

专·论·与·综·述

高 分 子 免 疫 佐 剂

卓仁禧 毛海泉

(武汉大学化学系, 武汉, 430072)

提要 随着新一代疫苗的发展,安全、高效的免疫佐剂的研究日益紧迫。本文介绍了这一领域的研究,扼要综述了高分子免疫佐剂的研究进展,并展望了高分子免疫佐剂的发展前景。

关键词 高分子免疫佐剂,控制释放,合成疫苗

迄今为止,免疫接种仍然是人类抵御和控制传染病的最有效方法,目前正在使用的疫苗已有 20 多种。一些难以治愈的疾病(如 AIDS 病)的出现更促进了这一领域的研究。传统疫苗的抗原成分来源于阳性血清或通过培养微生物获得,这些疫苗会因抗原的纯化或减毒不彻底,或因毒力回复带来安全性问题,对接种者造成威胁;亚单位疫苗也常含有一些杂蛋白,这些杂蛋白对免疫应答无贡献,甚至会造成免疫抑制等副作用。因此,新一代疫苗的研究不断致力于抗原的纯化。近年来发展起来的合成疫苗使用合成多肽模拟天然病原体中起主要作用的抗原成分,这些多肽抗原一般属于小肽,结构明确、单纯,易于合成和纯化。具有安全、稳定等优点^[1]。但是,随着抗原成分的纯化,其免疫原性显著降低。作为合成疫苗抗原成分的小肽是弱抗原,尤其难以诱生足够水平的、具有保护性的免疫应答,这些疫苗必须使用佐剂来增强免疫效果。因而佐剂研究成为新一代疫苗研制的一个重要内容。

佐剂是一类能够以非特异性方式增强机体对抗原免疫应答的物质。通常与抗原一起使用,组成疫苗,可以明显增强疫苗的免疫效果,提高疫苗效价。对于以弱抗原构成的疫苗而言,要诱生较强的、具有保护性的免疫应答,佐剂是必不可少的成分。理想的疫苗佐剂应当是高效、无毒、在体内易代谢,非冷藏条件下稳定。现已广

泛使用的两类经典佐剂是弗氏佐剂和铝佐剂。弗氏佐剂主要在实验室中使用,它是 1937 年由 Freund 发展起来的一类油包水乳剂^[2],其中含有死的分枝杆菌的称为弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA),不含上述成份的称为弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FIA)。前者对体液免疫和细胞免疫增强效果都很好,而后者仅增加体液免疫应答。弗氏佐剂目前还不适于人用疫苗,原因在于其毒副作用较大,常在注射部位形成肉芽肿,并伴有结核菌型超敏反应。

铝佐剂是目前唯一用于临床的佐剂。1926 年 Glenny 等发现铝盐能增强对破伤风类毒素等抗原的免疫应答后^[3],铝佐剂得到了广泛的应用,它也已成功地用于重组乙型肝炎表面抗原等亚单位疫苗中。常用的有氢氧化铝,磷酸铝和明矾等。但是铝佐剂在有些情况下效果不好,对于弱抗原通常无效,且不增强细胞免疫应答。此外,铝佐剂也会引起局部炎症反应,有稳定性



卓仁禧 武汉大学化学系教授,博士生导师。1953 年毕业于上海复旦大学,同年到武汉大学化学系任教。现任武汉大学功能材料研究所所长,高分子教研室主任。主要研究领域是生物活性高分子、高分子控制释放材料、有机硅高分子和金属络

合高分子。在国内外杂志上已发表论文 100 余篇。

差等问题。

除了这两种经典佐剂外,70年代以来还发现其它一些有机化合物也具有佐剂活性,如脂质体(liposomes)^[4],类脂胺(lipoidal amines)^[5],胞壁酰二肽(muramyl dipeptide,MDP)^[6],类脂A(lipid A)^[7]以及脂氨基酸(lipoamino-acids)^[8]、脂多肽(lipopeptides)^[9]等,其中以胞壁酰二肽和脂氨基酸、脂多肽类最引人注目。

胞壁酰二肽是1974年 Ellouz 等从分枝杆

菌细胞壁中分离得到的具有活性的最小结构片段(见图1),MDP具有很强的佐剂活性,但存在致热原性(pyrogenicity),在动物体内会引起赖特尔过敏综合症(Reiter's syndrome)^[16]。对MDP进行结构改性的研究十分活跃,在已报道的一百多种MDP衍生物中,活性较高、毒性较低的有不少。其中胞壁肽丁脂(murabutide)与MDP的活性相当,而致热原性很弱^[10]。胞壁酰三肽磷脂酰乙醇胺(MTP-PE)^[11]和胞壁酰二

