

Received: 2003.09.17

Accepted: 2003.11.17

Published: 2004.03.02

## Adiuwanty jako czynniki podnoszące skuteczność szczepionek

### Adjuvants as factors improving efficiency of vaccination

**Grzegorz Chodaczek**

Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda

#### Streszczenie

Obecnie opracowywane szczepionki zawierają coraz częściej antygeny wytwarzane metodami inżynierii genetycznej lub antygeny izolowane z drobnoustrojów chorobotwórczych. Dzięki temu są one pozbawione wielu działań niepożądanych, obserwowanych po zastosowaniu preparatów z całymi, inaktywowanymi mikroorganizmami. Polepszenie jakości szczepionek odbywa się często kosztem zmniejszenia ich zdolności do wzbudzania swoistych reakcji immunologicznych. Immunogenność antygeny można jednak zwiększyć podając go razem z adiuwantami, które poprawiają efektywność szczepień na wiele sposobów. Substancje te między innymi chronią antygen przed zbyt szybką degradacją w ustroju, stopniowo go uwalniając z miejsca podania; mogą również nieswoiście pobudzać komórki układu immunologicznego i przyczyniać się do wydajniejszego pochłaniania i prezentacji antygeny. Dobierając odpowiedni adiuwant, albo ich mieszaninę, uzyskać można odpowiedź immunologiczną o określonym typie - Th1 lub Th2. Dokładne poznanie procesów przetwarzania antygeny i aktywacji komórek antygenowo swoistych jest jednak niezbędne do tworzenia bardziej skutecznych szczepionek.

**Słowa kluczowe:**

**szczepionka • adiuwant • komórka prezentująca antygen • odpowiedź immunologiczna**

#### Summary

Modern vaccines, based on antigen subunits are devoid of many side-effects, but often lack immunogenicity. The addition of adjuvants to vaccine formulas can overcome this problem. As a very heterogeneous group of substances, adjuvants enhance immune response to weak antigens in different ways. They protect against the rapid degradation of immunogen in the organism after inoculation. They can form a reservoir of antigens (the depot effect), increasing the vaccine's persistence at the injection site and the draining lymph nodes. Adjuvants also non-specifically activate immune cells, including antigen-presenting cells and lymphocytes. In such a case, the elevated immunogenicity of the antigen results from a bystander effect: by choosing an appropriate adjuvant or a mixture of them, one can direct the type of immune response, toward the generation of cell-mediated immunity (Th1) or the stimulation of the production of specific antibodies (Th2). Recognition of the exact mechanisms of antigen processing and cell interactions will allow constructing more effective vaccines.

**Key words:**

**vaccine • adjuvant • antigen presenting cell • immune response**

**Full\_text PDF:**

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_58/4829.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4829.pdf)

**Word count:**

9212

**Tables:**

-

**Figures:**

-

**References:**

94

**Adres autora:**

Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: chodaczek@iitd.pan.wroc.pl

## WSTĘP

Dzięki szczepieniom organizm uczy się rozpoznawać i właściwie reagować na podany antygen. Efektywna immunizacja w szczepieniach profilaktycznych jest w pewnym sensie odwzorowaniem infekcji, z tą różnicą, że choroba nie może się rozwinąć, ponieważ do ustroju wprowadzony jest nieaktywny patogen albo tylko jego fragment. Spośród milionów komórek układu odpornościowego zostają wyselekcjonowane i powielone te, które swoiście wiążą i są aktywowane przez dany antygen. Powstaje odporność nabyta, której zasadniczymi elementami są:

- przeciwciała, obecne w płynach tkankowych i wydzielinach śluzowo-surowiczych,
- swoiste antygenowo klony limfocytów T i B, pełniące funkcje efektorowe,
- pozostające w gotowości komórki pamięci.

Dzięki tej odporności, przy ponownym napotkaniu antygeny, organizm szybciej uruchamia mechanizmy obrony przed prawdziwym zagrożeniem ze strony mikroorganizmów i ich toksyn.

Obecnie stosowane szczepionki prowadzą do powstania odporności głównie typu humoralnego, angażującej komórki pomocnicze typu Th2 i komórki B oraz objawiającej się obecnością swoistych przeciwciał. Chronią one przed rozwojem choroby tylko wówczas, gdy patogeny, przeciw którym się szczepi, są niezmiennie antygenowo a infekcje przez nie wywoływane są ostre i krótkotrwałe. W przypadku zakażeń przewlekłych np. wirusem zapalenia wątroby typu C, prątkami gruźlicy czy pasożytami, odpowiedź typu komórkowego i mechanizmy cytotoksyczne są niezbędne; te jednak zachodzą w wyniku generacji antygenowo swoistych komórek typu Th1, charakteryzujących się wytwarzaniem takich cytokin jak interferon gamma, interleukina 2 i 12.

Projektując szczepionki powinno się brać pod uwagę, jaki typ odpowiedzi immunologicznej zapobiega infekcji i jaki antygen należałoby wybrać do immunizacji tak, by odpowiedź i odpornośćżądanego typu mogły się rozwinąć. Obecnie prowadzone badania nad nowymi szczepionkami zmierzają do tego, by zaprzestać stosowania preparatów składających się z żywych patogenów o osłabionej chorobotwórczości (zdolnych do namnażania w ustroju - szczepionka przeciwko ospie, doustna szczepionka przeciwko polio) oraz z zabitych całych komórek. W przypadku atenuowanych szczepów istnieje ryzyko rewersji wirulencji, czyli

powtórznego pojawienia się cech zjadliwości, co byłoby szczególnie niebezpieczne u osób o obniżonej odporności. Całe, inaktywowane drobnoustroje chorobotwórcze mogą natomiast wywoływać groźne powikłania poszczepienne wskutek niepełnej neutralizacji toksyn (np. szczepionka pełnokomórkowa przeciwko krztuścowi). Szczepionki podjednostkowe są znacznie bezpieczniejsze. Zawierają izolowane antygeny, antygeny otrzymanywane metodami inżynierii genetycznej, syntetyczne peptydy, koniugaty białek i polisacharydów lub plazmidowe DNA. Obniżona toksyczność preparatów ma jednak swoją cenę; szczepionki te są zazwyczaj o wiele mniej immunogenne i dlatego wymagają jednoczesnego użycia adiuwantów – substancji, które wzmagają odpowiedź układu immunologicznego na podany antygen.

Jak dotąd dopuszczono do stosowania u ludzi zaledwie kilka adiuwantów: związki glinu (wodorotlenek i fosforan), MF59 – emulsja oparta na skwalenie, oraz liposomopodobny preparat IRIV – immunostymulujące, rekonstruowane wirosomy grypy. Nad wieloma potencjalnymi adiuwantami wciąż są prowadzone badania, zarówno przedkliniczne jak i kliniczne. Duże wymagania odnośnie bezpieczeństwa i braku działań toksycznych nowych postaci szczepionek znacznie jednak ograniczają prace nad ich wytwarzaniem, dotyczy to zwłaszcza szczepionek przeznaczonych do profilaktycznych immunizacji. W przypadku chorób, jak dotąd nieuleczalnych, można przypuszczać, że tolerancja na działania niepożądane nowych szczepionek prawdopodobnie wzrośnie.

Dokładne mechanizmy działania adiuwantów nie zostały w pełni wyjaśnione. Mogą one jednak poprawiać efektywność szczepień na wiele sposobów:

- podnoszą immunogenność słabych antygenów,
- przyspieszają generację i czas trwania odpowiedzi immunologicznej,
- modulują awidność, swoistość i rozkład izotypowy przeciwciał,
- pobudzają odpowiedź komórkową,
- indukują odporność związaną z błonami śluzowymi,
- zwiększają reaktywność komórek układu odpornościowego u niedojrzałych immunologicznie osobników oraz u osób w podeszłym wieku,

- zmniejszają dawkę antygeny w szczepionce i redukują jej koszty,
- pomagają przełamać współzawodnictwo pomiędzy antygenami w szczepionkach złożonych [69].

