

· 药咖论坛 ·

## 免疫佐剂及自佐剂递送系统研究进展

王晋苏, 董靖雯, 黄莹, 范一诺, 张琦岩, 周占威\*, 孙敏捷\*\*

(中国药科大学药学院药剂系, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 佐剂是防治疾病疫苗的重要组成部分, 可增强机体对抗原的特异性免疫应答, 显著提高免疫反应的强度、广度和持久性, 在传染病防治及肿瘤治疗方面起重要作用。目前基于免疫学与药剂学的发展, 传统佐剂暴露出生物毒性强、系统暴露量高及免疫刺激性机制不明等问题。开发免疫佐剂递送系统正成为生物制品免疫治疗的研究热点。简介已批准上市佐剂的组成与免疫激活机制, 分析具备佐剂效应的疫苗递送系统的开发优势, 重点综述基于脂质体、病毒样颗粒、有机合成材料、天然生物材料以及无机纳米材料的新型佐剂平台的研究进展, 以期开发安全、有效的新型疫苗佐剂材料和佐剂平台提供参考。

**[关键词]** 佐剂; 免疫疗法; 递送系统; 抗感染; 抗肿瘤

**[中图分类号]** R945

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1001-5094 (2024) 06-0421-16

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2024.06.004

## Advances in the Study of Immune Adjuvants and Their Delivery Systems

WANG Jinsu, DONG Jingwen, HUANG Ying, FAN Yinuo, ZHANG Qiyang, ZHOU Zhanwei, SUN Minjie

(Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** As important components of vaccines against diseases, adjuvants can enhance the human body's specific immune response to antigens and significantly increase the strength, breadth and durability of the immune response, thus playing an important role in the prevention and treatment of infectious diseases and tumors. With the development of immunology and pharmacology, traditional adjuvants have been exposed to such problems as biotoxicity, high systemic exposure and unknown mechanism of immunostimulatory activity. Thus, the development of immune adjuvant delivery system has become a research hotspot in biologic immunotherapy. Herein, we summarize the composition and immune activation mechanism of approved adjuvants, analyse and discuss the advantages of vaccine delivery systems with adjuvant effects, and focus on the progress of novel adjuvant platforms based on liposomes, virus-like particles, organic synthetic materials, natural biomaterials and inorganic nanomaterials, in order to provide some reference for the development of safe and effective novel vaccine adjuvant materials and adjuvant platforms.

**[Key words]** adjuvant; immunotherapy; drug delivery system; anti-infection; anti-tumor

免疫佐剂是疫苗中刺激与增强机体免疫强度、广度及持久性的一类物质<sup>[1]</sup>, 可放大抗原的免疫原性, 从而非特异性增强机体对匹配抗原的特异性免疫应答, 以克服疫苗抗原免疫原性不足或消耗过快的问题<sup>[2]</sup>。目前, 免疫佐剂广泛应用于多种疫苗中, 包括: 灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗和核酸疫苗, 在大型传染病的预防及自身免疫性疾病与癌

症的治疗中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。近年来, 随着系统生物学对于疫苗免疫反应的深入研究, 佐剂作用机制逐步明确, 主要体现在 1) 增强免疫应答: 提高中和抗体的滴度以增强体液免疫强度, 提高炎症细胞因子分泌水平以增强细胞免疫强度; 2) 降低免疫接种频率: 减少达到同等免疫保护效果所必须的抗原用量, 提高顺应性; 3) 扩大疫苗使用范围: 改善由于年龄、免疫性疾病(如艾滋病)患者等引起的疫苗保护力差的问题, 使得原先免疫原性较低的疫苗能够强效发挥作用; 4) 指导适应性免疫反应类型, 产生针对每种特定病原体的最有效免疫形式<sup>[2-4]</sup>。

### 1 已获批上市佐剂概述

1926年, Glenny 发现相较于单独注射抗原, 将硫酸铝钾(明矾)与抗原混合后注射到豚鼠体内

**接受日期:** 2024-04-28

**项目资助:** 江苏省科技计划 (No. BE2023845)

**\* 通信作者:** 周占威, 兴药研究员, 硕士生导师;

**研究方向:** 智能纳米递送系统研究, mRNA 疫苗及纳米新佐剂研究, 肿瘤免疫治疗;

**E-mail:** zwzhou@cpu.edu.cn

**\*\* 通信作者:** 孙敏捷, 教授, 博士生导师;

**研究方向:** 生物药物/载体递送研究, 高端制剂研发与产业化;

**E-mail:** msun@cpu.edu.cn

可诱发更多抗体, 增强白喉毒素的免疫原性, 铝盐佐剂由此进入大众视野并被批准应用。随后在 20 世纪 40 年代, Freund 及其同事开发了油包水乳剂, 弗氏佐剂也由此诞生。1956 年, 细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 被报道具备佐剂效果, 但与弗氏佐剂类似, 局部和全身的副作用限制了其在人类疫苗中的使用。直到 1997 年才出现的较为安全的新型非铝佐剂 (MF59) 被批准用于疫苗构

建, 免疫佐剂发展历程才得以逐步推动 (见图 1)。目前已有 4 类疫苗佐剂被美国食品和药品管理局 (FDA) 批准使用, 相关获批的疫苗已超过 30 种<sup>[5]</sup>, 多以肌肉注射途径给药, 在重大流行性疾病的预防中起到关键作用 (见表 1)。随着免疫学及生物学的发展, 研究人员对于免疫佐剂的作用机制进行了深入探究。下文就已获批上市的免疫佐剂组分及其固有免疫激活机制进行逐一阐述。

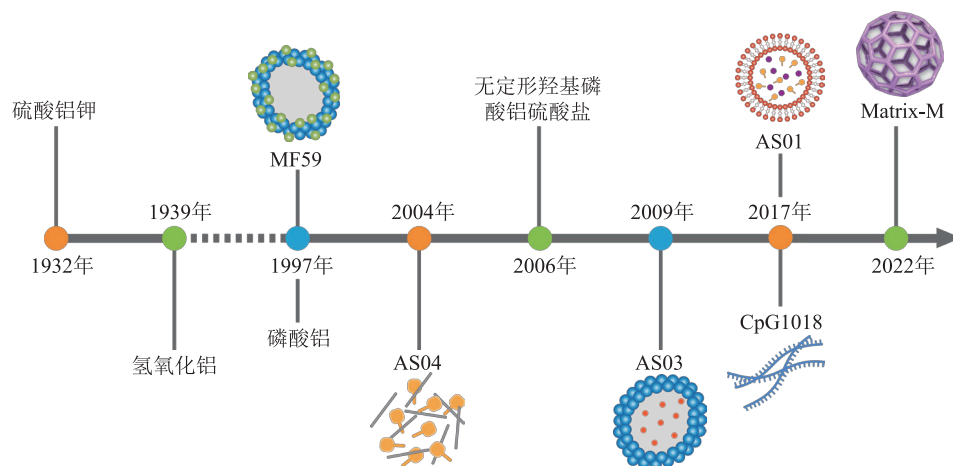


图 1 主要佐剂获批上市的时间线

Figure 1 Timeline of major adjuvants approved

表 1 已获批佐剂概况

Table 1 Approved adjuvants

佐剂	组成	给药途径	代表性疫苗
铝佐剂	由以下一种或多种组成: 无定形羟基磷酸铝硫酸盐、氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝钾 (明矾) 及其与单磷酸脂质 A 形成的复合物	肌肉注射	炭疽吸附疫苗 (Biothrax™)
			白喉、破伤风类毒素、百日咳疫苗 (Infanrix™ 等)
			B 型嗜血杆菌疫苗 (PedvaxHIB™)
			甲型/乙型肝炎疫苗 (Havrix™、Recombinax HB™)
			重组人乳头瘤病毒九价疫苗 (Gardasil 9™)
			日本脑炎病毒灭活疫苗 (Ixiaro™)
			B 组脑膜炎球菌疫苗 (Trumenba™)
			肺炎球菌疫苗 (Prevnar 13™)
重组人乳头瘤病毒二价疫苗 (Cervarix™)			
乳剂佐剂	由角鲨烯和 $\alpha$ -生育酚的一种或多种组成的水包油乳液	肌肉注射	流感疫苗 (Fluad™、Fluad 4™) 甲型 H5N1 流感病毒佐剂单价疫苗 (Q-pan™)
核酸佐剂	胞嘧啶磷酸鸟嘌呤	肌肉注射	乙型肝炎疫苗 (Heplisav-B™)
皂苷佐剂	来源于皂皮树的皂苷 ( <i>Quillaja saponaria</i> Molina) 与单磷酸脂质 A 的脂质体复合物	肌肉注射	带状疱疹重组疫苗 (Shingrix®) 新型冠状病毒感染 COVID-19 疫苗 (Novavax™)

### 1.1 铝佐剂

铝佐剂主要包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝钾 (明矾) 及其与脂质的复合物, 已被广泛应用于白喉、破伤风、重组人乳头瘤病毒及乙型肝炎等疫苗

中<sup>[6]</sup>。氢氧化铝佐剂是氢氧化铝的不完全脱水产物, 为纤维状结晶形态的羟基氧化铝  $\text{AlO}(\text{OH})$ 。相比之下, 磷酸铝是羟基磷酸铝复合物, 为无定形结构。铝佐剂对抗原的充分吸附是其发挥免疫作用的关键,

可显著提高抗原结构稳定性, 增强固有免疫的激活作用。抗原与铝佐剂结合主要依赖静电吸附、氢键、疏水作用和配体互换等多种方式<sup>[7]</sup>, 如在生理条件下, 磷酸铝佐剂可通过静电吸附作用与牛血清白蛋白结合; 此外, 当抗原与铝佐剂电性相同时, 仍能通过配体交换实现抗原的吸附。铝佐剂的抗原吸附能力受制备环境中磷酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐等缓冲液阴离子浓度、离子强度及 pH 影响, 抗原吸附稳定性与小鼠的免疫原性密切相关<sup>[7-8]</sup>。此外, 单磷酸脂质 A (monophosphoryl lipid A, MPLA) 吸附于氢氧化铝佐剂上制成佐剂 AS04, 用于重组人乳头瘤病毒二价疫苗 (Cervarix™) 和乙型肝炎疫苗 (Fendrix™) 的制备。

