

Aşı adjuvanları

Kadriye Yurdakök¹, Tolga İnce²

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Pediyatri Profesörü, ²Pediyatri Uzmanı

SUMMARY: Yurdakök K, İnce T. (Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey). Vaccine adjuvants. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2008; 51: 225-239.

The final goal of vaccination is to generate a strong lifelong immunity against infection. Live vaccines have antigenic proliferation capacity, and a single dose usually provides sufficient immunity without requiring an adjuvant. However, killed whole organism or subunit vaccines, especially those containing more purified antigens such as derived by recombinant DNA technologies, are weak antigens and require an adjuvant to enhance immune response. The word "adjuvant" originates from the Latin word *adjuvare*, meaning to help or aid, defining any substance that acts to accelerate, prolong, or enhance antigen-specific immune responses when used in combination with specific vaccine antigens. The adjuvant concept was first recognized in the 1920s during diphtheria antitoxin production, when antigen specific antibody levels were found to be higher in horses that developed abscess at the inoculation site. In 1926, Glenny and colleagues discovered the adjuvant effects of aluminum salts, and 'alum adjuvants' became the only adjuvants used in licensed vaccines worldwide for the next 80 years. However, in the last few decades, the necessity to improve the immunogenicity of the suboptimal vaccines, to develop new vaccines against diseases for which no vaccine yet exists, and to develop vaccines against more challenging emerging pathogens that often cause chronic infections (e.g. HIV, HCV, tuberculosis) together with the need for therapeutic vaccines against cancer and autoimmune disorders have created a need for the development of new and improved vaccine adjuvants. New knowledge on different adjuvants and understanding the mechanisms of adjuvant action are discussed in the present article.

Key words: adjuvant, vaccine.

ÖZET: Aşılamada son hedef uzun süreli koruyuculuk (yaşam boyu) güçlü bir immün yanıt oluşturmaktır. Canlı aşılarda antijenik proliferasyon olduğu için aşının tek dozda immünite oluşturma kapasitesi vardır ve adjuvan gerekli değildir. Ancak antijenin daha saflaştırıldığı hatta rekombinat DNA tekniğiyle elde edilmiş antijenlerle üretilen ölü aşılar zayıf immünojenlerdir; güçlü ve kalıcı bir immün yanıt için adjuvana ihtiyaç gösterir. Adjuvan kelimesi Latince "adjuvare", yardım eden, güçlendiren anlamında olup antijenle birlikte inokule edildiğinde immün yanıtı arttıran, güçlendiren maddeler anlamındadır. Adjuvan konsepti 1920'li yıllarda inokülasyon yerinde apse olan vakalarda antijen spesifik antikor düzeylerinin çok yüksek olduğunun farkedilmesiyle gelişmiştir. 1926 yılında Glenny ve arkadaşları alüminyuma adsorbe edilmiş difteri toksoidi ile alüminyum tuzlarının adjuvan etkisini göstermiş; alüminyum hidroksit $Al(OH)_3$ ile alüminyum fosfat $Al(PO)_4$ tuzları adjuvan etki mekanizması halen tam olarak anlaşılammış olduğu halde günümüzde halen kullanılmakta olan son 80 yılın en önemli adjuvanları olmuştur. Yeni aşı adjuvanları arayışında 1980'li yıllara kadar bir gelişme olmamıştır. Daha sonra, var olan eski aşıların immünojenisitelerinin arttırılması gereği, enfeksiyonlara karşı yeni koruyucu aşıların geliştirilmeye başlanması, allerjik, otoimmün hastalıklar, kanser ve fertilitte tedavileri için geliştirilen tedavi aşıları ile ilgili çalışmalarının artması gibi nedenlerle adjuvan çalışmaları hız kazanmıştır. Son yirmi yılda yüzlerce doğal veya sentetik içerikli aşı adjuvanı üzerinde çalışılmaktadır.

Anahtar kelimeler: aşı, adjuvan.

Aşılanmanın hedefi enfeksiyonlara karşı güçlü, koruyucu ve uzun süren bir immün cevap oluşturmaktır. Hastalık oluşturmayacak şekilde zayıflatılmış (attenué edilmiş) ancak çoğalabilme özellikleri halen devam eden mikroorganizmalarla hazırlanan canlı aşılar, alıcıda bir süre sonra logaritmik olarak çoğalır. Tek doz canlı aşıyla hastalığın klinik bulguları ve komplikasyonları olmaksızın doğal enfeksiyonun sağladığına yakın bir immünite elde edilir. Bu nedenle canlı aşılar için adjuvan gerekmez.