#### MECHANIZMY POWSTAWANIA ODPOWIEDZI NA PODANY ANTYPEN

Wprowadzenie do organizmu antygeny zawartego w szczepionce wiąże się z mniejszym lub większym urazem i uszkodzeniem tkanek, zależnie od inwazyjności procedury szczepienia. W miejscu szczepienia gromadzą się jako pierwsze komórki żerne: neutrofile i makrofagi, których zadaniem jest pochłoniąć i rozłożyć obce, potencjalnie niebezpieczne struktury. W następstwie tego procesu wydzielają one wiele mediatorów zapalenia, powodujących mobilizację i aktywację większej liczby komórek. We wzbudzeniu swojej odpowiedzi najważniejsze są komórki prezentujące antygen (APC - antigen presenting cells) [10]. Należą do nich przede wszystkim wspomniane już makrofagi oraz komórki dendrytyczne. Ich zadanie polega na prezentacji fragmentów patogenu właściwym komórkom efektorowym odpowiedzi immunologicznej [13]. Limfocyty T muszą „zobaczyć” antygen w odpowiednim kontekście – komórka prezentująca antygen ekspozuje na swojej powierzchni przetworzony antygen, zwykle peptyd o długości 7-25 aminokwasów, połączony z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej (MHC - major histocompatibility complex). Kompleks peptyd-cząsteczka MHC klasy I jest rozpoznawany przez komórki T cytotoksyczne (zazwyczaj CD8<sup>+</sup>), które potrafią bezpośrednio niszczyć komórki zawierające daną sekwencję aminokwasów w białkach powierzchniowych. Cząsteczka MHC klasy II prezentuje peptyd pomocniczym limfocytom T (Th) o fenotypie CD4<sup>+</sup>, których rolą jest regulacja odpowiedzi immunologicznej poprzez kontakt z innymi komórkami i wytwarzanie cytokin. Limfocyty B, odpowiedzialne za wytwarzanie przeciwciał, rozpoznają swoiście, za pomocą receptora komórki B (BCR – B-cell receptor), niezwiązany i niemodyfikowany antygen; do pełnej aktywacji potrzebują one jednak współpracy z pomocniczymi limfocytami T.

Ze względu na wysoką ekspresję cząsteczek MHC i zdolność do aktywowania dziewięciu limfocytów, komórki dendrytyczne (DC - dendritic cells) są określane jako profesjonalne APC [24]. Obecne są one w większości tkanek: w nabłonku (populacja zasiedlająca naskórek nazywana jest komórkami Langerhansa), skórze właściwej, tkankach śródmiąższowych i w narządach limfatycznych. Niedoj-

rzałe DC wychwytyują antygeny w procesie fagocytozy, makropinocytozy i endocytozy za pośrednictwem receptorów DEC-205, DC-SIGN, receptora mannozowego, receptorów dla Fc końców immunoglobulin klasy  $\gamma$ ,  $\epsilon$  i receptora dopełniacza CR3. Pochłonięte antygeny, rozłożone w endosomach do krótkich peptydów, łączą się z cząsteczkami MHC klasy II i są ekspozowane przez długi czas na powierzchni komórki [93]. Makrofagi przetwarzają zfagocytowane cząstki w lizosomach – organellach ubogich w MHC klasy II, gdzie białka degradowane są do pojedynczych aminokwasów, dlatego też słabiej aktywują limfocyty T. Cząsteczki MHC klasy I służą do prezentacji antygenów endogennych, zsyntetyzowanych w cytoplazmie (np. białka wirusa) [83]. Antygeny wytwarzane przez zainfekowaną komórkę ulegają proteolitycznej obróbce w wieloenzymatycznym kompleksie białkowym - proteasomie, do którego trafiają dzięki wyznakowaniu ubikwityną. Powstałe 8 – 10 aminokwasowe peptydy transportowane są następnie przez białka TAP do siateczki endoplazmatycznej, gdzie łączą się z cząsteczkami MHC klasy I. Zdarza się, że antygeny egzogenne są prezentowane krzyżowo, szlakiem antygenów endogennych [56]. Komórki dendrytyczne mogą wówczas indukować antygenowo swoiste reakcje cytotoksyczne np. po pochłonięciu komórek apoptotycznych, zawierających białka wirusów, bakterii czy komórek nowotworowych. Trzecim systemem prezentacji antygenów są cząsteczki CD1 [13]. Wiążą one związki o charakterze lipidów, m.in. składniki ścian komórkowych prątków z rodzaju *Mycobacterium*, lipoarabinomannany, mannozydy fosfatydyloinozytolu, kwasy mikołowe. Komórki T rozpoznające takie glikolipidy wydzielają IFN- $\gamma$ , niszczą zainfekowane komórki, a także bezpośrednio prątki.

Jednocześnie w komórce dendrytycznej zachodzą procesy aktywacji i dojrzewania. DC odpowiadają na tak zwane „sygnały zagrożenia” wysyłane przez uszkodzone komórki podczas infekcji, stresu komórkowego, przy zmianach temperatury, w warunkach hipoksji czy urazu [36]. Aktywują je również cytokiny, kompleksy przeciwciało-antygen, bakteryjne i wirusowe kwasy nukleinowe oraz wysoce zorganizowane, ewolucyjnie niezmiennie wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP – pathogen-associated molecular pattern), do których należą m.in. białka szoku cieplnego, lipopolisacharydy, peptydoglikany czy kwasy lipoteichożowe [69]. Receptory rozpoznające wzorce (PRR – pathogen recognition receptor) występują konstytutywnie na powierzchni komórek układu odpornościowego i są kodowane przez geny nieulegające rekombinacji. Zalicza się do nich receptory Toll-podobne (TLR – Toll-like receptor), pobudzenie których prowadzi do wytwarzania cytokin i chemokin,

odpowiedzialnych za rozwój procesu zapalnego [89]. Cytoplazmatyczna domena TLR, przekazująca sygnał aktywacji jest homologiczna względem cytoplazmatycznej domeny receptora interleukiny 1 (IL-1) i interleukiny 18 (IL-18), cytokin istotnych w powstaniu odczynu zapalnego. Dojrzewaniu DC towarzyszy wzrost ekspresji białek MHC klasy I i II, cząstek kostymulujących (CD80, CD86, CD40, OX-40L), cząstek adhezyjnych ICAM-1 i VLA-4 oraz zmniejszenie liczby molekuł biorących udział w wychwytywaniu antygenów [24]. Ponadto, DC stają się niewrażliwe na immunosupresyjne sygnały np. od IL-10. Kolejnym etapem jest migracja APC do najbliższych położonych węzłów chłonnych pod wpływem miejscowego wytwarzania IL-1, czynnika martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ) i obniżonej syntezy receptorów dla chemokin: CCR1, CCR5, CCR6, które decydują o zasiedleniu skóry i nabłonków przez DC. Zwiększenie z kolei wytwarzania receptora chemokinowego CCR7 umożliwia wejście APC do strefy przykorowej węzła limfatycznego (bogatej w limfocyty T), dzięki obecności tam ligandów dla CCR7 - chemokin ELC (MIP-3 $\beta$ ) i SLC (6CKine) [13].

Dziewicze limfocyty nie mają dostępu do tkanek nie-limfoidalnych [80]. Wskutek braku ekspresji właściwych receptorów zasiedlania, umożliwiającymi im przejście przez ścianę naczynia, krążą pomiędzy drugorzędowymi tkankami limfatycznymi obejmującymi węzły chłonne i śledzionę. Dopiero napotkanie w węzle chłonnym aktywowanej APC ekspozycją antygen, swoicie wiązany przez receptor komórki T (TCR - T-cell receptor), daje szansę limfocytowi T na klonalną ekspansję. Jest to tak zwany „sygnał 1”. APC wydzielają wiele cytokin (IL-12, IL-15, IL-18) i chemokin, które mają przyciągnąć dziewicze limfocyty i komórki pamięci. Do pełnej aktywacji limfocyt T potrzebuje „sygnału 2”, dostarczanego przez cząsteczki kostymulujące B7.1 (CD80) i B7.2 (CD86) na APC, łączące się z CD28 na komórce T [55]. Przy braku kostymulacji limfocyt T przechodzi w stan anergii i organizm nabywa tolerancji na podany antygen. Ligandem dla CD80 i CD86 może być również cząsteczka CTLA-4, mająca o wiele większe powinowactwo do nich niż CD28 [55]. Białko to pojawia się po około 48 godzinach od początku aktywacji, podczas gdy ekspresja CD28 jest konstytutywna. CTLA-4 przekazuje do wnętrza komórki sygnał hamujący pobudzenie limfocytu.

W zależności od tego, jaka subpopulacja komórek dendrytycznych weszła w kontakt z limfocytym T CD4<sup>+</sup>, jakie cząsteczki kostymulujące wzięły udział w aktywacji oraz jakie cytokiny oddziaływały na komórki tworzące synapsę immunologiczną, kierunek

różnicowania się aktywowanego limfocytu T może być dwojaki: Th1 lub Th2 [31]. Powstające komórki Th1 wytwarzają przede wszystkim IL-2, IFN- $\gamma$  i pomagają w rozwoju odpowiedzi komórkowej: stymulują cytotoksyczność limfocytów oraz aktywują makrofagi. Komórki Th2 wytwarzają interleukiny 4, 5, 10 i 13, które uczestniczą w indukcji odpowiedzi humoralnej. Cytokiny charakterystyczne dla tych dwóch subpopulacji limfocytów działają względem siebie antagonistycznie. Silna aktywacja komórek jednej linii hamuje rozwój drugiej.