不同的铝盐类型各自具有独特的物理化学性质, 并影响免疫调节作用<sup>[9]</sup>。铝盐佐剂更倾向于诱导 2 型辅助性 T 细胞 (type 2 T helper cell, Th2) 介导的免疫应答, 而鲜有其诱导 1 型辅助性 T 细胞 (type 1 T helper cell, Th1) 应答的相关报道<sup>[10]</sup>。铝佐剂的作用机制主要包括抗原储库效应、增强抗原递呈细胞 (antigen-presenting cell, APC) 对抗原的摄取<sup>[4,11]</sup>, 铝佐剂还可以通过活化 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 的炎性小体来刺激先天免疫, 诱导单核细胞分泌白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 等相关免疫因子<sup>[12]</sup>。此外, 铝佐剂可以刺激注射部位的坏死细胞释放脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 和尿酸等损伤相关分子模式 (damage-associated molecular pattern, DAMP) 分子, 而释放的 DAMP 分子有助于树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 和 CD4<sup>+</sup>T 细胞的相互作用<sup>[13]</sup>。目前铝佐剂仍然是人用疫苗中唯一广泛使用的佐剂, 在新冠病毒疫情暴发期间, 铝佐剂被应用于灭活新冠病毒疫苗的构建, 并被批准用于紧急用途<sup>[14-15]</sup>。

此外, 临床研究数据表明, AS04 在重组人乳头瘤二价疫苗中可诱导长期、可持续的有效免疫应答<sup>[16]</sup>。这主要得益于 AS04 中双佐剂组分, 其中 MPLA 是内毒素的一种, 研究表明 MPLA 是能特异性激活 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4)

的激动剂<sup>[17]</sup>; 而氢氧化铝能发挥抗原储备介质的功能。目前, 使用 AS04 作为佐剂的重组人乳头瘤疫苗 (Cervarix™) 已成功上市, 且显示出良好的保护率。

然而, 铝佐剂存在极大的缺陷, 包括引起注射部位炎症反应, 诱导机体产生细胞免疫的能力较弱, 因而导致其应用范围小, 抗病毒和抗肿瘤的免疫效力有限<sup>[18]</sup>。

## 1.2 乳液佐剂

MF59 佐剂是以角鲨烯 (4%~5%) 作为油相, 聚山梨酯 80 (Tween 80) 与三油酸聚山梨酯 (Span 80) 作为表面活性剂的一类水包油乳剂。角鲨烯作为胆固醇的前体物质, 来源丰富且易于生物降解, 安全性高<sup>[19]</sup>。MF59 具有体液免疫增效作用, 可显著促进抗体产生, 并加强 Th1 型和 Th2 型免疫应答<sup>[20]</sup>, 其诱导产生的体液免疫反应比铝佐剂更强。上市产品中 MF59 主要应用于流感性疫苗 (Fluad™), 目前已被 30 多个国家及地区许可使用。MF59 佐剂的作用机制: 首先诱导注射部位抗原摄取增强, 并促进单核细胞、巨噬细胞和粒细胞的趋化因子分泌, 如趋化因子 CC 配体 2 (chemokine C-C motif ligand 2, CCL2)、CCL4、CCL3 和 CXC 型趋化因子配体 8 (CXC chemokine ligand 8, CXCL8), 进一步增加抗原递呈细胞进入淋巴结, 诱导机体产生大量特异性 T 细胞与 B 细胞, 进而激活获得性免疫响应<sup>[21-23]</sup>。

AS03 是一种类似于 MF59 的角鲨烯水包油乳剂, 但额外含有  $\alpha$ -生育酚 (维生素 E) 作为免疫增强成分。AS03 已被批准与诸多流行性流感疫苗联合使用<sup>[1]</sup>。AS03 佐剂作用机制与水包油佐剂 MF59 类似, 其添加的  $\alpha$ -生育酚可以调节某些趋化因子和细胞因子的表达, 如 CCL2、IL-6、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), 进而增强单核细胞的抗原摄取, 并增加粒细胞在引流淋巴结的聚集。体内外研究均表明,  $\alpha$ -生育酚可有效改善局部先天免疫应答谱, 导致更强的抗原抗体特异性反应<sup>[24]</sup>。

## 1.3 核酸佐剂

CpG 是一种非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤寡聚脱氧核苷酸, 广泛存在于细菌、病毒等非脊椎动物体内, 可通过物理混合与化学偶联的方式吸附抗原。CPG

可模拟病原体入侵活细胞损伤, 将危险信号传递给先天免疫系统, 进而激活由模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别介导的病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) 或 DAMP, 激活先天免疫细胞<sup>[25-27]</sup>。PRR 有多种受体家族, 包括 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)、NOD 样受体 (NOD-like receptors, NLRs)、C 型凝集素受体 (C-type lectin receptors, CLR)、RIG-I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs) 和细胞质 DNA/核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 受体等。上述受体能够识别脂多糖、脂蛋白、鞭毛蛋白以及一些特定的核酸序列, 一旦模式识别受体受到上述物质刺激, 就会启动炎症相关基因的表达, 激活免疫系统以应对感染<sup>[28-30]</sup>。

CpG1018 作为 TLR9 激动剂, 可促进 B 细胞和自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 活化, 并通过 TLR9 依赖性机制导致干扰素  $\alpha$  (interferon  $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ) 及髓样分化因子 88 (myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88) 的产生, 诱导激活核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 产生促炎因子并激活 Th1 型免疫<sup>[31]</sup>。2017 年, 由 Dynavax 公司开发的乙肝疫苗 Heplisav-B<sup>™</sup> 在美国获批上市, 该药是世界首个获批含 CpG1018 佐剂的疫苗, 其保护率高达 95%, 显著优于传统乙肝疫苗<sup>[32]</sup>。

#### 1.4 皂苷佐剂

AS01 由 2 种免疫刺激剂 MPLA 与 *Quillaja saponaria* Molina 皂皮树的树皮提取物中纯化得到的三萜糖苷 (*Quillaja saponaria* 21, QS-21) 的脂质体佐剂组成。MPLA 可直接激活表达 TLR4 的抗原递呈细胞, 并诱导干扰素  $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 的释放; QS-21 可激活被膜下淋巴窦巨噬细胞 (subcapsular sinus macrophages, SSMs) 中的 NLRP3, 诱导含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (cysteiny aspartate specific proteinase 1, Caspase 1)<sup>[33]</sup>。MPLA 和 QS-21 这 2 种成分可协同激活 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 显著提高引流淋巴结中 IL-6、CCL2 等细胞因子释放, 可有效激活适应性免疫<sup>[34]</sup>。

Matrix-M<sup>™</sup> 佐剂是一种由纯化的皂组分与合成

胆固醇和磷脂混合而形成的纳米颗粒, 其佐剂活性高、耐受性好、稳定性极佳, 可在 2~8 °C 水溶液中稳定数年, 目前被用于新冠病毒重组刺突蛋白疫苗 (Novavax<sup>™</sup>) 中<sup>[35]</sup>。Matrix-M<sup>™</sup> 可携带抗原快速回流至引流淋巴结中, 进入抗原递呈细胞后, 诱导溶酶体膜破裂产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 有助于 NLRP3 炎症小体的活化, 产生 IL-1 $\beta$  与 IL-18, 促进抗原的交叉递呈与 CD8<sup>+</sup>T 细胞的活化, 并形成长寿命浆细胞, 增强体液免疫及其相关的记忆反应<sup>[35-36]</sup>。基于上述优势, 含有 Matrix-M<sup>™</sup> 佐剂的疫苗 Shingrix<sup>®</sup> 已于 2017 年被 FDA 批准用于预防带状疱疹病毒感染。研究表明, 在 4 岁以上的患者中, Shingrix<sup>®</sup> 疫苗的保护作用长达 70 年<sup>[37]</sup>。

## 2 具备佐剂效应的新型疫苗递送系统

近百年来, 随着材料科学和药剂学的蓬勃发展, 疫苗佐剂的开发不断深入。科研人员们基于递送系统不断优化疫苗, 致力于打造性质稳定、安全性高的具备免疫佐剂效应的递送系统, 强效诱导机体产生体液免疫应答和细胞免疫应答能力。药物递送系统可实现佐剂的成药性优化, 基于生物药物作用特点扩大佐剂分子来源, 并拓展佐剂的疾病应用范围, 因此基于佐剂的递送系统的开发已成为疫苗及免疫治疗领域的研究热点。本节重点总结讨论基于各类材料的新型佐剂平台及其作用方式, 旨在为重大疾病的预防与治疗提供新的思路 (见图 2)。

### 2.1 生物膜自佐剂递送系统

**2.1.1 人工生物膜自佐剂递送系统** 脂质体是一类由脂类分子或类脂自组装形成的球形囊泡, 可在水中形成单层或多层囊泡, 且每一层均为磷脂双分子层, 结构类似于生物膜, 由内水相与脂质双层构成, 其两亲性结构可负载多种药物, 可作为人工生物膜递送系统用于抗原与佐剂递送。目前脂质体已在小分子化疗药物与核酸药物均展示出良好的包封能力。近年来, 脂质体佐剂被广泛应用于传染病疫苗、肿瘤疫苗等领域。此外, 2020 年, 在新型冠状病毒感染暴发的背景下, 脂质体也已被广泛应用于核酸疫苗制备, 并显示出较好的安全性和转化价值<sup>[38]</sup>。