Ölü mikroorganizmaların tamamı veya fraksiyonlarından üretilen cansız (inaktive) aşılar ise antijenik proliferasyon göstermez. Daha az immünojenik olan ölü aşıların immünizasyon oluşturabilmeleri için belli aralıklarla birkaç doz tekrarlanmaları ve adjuvanla birlikte verilmeleri gerekir. Adjuvanlar kendileri immünojen olmayan, antikor oluşturmayan ancak verildikleri antijenin immünojenitesini arttıran, güçlendiren maddelerdir¹. Ölü mikroorganizmanın tamamının kullanıldığı nispeten daha az saflaştırılmış olan aşılar, mikroorganizmanın bazı komponentleri (endotoksinler gibi) adjuvan etkisi (intrensik adjuvan) gösterebilir. Aşıya eklenen normal adjuvanın dışında "intrensik adjuvan" da içeren bu aşılar hem kendi, hem de birlikte verildiği diğer antijenlerin immünitesini artırıcı etki yapar (tam hücreli boğmaca aşısı içeren difteri ve tetanoz aşıları gibi)¹. Ancak son yıllarda aşı yan etkilerinin azaltılması amacıyla geliştirilen yeni teknolojilerle, aşı antijenleri daha saflaştırılmış hatta rekombinat DNA tekniğiyle üretilmeye başlanmıştır. Bu tür saflaştırılmış ölü aşılar, intrensik adjuvanları da ortadan kaldırmış olduğu için çok daha zayıf immünojenlerdir. Kalıcı bir immün yanıt için daha güçlü adjuvanlara gereksinim duyarlar. Ayrıca farklı mikroorganizmalardan veya aynı mikroorganizmanın birden farklı suşundan elde edilen saflaştırılmış antijenlerin birlikte verildiği "kombine" aşılar da her antijenden eşit bir immün yanıt elde etmek ve bunu çok daha az sayıda enjeksiyon ile yapmak için de güçlü adjuvanlara ihtiyaç vardır.

Adjuvanların genel olarak kullanım amaçları;

- İyice saflaştırılarak elde edilmiş veya rekombinant antijenlerin immünojenitesini arttırmak,
- Kısa sürede daha güçlü ve uzun süreli bir immün yanıt oluşturmak,
- Primer immün yanıt elde edebilmek için gereken antijen miktarını ya da aşılama sayısını azaltmak ve bu yolla aşı maliyetini düşürmek,

- Aşının yenidoğanlar, yaşlılar, immün yetmezliği olan kişilerde etkinliğini artırmak,
- Antijenlerin mukoza tarafından alınımını güçlendirmek (mukozal immüniteyi uyarmak),
- Hücrel immüniteyi uyarmak,
- Kombine aşılar da antijen kompetitasyonunun engellenmesine yardım etmektedir².

Adjuvan konsepti 1920'li yıllarda inokulasyon yerinde apse olan olgularda antijen spesifik antikor düzeylerinin çok yüksek olduğunun fark edilmesiyle gelişmiştir. Atlardan difteri antitoksini elde edilmeye çalışılırken, enjeksiyon yerinde apse gelişenlerde daha fazla antitoksin oluştuğu gözlenmiştir³. Daha sonraki çalışmalarda tetanoz toksoid antijeniyle birlikte apse oluşturmak için agar, tapioka, nişasta yağı, hatta ekmek kırıntısı gibi maddeler enjekte edilmiştir. Bu maddeler "spesifik bir antijenle beraber kullanıldığında, antijenin tek başına kullanıldığından daha güçlü, etkin immün yanıt oluşturan madde" olarak tanımlanmış ve "adjuvan" denmiştir. Adjuvan kelimesi Latince "adjuvare"den gelmektedir. Adjuvare yardım etmek, arttırmak, çoğaltmak anlamındadır. Tanımdan da anlaşılacağı gibi geniş bir grup madde adjuvan olarak kullanılabilir.

Adjuvanların etki mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmiştir. Hatta Janeway⁴ adjuvanlar için "immünologların kirli küçük sırrı" tanımını kullanmıştır. Bunun nedeni aşılarla pek çok çalışma olmasına rağmen, adjuvanlar konusunda sınırlı sayıda çalışma yapılması ve bilgilerin genellikle ampirik olmasıdır. Çok çeşitli ve birbirinden farklı maddenin adjuvan etkilerinin bulunması da adjuvanların etki mekanizmalarının ayrıntılı araştırılmasını zorlaştırmıştır.

Ramon'un adjuvanları 1925 yılında tanımlamasından bir yıl sonra Glenn ve arkadaşları⁵ alüminyuma adsorbe edilmiş difteri toksoidi ile alüminyum tuzlarının adjuvan etkisini göstermiştir. O yıllardan günümüze alüminyum bileşikler (alüminyum hidroksit $Al(OH)_3$ ile alüminyum fosfat $Al(PO)_4$ tuzları) en sık kullanılan aşı adjuvanı olmuştur⁶.

İntraselüler patojen mikroorganizmalardan korunmak için hücrel immün yanıtın, ekstraselüler mikroorganizmalardan korunmak için humoral immün yanıtın oluşması gerekir. Alüminyum tuzları zayıf adjuvanlardır. Çünkü sadece humoral immün yanıtı uyatarak antikor

cevabını artırır. Korunma için hümmoral immün yanıt gerektiren hastalıklar için (hepatit B ve boğmaca gibi) yeterlidir. Bununla birlikte sitotoksik T lenfosit hücrelerini (hümmesal immüniteyi) uyarıcı etkileri yoktur. Örneğin HIV aşılarda hedef antikor oluşturmak değil, sitotoksik lenfositleri uymaktır. Ayrıca alüminyum bileşikleri oral ya da intranazal uygulamalar için uygun değildir. Mukozal IgA cevabını tetikleyemezler. Aksine IgE cevabını arttırarak bazı insanlarda allerjik reaksiyonlara neden olabilirler². Dolayısıyla pek çok kimyasal, biyokimyasal madde ve immün sistem aktivitesi sonucu oluşan proteinler (sitokinler gibi) son yıllarda potansiyel adjuvan olarak incelenmeye başlanmıştır. Ancak bu maddelerin çoğunda görülen yerel ve sistemik toksisite şimdilik birçoğunun insan aşılarda adjuvan olarak kullanılmalarına imkan tanımamaktadır. Adjuvan etki arttıkça yan etki görülme riski de artmaktadır³. Adjuvanlara bağlı ağrı, enflamasyon, şişlik, enjeksiyon yerinde nekroz, granülomlar, steril apse ve lenfadenopatiler gibi lokal yan etkiler, bulantı, ateş, artrit, üveit, eozinofili, alerji, anafilaksi, immümsüpresyon ve

otoimmün hastalıklar gibi sistemik yan etkiler görülebilir³. Adjuvan araştırmalarında toksisiteyi en aza indirmek, en uğraştırıcı adım olarak görülmektedir. Bu nedenle yüzyıla yakın bir zamandır insan aşılarda kullanılabilir adjuvan olma özelliğini sadece alüminyumlu adjuvanlar sürdürmüştür.