Dziewicze limfocyty po przekształceniu się w komórki efektorowe zaczynają się dzielić [31]. Nabywają zdolności do migrowania poza tkanki limfatyczne, gdzie mogą realizować zadania, do których zostały przeznaczone. Po zniszczeniu patogenu 90% limfocytów T wchodzi w fazę śmierci, uruchamiając apoptozę. Komórki, które przeżyły dzięki zwiększonej ekspresji czynnika antyapoptotycznego Bcl-2, stają się komórkami pamięci. Podzielić je można na dwie subpopulacje: komórki efektorowe pamięci T<sub>EM</sub> (T effector-memory) i centralne komórki pamięci T<sub>CM</sub> (T central-memory). Zadanie T<sub>EM</sub> polega na natychmiastowym reagowaniu w miejscu ponownej infekcji, podczas gdy T<sub>CM</sub> zasiedlając tkanki limfatyczne w tym samym czasie szybko dzielą się i różnicują, aby wspomóc komórki efektorowe w tkankach obwodowych. W ten sposób wtórna odpowiedź na dany patogen rozwija się znacznie szybciej i efektywniej.

#### SPOSOBY ZWIĘKSZENIA IMMUNOGENNOŚCI ANTYGENÓW

##### Efekt *dépôt* i ułatwianie pochłaniania antygenu przez APC

Wolny antygen podany do organizmu szybko przedostaje się do krwiobiegu i w znacznej mierze jest degradowany przez proteazy osocza lub enzymy wątroby. Tylko niewielka jego ilość ma szansę trafić razem z APC do węzłów chłonnych i wywołać reakcję układu immunologicznego. Adiuwanty mogą zatrzymać antygen w miejscu podania, hamując jego zbyt szybką eliminację z ustroju i stopniowo go uwalniać, dzięki czemu następuje zwiększenie i wydłużenie czasu jego prezentacji przez APC [22]. Gwarantuje to nie tylko doraźne powstanie antygenowo swoistych komórek, ale i późniejsze, ciągłe utrzymywanie odpowiedniej liczby komórek pamięci, potrzebnych do zwalczania patogenu przy powtórnej infekcji.

##### Związki mineralne

W szczepionkach powszechnie stosuje się dodatek związków glinu – wodorotlenku i hydroksyfosforanu

[42]. Substancje te są nierozpuszczalne, mają strukturę żelową i adsorbują na swojej powierzchni antygen, dzięki czemu jest on wolniej usuwany z organizmu. Użycie takiej zawiesiny powoduje powstanie odpowiedzi głównie typu Th2, przy czym wytwarzane są również przeciwciała IgE, które mogą się przyczyniać do wywołania alergii. Aktywowany jest również układ białek dopełniacza: składnik C3 rozpada się m.in. do fragmentów C3dg i C3d, te zaś wiążąc się z cząsteczką CD21 na limfocytach B, wzmacniają ich aktywację i prowadzą do powstania komórek B pamięci [42].

Ten sam mechanizm działania wykazuje fosforan wapnia, który w badaniach porównawczych ze związkami glinu, był lepiej tolerowany [46]. Zwiększa on dodatkowo wytwarzanie przeciwciał klasy IgG2a, charakterystycznych u myszy dla odpowiedzi Th1 (u ludzi IgG1), nie podnosząc przy tym poziomu IgE. Jego zaletą jest również to, że stanowi naturalny składnik ludzkiego organizmu.

### **Emulsje**

Antygeny można zamykać w emulsjach, czyli mieszaninach oleju i wody z dodatkiem tenzydów - substancji powierzchniowo czynnych, stabilizujących obie fazy [6]. Zależnie od typu, uwalnianie antygeny może się różnić. Emulsje O/W („olej w wodzie”), gdzie fazą ciągłą jest woda a fazą zdyspergowaną olej, zatrzymują antygen białkowy na krótko; z kolei w emulsjach odwrotnego typu (W/O - „woda w oleju”) stopień zatrzymania antygeny jest dużo większy. Emulsje chronią antygeny przed rozkładem enzymatycznym, mogą nawet zwiększać ich immunogenność poprzez zmianę ich ładunku elektrycznego. Ułatwienie wychwytu antygeny przez APC wynika prawdopodobnie z aktywności samego tenzydu zawartego w emulsji. Obecne w nim grupy hydrofilowe i hydrofobowe obniżają napięcie powierzchniowe na granicy faz nie tylko wewnątrz struktury adiuwantu, ale również między kropelkami emulsji a błoną komórkową APC. Krople oleju pochodzące z emulsji znajdowane są również w węzłach chłonnych, gdzie mogą powodować akumulację limfocytów i modyfikować ich funkcje.

Klasycznymi adiuwantami typu W/O są pełny i niepełny adiuwant Freund'a (CFA - complete Freund's adjuvant, IFA - incomplete Freund's adjuvant) [51]. Składają się z oleju mineralnego (Marco 52) i emulgatora (Arlacel A - monooleinian mannitolu), CFA zawiera dodatkowo zabite prątki *Mycobacterium tuberculosis*. CFA i IFA określane są „złotym standardem” w grupie adiuwantów, ponieważ względem nich porównuje się nowe formuły adiuwan-

towe, mimo że same nie znalazły zastosowania w żadnej z komercyjnie dostępnych szczepionek (CFA ze względu na zbyt dużą toksyczność, IFA nadal w badaniach klinicznych – preparaty Montanide ISA).

Obecnie na znaczeniu zyskują emulsje wielokrotne typu W/O/W („woda w oleju w wodzie”), charakteryzujące się mniejszą lepkością niż W/O [67]. Antygen znajduje się wewnątrz wewnętrznej fazy wodnej oraz w zewnętrznej, dzięki czemu uzyskuje się dwuetapowe uwalnianie antygeny. Pierwsza porcja jest dostępna natychmiast po podaniu, druga opóźniona w czasie, służy za dawkę przypominającą, tak jak w przypadku emulsji W/O. Układ W/O/W jest wysoce niestabilny, dlatego bardzo ważny jest dobór właściwego stabilizatora. Zazwyczaj stosuje się wielkocząsteczkowe amfilowe kopolimery blokowe.

Rodzaj oleju użytego w emulsji decyduje o stopniu pobudzenia komórek immunokompetentnych [6]. Oleje mineralne (olej parafinowy) pozostają w miejscu iniekcji znacznie dłużej niż oleje metabolizowane w organizmie (skwalan, olej arachidonowy), działają jednak bardziej drażniąco na tkanki i powodują powstanie większego odczynu zapalnego. Im krótszy łańcuch węglowodorowy w resztach kwasów tłuszczowych, tym lepsze właściwości solubilizujące i większe działanie drażniące.

W emulsjach typu O/W zawartość fazy lipidowej nie przekracza 25%, rozmiar kropli oleju to około 200 nm [67]. Ich działanie adiuwantowe wiąże się z ułatwieniem transportu antygeny do APC oraz z ich aktywacją. Stymulują wytwarzanie przeciwciał, pobudzenie odpowiedzi komórkowej stwierdzono tylko u myszy. Reprezentantami tego rodzaju formuł są MF59 i SAF (syntex adjuvant formulation), oparte na biodegradowalnych olejach skwalenie (MF59) lub skwalenie (SAF) i detergentach: Tween 80 oraz odpowiednio Span 85 lub Pluronic L121 [3]. W celu zwiększenia immunogenności SAF zawiera dodatkowo modyfikowane produkty pochodzenia bakteryjnego. MF59 jest obecnie wykorzystywany w szczepionce przeciw grypie we Włoszech, a testowany klinicznie jako adiuwant w szczepionce przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B, opryszczce czy AIDS [67].

### **Amfilowe kopolimery blokowe**

Związki te należą do substancji powierzchniowo czynnych, często dodawanych do stabilizowania emulsji. Pod względem chemicznym są to glikole polioksyetylenopolioksypropylenowe, otrzymane poprzez polimeryzację tlenku propylenu i tlenku etylenu [87].

Zmieniając proporcje substratów względem siebie zsyntetyzować można kopolimery o różnym ułożeniu bloków polioksyetylenowych (POE) i polioksypropylenowych (POP), wpływając jednocześnie na właściwości fizyko-chemiczne końcowego produktu. Kopolimery o zawartości POE mniejszej niż 10% są nierozpuszczalne w wodzie i dlatego mogą być użyte jako adiuwant. Wartość liczby HLB (hydrophilic/lipophilic balance), informującej o względnym powinowactwie związku do fazy hydrofilowej, jest wówczas mniejsza od 2, czyli osiąga poziom bliski minimum, przypisany substancjom typowo hydrofobowym. Wraz ze wzrostem ilości grup POE, rośnie wielkość HLB i maleje aktywność adiuwantowa [48]. W szczepionkach eksperymentalnych wykorzystuje się kopolimery liniowe, w których reszty hydrofilowe – POE, znajdują się na końcach łańcucha. Masa cząsteczkowa decyduje o przeznaczeniu związku: polimery o masie 3-6 kDa służą jako emulgatory/stabilizatory emulsji, związki cięższe niż 6 kDa tworzą w roztworach micelle, które mogą adsorbować na swojej powierzchni antygeny i dostarczać je do APC [67]. Optymalnie wielkość rdzenia POP powinna wynosić 12-15 kDa [87]. Kopolimery zawierające 5% POE ( $HLB \leq 1$ ) indukują pobudzając zarówno komórki Th1, jak i Th2. Udział POE na poziomie 10% ( $HLB = 1,5-2$ ) przesuwa równowagę w kierunku odpowiedzi typu Th2 [67]. Związki te nie są rozkładane w organizmie, nie wiąże się to jednak z większą toksycznością.