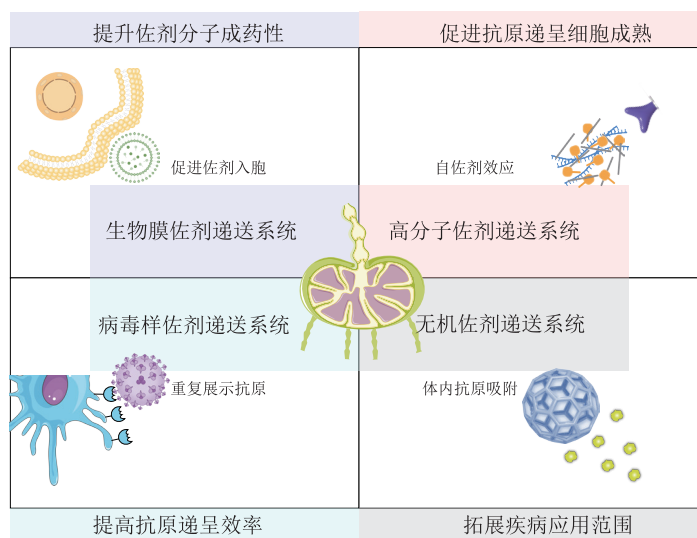


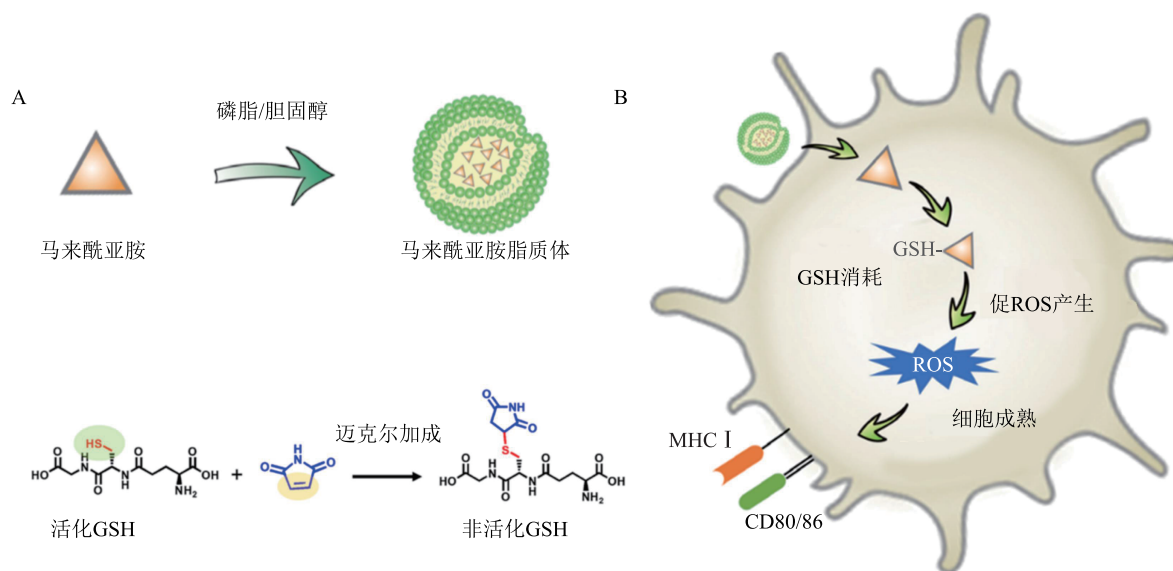
图2 新型佐剂递送系统分类及其作用方式

Figure 2 Classification and modes of action of novel adjuvant delivery systems

脂质体作为递送载体的同时也具备佐剂效应, 其可包裹抗原及佐剂分子在体内不被降解, 并促进抗原递呈细胞对抗原及佐剂分子的摄取。脂质体通过激活主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC I) 与 MHC II 途径, 促进交叉递呈及获得性免疫<sup>[39-40]</sup>。基于此, 脂质体被广泛应用于佐剂与抗原的递送, 进而增效免疫疗法。Giddam 等<sup>[41]</sup>用甘露糖基化脂质核心肽配制脂质体作为靶向配体, 用于将全血期寄生虫抗原递送至抗原递呈细胞。使用该甘露糖基化脂质体制剂进行免疫可诱导显著的 CD8<sup>+</sup>T 细胞反应, 与对照组小鼠相比, 免疫小鼠在疫苗接种后表现出更好的寄生虫血症控制和更长的生存期, 增效疟疾的免疫治疗。Go 等<sup>[42]</sup>将 MPLA 佐剂加入到脂质体中, 并与肿瘤细胞膜进行共挤出, 再偶联抗 CD28 抗体, 构建生物膜杂化脂质体 CCM-MPLA-aCD28。该脂质体被运转到淋巴结后, 可有效促进抗原递呈细胞对佐剂分子的摄取, MPLA 佐剂激活 TLR4 受体促进 DC 成熟, 增强抗原递呈和表达 CD28 的 T 细胞作用, 直接激活 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 双激活的疫苗形式引发了更强大的抗肿瘤细胞免疫。Jin 等<sup>[43]</sup>设计并开发了一种基于纳米脂质体的 K-纳米佐剂, 可促进 APC 对 TLR3a 及 TLR7/8 激动剂的同步摄取以改善佐剂分子的时空分布, 从而实现 TLR 持续激活。接

种 K-纳米佐剂的小鼠表现出显著增强抗原特异性的 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 产生 IFN- $\gamma$ 、颗粒酶 B 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 并表达 4-1BB、CD28 和 CD69 免疫激活标志物。与抗细胞程序性死亡-配体 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 联合使用时, K-纳米佐剂可诱导显著的全身免疫反应并产生免疫记忆, 与癌症免疫治疗产生协同作用。针对 MHC I 诱导特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞反应效率不足的问题, He 等<sup>[44]</sup>开发了一种钴卟啉脂质体疫苗佐剂系统, 可同时负载 MPLA 和 QS-21, 经糖蛋白 70 途径介导 MHC I 表位快速颗粒化, 促进 APC 摄取, 从而在低剂量下产生强烈的细胞免疫反应, 表现出对多种肿瘤细胞系的免疫排斥反应。

为提升佐剂分子成药性, Zhou 等<sup>[45]</sup>开发了马来酰亚胺脂质体 (maleimide liposome, ML) 纳米佐剂, 突破性地提升马来酰亚胺佐剂分子的入胞能力, 打破 DC 中氧化还原平衡, 提高胞内的 ROS 水平, 从而上调 MHC II 和共刺激分子 CD80/86 的表达 (见图 3)。辅助光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 可促进 DCs 成熟至 57%, 且增加 CTLs 浸润至 53%, 显著延长了荷瘤小鼠的生存期。ML 纳米佐剂与 PDT 相结合的创新策略缓解了 DCs 功能失调, 级联放大了抗肿瘤免疫治疗的作用。



A: 马来酰亚胺脂质体制备及其消耗谷胱甘肽 (GSH) 的机制示意图; B: 马来酰亚胺脂质体促进树突状细胞成熟的机制示意图; ROS: 活性氧; MHC I: 主要组织相容性复合体 I 型; CD80/86: 抗原分化簇 80/86

图 3 马来酰亚胺脂质体用于改善树突状细胞功能失调增效抗肿瘤治疗<sup>[45]</sup>

Figure 3 Maleimide liposome remodel the dendritic cells for enhancing the immune response

脂质体制备中使用的脂质材料及各组分的比例会影响脂质囊泡的物理化学性质 (如形状、大小、膜流动性、表面电荷), 并可与含有 TLR 激动剂、CLR 激动剂、NLR 激动剂、皂苷、角鲨烯衍和可电离脂质等生物功能分子结合, 从而显著增强溶酶体逃逸和抗原交叉递呈, 影响抗原及佐剂分子的装载和释放、生物行为以及作为药物/疫苗递送系统的能力<sup>[46]</sup>, 并可影响 Th1/Th2 的表型比例, 进而改善机体免疫应答, 显著提高疫苗效力<sup>[47]</sup>。综上, 脂质体递送系统可提升佐剂分子的入胞能力, 显著改善佐剂分子成药性, 为人工生物膜佐剂递送系统研究带来全新思路。

**2.1.2 天然生物膜自佐剂递送系统** 外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMV) 是由革兰阴性细菌分泌的天然纳米囊泡, 粒径为 30~250 nm, 是一种优异的佐剂载体平台。由于 OMV 囊泡含有肽聚糖、LPS 和鞭毛蛋白等多种 PAMP, 因此具有激活先天免疫信号通路的强大能力<sup>[48]</sup>。鉴于此, Shehata 等<sup>[49]</sup> 构建了一种基于 OMV 的甲型 H1N1 流感病毒和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 双重疫苗, 该疫苗同时呈现了 H1N1 毒株的抗原稳定嵌合融合蛋白和 MERS-CoV 的受体结构域, 与灭活疫苗对照

组相比, 接种该双重疫苗的小鼠在 8 周后产生针对 H1N1 和 MERS-CoV 的强效中和抗体滴度, 从而保护免疫小鼠免受这 2 种病毒的侵害。此外, Cheng 等<sup>[50]</sup> 构建了一种“即插即用”的 OMV 多功能平台, 将多种肿瘤抗原同时展示在 OMV 表面, 结合 OMV 固有的免疫佐剂特性, 引发协同抗肿瘤免疫疗效, 或提取肿瘤膜抗原与 OMV 融合, 进行抗肿瘤治疗。接着, 研究人员进一步探究了细菌源性外膜囊泡对先天免疫细胞的训练增效肿瘤疫苗治疗。通过提取大肠埃希菌来源的 OMV, 并进行腹腔注射, 可观察到抗原递呈细胞, 包括 DCs 和巨噬细胞的增加与成熟, 以及祖细胞谱系转变和表观遗传学重塑, 促进骨髓分化。OMV 表面的脂多糖 LPS 触发 Caspase11 成熟, 引发 NLRP3 炎症小体激活, 显著升高 IL-1 $\beta$  水平, 导致肿瘤抗原递送时免疫反应增加, 并增强肿瘤抗原特异性 T 细胞活化<sup>[51]</sup>。

另一项关于 OMV 的研究, 采用静脉注射给药以提高抗肿瘤相关细胞因子的分泌水平来激活免疫系统。单次静脉注射 OMV 会使肿瘤内的红细胞外渗, 而这种作用在其他正常器官中未见, 因此, 研究人员将这一特点应用于肿瘤近红外光热治疗<sup>[52]</sup>。通过 OMV 的预先给药, 促进 TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、

IL-6 及 IFN- $\gamma$  等细胞因子分泌, 并加深肿瘤颜色以增加瘤内近红外光学吸光度, 提高肿瘤光热免疫疗效。

另一类细菌相关佐剂是鞭毛蛋白, 已有研究证明鞭毛蛋白能与 TLR5 结合, 激活 MyD88 依赖性的 NF- $\kappa$ B 信号通路, 从而诱导多种下游炎症因子如 TNF- $\alpha$  的表达, 促进免疫反应。此外, 鞭毛蛋白也可被 NLR 家族 CARD 结构域蛋白 4 与 NLR 家族 CARD 结构域蛋白 5 识别, 促进炎症小体的形成和激活<sup>[53]</sup>。Mizel 等<sup>[54]</sup>设计了一种由鼠疫杆菌的 2 种保护性抗原 (F1 和 V 蛋白) 组成的重组蛋白, 然后将其与鞭毛蛋白的高变区结合, 形成最终的候选疫苗 (鞭毛蛋白-F1-V)。在对小鼠和 2 种非人灵长类动物进行鼻内免疫后发现, 所有实验动物物种均显示有效的抗 F1 和抗 V 体液免疫反应, 细菌在攻击后 3 日内被完全清除, 与未接种佐剂疫苗组相比, 疫苗接种后可产生保护性免疫反应。鞭毛是某些细菌特有的结构, 是细菌的运动器官。为增效抗肿瘤治疗, 研究人员借助鞭毛的运动性构建开发了一种新的佐剂策略, 选择运动能力是大肠埃希菌 10 倍以上的减毒沙门氏菌并在其表面修饰阳离子纳米颗粒, 用于抗原运输<sup>[55]</sup>。在放射治疗后, 进行瘤内注射, 由细菌大量捕获抗原, 通过鞭毛运动将抗原运输至肿瘤边缘, 结合鞭毛蛋白佐剂作用促进 DC 激活和抗原递呈。综上, 仿生佐剂递送系统为拓展佐剂分子功能, 拓宽疾病应用范围提供了可能。