Yeni aşı adjuvanları arayışında 1980'li yıllara kadar bir gelişme olmamıştır. Daha sonra, var olan eski aşılarda immünojenisitelelerinin arttırılması gereği, enfeksiyonlara karşı yeni koruyucu aşılarda geliştirilmeye başlanması, allerjik, otoimmün hastalıklar, kanser ve fertilitte tedavileri için geliştirilen tedavi aşılarda ile ilgili çalışmalarının artması gibi nedenlerle düzinelerce aşı adayları geliştirilmiş ve adjuvan çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Son yirmi yılda yüzlerce doğal veya sentetik içerikli aşı adjuvanı üzerinde çalışılmaktadır. İnsan ve hayvan aşı geliştirme çalışmalarında adjuvan aktivitesi gösteren doğal ve sentetik pek çok madde vardır. Bunlar Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I. Çeşitli adjuvan örnekleri¹.

Adjuvanın tipi	Genel örnekler	Özgün örnekler
Mineral tuzları	Alüminyum hidroksit Alüminyum fosfat Kalsiyum fosfat	Alhydrogel™, Rehydrigel® Adju-Phos™, Rehydraphos™ Calcium Phosphate Adjuvant
Mikroorganizma kaynaklı	Muramil dipeptid (MDP) analogları Bakteriyel ekzotoksinler Endotoksin Bakteriyel DNA Flagellin	Murabutide, Threonyl-MDP Kolera toksini (CT) TM E. coli heat labil toksin (LT), Monofosforil lipid-A (MPL®) CpG oligonükleotidleri Flagellin komponentleri FljB
Partiküller	Biyodegradabl polimer mikropartiküller İmmünostimülator kompleksler Lipozom, virozom, proteozomlar	Polilaktid co-glikolid partiküller (PLG) ISCOMATRIX®
Yağ-emülsiyonları ve Sürfaktan adjuvanlar	Freund inkomplet antijeni Metabolize edilebilir emülsiyonlar Saponinler	Montanide® ISA 51 MF59 SAF Montanide® ISA 720 QS-21
Sentetik	Non-iyonik blok kopolimerler Polifosfazen LPS-based sentetik bileşikler İmidazokuinolin benzeri moleküller Sentetik polinükleotidler	L121 PCPP RC529 E5564 İmiquimode, Resiquimode Poly A:U, Poly I:C
Sitokinler	IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN-γ	
Genetik	Sitokin genleri, kostimülator molekül genleri	IL-12, IL-2, IFN-γ, CD40L

İdeal bir adjuvan hücrel veya humoral ne tür bir korunma isteniyorsa istenilen immünitenin oluşmasını sağlamalı, immün hafıza yani uzun süreli immünite oluşturmalı, güvenli ve yan etkisi az olmalı (ruhsat öncesi 5000-25000 vakada etkin ve güvenli olduğu gösterilmeli), otoimmüniteyi uyarıcı etkisi olmamalı, mutajenik, karsinojenik, teratojenik olmamalı, biyolojik olarak parçalanabilir olmalı (biodegradable), ucuz ve raf ömrü uzun olmalıdır³. Şu anda kullanılmakta olan lisanslı adjuvanlar Tablo II'de görülmektedir.

Önceleri doğal immünitenin kazanılmış immüniteden bağımsız spesifik olmayan yoldan (non-spesifik immünite) çalıştığı sanılmaktaydı. Ancak son yıllarda doğal immünitenin patojen mikroorganizmaların grup ve tiplerini özgül olarak tanıyarak cevap verdiği fark edilmiştir. Hatta bu tanıma, patojene karşı oluşacak adaptif immün yanıtın başlatılması ve yönlendirilmesini sağlamaktadır. Doğal immünite ile adaptif immünite arasındaki ilişkiyi sağlayan temel mekanizma, doğal immünitenin “patojene özgün moleküler yapılar”ı (pathogen associated

Tablo II. Çeşitli lisanslı aşuların içerdikleri adjuvanlar¹.

Aşı	Ticari adı	Adjuvan
Difteri ve tetanoz aşısı (DT)	Difteri ve adsorbe tetanoz toksoidi USP (1)	Alüminyum potasyum fosfat
DT aseltiler boğmaca (DBaT)	Tripedia® (1)	Alüminyum potasyum fosfat
Hemofilus influenza tip B (HIB)	Pedvax HIB® (2)	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
DBaT + HIB	TriHibit® (1)	Alüminyum potasyum fosfat
Hepatit B	Recombivax HB® (2)	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
Hepatit B	Engerix-B® (3)	Alüminyum hidroksit
Hepatit B + HIB	Comvax™ (2)	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
Hepatit A	Havrix® (3)	Alüminyum hidroksit
Hepatit A	Epaxal® (6)	Virozom
Hepatit A + HepatitB	Twinrix® (3)	Alüminyum hidroksit/fosfat
Konjuge pnömokok aşısı	Prevnar® (4)	Alüminyum fosfat
İnfluenza aşısı	Fluad™ (4)*	MF59
İnfluenza aşısı	Inflexal® V (6)*	Virozom
Human Papilloma Virus (HPV) aşısı	Gardasil® (2)	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
Hepatit B	Fendrix® (3)*	ASO4 (MPL® + Alüminyum tuzu)
Hepatit B	Supervax™ (7)**	RC529

(1) Sanofi Pasteur, (2) Merck, (3) GSK, (4) Wyeth, (5) Novartis, (6) Crucell, (7) Dynavax Europe, * Avrupa'da lisanslı, ** Arjantin'de lisanslı.

