致疫苗反应能力降低的问题;(3)便于小剂量抗原的使用;(4)减少疫苗的接种次数;(5)增加初始免疫反应速率;(6)用于研发治疗性的疫苗;(7)减缓抗原的消耗速率。

除此之外,佐剂还能够改变适应性免疫应答的类型,促使机体产生针对特定疾病最有效的抵御形式,这使得机体对于抗原的免疫反应发生质的改变。佐剂的这方面作用主要包括但不限于:(1)提供功能上合适的免疫应答类型,如改变辅助性 T 细胞的类型(Th1 细胞与 Th2 细胞)、杀伤性 CD8<sup>+</sup> T 细胞;(2)增加机体产生具有记忆性的适应性免疫细胞;(3)改变抗体的特异性、亚型以及亲和力<sup>[1]</sup>。

## 2 佐剂的种类

从铝佐剂的发现到现在,被发现有佐剂活性的物质多种多样。根据其化学性质大致可分为 5 类。

### 2.1 矿物盐类佐剂

这类佐剂主要是铝及镁的盐类化合物,这也是人类最早发现以及使用最广泛的疫苗佐剂。目前为止,大约有三分之一被批准的疫苗使用铝佐剂,这主要得益于铝佐剂的安全性。大量的临床免疫试验认为铝佐剂能够刺激机体产生强大 Th2 介导的体液免疫,在人体的试验中也会有一部分 Th1 细胞免疫反应的存在<sup>[2]</sup>。因为铝佐剂能够诱导很强的 Th2 反应,增加嗜酸性粒细胞和 IgE 型抗体的产生,从而增加了受试者产生过敏反应的风险。另外,过高剂量的铝佐剂能够影响大脑和骨组织,导致神经系统综合症和透析性痴呆<sup>[3]</sup>。

### 2.2 油乳剂佐剂

此类佐剂包括皂角苷类佐剂、水包油类和油包水类乳剂。从皂角苷混合物 QuilA 中分离出的 QS-

21 现已被作为佐剂广泛应用于多种疫苗的临床试验中,其中包括针对肿瘤、HIV、疟疾以及阿尔兹海默症等多种疾病。弗氏佐剂包括完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂两种,是动物实验中运用最为广泛的佐剂。Montanide 系列疫苗佐剂是由轻质液体石蜡联合表面活性剂系统设计而成,现已进行了 HIV、疟疾以及乳腺癌等疫苗的研究<sup>[4]</sup>。MF59 是一款水包油疫苗佐剂,它是由司盘、吐温和角鲨烯制成,由于其稳定性好、毒副作用小、易于进行质量监控等优点,已于 2015 年被 FDA 批准用于 Fluvad 流感疫苗当中<sup>[5]</sup>。AS03 主要成分为吐温、维生素 E 以及角鲨烯,现已被应用于葛兰素史克流感疫苗 Pandemrix 中<sup>[6]</sup>。

### 2.3 靶向于模式识别受体的微生物和植物提取物以及衍生物类佐剂

细菌、真菌、病毒以及植物中的一些成分能通过靶向模式识别受体,激活先天免疫,从而成为潜在的疫苗佐剂。Toll 样受体是免疫细胞表面表达的跨膜信号分子,与其结合的配体必须具有高度的特异性,这些配体都是进化特征明显的病原相关分子模式。例如,TLR3 的配体聚肌胞苷酸(Poly I:C)能够和多肽联合促进机体产生很强的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应,是目前为止实验室发现的最强的 Th1 诱导佐剂之一<sup>[7]</sup>。TLR4 的配体脂多糖(LPS)中具有佐剂活性的结构成分主要是脂质 A,在弱酸性条件下脂质 A 能水解为单磷酸脂 A(MPL)。由 MPL 和氢氧化铝组成的佐剂 AS04 由葛兰素史克公司所研发,以其为佐剂的宫颈癌疫苗卉妍康于 2009 年通过 FDA 的批准上市<sup>[8]</sup>。TLR9 的配体是非甲基化的 CpG 基序如 CpG-ODN。Dynavax 公司以 CpG 序列 1018 为佐剂,HBsAg 为抗原的 HBV 疫苗,已于 2017 年被 FDA 批准<sup>[9]</sup>。抗原递呈细胞表面还有丰富的凝集素受体,如甘露糖受体、葡聚糖受体以及树突状细胞相关性 C 型植物血凝素受体等。这些受体的配体能够活化抗原递呈细胞,促进体液以及细胞免疫的进行,如葡聚糖能够促进巨噬细胞分泌 IL-6 以及 TNF- $\alpha$  等细胞因子,被运用于多种兽用疫苗中<sup>[10]</sup>;甘露聚糖能够激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,促进树突状细胞的成熟。以氧化甘露聚糖为佐剂,MUC1 为抗原制成的肿瘤疫苗能够有效地抵御乳腺癌的复发<sup>[11]</sup>。