## 2.2 病毒衍生自佐剂递送系统

病毒样颗粒 (virus-like particle, VLP) 是一种自组装病毒结构蛋白颗粒 (20~200 nm), 其模仿天然病毒的几何排列, 但不含任何病毒遗传物质, 因此能够在不具有传染性的前提下激活机体免疫。VLP 具有封装和递送许多不同分子的能力, 包括 RNA、小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)、蛋白质和多肽<sup>[56]</sup>。VLP 是利用重组蛋白技术在细胞 (如细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物等细胞) 内产生衣壳蛋白并自组装形成, 可根据所需的抗原序列修饰 VLP 结构蛋白赋予多种功能<sup>[57-58]</sup>。VLP 的结构类似于病毒的空间立体结构, 可重复展示抗原, 在抗原递呈过程中更容易被哺乳动物的免疫系统检测

到, 进而产生强烈的 B 细胞和 T 细胞反应, 是高效、安全且可大规模生产的疫苗形式<sup>[59]</sup>。VLP 作为递送载体或佐剂, 通常与额外的佐剂一同给药, 例如使用铝佐剂的 Engerix-B<sup>™</sup>, 使用 AS04 的 Cervarix<sup>™</sup> 和 FENDrix<sup>™</sup><sup>[60]</sup>。

基于 VLP 的佐剂可应用于肿瘤免疫治疗, Wang 等<sup>[61]</sup>利用植物病毒纳米颗粒豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus, CPMV) 促进多种先天免疫细胞的激活和促炎细胞因子的分泌, 诱导 T 细胞的细胞毒性, 进而增效免疫检查点疗法 (immune checkpoint therapy, ICT), CPMV 原位接种可增加肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的检查点调节因子的表达。该研究结果表明, 在 3 种具有免疫功能的同基因小鼠肿瘤模型中, 联合使用 CPMV 和特定的检查点靶向抗体 (PD-1 抗体或 OX40 特异性抗体), 可降低肿瘤负担, 延长生存期, 诱导肿瘤抗原特异性免疫记忆, 以防止复发。VLP 介导的抗原重复展示可大大提升免疫系统对抗原的识别与摄取, 有效增强抗原递呈效率, 为广谱疾病治疗带来了新的希望。

噬菌体是一类特殊的病毒, 具有诱导细胞免疫及体液免疫的能力, 基于噬菌体的疫苗已被用于预防或治疗多种疾病, 包括癌症及病毒、寄生虫和真菌感染等<sup>[62]</sup>。例如 M13 噬菌体作为一种原核病毒, 具有高纵横比, 结构上类似纳米纤维, 是一种有前途的佐剂生物组件。研究人员通过基因工程改造和化学修饰, 构建一种基于 M13 噬菌体的自佐剂凝胶平台, 用于激活 TLR9 通路, 介导 APC 的成熟<sup>[63]</sup>。应用病毒载体构建凝胶体系有利于重塑免疫微环境, 招募免疫细胞并激活其功能, 增强先天免疫和适应性免疫 (见图 4)。类似的, Hao 等<sup>[64]</sup>构建一种壳聚糖凝胶牢笼 VAX, VAX 可阻止病毒颗粒的逃逸, 并上调抗病毒免疫的模式识别受体, 构建局部免疫微环境, 进而招募免疫细胞, 促进吞噬, 增强抗原加工和交叉递呈。上述研究显示了噬菌体等天然高分子在自佐剂递送系统应用方面的巨大潜力。

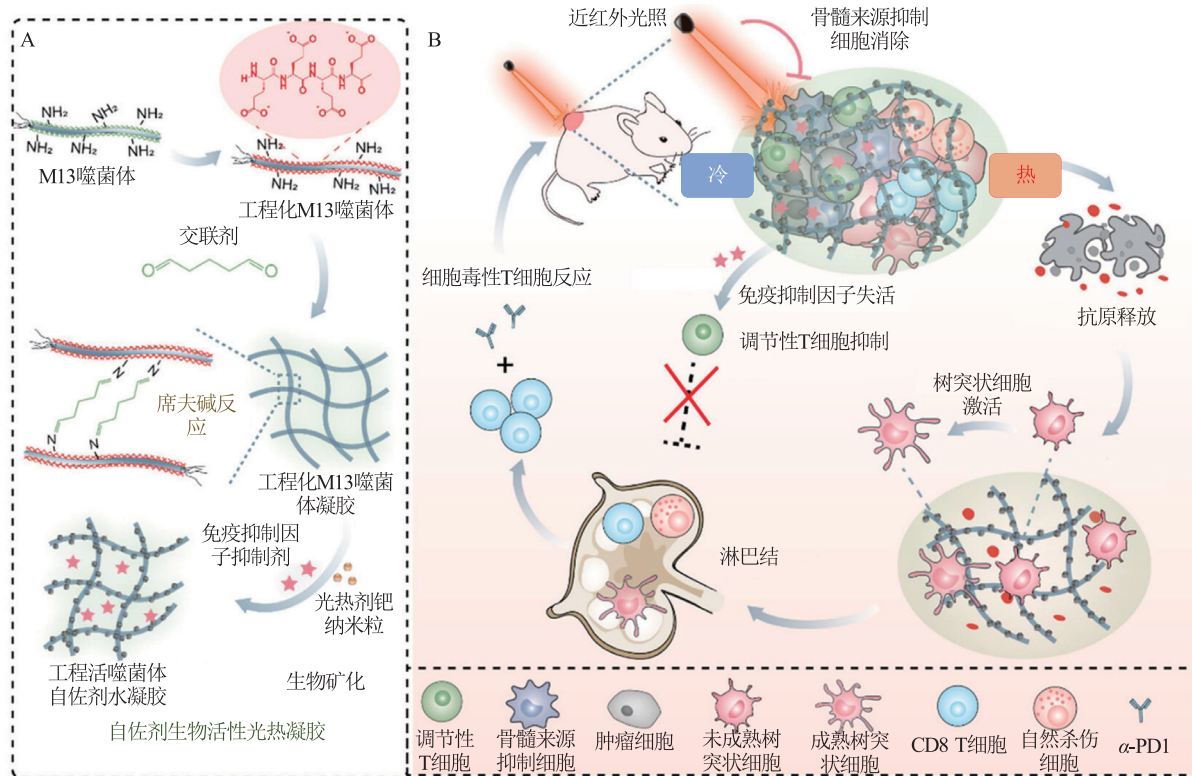
## 2.3 高分子自佐剂递送系统

2.3.1 天然高分子自佐剂递送系统 自然界的天然材料相比合成有机物, 生物相容性好, 体内代谢途径

明晰, 因此在免疫治疗中更具有吸引力。目前, 氨基酸、核酸等基础生物分子以及细菌、藻类等微生物均具有佐剂效应, 可用于构建佐剂平台。

氨基酸具有多活性位点, 可被广泛修饰, 例如 Skwarczynski 等<sup>[65]</sup>使用固相肽合成方法, 构建了能

够与多肽抗原偶联的天然疏水氨基酸聚合物。这种自佐剂氨基酸平台无需添加额外的佐剂, 在小鼠体内实验中, 纳米疫苗能够高效诱导 DC 成熟和高水平免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 抗体滴度, 应用于抗菌治疗。



A: 基于 M13 噬菌体的自佐剂光热凝胶的构建; B: 基于 M13 噬菌体的生物活性凝胶用于光热治疗 (PTT) 和免疫治疗协同触发更强大的抗肿瘤免疫反应的机制示意图

图 4 工程活噬菌体自佐剂水凝胶用于重塑肿瘤微环境和癌症治疗<sup>[63]</sup>

#### Figure 4 Engineered living bacteriophage-enabled self-adjuvating hydrogel for remodeling tumor micro-environment and cancer therapy

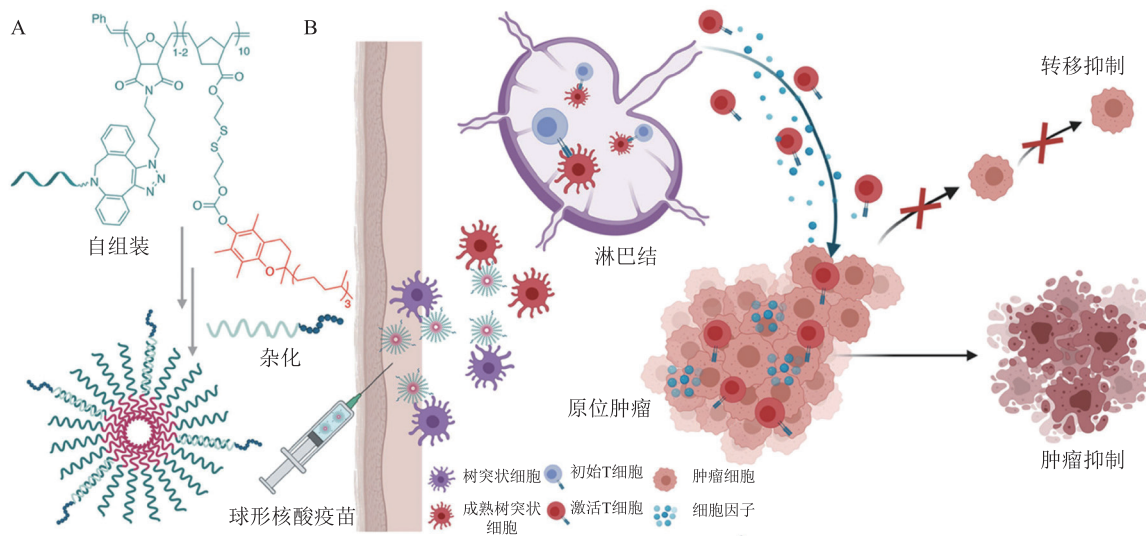
核酸分子具有激活模式识别受体 PRR 的功能, 是具有良好前景的高性能佐剂。然而, 细胞和体内代谢功能障碍, 包括细胞摄取不良、核酸酶不稳定和快速肾脏清除限制了核酸在免疫调节方面的应用<sup>[66]</sup>。基于此, Chen 等<sup>[67]</sup>通过将亲水性的寡核苷酸与疏水性的维生素 E 片段偶联, 自组装形成球形核酸纳米疫苗 dsSNA, 核酸与维生素 E 作为彼此的载体共递送, 可增效癌症免疫治疗。dsSNA 可被细胞快速摄取到 TLR9 主要位于的细胞区室中, 核酸与维生素 E 协同作用, 激活 TLR9 介导的下游通路, 诱导强烈的抗原特异性免疫反应, 促进抗原靶向引流淋