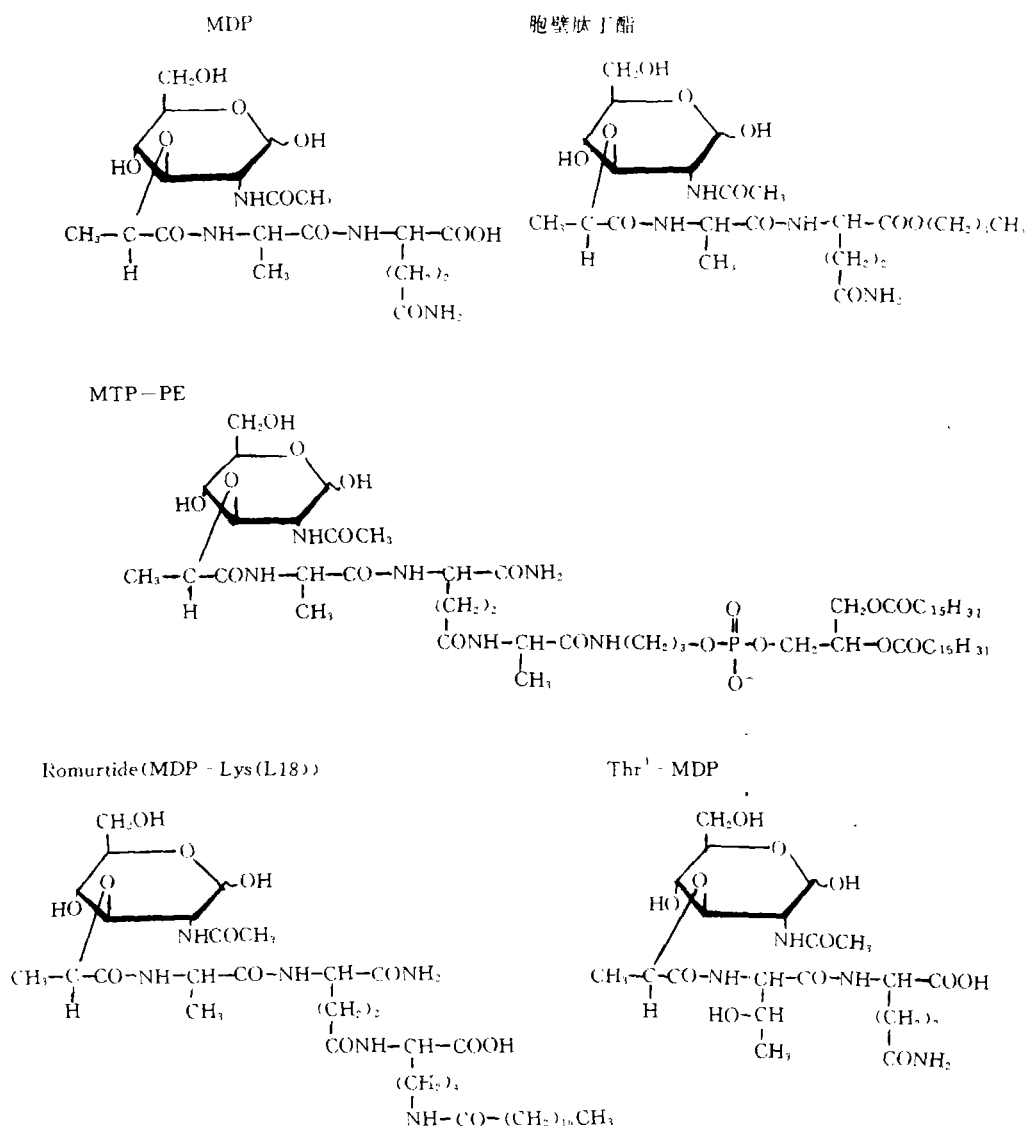


图1 胞壁酰二肽及其衍生物

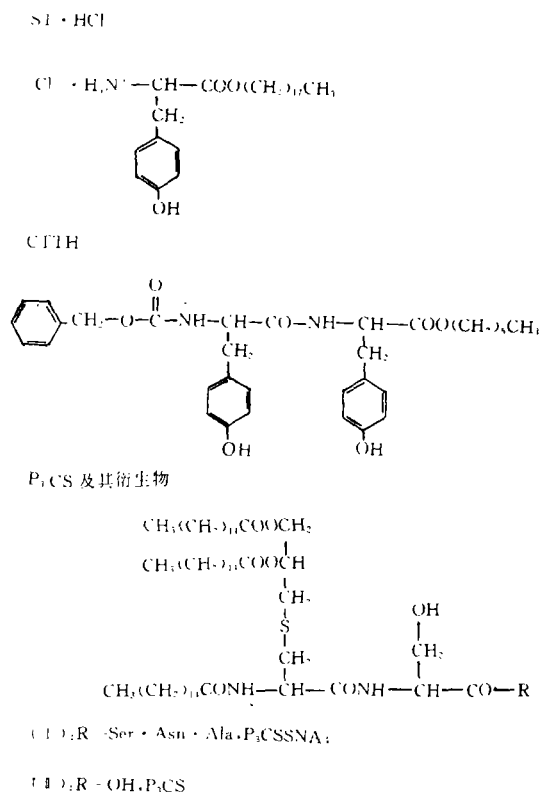


图 2 脂氨基酸和脂多肽

肽-*N*⁶-十八烷酰基-*L*-赖氨酸(romurtide)^[12]也具有较强的活性和低的副作用。苏氨酸¹-胞壁酰二肽((Thr¹-MDP)是已知 MDP 衍生物中最理想的一个^[13],其佐剂活性比 MDP 还高,副作用只有 MDP 的 1%。

近年来发现的酪氨酸十八烷基酯(stearyl tyrosine ester, ST,图 2)具有较强的佐剂活性。Moloney(1984 年)和 Nixon-George(1990 年)等分别证实了 ST 盐酸盐对破伤风类毒素、脊髓灰质炎疫苗^[8]和乙肝表面抗原亚单位疫苗^[14]等具有较强的佐剂活性。Kohn(1986 年)合成的脂二肽:苄氧羰基保护的酪氨酸酪氨酸己酯(CTTH,图 2)也具有很好的佐剂活性^[9]。Cybulla 等(1980 年)发现的一类具有较好佐剂活性的脂多肽是模拟大肠杆菌细胞壁脂蛋白的 N-端片段合成的^[15],其中脂二肽[图 2 中 (II)]的活性与脂五肽[图 2 中 (I)]的相当^[16]。它们能够有效地增强机体对抗原的体液

免疫应答。脂氨基酸、脂多肽类佐剂的优点在于它们在体内易被代谢,无毒副作用。