### 2.4 微粒抗原递呈系统佐剂

现在研究比较清楚的微粒抗原递呈系统佐剂主要包括脂质体、免疫刺激复合物、微粒以及纳米粒子

等。脂质体是球形的结构,四周由磷脂双分子层组成,抗原可以被包裹在球形的内部,也可以插入在磷脂双分子层上<sup>[12]</sup>。免疫刺激复合物主要成分有皂角苷、磷脂和胆固醇。以聚乙丙交酯(PLG)为基础形成的微粒被证明可作为新的佐剂。这种微粒有生物相容性及可降解性,其作为佐剂可以做到减少免疫次数的作用。以 PLG 为基础制成的直径为 0.5~2 μm 微粒以及直径为 1~1 000 nm 的纳米颗粒,都具有一定的佐剂作用<sup>[13]</sup>。

### 2.5 细胞因子类佐剂

最早用作佐剂的细胞因子 IL-1 可增强对抗原的初次和二次反应,诱导抗原特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞活性增强和 B 细胞增殖。IL-2 也被证明可以作为佐剂,IL-2 是细胞免疫应答过程中的一个初始因子,它能抑制 Th2 细胞的发育,选择性增强 Th1 型细胞分化、增殖。IL-12 也具有较强的佐剂作用,它能够刺激 Th1 反应的进行,也可诱导 Th2 向 Th1 细胞应答转变,它也被尝试用于多种病毒、细菌的疫苗,特别是针对肺部感染的疫苗。粒细胞巨噬细胞集落刺激因子通过激活和招募抗原递呈细胞来增强初始免疫反应,一直被用来作为肿瘤治疗性疫苗中的佐剂。Valeant 公司将它和前列腺酸性磷酸酶组成 Sipuleucel-T 前列腺癌疫苗,于 2010 年由美国 FDA 批准上市,该药是首个由美国 FDA 批准的用于治疗肿瘤的疫苗,用于治疗转移性去势抵抗性前列腺癌<sup>[14]</sup>。

## 3 佐剂机理的研究

佐剂最主要的作用是促进机体产生针对抗原特异性的体液与细胞免疫。在近 20 年的时间里,针对佐剂机理的研究有了长足的进步,这其中涉及到抗原递呈细胞对抗原的摄取、抗原的处理以及抗原的递呈等方面。但仍有许多佐剂的机制并不是十分清楚,且一些研究之间也存在着诸多矛盾,很多佐剂效应也不能通过单一机理进行解释。目前被认知的佐剂作用机理可以大致分为 6 类。

### 3.1 缓释抗原

抗原混合佐剂注入机体以后,改变了抗原的物理性状,可使抗原物质缓慢地释放、延长抗原的作用时间。这个被认为是最为古老,也是最容易为大众所认知的机理,到现在也被认为是很多佐剂的作用机制。人们将抗原吸附到铝佐剂上,三周后在动物的免疫部位肉芽肿上仍然能检测出抗原的存在<sup>[15]</sup>。也有科学家将白喉类毒素吸附到铝佐剂上,7 周后

免疫部位的组织仍然可以帮助其他几内亚猪抵抗白喉毒素的感染<sup>[2]</sup>。除了铝佐剂,油包水类的佐剂如弗氏佐剂以及一些生物可降解的微粒和纳米颗粒也被认为是通过该机理进行的。