巴结 (draining lymph node, dLN) 并延长其在 dLN 的有效保留。值得注意的是, 该 dsSNA 疫苗几乎完全由天然存在的化合物构成, 避免了额外的载体系统引发的安全性和免疫学的问题 (见图 5)。

**2.3.2 合成高分子自佐剂递送系统** 合成高分子材料具有多个活性位点, 是构建纳米佐剂的有力候选物, 可连接或缠绕包裹免疫刺激剂形成纳米佐剂, 如壳聚糖、聚乙烯亚胺 (polyetherimide, PEI) 等。壳聚糖纳米颗粒 (chitosan nanoparticles, CNP) 为一种有效的佐剂候选物, 作为载体材料的壳聚糖具有免疫刺激活性和生物黏附性, 可改善细胞摄取和渗透, 并提供更精

细的抗原保护<sup>[68]</sup>。研究表明,壳聚糖可诱导线粒体应激,导致线粒体 ROS 的产生和 DNA 的释放,激活环鸟嘌呤-腺嘌呤核苷酸合成酶-干扰素基因刺激蛋白(cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS-STING)途径,以 I 型干扰素受体依赖性方式增强 DC 细胞成熟及抗原特异性 Th1 细胞反应<sup>[69]</sup>。也有研究表明,壳聚糖可诱导钾离子外排和溶酶体破裂,具有促进炎症小体 NLRP3 激活的能力。此外,壳聚糖长链也可作为免疫刺激剂的递送载体。

例如氟碳改性壳聚糖能够与核酸佐剂自组装,构建经皮递送载体。氟碳改性壳聚糖具有良好的透皮促渗功能,聚核糖胞苷酸能够通过 TLR3 受体等激活 TANK 结合激酶 1 (TANK-binding kinase 1, TBK1) 和干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 介导的 I 型干扰素应答免疫反应,有效激活皮下免疫细胞<sup>[70]</sup>。由于天然来源和良好的生物相容性以及对人类和动物无致命毒性,壳聚糖及其衍生物已被广泛用于预防性和治疗性疫苗的构建。



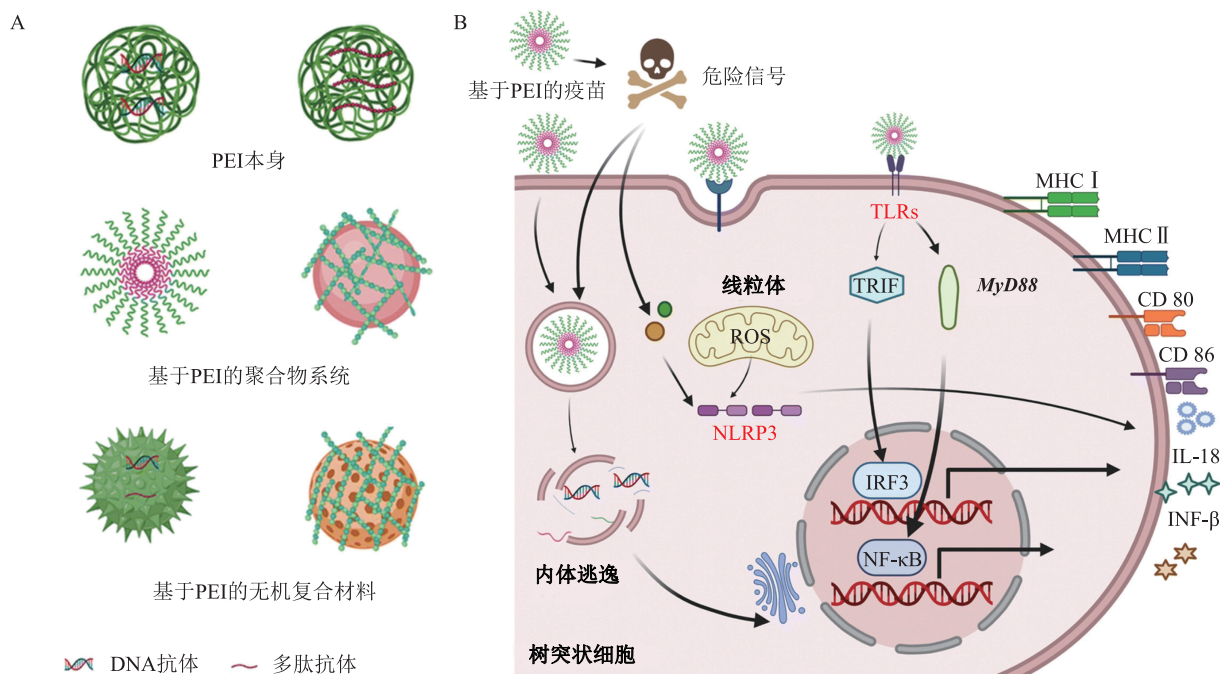
A: 双佐剂球形核酸的构建; B: 双佐剂球形核酸体内增效肿瘤免疫治疗的机制示意图

图 5 双佐剂球形核酸增效激活 TLR9 介导的癌症免疫治疗<sup>[67]</sup>

Figure 5 Dual adjuvant spherical nucleic acids maximize TLR9 activation in cancer immunotherapy

PEI 含有多个氨基结构,是一种经典的阳离子高分子材料。得益于 PEI 的伯胺、仲胺和叔胺基团,内吞进入溶酶体后可捕获氢离子,为达到电荷平衡和渗透压平衡,氯离子和水大量流入,导致溶酶体区室肿胀破裂,释放抗原到细胞质,即阳离子的“质子海绵效应”,随后由内质网新合成的 MHC II 类分子转运至内体,形成抗原-MHC II,再经由高尔基体转运进行抗原递呈,因此 PEI 材料有利于实现抗原的溶酶体逃逸<sup>[71]</sup>。更为重要的是,有研究表明 PEI 具有 TLR 激动剂的佐剂效应(见图 6)。Jin 等<sup>[72]</sup>将 PEI 作为佐剂及载体,与抗原热休克蛋白 90-CTD 通过正负电荷作用形成纳米疫苗,可增强小鼠体内免疫应答,用于治疗白色念珠菌感染。该研究结果表明,制备的抗真菌纳

米疫苗可通过诱导 B 细胞分化为长寿命浆细胞,在小鼠中诱导快速免疫反应,并在体内提供长期抗体,进而对被白色念珠菌感染的小鼠发挥保护作用。Xu 等<sup>[73]</sup>报道了一种氟化聚乙烯亚胺(F<sub>13</sub>-PEI)个性化肿瘤疫苗用于术后免疫治疗。含氟烷基链具有既疏水又疏油的特性,在水溶液中可自组装成纳米胶束或纳米聚集体。因此,对 PEI 进行氟化烷基链修饰,可减少细胞毒性,并提高阳离子高分子的血清稳定性、细胞摄入、内含体逃逸。F<sub>13</sub>-PEI 与抗原组成的简单复合物不仅可有效促进抗原的胞质输送和交叉递呈,还可以通过激活 TLR4 刺激产生细胞因子 IL-1 $\beta$ ,从而显著增强该纳米疫苗的抗癌效应。因此,基于有机高分子 PEI 的佐剂纳米颗粒研究受到广泛关注。



A: 基于聚乙烯亚胺 (PEI) 免疫佐剂的多种抗原递送系统; B: 基于 PEI 的递送系统增强疫苗免疫原性的机制示意图; NF- $\kappa$ B: 核因子- $\kappa$ B; IRF3: 干扰素调节因子 3; ROS: 活性氧; TLRs: Toll 样受体; TRIF: 含有 TIR 结构域的衔接诱导干扰素- $\beta$ ; MyD88: 髓系分化原发反应基因 88; MHC: 主要组织相容性复合体; IL: 白细胞介素; IFN: 干扰素

图 6 基于 PEI 免疫佐剂的递送系统增效疫苗免疫原性<sup>[71]</sup>

Figure 6 Potentiation of vaccine immunogenicity by a delivery system based on PEI immune adjuvants

## 2.4 无机自佐剂递送系统

在免疫反应过程中, 无机纳米佐剂可作为抗原暂时储库, 稳定抗原构象, 延长抗原暴露时间, 协助免疫细胞的招募和成熟并促进抗原的摄取、递呈与交叉递呈<sup>[74]</sup>, 选择性诱导不同类型的免疫反应。目前, 已有多种无机纳米佐剂被开发用于增效免疫治疗, 主要包括金属离子佐剂与硅基佐剂等。