Adjuvanlar, doğal ve adaptif (kazanılmış) immünite

Memelilerin immün sistemi, patojen mikroorganizmalarla invazyonu önleyecek iki farklı ancak entegre çalışan sistem şeklinde evrimleşmiştir. Bunlar doğal (innate) ve adaptif (kazanılmış) immün sistemlerdir. Doğal immünite, patojeni hızla farkedenden ve tanıyan, patojene özel savunma mekanizmalarını hızla etkinleştiren ilk savunma hattını oluşturur. Doğal immün sistem makrofaj gibi fagositik hücreler yoluyla mikroorganizmanın dakikalar içerisinde tanınmasını, yutulmasını ve parçalanmasını sağlar. Bir yandan da adaptif immünite faaliyete geçerek, günler ve haftalar içinde aynı mikroorganizma veya immünolojik olarak benzer patojenlerle daha sonra oluşabilecek ikinci bir атаğa karşı immün hafıza oluşmasını sağlar¹.

moleculer patterns-PAMPs) tanıma becerisidir. Bu tanıma doğal immün sistemde varolan “grup-özgün yapıları tanıma reseptörleri” (class-specific pattern recognition receptors-PRR) yoluyla olmaktadır. Doğal immün sistem mikroorganizmada var olan PAMPs'ı hemen bir tehlike sinyali olarak algılar ve adaptif immün sistemi harekete geçirir. Ölü veya canlı tam hücre içeren aşılarda gözlenen “intrensik adjuvan etkisi”nin tam hücreli aşılarda var olan PAMPs nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle doğal immün sistem tarafından tanınamayacak şekilde çok iyi saflaştırılmış protein veya subunit içeren aşılarda, adjuvan olarak PAMPs kullanılması, patojen tanıma mekanizmasını yani doğal immüniteyi uyararak adaptif immünite oluşmasını sağlamaktadır. Doğal immünitede var olan en önemli PRR, “toll-like receptor”dür (TLR).

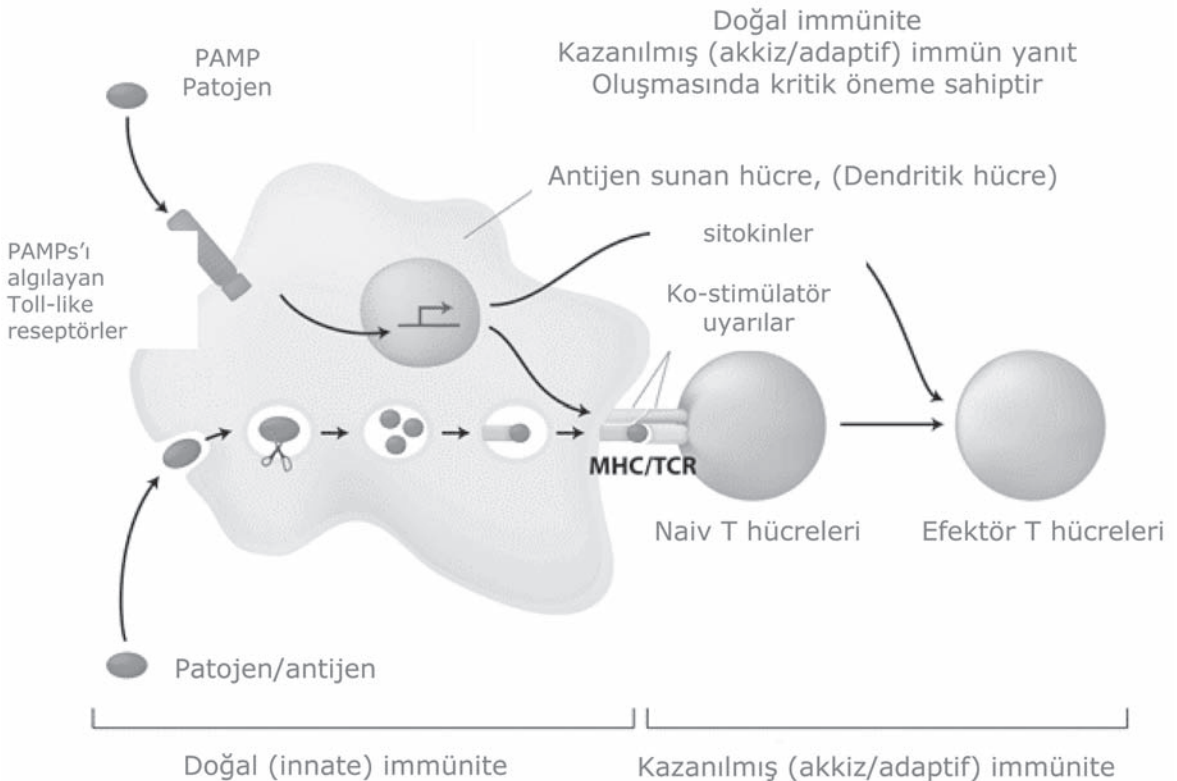
Dolaşımda bulunan ve immün sistemin gözcüleri olan “antijen sunan hücreler” (antigen presenting cells, APC) patojenle ilk karşılaşan ve onun “yabancı” olduğunu tanımlayan hücre grubudur. Antijen sunan hücreler yabancı olduğunu tanımladıkları antijenle birlikte en yakın lenf noduna gelerek burada antijeni T lenfositlerine sunar. APC içine endositozla alınan antijen, hücre içinde bir takım işlemlerden geçtikten sonra membranda yer alan “Major Histocompatibility Complex” (MHC) molekülü içinde yer alan bir kovukta T hücrelerine sunulur. MHC molekülü içindeki antijen, spesifik T hücre reseptörüne (TCR) bağlanır. Bu bağlanma T lenfositlerin aktivasyonu için gerekli, ancak yeterli değildir. Aktivasyon için mutlak suretle ko-stimülatör molekül ile T lenfositlerde bulunan reseptörün de bağlanması gereklidir. Aktivasyon sonrası sitokinler salgınır. Bu sitokinler aracılığıyla T lenfositler olgunlaşır, efektör T lenfositlere dönüşürler (Şekil 1). Efektör yardımcı T lenfositleri salgıladıkları sitokinlere göre Th1 ve Th2 olarak farklılık gösterir. Th1 lenfositler, interferon gama (IFN- γ), interlökin-2 (IL-2) üretir. Th2 lenfositler ise IL-4, IL-5 ve IL-10 üretir. Adjuvanların immunolojik aktiviteleri