### 3.2 增加抗原的吞噬

佐剂吸附了抗原后,增加了抗原的表面积,使抗原易于被抗原递呈细胞吞噬。铝佐剂的部分机理被认为是通过增加树突状细胞(Dendritic Cell, DC)对抗原的内吞,增加了抗原在细胞内的持续时间<sup>[16]</sup>。MF59 在体内也被发现有募集炎性细胞,增加 DC 吞噬的作用<sup>[17]</sup>。免疫刺激复合物能够增强 DC 的吞噬能力,并且可以延长带有抗原的 DC 在淋巴结中的停留时间,引起大量的抗体反应以及 T 细胞的激活<sup>[18]</sup>。也有学者将抗原和一些模式识别受体的激动剂偶联在一起,例如将 CpG-ODN 和 OVA 偶联在一起,也能够增强 DC 对抗原的吞噬作用<sup>[19]</sup>。

### 3.3 刺激细胞因子与趋化因子释放

佐剂能刺激机体产生细胞因子以及趋化因子,增强免疫细胞向免疫部位的募集。在 MF59 的机理研究过程中人们发现,肌肉注射 MF59 以后,小鼠的肌肉中会有大量的免疫细胞,全基因组基因芯片分析发现 MF59 能够引起机体分泌大量的趋化因子<sup>[20]</sup>。当腹腔注射铝佐剂后,腹腔中也会募集大量的单核细胞吞噬抗原,这些单核细胞会分化成 DC,并携带吞噬的抗原进入淋巴结中,刺激并活化特异性的 T 细胞<sup>[21]</sup>。AS04 中的 MPL 能够通过 TLR4 激活细胞,产生大量的趋化因子,导致大量的 DC 以及单核细胞吞噬抗原后进入淋巴结中<sup>[22]</sup>。而 CpG 不仅可以引起细胞因子的产生,还能够导致很多与细胞信号传输、细胞迁移以及 DNA 损伤反应相关蛋白的表达上调<sup>[23]</sup>。

### 3.4 增强抗原递呈

佐剂可以促进抗原递呈细胞的活化与成熟,增强 T 细胞的功能。完全弗氏佐剂、LPS、CpG 以及 AS04 等佐剂都被证明能够在体外诱导 DC 的成熟,从而增强适应性免疫。因为这些佐剂本身含有模式识别受体的配体,能够通过细胞表面的受体直接活化细胞。当小鼠腹腔注射 OVA 和铝佐剂时,小鼠体内的 DC 能够活化成熟<sup>[21]</sup>。但体外铝佐剂对 DC 的活化存在争议。2003 年,有研究发现铝佐剂在体外并不能促进 DC 的成熟,也不能增强 DC 的抗原递呈能力<sup>[24]</sup>。但 2007 年有人发现铝佐剂可以诱导 DC 表面 CD86 的表达上调,并能够增强 DC 的抗原

递呈能力<sup>[25]</sup>。MF59 在体外也不能刺激人的 DC 活化,但在体内却能够增强 MHCII 和共刺激分子的表达,增强 T 细胞的增殖和分化。脂质体以及一些微粒佐剂如 PLG 也是同样的情况,在体外并不能活化免疫细胞,但是在体内却能够引起 DC 的活化,增强抗原递呈细胞的递呈能力。