### Mikrosfery

Bardzo dobry efekt *dépôt* uzyskuje się stosując polimery poliestrowe składające się z kwasu glikolowego i mlekowego (homo- i kopolimery) [43]. Tworzą one kuliste, monolityczne cząsteczki o rozmiarach 1-50  $\mu\text{m}$ , wewnątrz których można rozpuścić lub zawiesić antygen. Polimery te od dawna są wykorzystywane do wyrobu wchłaniających nici chirurgicznych. Tempo rozkładu polimeru reguluje się dobierając odpowiednie proporcje substratów. Mikrosfery można zaprojektować tak, by rozpadały się po kilku tygodniach, miesiącach a nawet po roku. Wprowadzone do organizmu wchłaniane są przez APC, jeśli ich rozmiar nie przekracza 10  $\mu\text{m}$  średnicy [28]. Antygen jest uwalniany wówczas wewnątrz komórki. Mikrocząstki o średnicy powyżej 10  $\mu\text{m}$  hydrolizują w tkankach a antygen przechodzi do płynu zewnątrzkomórkowego. Stosując mieszaninę mikrosfer o różnej wielkości i czasie połowicznego rozpadu można uzyskać uwalnianie pulsacyjne, dzięki czemu powtórne szczepienie w celu utrzymania ochronnego poziomu przeciwciał nie byłoby konieczne. Jedna szczepionka zawierałaby więc od razu dawki przypo-

minające. Mikrosfery można wykorzystać jako nośnik antygenów podanych doustnie [20].

### Liposomy

Liposomy to pęcherzyki zbudowane z podwójnej (czasem wielokrotnej) błony lipidowej, w skład której wchodzi fosfolipidy, glikolipidy oraz cholesterol [60]. Antygeny można wprowadzać do ich wewnętrznej fazy wodnej, adsorbować na powierzchni błony lub bezpośrednio w niej osadzać. Podobnie do mikrosfer mogą stanowić rezerwuuar antygeny z kontrolowanym uwalnianiem lub służyć za system nośnikowy do APC [41]. Liczba warstw lipidowych decyduje m.in. o dostępności antygeny. Właściwości adiuwantowe liposomów zależą ponadto od ładunku powierzchniowego, składu chemicznego i metody sporządzania. Problemem jest trwałość i stabilność liposomów. Są one jednak bardzo dobrze tolerowane, pobudzają odporność humoralną i komórkową, aczkolwiek w celu podniesienia immunogenności całej formuły, często oprócz antygeny, wprowadza się do nich substancje oddziałujące bezpośrednio na komórki układu immunologicznego. Preparat IRIV - immunostymulujące rekonstruowane wirusosomy grypy, zawiera liposomy zbudowane z fosfatydylocholino, fosfatydyloetanoloaminy i cholanu sodu oraz zintegrowane z błoną lipidową glikoproteiny wirusa grypy: hemaglutyninę oraz neuraminidazę [38]. Pierwsza odpowiada za wiązanie liposomu z APC i rozpoczęcie endocytozy; druga, przy braku efektywnej fagocytozy, umożliwia oderwanie się od receptora zawierającego kwas neuraminowy – dzięki zachowanej aktywności enzymatycznej i połączenie z inną komórką. IRIV wykorzystano już w szczepionce przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu A (HAV), zarejestrowanej w Szwajcarii [39].

Stosunkowo nowym odkryciem są archaeosomy – liposomy otrzymane z lipidów wyizolowanych z *Archaeobacteria*, charakteryzujących się obecnością długich, nasyconych i rozgałęzionych łańcuchów węglowodorowych o liczbie atomów węgla 20, 25, 40, połączonych z glicerolem wiązaniem eterowym [70]. Te odmienne właściwości chemiczne od standardowych składników liposomów powodują, że archaeosomy mają lepszą stabilność i trwałość, ich pochłanianie przez fagocyty jest większe, indukują odpowiedź typu Th1 i Th2 oraz powstanie komórek pamięci. Nie wymagają dodatkowych adiuwantów, by zwiększyć immunogenność zawartego w formule antygeny.

### **Aktywacja APC i innych komórek immunokompetentnych**

Przedłużona obecność antygeny w organizmie w postaci dépôt czy też ukierunkowanie go do APC zapewnia powstanie tylko „sygnału 1”. Prezentacja peptydów na cząsteczkach MHC bez dodatkowych sygnałów wzmacniających aktywację limfocytów, powoduje ich przejście w stan anergii i wytworzenie tolerancji na antygen. „Sygnał 2” jest więc niezbędny. Ekspresja na APC cząsteczek kostymulujących i wydzielanie cytokin prozapalnych zachodzi tylko podczas ich różnicowania się do postaci dojrzałej po otrzymaniu odpowiednich bodźców („sygnał 0”), działających na receptory odporności nieswoistej, np. PRR. Adiuwanty mogą swoją strukturą odpowiadać ligandom tych receptorów lub same stanowić PAMP lub „sygnały zagrożenia” [80]. Podane razem z antygenem wywołują niezależnie od niego odczyn zapalny i aktywują APC. Powstająca swoista odpowiedź na główny składnik szczepionki jest właściwie działaniem ubocznym procesów zapoczątkowanych przez adiuwant.

### **Dipeptyd muramylowy i jego pochodne**

Poszukując alternatywnych dla CFA, mniej toksycznych adiuwantów, wyizolowano ze ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, dipeptyd muramylowy (MDP – N-acetylmuramylo-L-alanylo-D-izoglutamina) [42]. Jego działanie immunostymulujące polega na mobilizacji APC, ich aktywacji połączonej z wydzielaniem cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , GM-CSF i pobudzeniu fagocytozy. Zwiększa proliferację limfocytów T, indukowaną mitogenami i sam jest mitogenem dla limfocytów B. Wskutek zbyt wysokiej pirogenności preparatu dokonano kilku modyfikacji strukturalnych i otrzymano bardziej bezpieczne pochodne: GMDP – dołączony jeden cukier, treonylo-MDP – alanina podstawiona treoniną, MTP-PE – tripeptydowe (dodatkowa alanina) połączenie z fosfatydyloetanoloaminą, nadające cząsteczce amfifilowy charakter [91]. MDP podany w roztworze soli fizjologicznej wywołuje głównie odpowiedź humoralną; zawarty w emulsji W/O pobudza dodatkowo odpowiedź komórkową. Treonylo-MDP jest stosowany w SAF [63].

### **Monofosforylowany lipid A**

Zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi często prowadzą do wstrząsu septycznego z powodu obecnych w krwiobiegu lipopolisacharydów – składników ścian komórkowych tych bakterii [62]. Związki te należą do najsilniejszych aktywatorów procesu zapalnego. Lipopolisacharyd (LPS) zawiera w swoim

składzie łańcuch polisacharydowy O-swoisty, rdzeń oligosacharydowy oraz lipid A. Ten ostatni fragment (dwucukier zbudowany z dwóch reszt glukozaminy, z dwoma grupami fosforanowymi i pięcioma lub sześcioma resztami kwasów tłuszczowych o długości 12-16 atomów węgla, podłączonymi do cząsteczek cukrów) odpowiada za tak masywne pobudzenie komórek układu odpornościowego. Wykazano, że LPS jest agonistą TLR4 [89]. Nawet śladowe ilości lipopolisacharydu wywołują u ludzi gorączkę, dlatego też użycie go jako adiuwantu nie jest możliwe. Wolny lipid A jest tak samo aktywny jak LPS, ale poddany łagodnej hydrolizie traci jedną grupę fosforanową, dzięki czemu zmniejsza się jego toksyczność. Przeprowadzając bardziej selektywną hydrolizę monofosforylowanego lipidu A z *Salmonella minnesota* R595, polegającą na odcięciu jednego łańcucha kwasu tłuszczowego, otrzymano nowy adiuwant – MPL<sup>TM</sup> [71]. Związek ten zachowuje wiele cech wyjściowej cząsteczki, działa jednak gorączkotwórczo w stopniu o wiele mniejszym. Jego aktywność adiuwantowa wynika ze zdolności do pobudzania APC do efektywniejszej prezentacji antygeny – wzrost ekspresji cząsteczek kostymulujących [25]. Zaobserwowano, że pod wpływem MPL<sup>TM</sup> komórki dendrytyczne przemieszczają się w obrębie śledziony do strefy limfocytów T. Ponadto, DC traktowane tym adiuwantem wydzielają większe ilości IFN- $\gamma$ . Limfocyty T, którym prezentowany jest swoisty antygen, w obecności MPL<sup>TM</sup> eksponują na błonie komórkowej więcej cząsteczek CD40L – ligandów białek CD40, przekazujących komórkom dendrytycznym sygnał do dojrzewania [49]. Wykazano, że jednoczesne użycie antygeny zamkniętego w liposomie i monofosforylowanego lipidu A uruchamia swoiste mechanizmy cytotoksyczne [94]. MPL<sup>TM</sup> jest też skutecznym adiuwantem podczas immunizacji donosowej [9]. Pobudza syntezę przeciwciał IgA w obrębie błon śluzowych, nie tylko w górnych drogach oddechowych; w surowicy natomiast obserwuje się podwyższony poziom IgG2a. W badaniach klinicznych MPL<sup>TM</sup> razem ze związkami glinu (formuła SBAS4) szybciej indukował powstanie ochronnego poziomu przeciwciał anti-HBs w porównaniu do komercyjnie dostępnych szczepionek przeciw HBV [4]. Adiuwant Detox-B<sup>TM</sup> zawiera monofosforylowany lipid A i szkielet ściany komórkowej *Mycobacterium phlei* (CWS) i jest składnikiem szczepionki terapeutycznej przeciwko czerniakowi Melacine<sup>TM</sup> [63].