50 年代开始,尤其是 80 年代以来,人们发现许多高分子化合物用于增强机体对抗原的免疫应答十分有效,我们称之为高分子免疫佐剂(polymer immunoadjuvant)。按不同的作用机理,可以分为 3 类。

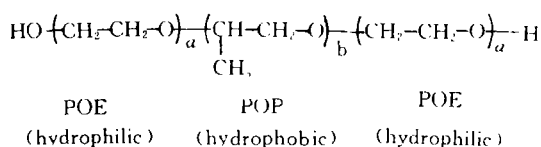
(1)高分子本身能刺激、活化免疫细胞。一些天然多糖及其衍生物,如革兰氏阴性菌脂多糖^[17],葡聚糖磺酸盐^[18],70%脱乙酰甲壳质^[19]等,具有促进 B 细胞有丝分裂,刺激巨噬细胞释放白细胞介素-1 和诱导 T 细胞活化、增殖的作用,从而能够增强体液免疫和细胞免疫应答。60 年代初以来,陆续发现一些合成的聚阴离子^[20],如聚丙烯酸及其共聚物,聚马来酸、聚马来酸酐及其共聚物等等,也能活化巨噬细胞和 T 细胞。其中研究得较多的是马来酸的共聚物。

自 Butler 等合成了二乙烯基醚-马来酸酐共聚物(DIVEMA)及其水解产物后,其明显的免疫增强活性引起了人们极大兴趣^[21]。实验发现,马来酸和其它一些乙烯基单体(如丙烯酸,苯乙烯,2-环己基-1,3-二氧杂环庚-5-烯,4-烯丙基邻苯二酚等)的交替共聚物均有一定程度的免疫增强活性。Ottenbrite 等对这类聚阴离子的研究结果表明,较高的电荷密度是这类聚合物具有较好活性的必需条件之一;增加聚合物的亲脂性,有利于细胞吸收,也可以提高其活性。Suda 和 Ottenbrite 等(1992 年)将马来酸与 2-环己基-1,3-二氧杂环庚-5-烯的交替共聚物经脂质体包裹或直接在聚合物上引入亲脂基团,可以提高细胞膜与聚阴离子的相互作用,明显增强其活性^[22]。