hangi sitokinleri uyardıklarına bağlı olarak değişir. Ancak enfeksiyon hastalıklarından korunmada istenilen Th1 yanlı bir immünitedir (hüresel immünite). Alüminyum içeren adjuvanlar ise oluşacak immün yanıtı Th2 benzeri yanıtı (hümorale immünite) yönlendirerek IgA, IgE, de dahil olmak üzere antikor yapımını stimüle eder¹.

Özetle immün yanıtın başlatılmasında dört kritik nokta ve dört sinyal önemlidir. Sinyal 0 antijenin tanınması ve antijen sunan hücrelerin aktivasyonu, sinyal 1 antijenin antijen sunan hücreler tarafından oluşturulan MHC aracılığıyla T lenfositlerine sunulması, sinyal 2 ko-stimülasyon moleküllerinin oluşumu, sinyal 3 ise sitokin salgılanmasıdır. Adjuvanlar bu dört kritik sinyalden birine veya birkaçına etki ederek, yani antijen sunan hücreler tarafından antijenin alınımını, işlenmesini ve sunumunu etkileyerek çalışabilirler^{7,8}.

Mineral tuzları

Güvenliği ve etkinliği iyi bilinen alüminyum tuzları, alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat 1920’li yıllardan günümüze aşılarda kullanılan



Şekil 1. Doğal ve adaptif immünite arasındaki ilişki.

tek adjuvanlar olmuştur⁹. Alüminyumlu bileşiklerin adjuvan etki göstermesi için antijen ile alüminyum bileşikleri arasında fiziksel temasın olması yani antijenlerin alüminyum moleküllerine adsorbe olması gereklidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) difteri, tetanoz aşılarında toksoid antijenlerin en az %80'inin alüminyum adjuvanlar tarafından adsorbe olmasını önermektedir¹⁰. Proteinlerin (difteri, tetanoz toksoid antijenlerinin) alüminyum tuzlarına adsorpsiyonları, daha yeni anlaşılmış karmaşık bir süreçtir. Proteinler alüminyum adjuvanlara temelde iki mekanizmayla tutunur. En sık kullanılan mekanizma elektrostatik etkiye dayanır. Proteinler elektrostatik etki ile pozitif yüklü alüminyum hidroksite adsorbe olurlar. İkinci mekanizma "ligand exchange"dir. Protein ile alüminyum tuzları arasında hidroksil ve fosfat grupları değiştirilir. Örneğin proteinlerin hidroksil grubu ile alüminyum fosfatın fosfatı değiştirilerek bir bağlanma sağlanır. Bu tür bağlantı ayrıca alüminyum hidroksit ile fosfat grubu içeren proteinler arasında da gösterilmiştir^{11,12}.

Alüminyum tuzlarının nasıl adjuvan etki gösterdiği tam olarak bilinmemektedir. Antijenin enjeksiyon yerinde depolanmasına yol açarak yavaş ve sürekli salınım sağlayarak antikor yapımını stimüle ettiği düşünülmektedir. Ancak antijenlerin çoğunun intertisyel sıvıyla karşılaşır karşılaşmaz alüminyumdan ayrıldıklarının gösterilmesi yavaş ve sürekli salınımın o kadar etkili olmayabileceğini düşündürmektedir. Alüminyum tuzları enjeksiyon yerinde yüksek konsantrasyonda antijen olmasına ve böylece antijenin APC tarafından alınımının (endositozun) artmasına yol açmaktadır. Ayrıca alüminyum bileşikleri doğrudan veya dolaylı yollarla dendritik hücrelerin (DH) stimülasyonu, kompleman aktivasyonu ya da kemokin salınımını uyularak da etki etmektedir¹³.