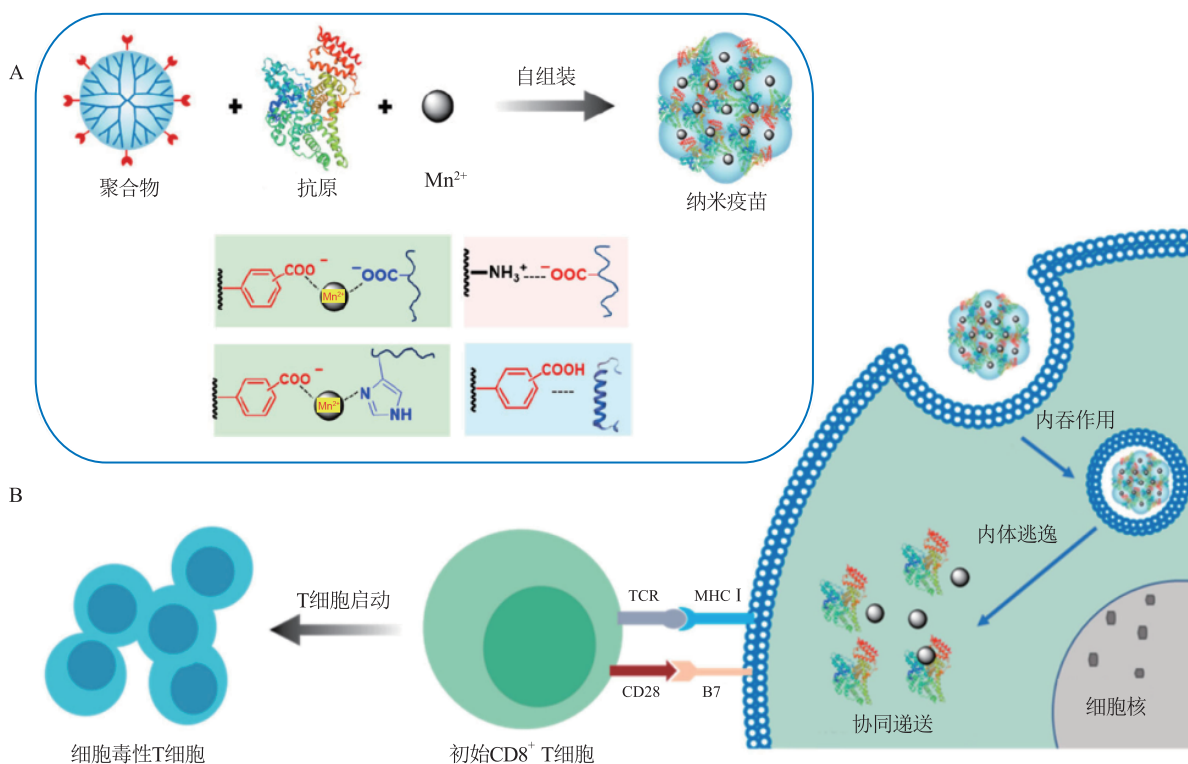
**2.4.1 金属离子自佐剂递送系统** 铝佐剂作为首个被批准的无机材料佐剂, 被广泛应用于疫苗构建。然而, 研究表明以明矾为代表的铝佐剂, 只能附着在细胞膜上而不能进入 DC 胞内, 因此无法实现抗原在细胞内的传递和加工, 难以激发 T 细胞介导的免疫应答。针对上述问题, 通过药剂学方式以改良铝佐剂的理化性质, 以期实现 DC 的免疫激活。Peng 等<sup>[75]</sup>通过 Pickering 乳液制备了明矾的微粒递送系统, 即将明矾加入到角鲨烯/水界面上, 形成稳定体系。由于明矾位于微粒表面, 可大量吸附抗原, 且微粒可刺激 DC 内吞, 促进抗原的摄取和交叉递呈。与传统的明矾佐剂相比, 明矾 Pickering 乳液诱导产生的

抗原特异性抗体滴度提高了 6 倍以上, IFN- $\gamma$  的 T 细胞数量提高了 3 倍以上, 显示出强效的体液免疫和细胞免疫激活作用。纳米铝佐剂不仅可应用于抗感染治疗引发机体体液免疫, 还能激起细胞免疫用于抗肿瘤治疗。Jia 等<sup>[74]</sup>以临床铝佐剂为原型, 设计并构建了一种呈弱碱性的含镁离子的新型纳米铝佐剂, 可有效中和酸性 TME 并补充 TME 内的  $Mg^{2+}$  水平, 促使免疫应答向 Th1 极化以诱导 T 细胞免疫应答, 并通过阻断肿瘤细胞自噬途径诱导细胞凋亡, 增效癌症免疫治疗。该实验结果显示, 瘤周注射纳米铝能够有效抑制实体瘤生长。该研究团队进一步将分子佐剂 CpG 负载在纳米铝佐剂上, 用以捕获大量的肿瘤抗原, 构建原位肿瘤疫苗诱导抗原特异性保护性免疫应答。

锰 (Mn) 是第 2 个被认为具有免疫刺激作用的金属元素。相比于无法被机体吸收和代谢的铝元素, 锰作为一种必需的营养元素, 参与各种生理活动, 具有更高的生物安全性和相容性<sup>[76]</sup>。研究表明, 二价锰离子 ( $Mn^{2+}$ ) 与 cGAS-STING 通路密切联系,

参与宿主的先天免疫调控<sup>[77]</sup>。基于此研究发现,  $Mn^{2+}$  可诱导 STING 非依赖的 TBK1 与 p65 磷酸化, 从而增加 STING 依赖的 IRF3 磷酸化, 促进 IFN- $\beta$  转录增强体的组装, 最终扩增级联 STING 信号传导并增强 IFN-I 的产生。Gao 等<sup>[78]</sup> 以苯甲酸 (benzoic acid, BA) 修饰的第 5 代聚氨基胺 (G5-PAMAM) 树枝状分子衍生物作为载体, 将  $Mn^{2+}$  和蛋白抗原卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 结合, 制备成癌症纳米疫苗 G5-pBA/OVA@Mn。  $Mn^{2+}$  不仅作为 STING 佐剂, 且可与 OVA 蛋白进行配位, 在纳米疫苗的形成中起关键的协调作用。该纳米疫苗经皮下注射后, 被运输至淋巴结, 显示于 CD11c<sup>+</sup> DC 细胞上, 血清 IgG1 和 IgG2a 均显著升高, 表明纳米疫苗诱发了 Th1 极化免疫应答, 诱导的脾 OVA 抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞比例是 G5-pBA/OVA 的 16.4 倍, 表

明  $Mn^{2+}$  佐剂在免疫激活中发挥关键放大作用 (见图 7)。Li 等<sup>[79]</sup> 通过将 Mn 锚定在乳铁蛋白-PEG 偶联物中, 构建了一种预防病毒感染的锰基纳米疫苗平台 LaMP。Mn 作为佐剂, 一方面牢固地嵌入 LaMP 的金属核心中, 为锚定含咪唑的佐剂和病毒抗原提供配位支架; 另一方面  $Mn^{2+}$  通过激活 cGAS-STING 协同增强 STING 激动剂二氨基苯并咪唑化合物的预防效果, 诱导体液免疫产生针对 SARS-CoV-2 的中和抗体。该纳米疫苗还触发了黏膜免疫反应, 在免疫仓鼠的肺中产生抗原特异性分泌型免疫球蛋白 A。抗原特异性 T 细胞和抗原非依赖性 NK 细胞被激活, 从而在假病毒感染模型中单次鼻内给药后防止 SARS-CoV-2 感染肺上皮细胞。上述结果表明, 金属离子佐剂递送系统在抗原递呈细胞激活与抗原体内吸附方面展现了巨大优势, 有望拓宽疾病的应用范围。



A: 锰离子配位纳米疫苗的构建; B: 锰离子配位纳米疫苗体内增效癌症免疫治疗的机制示意图; TCR: T 细胞受体; MHC I: 主要组织相容性复合体 I 型

图 7 锰离子配位纳米疫苗抗原和佐剂的胞质递送用于增强癌症免疫治疗<sup>[78]</sup>

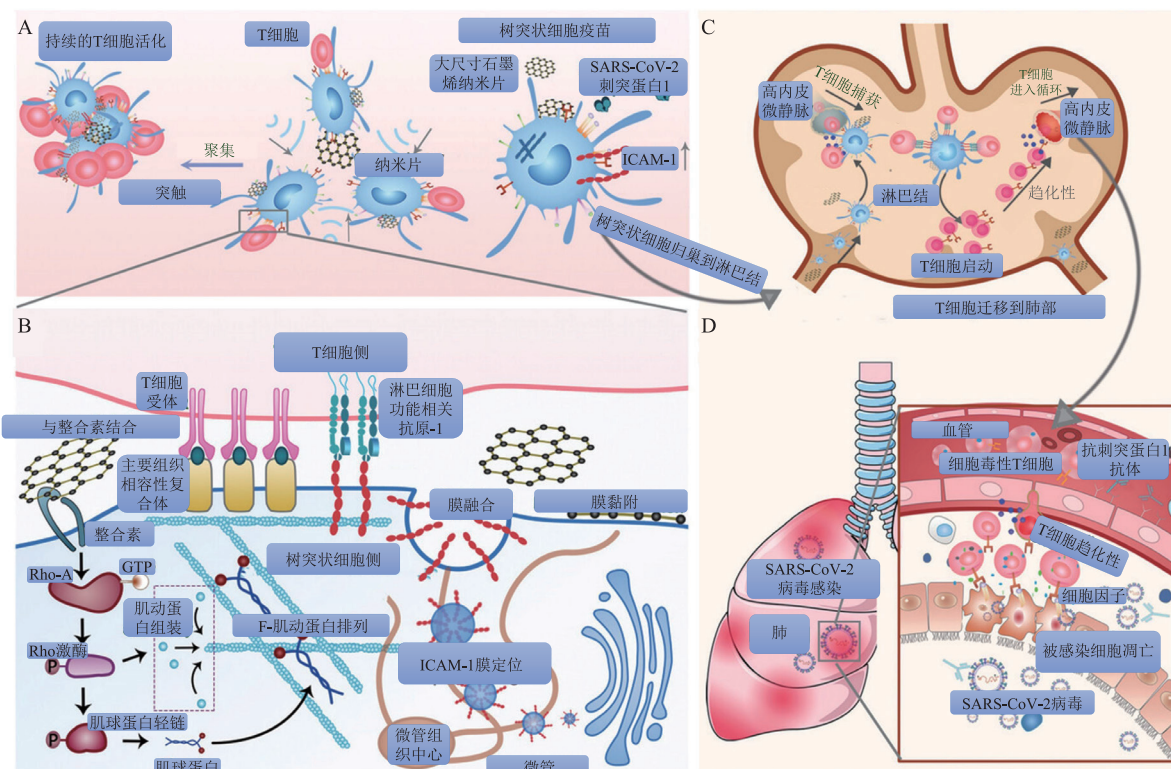
Figure 7 Orchestrated cytosolic delivery of antigen and adjuvant by manganese ion-coordinated nanovaccine for enhanced cancer immunotherapy

2.4.2 石墨烯自佐剂递送系统 石墨烯是构建多功能纳米疫苗平台的优异材料。Xu 等<sup>[80]</sup> 构建的高度模

块化和可生物降解的石墨烯纳米片仅有 20~30 nm, 且可在极短的 2 h 内即可构建个性化疫苗, 并在淋

巴结递送上实现快速、高效和持续的蓄积, 与单纯抗原相比, 淋巴靶向递送效率提高 100 倍。更为重要的是石墨烯纳米粒能诱导 DC 内 ROS 生成, 促进成熟, 引导抗原递呈。另一项研究显示, 直径大于  $1 \mu\text{m}$  的大尺寸氧化石墨烯纳米粒 L-GO 成功制备, 由于粒径小于  $500 \text{ nm}$  的离子更倾向于被 DC 吞噬, 大尺寸的石墨烯纳米片则表现出更强的黏附性, 可