### **CpG i syntetyczne immunostymulujące oligodeoksynukleotydy**

DNA pochodzenia bakteryjnego jest rozpoznawane i wiązane przez TLR9 wskutek zawartych w nim

niemetylowanych sekwencji dinukleotydów cytozyny-guaniny, umieszczonych w odpowiednim sąsiedztwie dwóch zasad purynowych od 5' końca i dwóch pirymidynowych od końca 3' [54]. Częstość występowania takich motywów CpG u bakterii wynosi 1/16 par zasad, podczas gdy u kręgowców 1/64 i u nich zazwyczaj cytozyna ma przyłączoną grupę metylową. W wyniku związania CpG dochodzi do poliklonalnej aktywacji i proliferacji limfocytów B, niezależnej od pomocy limfocytów T, połączonej z wytwarzaniem przeciwciał i czynników antyapoptotycznych. APC reagują na bakteryjne DNA lub syntetyczne oligodeoksynukleotydy z motywami CpG wzmożonym wydzielaniem IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , GM-CSF i chemokin oraz wzrasta liczba cząsteczek kostymulujących i MHC klasy II na ich powierzchni [63]. Uruchomiona zostaje także odpowiedź typu Th1, która obejmuje również cytotoksyczne komórki NK. Ten rodzaj odpowiedzi można wzbudzić po podaniu CpG noworodkom, u których reakcje obronne od początku są zdominowane przez komórki Th2, dzięki czemu szybciej powstają mechanizmy odporności komórkowej. W przypadku schorzeń przebiegających z nadmierną aktywacją limfocytów Th2 (choroba alergiczna), motywy CpG mogą przesunąć punkt ciężkości reakcji immunologicznych w kierunku odpowiedzi typu Th1. W konsekwencji zmniejsza się synteza przeciwciał IgE, odpowiedzialnych za rozwój choroby, a wzrasta wytwarzanie przeciwciał IgG2a [29]. Mechanizm ten może mieć zastosowanie w szczepionkach terapeutycznych, a także w leczeniu nowotworów [54].

Syntetyczne oligodeoksynukleotydy konstruuje się najczęściej wprowadzając wiązania fosforotioestrowe między nukleotydami, chroniąc je w ten sposób przed atakami nukleaz. Zwiększenie aktywności można osiągnąć również przez adsorbowanie CpG na związkach glinu [85].

### QS21 i inne saponiny

Saponiny Quil A wyizolowane z kory kwilaji (*Quillaja saponaria*), drzewa rosnącego w Ameryce Południowej, od dawna są stosowane w szczepionkach weterynaryjnych [69]. Pod względem chemicznym są to glikozydy triterpenoidowe, zdolne do wiązania się z cholesterolem. Działają hemolitycznie, wbudowują się w błony komórkowe i tworzą pory. Dokładny mechanizm ich działania adiuwantowego nie został jeszcze poznany. Umożliwiają najprawdopodobniej wnikięcie antygeny do cytosolu i jego prezentację przez cząsteczki MHC klasy I, indukując w ten sposób odpowiedź komórkową. Oczyszczona frakcja saponinowa QS21 wykazuje największą aktywność skorelowaną z obniżoną toksycznością [23]. Pobudza

m.in. komórki cytotoksyczne CD8<sup>+</sup>, indukuje syntezę przeciwciał IgG2a, a także IgG1. W połączeniu z MPL<sup>TM</sup> oddziaływanie na komórki Th1 jest bardziej zaznaczone [64]. QS21 silnie stymuluje wytwarzanie IFN- $\gamma$  w odpowiedzi na antygen, ułatwiając tym samym uwalnianie IL-12 przez MPL<sup>TM</sup> [65]. Adiuwant SBAS2, zawierający oba składniki, testowany jest w badaniach klinicznych nad szczepionką przeciw-malaryczną, w szczepionce przeciw HIV. QS21 (Stimulon<sup>TM</sup>) wykorzystywano również w wielu badaniach nad szczepionkami przeciwnowotworowymi [63].

Dażąc do zmniejszenia toksyczności preparatów saponinowych, opracowano nowy system nośnikowy – immunostymulujące kompleksy – ISCOM [23]. Saponiny Quil A wbudowano do lipidowych cząsteczek, składających się z cholesterolu i fosfolipidów (fosfatydylocholina lub fosfatydyloetanolamina). Powstałe struktury wyglądają jak sferyczna klatka, pusta w środku, ujemnie naładowana, mająca około 40 nm średnicy. Kompleksy ISCOM ułatwiają wychwyt antygeny oraz jego prezentację w narządach limfatycznych [81]. Indukują one syntezę i uwalnianie IL-1 przez APC, zwiększając też u nich liczbę cząsteczek MHC klasy II na powierzchni błony komórkowej w sposób zależny od dawki antygeny [23]. Antygeny są również prezentowane krzyżowo na cząsteczkach MHC klasy I [90]. DC traktowane immunostymulującymi kompleksami wytwarzają IFN- $\gamma$  [81]. Najważniejszą cytokiną w adiuwantowej aktywności ISCOM wydaje się IL-12, która świadczy o pobudzeniu odpowiedzi Th1 [82]. Próbuje się to wykorzystać w badaniach nad szczepionką przeciw grypie i HCV [72, 78].

Podobną aktywność do Quil A wykazują saponiny odkryte w korzeniach krzyżownicy wirginijskiej (*Polygala senega*). Frakcje PS-1 i PS-2, podane razem z antygenem, stymulują wytwarzanie przeciwciał IgG2a, a profil wydzielanych cytokin odpowiada odpowiedzi Th1. W porównaniu do Quil A są jednak mniej toksyczne [32].

### Enterotoksyny

Toksyna cholery (CT), pochodząca z przecinkowca cholery (*Vibrio cholerae*) i ciepłochwiejna enterotoksyna z *Escherichia coli* (LT) są bardzo silnymi immunogenami po podaniu na błony śluzowe [92]. Pod względem budowy są homologiczne w 80%, składają się z pojedynczej jednostki A (CTA/LTA) i pięciu jednakowych monomerów tworzących podjednostkę B (CTB/LTB). Toksyczność, związana z przeżyciem pokarmowym, jest wynikiem enzymatycznej aktywności podjednostki A, która po odszczepieniu od



podjednostki B, nieodwracalnie aktywuje cyklazę adenylanową, prowadząc do wzrostu poziomu komórkowego cAMP i ucieczki z komórki jonów chlorkowych. Towarzyszy temu przejście wody do światła jelita, czego następstwem jest masywna biegunka. Podjednostka B odpowiada za wiązanie toksyny i jej transport na zasadzie endocytozy do wnętrza komórki. Toksyna cholery wiąże przede wszystkim gangliozyd GM1, LT dodatkowo inne glikosfingolipidy lub glikoproteiny zawierające galaktozę.

Aktywność adiuwantowa toksyn polega na pobudzeniu syntezy wydzielniczych przeciwciał IgA swoistych wobec jednocześnie podanego antygeny w obrębie błon śluzowych [77]. Odporność związana ze śluzówkami ma ogromne znaczenie, ponieważ to one stanowią wrota zakażenia dla większości patogenów. Wykazano, że toksyny CT i LT oddziałują na APC, zwiększając u nich ekspresję białek MHC klasy II, cząsteczek kostymulujących i receptorów dla chemokin (CCR7) [35, 66]. Indukowane jest również u nich wytwarzanie IL-1, które uruchamia odczyn zapalny [19]. Przyjmuje się, że LT pobudza mieszany typ odpowiedzi Th1/Th2 [86], podczas gdy CT według jednych badaczy aktywuje tylko komórki Th2 [59], według innych obie populacje [30]. Za działanie immunomodulujące toksyn jest odpowiedzialna podjednostka B [17]. Działanie adiuwantowe rekombinowanych podjednostek B jest jednak słabsze w porównaniu z całą toksyną [45]. CTB i LTB podane doustnie razem z wolnym antygenem właściwie nie zwiększają jego immunogenności; sprawdzają się natomiast jako adiuwanty, jeśli zostaną wprowadzone na błonę śluzową jamy nosowej [44].