Alüminyum adjuvanları için önemli bir problem, kullanımlarının nötralizan antikor üretimi gerektiren bakteriyel ve viral aşılarda sınırlı olmasıdır. Alüminyum tuzlarıyla yapılan ilk çalışmalarda, alüminyum bileşiklerinin hümmoral immün yanıt oluşturmada (IgE üretimi dahil) oldukça başarılı olmalarına karşılık, hümmoral immün yanıtı (örneğin gecikmiş tip hipersensitivite) stimüle edemedikleri bulunmuştur. Son yıllardaki çalışmalarda da alüminyum adjuvanlarının hümmoral immün yanıtı uyardığı; IL-4, IL-5 ve B lenfositlerden IgG1, IgE üretimlerinin stimüle olduğu buna karşılık

hümmoral immün cevabın ise uyarılamadığı; interferon gama (IF- γ) ve IgG2 üretimlerinin artmadığı tespit edilmiştir. Bu durum özellikle yeni geliştirilmeye çalışılan, dünyadaki en önemli üç ölüm nedeni olarak kabul edilen HIV, tüberküloz ve sıtma aşıları gibi Th1 tip immün yanıtı bağımlı aşılarda için çok önemli bir problemdir¹⁴.

Alüminyuma adsorbe antijenler dendritik hücreler tarafından daha etkili bir şekilde alınır. Sokolovska ve arkadaşları⁸ fare dendritik hücreleri ile yaptıkları çalışmada alüminyum adjuvanlarının direkt olarak DH'leri aktive ettiklerini göstermiştir. Çalışma sonucunda alüminyumlu adjuvanların doğrudan antijenlerin T hücrelerine sunumlarını (sinyal 1), CD86 gibi ko-stimülatör moleküllerin DH'ler üzerindeki ekspresyonlarını (sinyal 2) ve DH'ler tarafından IL-1 β ve IL-18 salınımını (sinyal 3) arttırdıkları gösterilmiştir⁸.

Alüminyum adjuvanlarının en önemli yan etkisi enjeksiyon yerinde yerel granülom oluşturmalarıdır. Bu durum özellikle aşının intramusküler yerine intradermal ya da subkutan uygulanması sonucunda gelişir. Yerel ağrı, enflamasyon, şişlik, enjeksiyon yerinde ülser ve nekroz da görülebilir. Diğer önemli yan etkileri, artmış IgE yapımı ile alerjiye eğilim ve potansiyel nörotoksisiteye yol açabilmesidir³. Normalde alüminyum vücuttan böbrekler yoluyla atılır. Böbrek fonksiyon bozukluklarında alüminyum vücutta birikir. Yüksek alüminyum düzeyleri özellikle beyin ve kemik dokularını etkiler, fatal nörolojik sendrom ya da diyaliz ilişkili demansa yol açabilir. Alüminyum intoksikasyonu amiyotrofik lateral skleroz ve Alzheimer hastalığı ile de ilişkili bulunmuştur³.

Alternatif mineral tuzları olarak magnezyum hidroksit [Mg(OH)₂], çinko sulfat [ZnSO₄], kalsiyum fosfat [Ca₃(PO₄)₂] ile demir ve zirkonyum tuzları kullanılmaktadır. Örneğin kalsiyum fosfat bazı Difteri-Boğmaca-Tetanoz aşılarında adjuvan olarak kullanılır^{15,16}. Vücudun normal yapısında bulunduğu için diğer adjuvanlara göre daha iyi absorbe olur ve daha iyi tolere edilir. Antijeni çok iyi hapseder ve yavaş salımına yol açar. Ayrıca daha fazla IgG ve daha az IgE antikor yapımına yol açar.

Tensoaktif bileşikler (Saponinler)

Saponinler bitkilerde, bazı ilkel deniz canlılarında ve bakterilerde bulunan steroid ya da triterpenoid glikozidlerdir. Doğada bol miktarda bulunurlar.

Triterpenoid saponinler soya fasülyesi, fasülye, bezelye, çay, ıspanak, şeker pancarı, meyankökü, ayçiçeği, at kestanesi ve ginseng içinde, steroid saponinler ise yulaf, dolmalık biber, patlıcan, domates çekirdeği, soğan, kuşkonmaz, tatlı patates, ginseng içinde gösterilmiştir¹⁷.

Hidrofobik bir nükleus ve buna bağlı karbonhidrat zincirleri içerir. Saponin içeren adjuvanlar hem hücrel hem de hümorale immüniteyi stimüle ederler. Adjuvan etki için düşük doz yeterlidir¹⁷. Saponinler aynı zamanda CD8(+) sitotoksik lenfosit cevabını artırır, mukozal antijenlere karşı oluşan immün yanıtı güçlendirir. Ancak yüzey aktif ajanlar olduklarından, in vitro çalışmalarda hemolize yol açtıkları tespit edilmiştir. Saponin içeren çok çeşitli adjuvan bulunmaktadır.

Quillaja saponaria

Bir Güney Amerika ağacı olan Quillaja saponaria Molina'nın kabuğundan elde edilen öz suyudur. Uzun yıllardan beri veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Bu ağaç kabuğu ekstresinin çoğu komponenti adjuvan etki göstermektedir. Genel olarak immün hücre proliferasyonuna ve artmış antikor oluşumuna yol açar. Quillaja saponinlerinin mitojenik etkiye sahip olduklarını ve bu yolla T ve B hücre proliferasyonuna neden olduklarını gösteren çalışmalar vardır¹⁷.

Quil A, Quillaja saponaria'dan elde edilen doğal bir üründür ve 23 çeşitten fazla saponin içerir. Uzun zamandır veteriner hekimlikte başarıyla kullanılmasına karşılık insanlar için oldukça toksik bir maddedir⁴. Ağır yerel reaksiyonlar ve granülom oluşturmasının yanı sıra eritrosit membranındaki kolesterolere etki ederek ağır hemolize yol açar¹⁷.