### 3.5 激活炎症小体

“炎症小体”这个概念是 2002 年由瑞士巴塞尔大学的科学家 Jurg Tschopp 首次提出,它能够促进细胞内 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 IL-33 等细胞因子的成熟释放。2007 年,有研究发现铝佐剂能够诱导细胞释放 IL-1 $\beta$  和 IL-18,并且这个过程依赖于 NLRP3 炎症小体<sup>[26, 27]</sup>。2008 年,耶鲁大学的 Richard A. Flavell 组首次发现铝佐剂的作用机理是通过活化炎症小体的方式进行;当小鼠的 NLRP3、ASC 或者是 caspase-1 缺失后,再用吸附有 OVA 的铝佐剂免疫小鼠,铝佐剂不能增强 OVA 特异性抗体产生<sup>[28]</sup>。但是这一结果在之后的研究并没有得到很好的重现,当小鼠的 NLRP3 缺失后,用吸附有 OVA 的铝佐剂免疫小鼠,OVA 特异性的 IgG 并不会发生很明显的降低<sup>[29, 30]</sup>。而在 MF59 的研究中发现,NLRP3 缺失的小鼠并不会影响 MF59 佐剂作用的发挥<sup>[31]</sup>;而另一研究却发现 ASC 对于 MF59 佐剂的作用具有非常重要的影响,多种抗体亚型在 ASC 缺失的小鼠中都有不同程度的减少<sup>[32]</sup>。无疑,关于炎症小体在佐剂中的作用长期存在较多争议,需要科学、规范的研究来厘清其中的谬误。

### 3.6 延缓抗原的消化过程

抗原的大小影响着抗原递呈效果,当抗原直径大时,抗原递呈的能力就会变强,而抗原直径较小时,递呈能力就弱。之前普遍的认识都认为是因为抗原递呈细胞容易吞噬直径较大的抗原,导致抗原的吞噬量变大。但现在也有研究表明,当抗原较大(大于 200 nm)时,抗原更愿意停留在内体/吞噬小体中,而直径小(小于 200 nm)的抗原会被迅速地运输到溶酶体中,且在内体/吞噬小体停留的抗原比在溶酶体中的抗原具有更强的诱导免疫应答能力<sup>[33]</sup>。在铝佐剂的研究中也发现同样的现象,当抗原吸附到铝佐剂上,再被抗原递呈细胞吞噬后,抗原的消化速度要明显地低于没有加入铝佐剂的速度<sup>[34]</sup>。这一现象在之前也被研究报道,当细胞吞噬铝佐剂后,铝佐剂的晶化颗粒会造成溶酶体的不稳定,导致溶酶体的破裂,从而造成吞噬带有抗原的铝佐剂后,抗原的降解变慢<sup>[35]</sup>。在甲羟戊酸通路抑制剂类佐剂

的研究中也发现,甲羟戊酸通路抑制剂能够通过影响 DC 中一些 Small GTPases(如 Rab5)的翻译后修饰,致使细胞内内体成熟的速率变低,增加了抗原在细胞中的停留时间,增强了抗原递呈细胞的抗原递呈能力<sup>[36]</sup>。

## 4 佐剂在开发中面临的问题

相对于其他的医学领域,疫苗佐剂的发展非常缓慢。从 1926 年第一款佐剂发现到现在,佐剂的发展已接近百年,但美国 FDA 批准上市的佐剂只有铝佐剂、MF-59、AS03、AS04 以及 CpG 这 5 款,其中有一分之一的疫苗都在使用铝佐剂。而我国目前还没有自主知识产权的佐剂在临床上应用。佐剂发展的缓慢有诸多原因,包括安全性、作用机制缺乏等诸多因素。

### 4.1 佐剂的安全性

安全性是药物研发中考虑的首要因素。20 世纪 50 年代始,弗氏不完全佐剂被用在人用疫苗当中,但由于毒性问题在 20 世纪 60 年代被终止使用。这些油乳剂的副作用主要包括强烈的疼痛感,在接种位点处形成炎症反应、肉芽肿以及溃疡等<sup>[2]</sup>。在皂角苷类佐剂的研究中,QuilA 因强毒性未能应用于疫苗中。虽然从 QuilA 中提取的 QS-21,毒性得到了减弱,但在高剂量下仍具有一定的毒性,并伴有疼痛感<sup>[37]</sup>。而细胞因子类佐剂在大量使用时可导致发烧、发热等炎症副作用。安全性的问题严重制约了这些佐剂的应用。