Dokonując punktowej mutacji w obrębie podjednostki A, można zmniejszyć lub całkiem zlikwidować toksyczność CT i LT [77]. Podstawienie w pozycji 63 seryny lizyną powoduje powstanie mutantów (LTK63/CTK63), które są nieaktywne enzymatycznie i w związku z tym nietoksyczne. LTK63 zachowuje aktywność adiuwantową, silniejszą od LTB, zarówno po podaniu doustnym jak i donosowym [27]. CTK63 jest natomiast słabym adiuwantem [26].

Enterotoksyny umożliwiają również immunizację poprzez skórę [37]. Umieszczając na nieuszkodzonej skórze plaster nasączony roztworem antygeny i CT lub LT indukuje się odpowiedź humoralną (głównie typu Th2) wyrażoną przeciwciałami IgG i IgA w surowicy i błonach śluzowych wobec obu składników szczepionki [37].

### *Cytokiny i inne immunomodulatory*

Użycie cytokin jako adiuwantów wydaje się najprostszym rozwiązaniem. Zamiast stymulować ich wytwarzanie odpowiednimi czynnikami, podaje się je bezpośrednio razem z antygenem. Możliwe jest w ten sposób oddziaływanie na proces przetwarzania antygeny i aktywacji APC na poziomie jednej i tej samej komórki. Problematyczne może być dobranie odpowiedniej dawki, ponieważ za mała nie będzie miała żadnego wpływu, przedawkowanie natomiast może doprowadzić do sytuacji zupełnie odmiennej niż oczekiwana, np. autoagresja (IL-2) lub immunosupresja (IFN- $\gamma$ ) [47]. Nie zawsze też użycie cytokin związanych z jednym typem odpowiedzi kieruje reakcje immunologiczne w tym właśnie kierunku [47].

Dzięki zastosowaniu czynników wzrostowych dla komórek dendrytycznych: GM-CSF i liganda dla Ftl3 (Ftl3-L), ich populacja może zostać wzbogacona ilościowo i jakościowo [74]. GM-CSF preferencyjnie zwiększa liczbę DC pochodzenia mieloidalnego, które po aktywacji stymulują limfocyty T do wydzielania przede wszystkim cytokin Th2 (IL-4 i IL-10) oraz pobudzają wytwarzanie przeciwciał IgG1 [75]. Ftl3-L podnosi liczbę komórek zarówno mieloidalnych jak i limfoidalnych, ale profil indukowanych cytokin i przeciwciał w reakcji na podany antygen odpowiada typowi Th1. Ftl3-L ponadto przełamuje tolerancję na antygeny podane systemowo [76]. Bez adiuwantu komórki swoiście rozpoznające wstrzyknięty antygen wchodzą w stan anergii. Najprawdopodobniej Ftl3-L wpływa na przekazywanie sygnału kostymulującego przez DC [76].

Chemokiny, pełniąc funkcje czynników chemotaktycznych, przyciągają komórki układu immunologicznego do węzłów chłonnych lub miejsc objętych procesem zapalnym. Jednoczesne więc użycie antygeny z chemokiną może ułatwić jego rozpoznanie przez komórki immunokompetentne. Dość dobrze scharakteryzowana jest aktywność adiuwantowa chemokin RANTES i limfotaktyny przy podaniu dośluzówkowym [16]. Pierwsza nasila reakcje Th1, druga indukuje mieszany typ odpowiedzi. Obie stymulują jednak wydzielnicze przeciwciała IgA.

Immunizowanie donosowe, aplikując antygen razem z IL-1, IL-12, IL-18 i GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów), prowadzi do powstania układowych i śluzówkowych reakcji cytotoksycznych, charakteryzujących się wzmożonym wydzielaniem IFN- $\gamma$ , prezentacją białek MHC klasy II i cząsteczek kostymulujących [18, 84]. IL-1 $\alpha/\beta$  jako adiuwant śluzówkowy wspomaga syntezę

przeciwciał głównie IgG1 i wydzielniczych IgA [16]. Fragment IL-1 $\beta$ , składający się z 9 aminokwasów (pozycje 163-171), wykazuje podobną aktywność immunostymulującą i adiuwantową, aczkolwiek pozbawiony jest toksycznych działań wyjściowej cząsteczki [15].

Aktywność przeciwwirusowa IFN- $\alpha/\beta$  skłoniła badaczy do sprawdzenia, czy dodanie ich do szczepionki przeciw grypowej poprawi jej ochronne właściwości. Interferony stymulowały bardzo wytwarzanie przeciwciał IgG2a, zapewniając pełną ochronę przed infekcją wirusem. Podane donosowo zwiększały również ilość IgA [73].

Zamknięcie cytokin w liposomach pozwala na zmniejszenie dawki antygeny a ponadto zwiększa działanie cytokin, wydłużając czas ich eliminacji i ułatwiając ich przechwycenie przez APC [8, 88]. IL-2 zawarta w liposomach razem z białkami powierzchniowymi wirusa grypy podnosi poziom ochronnych przeciwciał u osób w podeszłym wieku, u których skuteczność standardowych szczepień nie przekracza 50% [12]. Na tej samej zasadzie opiera się stosowanie cytokin adsorbowanych na związkach glinu [50].

Synergistycznie z IL-2 działa GM-CSF, który jest czynnikiem wzrostowym komórek dendrytycznych i makrofagów [7]. Oddziałuje on m.in. na proces prezentacji antygeny, aktywując APC i pobudzając je do migracji do węzłów chłonnych. Porównany z innymi cytokinami stosowanymi pojedynczo (IL-2, IL-4, IL-7, IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) GM-CSF okazał się najskuteczniejszym adiuwantem w indukcji odpowiedzi humoralnej i komórkowej [2]. Razem z IL-12 i TNF- $\alpha$  nasila aktywność komórek cytotoksycznych CD8<sup>+</sup>, hamując wydzielanie IL-4 i IL-10 oraz stymulując wytwarzanie IFN- $\gamma$  [1].

W badaniach dotyczących wzbudzenia swoistej odpowiedzi typu Th1 modelową cytokiną jest IL-12. Wykazano, że IL-12 skutecznie stymuluje reakcje cytotoksyczne w stosunku do prątków gruźlicy [34] i pierwotniaków z rodzaju *Leishmania* [52]. Podana noworodkom razem z antygenem przełamuje dominację odpowiedzi Th2, pobudza syntezę przeciwciał IgG2a, aktywując jednocześnie limfocyty B pamięci [5].

W celu poprawy immunogenności szczepionek próbuje się eksperymentalnie wykorzystać cząsteczki kostymulujące. Podanie dożylnie zabitych przez ogrzewanie bakterii *Listeria monocytogenes* i przeciwciała anty-CD40, o aktywności naturalnego liganda tego białka - CD40L, pobudza odporność komórkową i

zapewnia ochronę przed zakażeniem śmiertelną dawką bakterii [79]. Przeciwciała to, zamknięte razem z antygenem w liposomie, indukuje również mechanizmy cytotoksyczne po podaniu na błonę śluzową jamy nosowej [68].

Inną strategią jest blokowanie sygnałów hamujących aktywację, przekazywanych do wnętrza limfocyty po połączeniu się CD80/86 z CTLA-4. Przeciwciała anty-CTLA-4 (bez aktywności wewnętrznej) zapobiega stłumieniu swoistych antygenowo reakcji, co zwykle się odbywa w warunkach niedostatecznej ekspresji cząsteczek CD80/86 na powierzchni APC [57].

Przetrawanie aktywowanych podczas szczepienia limfocytów gwarantuje utrzymanie odporności. Większość uczulonych komórek ginie jednak wskutek mechanizmów apoptotycznych, zapoczątkowanych przez interakcje między cząsteczkami Fas i Fas-L. Zwiększenie przeżycia swoistych antygenowo limfocytów osiągnąć można dzięki zaangażowaniu cząsteczek OX40 [61]. Białka te obecne są głównie na aktywowanych limfocytach CD4<sup>+</sup> (wskutek oddziaływań CD28-CD80/86) a ich ligand występuje na powierzchni APC, które zostały pobudzone przez CD40L [40]. Agonistyczne przeciwciała anty-OX40, użyte w ciągu 24-48 godzin po immunizacji antygenem, chroni przed rozwojem apoptozy, zwiększa produkcję przeciwciał i pobudza rozwój komórek pamięci [33].