作为“纳米拉链”以促进 DC-T 细胞簇的聚集, 从而为 T 细胞激活提供稳定的微环境 (见图 8)<sup>[81]</sup>。在抗 SARS-CoV-2 疾病模型中, 基于大尺寸石墨烯纳米片佐剂的疫苗治疗组的病毒 RNA 清除率高达 99.7%, 实现了强效的抗病毒治疗。这种“纳米拉链”的免疫激活策略进一步丰富了佐剂分子机制的研究基础, 在未来佐剂应用中展现了巨大潜力。



SARS-CoV-2: 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2; Rho-A: Ras 同系物家族成员 A; GTP: 三磷酸鸟苷; ICAM-1: 细胞间黏附分子-1

图 8 大尺寸氧化石墨烯增强 DC-T 细胞突触接触并放大 DC 疫苗对抗 SARS-CoV-2 效率的示意图<sup>[81]</sup>

Figure 8 Schematic diagram of large-sized graphene oxide to enhance DC-T cell synaptic contacts and amplify the efficiency of DC vaccines against SARS-CoV-2

### 3 结语与展望

目前, 广谱疫苗的开发策略主要集中在抗原设计上, 但作为疫苗的关键组分, 佐剂可通过增强抗原的免疫反应强度, 提高交叉保护效率, 从而为广谱疫苗开发提供更多的选择。与特异性抗原设计相比, 可调控佐剂能够方便地应用于不同来源和不同类型的抗原, 以快速应对新发再发疫情。

目前 FDA 批准上市的疫苗用佐剂数量仍较少, 除应用百年的铝盐佐剂外, 新获批上市的佐剂仅

MF59、AS04、AS03、AS01、CpG1018 及 Matrix-M 这 6 种。如何调控佐剂活性、适配抗原特性、实现最佳免疫反应的策略研究相对缺乏。不管是肿瘤疫苗, 还是针对重大公共卫生问题的传染病疫苗, 均须大力扩充佐剂库以增强疫苗效力。

近年来随着对先天免疫的认知不断加深, 功能性材料及生物工程学等领域飞速发展, 这些突破性研究进展为开发更安全、更高效的下一代佐剂带来机遇, 为疫苗开发领域带来新的研究思路。基于一

体化多功能设计的佐剂纳米材料,可整合免疫激活、抗原递送和受控的持久调节,作为载体实现抗原与佐剂的共递送,改善 APC 介导的 T 细胞活化,增强免疫效力。在佐剂平台的开发上,不仅需要关注材料本身的佐剂特性,递送平台的化学组成及物理性质,包括大小、表面电荷、表面配体、孔径大小、形貌等,均会影响佐剂性能。此外,新型佐剂方式,包括共振辐射以激活 T 细胞,温和光热以诱导肿瘤细胞表达热休克蛋白以促进 DC 激活诱导佐剂,形

成的新方式和新途径。

值得深思的是,强而持久的免疫刺激是否是递送系统研究的唯一追求。不适当的免疫刺激不仅会引发毒副作用,还可能导致免疫耐受和 T 细胞功能障碍。在强大的局部免疫刺激和低全身毒性之间取得有效平衡,合理设计强效且安全的佐剂是一项重大挑战。因此开发安全有效的新型疫苗佐剂、拓宽佐剂在疫苗中的应用范围任重而道远。

## 【参考文献】

- [1] Pulendran B, Arunachalam P S, O'Hagan D T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(6): 454-475.
- [2] Coffin R L, Sher A, Seder R A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work[J]. *Immunity*, 2010, 33(4): 492-503.
- [3] Shi S T, Zhu H R, Xia X Y, et al. Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvanticity[J]. *Vaccine*, 2019, 37(24): 3167-3178.
- [4] Hogenesch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants[J]. *Vaccine*, 2002, 20(Suppl 3): S34-S39.
- [5] Reed S G, Orr M T, Fox C B. Key roles of adjuvants in modern vaccines[J]. *Nat Med*, 2013, 19(12): 1597-1608.
- [6] Gupta R K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 32(3): 155-172.
- [7] Hogenesch H, O'Hagan D T, Fox C B. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want[J]. *NPJ Vaccines*, 2018, 3(1): 51. DOI: 41510.41038/s41541-41018-40089-x.
- [8] Huang M, Wang W. Factors affecting alum-protein interactions[J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1/2): 139-146.
- [9] Sun B B, Xia T. Nanomaterial-based vaccine adjuvants[J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4(33): 5496-5509.
- [10] Hogenesch H. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants[J]. *Front Immunol*, 2013, 3: 406. DOI: 35910.33389/fimmu.32012.00406.
- [11] Li X, Wang X P, Ito A. Tailoring inorganic nanoadjuvants towards next-generation vaccines[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(13): 4954-4980.
- [12] Sun B B, Ji Z X, Liao Y P, et al. Engineering an effective immune adjuvant by designed control of shape and crystallinity of aluminum oxyhydroxide nanoparticles[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(12): 10834-10849.
- [13] Sokolovska A, Hem S L, Hogenesch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants[J]. *Vaccine*, 2007, 25(23): 4575-4585.
- [14] Xia S L, Zhang Y T, Wang Y X, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(1): 39-51.
- [15] Zhang Y J, Zeng G, Pan H X, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial[J]. *Lancet Infect Dis*, 2021, 21(2): 181-192.
- [16] Giannini S L, Hanon E, Moris P, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only[J]. *Vaccine*, 2006, 24(33/34): 5937-5949.
- [17] Park B S, Song D H, Kim H M, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1191-1195.
- [18] Kumru O S, Sanyal M, Friedland N, et al. Formulation development and comparability studies with an aluminum-salt adjuvanted SARS-CoV-2 spike ferritin nanoparticle vaccine antigen produced from two different cell lines[J]. *Vaccine*, 2023, 41(44): 6502-6513.
- [19] Masihi K N, Lange W, Brehmer W, et al. Immunobiological activities of nontoxic lipid A: enhancement of nonspecific resistance in combination with trehalose dimycolate against viral infection and adjuvant effects[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1986, 8(3): 339-345.

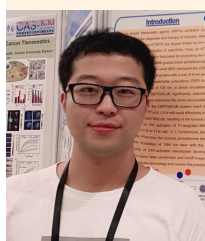
- [20] Galli G, Medini D, Borgogni E, *et al.* Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4<sup>+</sup> T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(10): 3877–3882.
- [21] Cioncada R, Maddaluno M, Vo H T M, *et al.* Vaccine adjuvant MF59 promotes the intranodal differentiation of antigen-loaded and activated monocyte-derived dendritic cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185843. DOI: 10.1371/journal.pone.0185843.
- [22] O'Hagan D T, Ott G S, de Gregorio E, *et al.* The mechanism of action of MF59—an innately attractive adjuvant formulation[J]. *Vaccine*, 2012, 30(29): 4341–4348.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Aleynick M, Svensson-Arvelund J, Flowers C R, *et al.* Pathogen molecular pattern receptor agonists: treating cancer by mimicking infection[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(21): 6283–6294.
- [26] Bhagchandani S, Johnson J A, Irvine D J. Evolution of Toll-like receptor 7/8 agonist therapeutics and their delivery approaches: from antiviral formulations to vaccine adjuvants[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 175: 113803. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.013.
- [27] van Herck S, Feng B, Tang L. Delivery of STING agonists for adjuvanting subunit vaccines[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 179: 114020. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114020.
- [28] Demaria O, Cornen S, Daëron M, *et al.* Harnessing innate immunity in cancer therapy[J]. *Nature*, 2019, 574(7785): 45–56.
- [29] Wang B, van Herck S, Chen Y, *et al.* Potent and prolonged innate immune activation by enzyme-responsive imidazoquinoline TLR7/8 agonist prodrug vesicles[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(28): 12133–12139.
- [30] Luchner M, Reinke S, Milicic A. TLR agonists as vaccine adjuvants targeting cancer and infectious diseases[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 142. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020142.
- [31] Lipford G B, Sparwasser T, Zimmermann S, *et al.* CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses[J]. *J Immunol*, 2000, 165(3): 1228–1235.
- [32] Kwon J Y, Daoud N, Ghooz H, *et al.* Efficacy of a two-dose hepatitis B vaccination with a novel immunostimulatory sequence adjuvant (Hepilisav-B) on patients with chronic liver disease: a retrospective study[J]. *Transl Gastrointest Hepatol*, 2023, 8: 8. DOI: 10.21037/tgh-22-12.
- [33] Detienne S, Welsby I, Collignon C, *et al.* Central role of CD169<sup>+</sup> lymph node resident macrophages in the adjuvanticity of the QS-21 component of AS01[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 39475. DOI: 10.1038/srep39475.
- [34] Didierlaurent A M, Laupèze B, Di Pasquale A, *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16(1): 55–63.
- [35] Stertman L, Palm A E, Zarnegar B, *et al.* The Matrix-M™ adjuvant: a critical component of vaccines for the 21<sup>st</sup> century[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2023, 19(1): 2189885. DOI: 10.1080/21645515.2023.2189885.
- [36] Magnusson S E, Reimer J M, Karlsson K H, *et al.* Immune enhancing properties of the novel Matrix-M™ adjuvant leads to potentiated immune responses to an influenza vaccine in mice[J]. *Vaccine*, 2013, 31(13): 1725–1733.
- [37] Syed Y Y. Recombinant zoster vaccine (Shingrix®): a review in herpes zoster[J]. *Drugs Aging*, 2018, 35(12): 1031–1040.
- [38] Tenchov R, Bird R, Curtze A E, *et al.* Lipid nanoparticles—from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(11): 16982–17015.
- [39] Tretiakova D S, Vodovozova E L. Liposomes as vaccine delivery systems and adjuvants[J]. *Biol Membranes*, 2022, 39(2): 85–106.
- [40] Tretiakova D S, Vodovozova E L. Liposomes as adjuvants and vaccine delivery systems[J]. *Biochem Mosc Suppl A*, 2022, 16(1): 1–20.
- [41] Giddam A K, Reiman J M, Zaman M, *et al.* A semi-synthetic whole parasite vaccine designed to protect against blood stage malaria[J]. *Acta Biomater*, 2016, 44: 295–303. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.08.020.
- [42] Go S, Jung M, Lee S, *et al.* A personalized cancer nanovaccine that enhances T-cell responses and efficacy through dual interactions with dendritic cells and T cells[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(49): e2303979. DOI: 10.1002/adma.202303979.
- [43] Jin S M, Yoo Y J, Shin H S, *et al.* A nanoadjuvant that dynamically coordinates innate immune stimuli activation enhances cancer immunotherapy and reduces immune cell exhaustion[J]. *Nat*