(2)利用高分子物质改变抗原的物理状态和递呈方式。颗粒性抗原和不溶性抗原能够比可溶性抗原诱生更强的免疫应答。用聚丙烯酸酯等疏水性聚合物吸附可溶性抗原,可以大大增强抗原的免疫原性。O'Hagan(1989 年)等制备的聚-α-氰基丙烯酸丁酯的胶体溶液作为口

服疫苗的佐剂,能够诱生高水平的分泌型 IgA 抗体^[23]。Hunter 等(1981 年)发现环氧乙烷-环氧丙烷嵌段共聚物(Pluronic block copolymer)

Pluronic 嵌段共聚物



L121; POE 含量为 10%, $M_r = 4400$

图 3 Pluronic 嵌段共聚物的结构

乳化的水包油乳液能显著增强抗体应答水平^[24](图 3)。实验表明,在具有适当的疏水-亲水比例时(如 Pluronic L121),聚合物才显示强的佐剂活性和较低的毒副作用。而且在该乳剂中,抗原定位于油滴表面^[13]。

这类聚合物佐剂的特征在于它们是将抗原转移至疏水性微粒或油滴的表面,将抗原变为“不溶性”和“颗粒性”的,改变了抗原的物理形态。这种抗原-佐剂复合物易被巨噬细胞等抗原递呈细胞吞噬、处理,以将抗原信息传递给淋巴细胞。并且抗原处于微粒和油滴表面,也易被抗原递呈细胞识别。

(3)利用高分子对抗原控制释放。1979 年 Langer 等人证实了抗原的缓慢释放能够强烈增加抗体应答^[25]。他们将牛血清白蛋白包封于聚(乙烯-醋酸乙烯酯)(EVA)中,一次免疫即可获得与 FCA 作佐剂时相当的效果。EVA 的作用在于保护抗原,避免它在体内过快地被酶解,由于缓释作用,延长了抗原与免疫细胞的作用时间,强化了抗原对免疫系统的刺激,从而达到增强免疫应答的目的。无疑,选用生物可降解聚合物作为高分子佐剂具有更大优点:免疫接种后,不存在聚合物在体内滞留、积累的问题。1988 年 Martin 等^[26]用交联的血清白蛋白微球缓释抗原,一次免疫即可诱生强的体液免疫应答。最近,用生物可降解聚酯,如聚(乳酸-乙醇酸),作为高分子佐剂已有报道。Eldridge 等^[27](1991 年)用聚(D,L-乳酸-乙醇酸)(PLGA)微球包封葡萄球菌 B 型类毒素,其佐剂活性与

FCA 相当,而无炎症反应和局部肉牙肿等副反应。改变微球形态还可以调节其活性高低,其中尤以粒径在 1~10 μm 的微球效果最佳,因为这种粒径的微球易于被淋巴结截留,增加了抗原向抗原递呈细胞的提呈。

将抗原共价偶联于合成高分子上,也可以达到增强免疫应答的目的^[20]。1986 年 Beachey^[28]把合成的 24 型链球菌 M 蛋白的片段肽(S-CB7)(35 肽,序列见图 4)作为抗原与聚赖氨酸共价偶联,所得偶合物溶于生理盐水中,免疫家兔,可以诱生型特异性(typespecific)和调理性(opsonic)抗体,且抗体应答水平与用胞壁肽丁酯作佐剂时相当。

Asn - Phe - Ser - Thr - Ala - Asp - Ser - Ala - Lys -
Ile - Lys - Thr - Leu - Glu - Ala - Glu - Lys - Ala -
Ala - Leu - Ala - Ala - Arg - Lys - Ala - Asp - Leu -
Glu - Lys - Ala - Leu - Glu - Gly - Ala - Met

图 4 合成的 24 型链球菌 M 蛋白 35 肽(S-CB7)

把小分子佐剂引入生物可降解聚合物体系中,除可以发挥缓释作用外,还能够同时释放出具有佐剂活性的小分子物质,可望具有更强的佐剂活性。Kohn^[9]等(1986 年)合成了含酪氨酸二肽(CTTH)的聚亚胺碳酸酯[图 5 中(Ⅱ)],用该聚合物包封的 BSA,在小鼠体内诱生的抗体应答比用聚合物(Ⅰ)(图 5)更强。卓仁禧等^[29](1991 年)合成了一系列含酪氨酸二肽的聚磷酸酯[图 5(Ⅲ)],具有较好的生物可降解性,无毒副作用。用它作为血吸虫成虫可溶性抗原(soluble antigen extracted from adult Schistosoma japonicum)的佐剂,可获得与 FCA 作佐剂时相当的免疫效果。卓仁禧等^[30](1992 年)还合成了脂二肽与聚赖氨酸的偶合物[见图 5(N)],初步实验表明,该偶合物具有较好的吸附抗原的性能。