### 4.2 佐剂的有效性

目前发现具有佐剂作用的物质多种多样,但是高效佐剂仍然匮乏。虽然铝佐剂是目前临床应用最为广泛的佐剂,但它仍有很多问题需要解决。首先铝佐剂不能引起 Th1 和杀伤性 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应;同时铝佐剂也并不适合所有的抗原尤其不适合多肽类抗原的应用<sup>[38, 39]</sup>。PLG 的问题是生物可降解性必须是在有水的条件下进行,所以当抗原被包裹在 PLG 当中时,抗原释放出来的条件很苛刻,从而导致 PLG 效果减弱,所以在实际应用中并不能单独使用,只能通过联合其他佐剂来提高该佐剂的效果。另外抗原在微粒的包裹中也会很不稳定,导致微粒佐剂使用受限<sup>[40]</sup>。

### 4.3 佐剂在实际应用中的其他问题

铝佐剂形成的疫苗还有一个缺点就是不能够冻融,当含有铝佐剂的疫苗冻结后,铝佐剂形成的颗粒会聚集在一起,再使用时会大大降低疫苗的效

果<sup>[38, 39]</sup>。QS-21 也面临着诸多应用问题：首先，QS-21 是从天然产物中提取的，产率低、造价高；另外 QS-21 本身不稳定，在生理的条件下会被水解，这些都造成了 QS-21 使用的局限性<sup>[4]</sup>。细胞因子佐剂在实际应用中也存在很多问题，首先是细胞因子都是蛋白质分子，所以对生产、储存以及运输都有极高的要求；同时这些细胞因子在体内半衰期较短，其活性易受内环境如 pH 值、各种水解酶及血浆蛋白的影响。

#### 4.4 佐剂机理的明确

截至目前，很多佐剂的作用机制还不是十分清楚。例如 QS-21 和免疫刺激复合物机理的未知，制约了这类佐剂的发展。在铝佐剂的研究中，其佐剂作用是否依赖于局部的驻留、是否能刺激抗原递呈细胞的直接活化、是否依赖于炎症小体的激活？铝佐剂、MF59 和脂质体等佐剂在体外不刺激细胞，在体内如何诱导细胞因子以及趋化因子的产生？另外，不同佐剂是如何诱导体内 T 细胞向不同方向分化，如铝佐剂和 PEI 等佐剂能够诱导 Th2 反应；Poly I : C、QS-21 等偏向于诱导 Th1 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应；而 C-型 lectin 激动剂类佐剂可以诱导 Th1 和 Th17 反应，这些机制并没有被充分的揭示。以上问题的明确对于这些佐剂作用的提升、开发以及与其他佐剂的联合使用具有重要的意义。

### 5 佐剂的发展趋势

长期以来，佐剂研究被认为是疫苗行业的“dirty little secrets”<sup>[42]</sup>，这主要是人们对佐剂的作用机制了解较少。从设计理念来看，早期的疫苗佐剂铝盐和乳剂，其机制主要在于延缓抗原清除、缓释免疫原和提高抗原被摄取的数量<sup>[20, 43]</sup>。近年来，现代免疫学的发展尤其是对于固有免疫知识的积累，在一定程度上加速了疫苗佐剂的开发<sup>[1, 44]</sup>。这些免疫佐剂多靶向于模式识别受体。模式识别受体是免疫细胞表达的，与病原微生物或细胞应急相关的蛋白。典型的模式识别受体可以分为五类，包括 Toll 样受体 (TLRs)、RIG-I 样受体 (RLRs)、NOD 样受体 (NLRs)、C 型凝集素受体 (CLRs) 和 DNA 感受器 (如 STING 等)。以新型佐剂为代表的疫苗突破了传统以铝佐剂为主诱导 Th2 免疫反应类型、应答慢、持久性差等的瓶颈，达到既可以诱导高水平持久性抗体，又能诱导极强的 Th1 型免疫反应的理想目标。其代表有 CpG 佐剂的乙肝疫苗<sup>[45]</sup>、QS21 + MPL 的水痘带状疱疹病毒疫

苗<sup>[46]</sup>。我国在基于模式识别受体的佐剂研究方面也有很多亮点工作，例如北大的蒋争凡教授发现锰离子有很好的 STING 激活作用<sup>[47]</sup>，其开发的以纳米胶体形式存在的二价锰有优秀的疫苗佐剂效果。从细胞层面上，这些疫苗佐剂通过激活模式识别受体而活化了抗原呈递细胞 (主要是树突状细胞)，将抗原的信号有效地传递给效应 T 细胞，从而起到调节抗原相关免疫应答的作用。整体上新型佐剂研究都是基于模式识别受体或所谓的炎症效应到共刺激分子的方法学。