## PODSUMOWANIE

W miarę poznawania mechanizmów odpowiedzialnych za rozpoznanie antygeny i aktywację komórek zdolnych do usunięcia zagrożenia, stopień wysublimowania technik służących poprawieniu jakości szczepionek wzrasta. Badania są prowadzone nie tylko nad adiuwantami, pracuje się również nad postacią i rodzajem antygeny, zawartego w kompozycji szczepionki. Poszukiwane są m.in. epitopy w obrębie antygeny, zapewniające ochronę przed infekcją i chorobą. Projektuje się dla nich nośnikowe peptydy, które wiążą się ze strukturami obecnymi na większości cząsteczek MHC, po to, by zwiększyć liczbę swoistych komórek rozpoznających wybrany epitop [14]. Nie bez znaczenia jest także procedura wykonania samego szczepienia (iniekcja podskórna/domięśniowa, podanie doustne/donosowe/transdermalne, jedna dawka uczulająca/zmienna ilość dawek przypominających). Wstrzyknięcie domięśniowe szczepionki właściwie nie prowadzi do wytworzenia ochronnych przeciwciał IgA w obrębie błon śluzowych.

Klasyczne adiuwanty, których działanie opiera się na efekcie *dépôt* lub ułatwionym transporcie antygeny do

APC, prawdopodobnie zostaną w przyszłości zastąpione adiuwantami nowej generacji, o właściwościach immunomodulujących. Próbuje się otrzymać szczepionki, które indukują odpowiedź immunologiczną w pełni kontrolowaną, możliwą do sterowania. Dąży się jednocześnie do stworzenia szczepionek nietoksycznych, nieinwazyjnych, niewymagających specjalnych

warunków przechowywania, stabilnych i prostych w produkcji. Szansą wydają się techniki inżynierii genetycznej. Coraz częściej prowadzone są badania, w których korzysta się z „nagiego” plazmidowego DNA, kodującego dany antygen i/lub czynniki immunomodulujące w postaci białek regulatorowych, takich jak cytokiny i cząsteczki kostymulujące [58].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Ahlers J.D., Belyakov I.M., Matsui S., Berzofsky J.A.: Mechanisms of cytokine synergy essential for vaccine protection against viral challenge. *Int. Immunol.* 2001, 13, 897-908.
- [2] Ahlers J.D., Dunlop N., Alling D.W., Nara P.L., Berzofsky J.A.: Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 1997, 158, 3947-3958.
- [3] Allison A.C., Byars N.E.: Syntex adjuvant formulation. *Res. Immunol.* 1992, 143, 519-525.
- [4] Ambrosch F., Wiedermann G., Kundi M., Leroux-Roels G., Desombere I., Garcon N., Thiriart C., Slaoui M., Thoelen S.: A hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine* 2000, 18, 2095-2101.
- [5] Arulanandam B.P., Van Cleave V.H., Metzger D.W.: IL-12 is a potent neonatal vaccine adjuvant. *Eur. J. Immunol.* 1999, 29, 256-264.
- [6] Aucouturier J., Dupuis L., Ganne V.: Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001, 19, 2666-2672.
- [7] Babai I., Samira S., Barenholz Y., Zakay-Rones Z., Kedar E.: A novel influenza subunit vaccine composed of liposome-encapsulated haemagglutinin/neuraminidase and IL-2 or GM-CSF. I. Vaccine characterization and efficacy studies in mice. *Vaccine* 1999, 17, 1223-1238.
- [8] Baca-Estrada M.E., Foldvari M., Snider M., Van Drunen Littel-Van Den Hurk S., Babiuk L.A.: Effect of IL-4 and IL-12 liposomal formulations on the induction of immune response to bovine herpesvirus type-1 glycoprotein D. *Vaccine* 1997, 15, 1753-1760.
- [9] Baldrige J.R., Yorgensen Y., Ward J.R., Ulrich J.T.: Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine* 2000, 18, 2416-2425.
- [10] Banchereau J., Steinman R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392, 245-252.
- [11] Belyakov I.M., Ahlers J.D., Clements J.D., Strober W., Berzofsky J.A.: Interplay of cytokines and adjuvants in the regulation of mucosal and systemic HIV-specific CTL. *J. Immunol.* 2000, 165, 6454-6462.
- [12] Ben-Yehuda A., Joseph A., Barenholz Y., Zeira E., Even-Chen S., Louria-Hayon I., Babai I., Zakay-Rones Z., Greenbaum E., Galprin I., Gluck R., Zurbriggen R., Kedar E.: Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. *Vaccine* 2003, 21, 3169-3178.
- [13] Bhardwaj N.: Processing and presentation of antigens by dendritic cells: implications for vaccines. *Trends Mol. Med.* 2001, 7, 388-394.
- [14] Bona C.A., Casares S., Brumeau T.D.: Towards development of T-cell vaccines. *Immunol. Today.* 1998, 19, 126-133.
- [15] Boraschi D., Tagliabue A.: Interleukin-1 and interleukin-1 fragments as vaccine adjuvants. *Methods* 1999, 19, 108-113.
- [16] Boyaka P.N., McGhee J.R.: Cytokines as adjuvants for the induction of mucosal immunity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001, 51, 71-79.
- [17] Boyaka P.N., Ohmura M., Fujihashi K., Koga T., Yamamoto M., Kwon M.N., Takeda Y., Jackson R.J., Kiyono H., Yuki Y., McGhee J.R.: Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 2003, 170, 454-462.
- [18] Bradney C.P., Sempowski G.D., Liao H.X., Haynes B.F., Staats H.F.: Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization. *J. Virol.* 2002, 76, 517-524.
- [19] Bromander A., Holmgren J., Lycke N.: Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. *J. Immunol.* 1991, 146, 2908-2914.
- [20] Challacombe S.J., Rahman D., Jeffery H., Davis S.S., O'Hagan D.T.: Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen. *Immunology* 1992, 76, 164-168.
- [21] Cleland J.L., Lim A., Daugherty A., Barron L., Desjardin N., Duenas E.T., Eastman D.J., Vennari J.C., Wrin T., Berman P., Murthy K.K., Powell M.F.: Development of a single-shot subunit vaccine for HIV-1. 5. programmable in vivo autoboot and long lasting neutralizing response. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87, 1489-1495.
- [22] Cox J.C., Coulter A.R.: Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997, 15, 248-256.
- [23] Cox J.C., Sjolander A., Barr I.G.: ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 247-271.
- [24] Cutler C.W., Jotwani R., Pulendran B.: Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? *Infect. Immun.* 2001, 69, 4703-4708.
- [25] De Becker G., Moulin V., Pajak B., Bruck C., Francotte M., Thiriart C., Urbain J., Moser M.: The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 2000, 12, 807-815.
- [26] Douce G., Fontana M., Pizzi M., Rappuoli R., Dougan G.: Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1997, 65, 2821-2828.
- [27] Douce G., Giuliani M.M., Giannelli V., Pizzi M.G., Rappuoli R., Dougan G.: Mucosal immunogenicity of genetically detoxified derivatives of heat labile toxin from *Escherichia coli*. *Vaccine* 1998, 16, 1065-1073.
- [28] Eldridge J.H., Staas J.K., Meulbroek J.A., McGhee J.R., Tice T.R., Gilley R.M.: Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol. Immunol.* 1991, 28, 287-294.
- [29] Erb K.J., Wohlleben G.: Novel vaccines protecting against the development of allergic disorders: a double-edged sword? *Curr. Opin. Immunol.* 2002, 14, 633-643.
- [30] Eriksson K., Fredriksson M., Nordstrom I., Holmgren J.: Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect. Immun.* 2003, 71, 1740-7.
- [31] Esser M.T., Marchese R.D., Kierstead L.S., Tussey L.G., Wang F., Chirmule N., Washabaugh M.W.: Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 2003, 21, 419-430.
- [32] Estrada A., Katselis G.S., Laarveld B., Barl B.: Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2000, 23, 27-43.
- [33] Evans D.E., Prell R.A., Thalhoffer C.J., Hurwitz A.A., Weinberg A.D.: Engagement of OX40 enhances antigen-specific CD4(+) T cell mobilization/memory development and humoral immunity: comparison of alphaOX40 with alphaCTLA-4. *J. Immunol.* 2001, 167, 6804-6811.