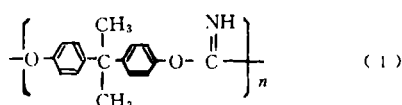
综上所述,高分子佐剂可以通过不同的机理有效地增加机体的免疫应答。与小分子佐剂相比,高分子佐剂的结构可变性较大,易于进行结构修饰。通过改变高分子的化学、物理性质,可以调节抗原的释放和递呈方式、调节免疫细

胞的功能,实现对免疫应答的调控,以获得最佳的免疫效果。利用高分子控制释放系统,设计具有向免疫器官(如脾脏、淋巴结等)和免疫细胞(如巨噬细胞等)靶向输送性能的高分子佐剂也将是十分有意义的研究课题。高分子免疫佐剂的优点还在于,这种“长效”佐剂可望将初免和加强免疫合并为一次接种,大大简化接种程序,降低疫苗成本。

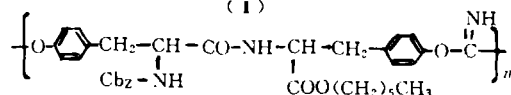
高分子免疫佐剂对于新一代合成多肽疫苗尤为重要。小分子佐剂,如铝佐剂、FCA 和脂质体等,对于小肽的佐剂效果不明显。而高分子佐剂最有希望应用于这类合成多肽抗原。

尽管高分子免疫佐剂的研究才开始不久,但这一领域的研究必将丰富和深化人类对免疫佐剂和免疫系统机制的认识。高分子免疫佐剂的研制成功将使免疫接种的效果得到改善,拓宽可预防疾病的范围,从而大大增强人类抵御疾病的能力。

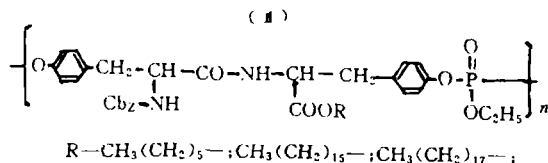
聚(双酚 A - 亚胺碳酸酯)



聚(苄氧羰基酪氨酸酰胺酯己酯 - 亚胺碳酸酯)
(1)



含酪 - 酪二肽的聚磷酸酯



脂二肽与聚赖氨酸的偶合物

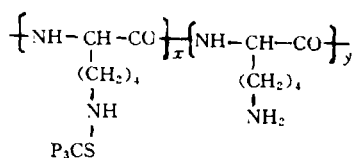


图5 合成的高分子免疫佐剂

参考文献

- 1 Arnon R. Synthetic peptides as the basis for vaccine design. *Molecular Immunol*, 1991, 28(3):209~215
- 2 Freund J, Casals J, Hismar E P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 1937, 37:509
- 3 Glennly A T, et al. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J. Pathol. Bacteriol*, 1926, 29:38
- 4 Gregoriadis G. Immunological adjuvants; a role for liposomes. *Immunol. Today*, 1990, 11(3):89~96
- 5 Dalsgaard K. Adjuvant. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 1987, 17:145~152
- 6 Ellouz F, et al. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1974, 59:1317~1325
- 7 Kotani S, et al. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* re-mutant. *Infect. Immun*, 1985, 49:225~237
- 8 Moloney P J, Wojcik G. Synthetic adjuvants for stimulating antigenic responses. *Eur. Patent*, B1, 18189(1984)
- 9 Kohn J, et al. Single-step immunization using a controlled release, biodegradable polymer with sustained adjuvant activity. *J. Immunol. Methods*, 1986, 95(1):31~38
- 10 Chedid L, et al. Biological activity of a new synthetic muramyl dipeptide adjuvant devoid of pyrogenicity. *Infect. Immun*, 1982, 35:417~424
- 11 Koff W C, et al. Protection of mice against fatal herpes simplex type 2 infection by liposomes containing muramyl tripeptide. *Science*, 1985, 228:495~497
- 12 Akasaki M, et al. Augmentation of immune responses by a muramyl dipeptide analog, MDP-lys(L18). *Agents Actions*, 1987, 22:144~150
- 13 Allison A C, Byars N E. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity. *J. Immunol. Methods*, 1986, 95(2):157~168
- 14 Nixon-George A, et al. The adjuvant effect of stearyl tyrosine on a recombinant subunit hepatitis B surface antigen. *J. Immunol*, 1990, 144(12):4798~4802
- 15 Cybulla J, et al. The mitogenic principle of *Escherichia coli* lipoprotein; B-lymphocyte mitogenicity of N-palmitoyl