佐剂设计需要跳出已有思维局限，发掘新方向。我们团队于 2018 年底在 *Cell* 上提出调控特定脂代谢发展新型佐剂的科学假说<sup>[36]</sup>。该研究思路源于一种罕见性疾病—甲羟戊酸激酶 (MVK) 缺乏症。MVK 位于胆固醇代谢通路 (即甲羟戊酸通路) HMG-CoA 还原酶的下流<sup>[48]</sup>。MVK 的突变会导致甲羟戊酸代谢途径障碍，病人会有周期性发热、淋巴细胞肿大、细胞因子及抗体增多等症状<sup>[49, 50]</sup>。基于这一观察，我们提出抑制甲羟戊酸通路刺激免疫应答这一假设，并发现甲羟戊酸通路抑制剂呈现较强的佐剂效果，并能诱导 Th1 和 CTL 应答。该研究表明靶向脂代谢而不是模式识别受体，也可以发展新型的候选佐剂。可以预见除了代谢通路外，激酶等其他药物靶点也可以被用来开发小分子佐剂，活化天然免疫。

佐剂作用原理的核心在于促进病原体的多肽抗原被获得性免疫识别，产生特定的抗体和细胞应答。因此，任何能促进这一过程的因素都有可能被利用于发展新型的佐剂分子。例如，完整的免疫应答需要经过抗原递呈细胞、T 细胞以及 B 细胞进行，未来可以设计针对这其中的多个环节，包括抑制免疫反应的负反馈，如靶向 PD1、PDL1 以及 CTLA4 等免疫检查点、抗原递呈细胞以及 T 细胞的凋亡、T 细胞衰竭、Treg 以及 MDSC 等抑制性细胞等诸多方面；另一方面也可以发展直接针对 T 细胞以及 B 细胞的免疫刺激剂。同时，艾滋病、寄生虫等疫苗的成功往往需要诱导特定的细胞应答。例如， $\gamma\delta$ -T 细胞在疟原虫疫苗诱导的免疫保护中起着重要作用，而目前的小分子佐剂都不能诱导  $\gamma\delta$ -T 细胞活化。无疑，未来的疫苗佐剂需要向多样化、精细化的方向发展，这些对药理学研究提出了更高的要求，需要针对免疫的精细调节发展安全、有效的小分子化合物。

### 6 结 语

随着分子生物学及基因工程学的发展，佐剂现

已成为重组疫苗以及亚单位疫苗中很重要的一部分。近些年对免疫研究的深入,使得我们对佐剂机理有了更多的理解,这些对开发安全有效的疫苗佐剂具有重要的指导意义。

我国目前疫苗中所使用的佐剂为传统的铝佐剂。以新冠疫苗为例,北京科兴中维生物技术有限公司将灭活的 COVID-19 病毒吸附在铝佐剂上,由此制成 COVID-19 病毒灭活疫苗目前正处于 III 期临床试验中。而对于 COVID-19 病毒而言,此类疫苗在人体的保护效应是否需要 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答及 Th1 反应尚不明确。因此,我国疫苗公司亟需做好备案,推动使用不同佐剂的冠状病毒疫苗进入临床研究。而遗憾的是,大多数佐剂被国外制药公司(如葛兰素史克和赛诺菲等)控制,我们需要获得许可方可在临床上使用。因此,我们需要大力推动国内的优良候选佐剂进入临床研究。从长远来看我们更需要在佐剂的基础研究和应用研究方面加大投入,从根本上解决佐剂这一疫苗行业卡脖子和卡脑袋的问题。