- [34] Freidag B.L., Melton G.B., Collins F., Klinman D.M., Cheever A., Stobie L., Suen W., Seder R.A.: CpG oligodeoxynucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in mice challenged with *M. tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2000, 68, 2948-2953.
- [35] Gagliardi M.C., Sallusto F., Marinaro M., Langenkamp A., Lanzavecchia A., De Magistris M.T.: Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 2000, 30, 2394-2403.
- [36] Gallucci S., Matzinger P.: Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 2001, 13, 114-119.
- [37] Glenn G.M., Scharton-Kersten T., Vassell R., Matyas G.R., Alving C.R.: Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. *Infect. Immun.* 1999, 67, 1100-1106.
- [38] Gluck R.: Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIVs). *Vaccine* 1999, 17, 1782-1787.
- [39] Gluck R., Walti E.: Biophysical validation of Epaxal Berna, a hepatitis A vaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV). *Dev. Biol. (Basel)* 2000, 103, 189-197.
- [40] Gramaglia I., Weinberg A.D., Lemon M., Croft M.: Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J. Immunol.* 1998, 161, 6510-6517.
- [41] Green S., Fortier A., Dijkstra J., Madsen J., Swartz G., Einck L., Gubish E., Nacy C.: Liposomal vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 383, 83-92.
- [42] Gupta R.K., Relyveld E.H., Lindblad E.B., Bizzini B., Ben-Efraim S., Gupta C.K.: Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 1993, 11, 293-306.
- [43] Gupta R.K., Singh M., O'Hagan D.T.: Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 225-246.
- [44] Haan L., Verweij W.R., Holtrop M., Brands R., Van Scharrenburg G.J., Palache A.M., Agsteribbe E., Wilschut J.: Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine* 2001, 19, 2898-2907.
- [45] Harandi A.M., Sanchez J., Eriksson K., Holmgren J.: Recent developments in mucosal immunomodulatory adjuvants. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2003, 4, 156-161.
- [46] He Q., Mitchell A.R., Johnson S.L., Wagner-Bartak C., Morcol T., Bell S.J.: Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000, 7, 899-903.
- [47] Hughes H.P.: Cytokine adjuvants: lessons from the past—guidelines for the future? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 63, 131-138.
- [48] Hunter R., Strickland F., Kezdy F.: The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile-lipophile balance. *J. Immunol.* 1981, 127, 1244-1250.
- [49] Ismaili J., Rennesson J., Aksoy E., Vekemans J., Vincart B., Amraoui Z., Van Laethem F., Goldman M., Dubois P.M.: Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J. Immunol.* 2002, 168, 926-932.
- [50] Jankovic D., Caspar P., Zweig M., Garcia-Moll M., Showalter S.D., Vogel F.R., Sher A.: Adsorption to aluminum hydroxide promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for antibody as well as type 1 cytokine responses to HIV-1 gp120. *J. Immunol.* 1997, 159, 2409-2417.
- [51] Jensen F.C., Savary J.R., Diveley J.P., Chang J.C.: Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 173-186.
- [52] Kenney R.T., Sacks D.L., Sypek J.P., Vilela L., Gam A.A., Evans-Davis K.: Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 1999, 163, 4481-4488.
- [53] Kensil C.R., Patel U., Lennick M., Marciani D.: Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* 1991, 146, 431-437.
- [54] Krieg A.M.: The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12, 35-43.
- [55] Krummel M.F., Allison J.P.: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 1995, 182, 459-465.
- [56] Larsson M., Fonteneau J.F., Bhardwaj N.: Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 2001, 22, 141-148.
- [57] Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P.: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996, 271, 1734-1736.
- [58] Leitner W.W., Ying H., Restifo N.P.: DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 1999, 18, 765-777.
- [59] Marinaro M., Staats H.F., Hiroi T., Jackson R.J., Coste M., Boyaka P.N., Okahashi N., Yamamoto M., Kiyono H., Bluethmann H.: Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4. *J. Immunol.* 1995, 155, 4621-4629.
- [60] Maurer N., Fenske D.B., Cullis P.R.: Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001, 1, 923-947.
- [61] Maxwell J.R., Weinberg A., Prell R.A., Vella A.T.: Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J. Immunol.* 2000, 164, 107-112.
- [62] Mayeux P.R.: Pathobiology of lipopolysaccharide. *J. Toxicol. Environ. Health* 1997, 51, 415-435.
- [63] McCluskie M.J., Weeratna R.D.: Novel adjuvant systems. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2001, 1, 263-271.
- [64] Mikloska Z., Ruckholdt M., Ghadiminejad I., Dunckley H., Denis M., Cunningham A.L.: Monophosphoryl lipid A and QS21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell proteins 4 and 27 through IFN-gamma and IL-12 production. *J. Immunol.* 2000, 164, 5167-5176.
- [65] Moore A., McCarthy L., Mills K.H.: The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and QS21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from Th2 to Th1. *Vaccine* 1999, 17, 2517-2527.
- [66] Nashar T.O., Hirst T.R., Williams N.A.: Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. *Immunology* 1997, 91, 572-578.
- [67] Newman M.J.: Vaccines Adjuvant. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2000, 10, 279-314.
- [68] Ninomiya A., Ogasawara K., Kajino K., Takada A., Kida H.: Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. *Vaccine* 2002, 20, 3123-3129.
- [69] O'Hagan D.T., MacKichan M.L., Singh M.: Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol. Eng.* 2001, 18, 69-85.
- [70] Patel G.B., Sprott G.D.: Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1999, 19, 317-357.
- [71] Persing D.H., Coler R.N., Lacy M.J., Johnson D.A., Baldrige J.R., Hershberg R.M., Reed S.G.: Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol.* 2002, 10(10 Suppl), S32-37.
- [72] Polakos N.K., Drane D., Cox J., Ng P., Selby M.J., Chien D., O'Hagan D.T., Houghton M., Paliard X.: Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. *J. Immunol.* 2001, 166, 3589-3598.
- [73] Proietti E., Bracci L., Puzelli S., Di Pucchio T., Sestili P., De Vincenzi E., Venditti M., Capone I., Seif I., De Maeyer E., Tough D., Donatelli I., Belardelli F.: Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. *J. Immunol.* 2002, 169, 375-383.
- [74] Pulendran B., Banchereau J., Maraskovsky E., Maliszewski C.: Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 2001, 22, 41-47.

- [75] Pulendran B., Smith J.L., Caspary G., Brasel K., Pettit D., Maraskovsky E., Maliszewski C.R.: Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 1036-1041.
- [76] Pulendran B., Smith J.L., Jenkins M., Schoenborn M., Maraskovsky E., Maliszewski C.R.: Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor:flt3 ligand as an adjuvant. *J. Exp. Med.* 1998, 188, 2075-2082.
- [77] Rappuoli R., Pizza M., Douce G., Dougan G.: Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol. Today* 1999, 20, 493-500.
- [78] Rimmelzwaan G.F., Nieuwkoop N., Brandenburg A., Sutter G., Beyer W.E., Maher D., Bates J., Osterhaus A.D.: A randomized, double blind study in young healthy adults comparing cell mediated and humoral immune responses induced by influenza ISCOM vaccines and conventional vaccines. *Vaccine* 2000, 19, 1180-1187.
- [79] Rolph M.S., Kaufmann S.H.: CD40 signaling converts a minimally immunogenic antigen into a potent vaccine against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 2001, 166, 5115-5121.
- [80] Schijns V.E.: Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000, 12, 456-463.
- [81] Sjolander A., Van't Land B., Lovgren Bengtsson K.: Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell. Immunol.* 1997, 177, 69-76.
- [82] Smith R.E., Donachie A.M., Grdic D., Lycke N., Mowat A.M.: Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses. *J. Immunol.* 1999, 162, 5536-5546.
- [83] Solheim J.C.: Class I MHC molecules: assembly and antigen presentation. *Immunol. Rev.* 1999, 172, 11-19.
- [84] Staats H.F., Bradney C.P., Gwinn W.M., Jackson S.S., Sempowski G.D., Liao H.X., Letvin N.L., Haynes B.F.: Cytokine requirements for induction of systemic and mucosal CTL after nasal immunization. *J. Immunol.* 2001, 167, 5386-5394.
- [85] Stacey K.J., Blackwell J.M.: Immunostimulatory DNA as an adjuvant in vaccination against *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 1999, 67, 3719-3726.
- [86] Takahashi I., Marinaro M., Kiyono H., Jackson R.J., Nakagawa I., Fujihashi K., Hamada S., Clements J.D., Bost K.L., McGhee J.R.: Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin. *J. Infect. Dis.* 1996, 173, 627-635.
- [87] Todd C.W., Balusubramanian M., Newman M.J.: Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 199-223.
- [88] Van Slooten M.L., Hayon I., Babai I., Zakay-Rones Z., Wagner E., Storm G., Kedari E.: Immunoadjuvant activity of interferon-gamma-liposomes co-administered with influenza vaccines. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1531, 99-110.
- [89] Vasselon T., Detmers P.A.: Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* 2002, 70, 1033-1041.
- [90] Villacres M.C., Behboudi S., Nikkila T., Lovgren-Bengtsson K., Morein B.: Internalization of iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. *Cell. Immunol.* 1998, 185: 30-38.
- [91] Vogel F.R., Powell M.F., Alving C.R.: A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition). <http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf> (01.09.2003).
- [92] Williams N.A., Hirst T.R., Nashar T.O.: Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol. Today* 1999, 20, 95-101.
- [93] Wubbolts R., Neeffjes J.: Intracellular transport and peptide loading of MHC class II molecules: regulation by chaperones and motors. *Immunol. Rev.* 1999, 172, 189-208.
- [94] Zhou F., Huang L.: Monophosphoryl lipid A enhances specific CTL induction by a soluble protein antigen entrapped in liposomes. *Vaccine* 1993, 11, 1139-1144.