- toyl - cysteine and N - palmitoyl - glutamic acid α - methyl esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 92(4):1389~1396
- 16 Prass W, et al. Lipopeptides of the N - terminus of *Escherichia coli* lipoprotein: synthesis, mitogenicity and properties in monolayer experiments. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, 1987, 900(1):116~128
 - 17 Seppala I J T, Makela O. Adjuvant effect of bacterial LPS and/or alum precipitation in response to polysaccharide and protein antigens. *Immunology*, 1984, 53:827~836
 - 18 Diamantstein T, et al. Stimulation of humoral antibody formation by polyanions. I. The influence of sulfate esters of polymers on the immune response in mice. *Eur. J. Immunol.*, 1971, 1:340
 - 19 Tokura S, Nishi N. Design of bioactive chitin derivatives. *Polymer*, 1986, 35(5):452~455
 - 20 Petrov R V, et al. Influenza virus antigens conjugated with a synthetic polyelectrolyte; a novel model of vaccines. *Vaccine*, 1985, 3:392
 - 21 Merigan T C. Induction of circulating interferon by synthetic anionic polymers of known composition. *Nature (London)*, 1967, 214:416
 - 22 Suda Y, et al. Modified polyanionic polymers for enhanced cell membrane interaction. *J. Bioact. Compat. Polym.*, 1992, 7:275~287
 - 23 O'Hagan D T, Palin K J, Davis S S. Poly (butyl - 2 - cyanoacrylate) particles as adjuvants for oral immunization. *Vaccine*, 1989, 7(6):213~216
 - 24 Hunter R L, Strickland F, Kezdy F. The adjuvant activity of non - ionic block polymer surfactants. I. The role of hydrophile - lipophile balance. *J. Immunol.*, 1981, 127: 1244~1250
 - 25 Preis I, Langer R S. A single - step immunization by sustained antigen release. *J. Immunol. Methods*, 1979, 20: 193~197
 - 26 Martin M E D, Dewar J B, Newman J F E. Polymerized serum albumin beads possessing slow release properties for use in vaccines. *Vaccine*, 1988, 6:33~38
 - 27 Eldridge J H, et al. Biodegradable and biocompatible poly (D, L - lactide - co - glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin - neutralizing antibodies. *Infect. Immun.*, 1991, 59(9):2978~2986
 - 28 Beachey E H. Type - specific opsonic antibodies evoked with a synthetic of streptococcal M protein conjugated to polylysine without adjuvant. *Infect. Immun.*, 1986, 51 (1):362~364
 - 29 Zhuo R X, Mao H Q, Fan C L. Synthesis and biological properties of polymer immunoadjuvants. *Guilin International Symposium on Biomaterials and Fine Polymers*, Preprints, 27~28 (Oct. 3~7, 1991, Guilin, China)
 - 30 卓仁禧, 范昌烈, 张勋高. 侧链含脂二肽聚赖氨酸的合成及其免疫佐剂活性的研究. 1992年全国高分子学术论文报告会, 预印集, 1396~1397 (1992年8月15~19日, 中国, 长春)

Polymer Immunoadjuvant

Zhuo Renxi, Mao Haiquan

(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

Summary With the development of the "new vaccine", i. e., subunit and especially synthetic peptide vaccine, the need for a safe and efficacious immunoadjuvant has become paramount because of the weak immunogenicity of the pure antigens. In this paper we review the various approaches that are being explored for the development of a safe and efficacious immunological adjuvant aimed at specifically increasing both the humoral and cellular immune response to a desired vaccine antigen. Among these approaches, the polymer adjuvant is highlighted, which encompass those improving the presentation of the various antigen (by controlled release or altering the presentation states) as well as those stimulating the immune cells, i. e., macrophages, T and/or B cells. It is expected that the biodegradable polymer immunoadjuvant is the most promising one that would be clinically acceptable in the near future.

Key words Polymer immunoadjuvant, Controlled release, Synthetic vaccine
(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>