### 参 考 文 献

- [1] Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 2013, 19 ( 12 ): 1597—1608.
- [2] Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 2010, 33 ( 4 ): 492—503.
- [3] Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug Safety*, 2015, 38(11): 1059—1074.
- [4] Aucouturier J, Dupuis L, Devil S, et al. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 2002, 1(1): 111—118.
- [5] O'Hagan DT, Rappuoli R, De Gregorio E, et al. MF59 adjuvant: the best insurance against influenza strain diversity. *Expert Review of Vaccines*, 2011, 10 ( 4 ): 447—462.
- [6] Cohet C, Robert VDM, Bauchau V, et al. Safety of AS03- adjuvanted influenza vaccines: a review of the evidence. *Vaccine*, 2019, 37(23): 3006—3021.
- [7] Cho HI, Cells E. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects. *Cancer Research*, 2009, 69(23): 9012—9019.
- [8] Harper DM, Demars LR. HPV vaccines - a review of the first decade. *Gynecologic Oncology*, 2017, 146 ( 1 ): 196—204.
- [9] Jackson S, Lentino J, Kopp J, et al. Immunogenicity of a two-dose investigational hepatitis B vaccine, HBsAg-1018, using a toll-like receptor 9 agonist adjuvant compared with a licensed hepatitis B vaccine in adults. *Vaccine*, 2018, 36(5): 668—674.
- [10] Bachelder EM, Beaudette TT, Broaders KE, et al. In vitro analysis of acetalated dextran microparticles as a potent delivery platform for vaccine adjuvants. *Molecular Pharmaceutics*, 2010, 7(3): 826—835.
- [11] Apostolopoulos V, Pietersz GA, Tsibanis A, et al. Pilot phase III immunotherapy study in early-stage breast cancer patients using oxidized mannan-MUC1 [ISRCTN71711835]. *Breast Cancer Research*, 2006, 8(3): R27.
- [12] 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. *Vaccine*, 2004, 22(29-30): 3831—3840.
- [13] Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, et al. Biodegradable and biocompatible poly ( DL-lactide-co-glycolide ) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infection & Immunity*, 1991, 59 ( 9 ): 2978—2986.
- [14] Burch PA, Breen JK, Buckner JC, et al. Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2000, 6(6): 2175—2182.
- [15] Osebold JW. Mechanisms of action by immunologic adjuvants. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1982, 181(10): 983—987.
- [16] Morefield GL, Sokolovska A, Jiang DP, et al. Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro. *Vaccine*, 2005, 23 ( 13 ): 1588—1595.
- [17] Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, et al. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cellular Immunology*, 1998, 186(1): 18—27.
- [18] Schnurr M, Orban M, Robson NC, et al. ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *Journal of Immunology*, 2009, 182(3): 1253—1259.

- [19] Heit A, Maurer T, Hochrein H, et al. Cutting edge: toll-like receptor 9 expression is not required for CpG DNA-aided cross-presentation of DNA-conjugated antigens but essential for cross-priming of CD8 T cells. *Journal of Immunology*, 2003, 170(6): 2802—2805.
- [20] Calabro S, Tritto E, Pezzotti A, et al. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine*, 2013, 31(33): 3363—3369.
- [21] Kool M, Soullié TT, Nimwegen MV, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205(4): 869—882.
- [22] Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *Journal of Immunology*, 2009, 183(10): 6186—6197.
- [23] Klaschik S, Tross D, Shirota H, et al. Short- and long-term changes in gene expression mediated by the activation of TLR9. *Molecular Immunology*, 2010, 47(6): 1317—1324.
- [24] Sun H, Pollock KGJ, Brewer JM. Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation in vitro. *Vaccine*, 2003, 21(9-10): 849—855.
- [25] Sokolovska A, Hem SL, Hogenesch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine*, 2007, 25(23): 4575—4585.
- [26] Li H, Nookala S, Re F. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *Journal of Immunology*, 2007, 178(8): 5271—5276.
- [27] Franchi L, Gabriel Núñez. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *European Journal of Immunology*, 2008, 38(8): 2085—2089.
- [28] Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 2008, 453(7198): 1122—1126.
- [29] Kool M, Petrilli V, De Smedt T, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *Journal of Immunology*, 2008, 181(6): 3755—3759.
- [30] Li H, Willingham SB, Ting PY, et al. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *Journal of Immunology*, 2008, 181(1): 17—21.
- [31] Seubert A, Calabro S, Santinil L, et al. Adjuvanticity of the oil-in-water emulsion MF59 is independent of Nlrp3 inflammasome but requires the adaptor protein MyD88. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(27): 11169—11174.
- [32] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(7): 2927—2932.
- [33] Brewer JM, Pollock KGJ, Tetley L, et al. Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *Journal of Immunology*, 2004, 173(10): 6143—6150.
- [34] Ghimire TR, Benson RA, Garside P, et al. Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunology Letters*, 2012, 147(1-2): 55—62.
- [35] Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, 2008, 9(8): 847—856.
- [36] Xia Y, Xie Y, Yu Z, et al. The mevalonate pathway is a druggable target for vaccine adjuvant discovery. *Cell*, 2018, 175(4): 1059—1073 e21.
- [37] Kensil CR, Kammer R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 1998, 7(9): 1475—1482.
- [38] Salnikova MS, Davis H, Mensch C, et al. Influence of formulation pH and suspension state on freezing-induced agglomeration of aluminum adjuvants. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2012, 101(3): 1050—1062.
- [39] Braun LTJ, Tyagi A, Perkins S, et al. Development of a freeze-stable formulation for vaccines containing aluminum salt adjuvants. *Vaccine*, 2009, 27(1): 72—79.
- [40] Jain S, O'Hagan DT, Singh M. The long-term potential of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microparticles as the next-generation vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 2011, 10(12): 1731—1742.