QS21, Quil A'dan ters faz kromatografi yöntemi ile damıtılarak elde edilir. QS-21 alüminyum adjuvanlarına alternatif olarak güçlü sellüler yanıt oluşturmak için geliştirilmiştir. Th1 sitokinlerini (IL-2, IFN- γ) ve IgG2a antikorlarını stimüle eder¹⁸. HIV ve DNA aşılı için adjuvan olarak denenmiştir. Hem mukozal hem de sistemik immünite oluşturmak için kullanılmıştır¹⁸.

Sonuç olarak toksisitelerinin yüksek olması, hemolitik etkileri ve kararlı bir kimyasal yapı göstermemeleri nedeniyle tüm Quillaja saponinleri halen insanlarda kullanım için uygun değildir. Ancak kanser aşılı gibi yüksek

toksisitenin kabul edilebileceği durumlarda, düşük dozlarda ya da diğer adjuvanlarla birlikte kullanılmaları yönünde çalışmalar devam etmektedir.

Ginseng

Geleneksel Çin tıbbında kullanılan saponin içeren bir bitkidir. Saponinler ginseng bitkisinin köklerinden elde edilir¹⁷. Ginseng ekstresinin insanlarda ve hayvanlarda fagositik hücreler, lenfositler ve antikor üretimi üzerinde düzenleyici etkileri olduğu pek çok kez bildirilmiştir. Wu ve arkadaşları¹⁹ düşük konsantrasyonda ginseng ekstresinin insanlara verildiğinde kanda fitohemaglutinine karşı artmış lenfosit proliferasyonuna yol açtığını, ancak yüksek konsantrasyonlarda bu etkinin baskılandığını göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada sekiz hafta süreyle günde iki kez ağızdan 100 mg sıvı ginseng ekstresi ya da standart ginseng ekstresi (G115) verilen insanlarda, lökositlerde fagositoz aktivitesinde ve intraselüler öldürmede anlamlı bir artış tespit edilmiştir²⁰. Bu ve benzeri çalışmalarda ginsengin insan ve hayvanlarda immünomodülatör etkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak tüm bu çalışmalar henüz deneme aşamasındadır ve insanlar için aşı adjuvanı olarak kullanılmaları onaylanmamıştır.

ISCOM® (immunostimulating complex)

Antijen, kolesterol, fosfolipid ve saponinden (Quil A) oluşan, 40 nm büyüklüğünde, kafes benzeri moleküler yapısı olan bileşiklerdir. Kolesterol, fosfolipid ve saponin birbirlerine hidrofobik bağlarla tutunur. Lipozomlardan daha rijid, stabil yapıları vardır²¹. ISCOM® içeren aşılıların çeşitli hayvan modellerinde (hindi, kedi, köpek, koyun, domuz, fok, inek ve at) hem hücrel hem de hümorale immün cevabı arttırdıkları bildirilmiştir. ISCOM® içerisinde saponin kullanımı adjuvan etkiyi artırır, buna karşılık saponinlerin yan etkileri daha az görülür. HIV, enfluenza virüs, EBV, HSV gibi aşı çalışmalarında denenmektedir. Hayvanlarda görülen influenzaya karşı üretilen bir aşı 1988'de İsveç'te kullanılmıştır^{2,17}.

ISCOMATRIX® adjuvanı ise kolesterol, fosfolipid ve saponinden (Quil A) oluşur. Yapısı ISCOM'a benzer ancak antijen içermez²¹. Hayvanlarda mukozal immünite için denenmiş ve iyi mukozal IgA yanıtları alınmıştır. Ancak

ISCOM® hem hücresel hem de hümorale tip yanıt oluştururken ISCOMATRIX® sadece hümorale tip immün yanıt oluşturur²². Hayvan deneylerinde ve son zamanlarda insan çalışmalarında denenmiş; güvenilir ve etkin bulunmuştur. Hümorale immün cevabın gücünü, hızını ve etki süresini arttırdığı ayrıca bu etkiler için gerekli antijen dozunu da düşürdüğü tespit edilmiştir²². Bu özellikleri nedeniyle hızlı immün cevap gerektiren durumlarda ya da her bir antijen dozunun düşük olması gereken kombine aşılarda tercih edilebilecek bir adjuvandır²². İnsanlarda kullanımı ile ilgili çalışmalar halen sürmektedir.

Mikroorganizma türevli adjuvanlar

Bakteriler ya da mantarlar immünostimulan kapasiteleri nedeniyle adjuvan olarak kullanılabilir. Ancak mikroorganizmaların bir bütün olarak adjuvan olarak kullanılması, insanlar için çok toksik olduğundan bu mümkün değildir. Bakteri hücre duvarı ve lipopolisakkaritler (LPS) antijen olarak güçlü immünojen olmamalarına rağmen immün cevabı güçlendirebilir, adjuvan etkisi gösterebilirler. Bu adjuvan etkilerini APC üzerinde bulunan "Toll-like receptor"leri aktive ederek gerçekleştirirler. Bu reseptörler yabancı bir antijenle karşılaştığında, konakta immün yanıtı başlatan sinyallerin kaynak noktasıdır³.

MDP (Muramil dipeptid)

Muramil dipeptid (MDP) de denilen N-asetil muramil-L-alanil-D-izoglutamin mikroorganizmaların adjuvan etkisinden sorumlu temel parçasıdır³. MDP yalnız başına kullanıldığında hümorale immüniteyi indüklerken, lipozomlarla ya da gliserol ile birlikte kullanıldığında güçlü hücresel immünite stimulanıdır^{3,23}.