- Nanotechnol*, 2023, 18(4): 390–402.
- [44] He X D, Zhou S Q, Huang W C, *et al.* A potent cancer vaccine adjuvant system for particleization of short, synthetic CD8<sup>+</sup> T cell epitopes[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(3): 4357–4371.
- [45] Zhou Z W, Wu H, Yang R X, *et al.* GSH depletion liposome adjuvant for augmenting the photothermal immunotherapy of breast cancer[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(36): eabc4373. DOI: 10.1126/sciadv.abc4373.
- [46] Wang N, Chen M N, Wang T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: from basics to clinical immunization[J]. *J Control Release*, 2019, 303: 130–150. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.68521.
- [47] Narayanan R R, Maanvizhi S. Applications of chitosan derivatives as adjuvant for nanoparticles based vaccines[J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2023, 23(3): e220922209066. DOI: 10.2174/1871526522666220922102621.
- [48] Gnopo Y M D, Watkins H C, Stevenson T C, *et al.* Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems-reprogramming bacteria for vaccine delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 114: 132–142. DOI: 10.1016/j.addr.2017.05.003.
- [49] Shehata M M, Mostafa A, Teubner L, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles (OMVs)-based dual vaccine for influenza a H1N1 virus and MERS-CoV[J]. *Vaccines*, 2019, 7(2): 46. DOI: 10.3390/vaccines7020046.
- [50] Cheng K M, Zhao R F, Li Y, *et al.* Bioengineered bacteria-derived outer membrane vesicles as a versatile antigen display platform for tumor vaccination via Plug-and-Display technology[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2041. DOI: 10.1038/s41467-021-22308-8.
- [51] Liu G N, Ma N A, Cheng K M, *et al.* Bacteria-derived nanovesicles enhance tumour vaccination by trained immunity[J]. *Nat Nanotechnol*, 2024, 19(3): 387–398.
- [52] Zhuang Q, Xu J, Deng D S, *et al.* Bacteria-derived membrane vesicles to advance targeted photothermal tumor ablation[J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120550. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120550.
- [53] Cui B F, Liu X S, Fang Y Z, *et al.* Flagellin as a vaccine adjuvant[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2018, 17(4): 335–349.
- [54] Mizel S A, Sriranganathan N, Ervin S, *et al.* Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(1): 21–28.
- [55] Wang W G, Xu H H, Ye Q S, *et al.* Systemic immune responses to irradiated tumours via the transport of antigens to the tumour periphery by injected flagellate bacteria[J]. *Nat Biomed Eng*, 2022, 6(1): 44–53.
- [56] Rohovie M J, Nagasawa M, Swartz J R. Virus-like particles: next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery[J]. *Bioeng Transl Med*, 2017, 2(1): 43–57.
- [57] Tang J L, Fu M Q, Xu C H, *et al.* Development of a novel virus-like particle-based vaccine for preventing tick-borne encephalitis virus infection[J]. *Virol Sin*, 2023, 38(5): 767–777.
- [58] Machida K, Imataka H. Production methods for viral particles[J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(4): 753–760.
- [59] Mazboudi R, Maasz H M, Resch M D, *et al.* A recombinant virus-like particle vaccine against adenovirus-7 induces a potent humoral response[J]. *NPJ Vaccines*, 2023, 8(1): 155. DOI: 10.1038/s41541-023-00754-3.
- [60] Cimica V, Galarza J M. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines[J]. *Clin Immunol*, 2017, 183: 99–108. DOI: 10.1016/j.clim.2017.08.004.
- [61] Wang C, Steinmetz N F. A combination of cowpea mosaic virus and immune checkpoint therapy synergistically improves therapeutic efficacy in three tumor models[J]. *Adv Funct Mater*, 2020, 30(27): 2002299. DOI: 10.1002/adfm.202002299.
- [62] González-Mora A, Hernández-Pérez J, Iqbal H M N, *et al.* Bacteriophage-based vaccines: a potent approach for antigen delivery[J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(3): 504. DOI: 10.3390/vaccines8030504.
- [63] Dong X, Pan P, Zhang Q L, *et al.* Engineered living bacteriophage-enabled self-adjuncting hydrogel for remodeling tumor microenvironment and cancer therapy[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(4): 1219–1228.
- [64] Hao H B, Wu S P, Lin J K, *et al.* Immunization against Zika by entrapping live virus in a subcutaneous self-adjuncting hydrogel[J]. *Nat Biomed Eng*, 2023, 7(7): 928–942.
- [65] Skwarczynski M, Zhao G Z, Boer J C, *et al.* Poly(amino acids) as a potent self-adjuncting delivery system for peptide-based nanovaccines[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(5): eaax2285. DOI: 10.1126/sciadv.aax2285.
- [66] Feng C, Li Y J, Ferdows B E, *et al.* Emerging vaccine nanotechnology: from defense against infection to sniping cancer[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(5): 2206–2223.
- [67] Chen P R, Wang D, Wang Y Y, *et al.* Maximizing TLR9 activation in cancer immunotherapy with dual-adjuncted spherical nucleic acids[J]. *Nano Lett*, 2022, 22(10): 4058–4066.
- [68] Dilnawaz F, Acharya S, Kanungo A. A clinical perspective of chitosan nanoparticles for infectious disease management[J]. *Polym Bull*, 2023, 5: 1–25. DOI: 10.1007/s00289-023-04755-z.

- [69] Carroll E C, Jin L, Mori A, *et al.* The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 597–608.
- [70] Zhuang Q, Chao T, Wu Y Y, *et al.* Fluorocarbon modified chitosan to enable transdermal immunotherapy for melanoma treatment[J]. *Small*, 2023, 19(46): e2303634. DOI: 10.1002/sml.202303634.
- [71] Yang X, Wei Y F, Zheng L N, *et al.* Polyethyleneimine-based immunoadjuvants for designing cancer vaccines[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(40): 8166–8180.
- [72] Jin Z, Dong Y T, Liu S, *et al.* Potential of polyethyleneimine as an adjuvant to prepare long-term and potent antifungal nanovaccine[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 843684. DOI: 10.3389/fimmu.2022.843684.
- [73] Xu J, Lv J, Zhuang Q, *et al.* A general strategy towards personalized nanovaccines based on fluoropolymers for post-surgical cancer immunotherapy[J]. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15(12): 1043–1052.
- [74] Jia Y B, Hu J, Zhu C J, *et al.* Engineered NanoAlum from aluminum turns cold tumor hot for potentiating cancer metalloimmunotherapy[J]. *J Control Release*, 2023, 354: 770–783. DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.01.043.
- [75] Peng S, Cao F Q, Xia Y F, *et al.* Particulate alum via pickering emulsion for an enhanced COVID-19 vaccine adjuvant[J]. *Adv Mater*, 2020, 32(40): e2004210. DOI: 10.1002/adma.202004210.
- [76] Zhang K, Qi C, Cai K Y. Manganese-based tumor immunotherapy[J]. *Adv Mater*, 2023, 35(19): e2205409. DOI: 10.1002/adma.202205409.
- [77] Wang C G, Guan Y K, Lv M Z, *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[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 675–687.
- [78] Gao Z L, Xu W, Zheng S J, *et al.* Orchestrated cytosolic delivery of antigen and adjuvant by manganese ion-coordinated nanovaccine for enhanced cancer immunotherapy[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(5): 1904–1913.
- [79] Li J X, Qiu Q, Ren H, *et al.* A metalloprotein nanoparticle scaffold co-delivers antigens and adjuvants with metal-enhanced STING activation for vaccination preventing viral infections[J]. *Nano Today*, 2024, 55: 102156. DOI: 10.1016/j.nantod.2024.102156.
- [80] Xu C, Hong H, Lee Y, *et al.* Efficient lymph node-targeted delivery of personalized cancer vaccines with reactive oxygen species-inducing reduced graphene oxide nanosheets[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 13268–13278.
- [81] Zhou Q Q, Gu H J, Sun S J, *et al.* Large-sized graphene oxide nanosheets increase DC-T-cell synaptic contact and the efficacy of DC vaccines against SARS-CoV-2[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(40): e2102528. DOI: 10.1002/adma.202102528.



**【专家介绍】孙敏捷:**中国药科大学药剂系教授, 国家高层次人才, 博士生导师, 教务处处长、孟目的学院院长。担任 *Journal of Controlled Release* 杂志编辑, 江苏省中医药学会新药研究与开发专委会常委, 江苏省药物研究与开发协会医疗器械与药学装备专委会委员, 白求恩医学专家委员会青年专家委员会委员。主要从事生物药物递送、高端药物制剂研发与产业化研究, 近年来承担主持国家重大研发计划“纳米专项”课题、国家自然科学基金等科研项目 12 项。以第一作者及通信作者在 *PNAS*, *Angew Chem*, *Sci Adv* 等杂志发表论文 58 篇。获教育部“长江学者”特聘教授, 江苏省“杰出青年基金”(2017), 入选江苏省“333 高层次人才培养工程”第二层次(2022)、江苏省“六大人才高峰”高层次人才(2016)等人才项目; 荣获国际控释协会(CRS)青年科学家 YIA 奖(2021)、江苏省第 18 届青年科技奖(2022)、教育部高等学校科学研究优秀成果一等奖(2018、2021)等重要奖项。



**【专家介绍】周占威:**博士, 兴药研究员, 硕士生导师。入选国家“博新计划”青年人才项目(2020年)。自 2020 年任职于中国药科大学药剂教研室。主要从事智能纳米制剂研究, 并获得了系列创新性研究成果。近 5 年以第一作者及通信作者在 *Science Advances* (IF: 14.957), *Angewandte Chemie International Edition* (IF: 16.823), *Advanced Functional Materials* (IF: 19.924), *Journal of Controlled Release* (IF: 11.467) 等国际著名期刊发表论文 20 余篇。申请发明专利 4 项。近 3 年主持纵向科研项目 6 项, 到账经费 150 万元, 包括: 国家“博新计划”(2020)、国家自然科学基金-青年基金(2021)、江苏省自然科学基金-青年基金(2021)、中国博士后面上基金(2020)、江苏省博士后科研资助项目 A 类(2021)等。获得 2021 年江苏省优秀博士毕业论文, 2020 年博新计划优秀创新成果奖等奖项。担任国际控释协会(CRS)、中国药学会、中国微纳纳米技术协会等会员, *Chinese Chemical Letters* 杂志青年编委。