- [41] Fernández-Tejada, Alberto, Chea EK, George C, et al. Design, synthesis, and immunologic evaluation of vaccine adjuvant conjugates based on QS-21 and tucaresol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, 22 (21): 5917—5923.
- [42] Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1989, 54: 1—13.
- [43] Mckee AS, Munks MW, Marrack P. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(4): 287—293.
- [44] Alberta P, Scott P, Fernanda S, et al. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel)*, 2015, 3 (2): 320—343.
- [45] Schillie S, Harris A, Link-Gelles R, et al. Recommendations of the advisory committee on immunization practices for use of a hepatitis B vaccine with a novel adjuvant. *Mmwr Morbidity & Mortality Weekly Report*, 2018, 67(15): 455—458.
- [46] Garçon N, Van Mechelen M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. *Expert Review of Vaccines*, 2011, 10 (4): 471—486.
- [47] Wang C, Guan Y, Lv M, et al. Manganese increases the sensitivity of the cGAS-STING pathway for double-stranded DNA and is required for the host defense against DNA viruses. *Immunity*, 2018, 48(4): 675—87 e7.
- [48] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 1990, 343(6257): 425—430.
- [49] Drenth JPH, Cuisset L, Grateau G, et al. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Nature Genetics*, 1999, 22 (2): 178—181.
- [50] Haraldsson A, Weemaes CMR, Deboer AW, et al. Immunological studies in the hyper-immunoglobulin D syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, 1992, 12(6): 424—428.

## Current Status and Future Trends of Immunologic Adjuvants

Xia Yun<sup>1, 3</sup> Wu Mengyu<sup>2</sup> Zhang Yonghui<sup>1, 2\*</sup>

1. *Advanced Innovation Center for Human Brain Protection, Capital Medical University, Beijing 100069*

2. *School of Pharmaceutical Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084*

3. *School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084*

**Abstract** Vaccines are one of the greatest inventions in the history of human medicine and play an important role in the prevention and treatment of infectious diseases. Vaccines are generally composed of antigens and adjuvants. Adjuvants, which are indispensable parts of the vaccine, can help the body to produce a more effective and long-lasting immune response to the antigens. However, due to many factors such as design, composition and mechanism of adjuvants, there are only a few adjuvants approved in clinical use, which is far from meeting the needs of vaccine development. The history, present situation and future development trends of adjuvants are reviewed in this paper. In particular, we emphasize the guiding role of new adjuvant direction and new immunological mechanisms in the development of adjuvants.

**Keywords** adjuvants; vaccines; mechanisms of actions; adjuvant future development

(责任编辑 张强)

\* Corresponding Author, Email: zhangyonghui@tsinghua.edu.cn