Lipopolisakkaritler & Monofosforil lipid A (MPL)

Gram negatif bakteri hücre duvarından elde edilen bir diğer önemli adjuvan ise lipopolisakkaritlerdir. Lipid A, adjuvan etkiden sorumlu kısımdır. Yüksek pH'lı ortamlarda lipid A hidrolize olur ve monofosforil lipid A (MPL) oluşur. MPL, lipid A kadar etkili ancak ondan daha az toksik bir adjuvandır³. Salmonella minnesota bakterisinin LPS'den elde edilir. IL-2 ve IFN- γ sentezini ve salınımını artırarak hücresel immün cevabı uyardığı bildirilmiştir².

MPL genellikle lipozomlar, emülsiyonlar, alüminyum veya QS21 ile birlikte formüle edilmiştir. Hemodializ hastaları gibi renal hastalığı olanlarda,

yaşlılarda, immün komprezize hastalarda ya da sağlıklı ancak rutin aşılarla cevap vermeyen hasta popülasyonunda hepatit B profilaksisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş ve yeni onay almış olan Fendrix® aşısı adjuvan olarak MPL ve alüminyum içermektedir¹. Aşı yüksek risk grubu insanlarda diğer lisanslı aşılarla oranla daha hızlı, güçlü ve uzun süreli immün yanıt oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda güvenilir, hızlı, immünojenik ve iyi tolere edilebilir bulunmuştur. En sık yan etkisi yerel olarak görülen ağrıdır²⁴⁻²⁶. Kanada'da lisans almış olan melanoma aşısında da MPL adjuvan olarak kullanılmaktadır². Avrupa'da kullanılmakta olan bazı allerji aşılarında MPL'nin adjuvan olarak kullanıldığı bilinmektedir²⁷.

Emülsiyonlar

Alüminyumdan sonra insan ve hayvanlarda en sık kullanılan adjuvanlardır. Bu grup yağ içinde su (water in oil, W/O; parafin içinde sıvı antijen) veya su içinde yağ (oil in water, O/W) emülsiyonları içerir. Enjeksiyon yerinde depo oluşturma ve buradan antijenin yavaş salınımı yolu ile plazma hücrelerinde antikor üretimini stimüle ederek etki ettikleri düşünülmektedir³.

Freund adjuvanı

Freund adjuvanı W/O emülsiyonlarına bir örnektir. Tamamlanmış Freund adjuvanı (Freund's Complete Adjuvant, FCA) mineral yağı (marco52), Arlacel A (mannitol ve oleik asit esteri) ve 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ölü Mycobacterium tuberculosis içerirken; tamamlanmamış Freund adjuvanı (Freund's Incomplete Adjuvant, FIA) Mycobacterium tuberculosis içermez. Yavaş ve sürekli antijen salınımı ve mononükleer hücre akümüasyonu ve antijenin lenf yoluyla lenf nodu ve dalak gibi uzak yerlere erişimini sağlayarak adjuvan etkisi gösterdiği düşünülmektedir⁷. 1944 yılında veteriner hekimler tarafından influenza aşısında, 1951 yılında ise askerlere uygulanan Salk aşısında kullanılmıştır. Ancak yüksek reaktogenitesi nedeniyle (granulom, apse, artrit, amiloidosis, allerjik reaksiyonlar gibi) insanlarda kullanımından vazgeçilmiştir. Bununla birlikte yan etkilerine karşı yüksek tolerans gösterilebilecek son dönem hastalıklarda (kanser gibi) kullanılabilirler⁷. Enjeksiyon yerinde ülser, enflamasyon, granulom sık görülen yan etkilerdir. Tavşan ve farelerde subkutan ya da intravenöz FCA kullanımı sonrası enflamasyon, endurasyon

ve akciğerler, karaciğer, böbrekler, kalp, lenf nodları ve iskelet kaslarında yaygın granülomlar görülmüştür⁷. Bir diğer W/O emülsiyon adjuvanı Montanide'dir. HIV, sıtma, meme kanseri ve diğer kanserler için geliştirilmeye çalışılan aşılarda denenmektedir^{28,29}.

MF59 O/W (Squalen)

Squalen, bitkiler tarafından üretilen ve çoğu yiyecekte bulunan bir triterpenoid hidrokarbondur (C₃₀H₅₀). İnsanlarda da kolesterol ve steroid hormonların prekürsörü olarak bol miktarda üretilir. Karaciğer ve deride üretilen squalen, kanda çok düşük dansiteli ve düşük dansiteli lipoproteinler ile taşınır ve sebase bezlerden sekrete edilir³⁰. İnsan vücudunda doğal olarak bulunması ve biyoparçalanabilir olması nedeniyle adjuvanların çoğunun yapısında vardır.

1980'li yıllarda yan etkisi çok olan FCA yerine, squalen içeren "syntex" adlı bir adjuvan formülü geliştirilmiştir. Muramil dipeptid ve non-iyonik bir surfaktan olan L121 de içeren syntex'in de insanlarda kullanımının oldukça toksik olduğunun görülmesi üzerine, bir squalen O/W emülsiyonu olan MF59 geliştirilmiştir.

Daha az toksik olan MF59, küçük hayvan modellerinde influenza aşısının etkinliğini arttırmıştır. Daha sonra babunlarda yapılan deneylerde hepatit B aşısı için alüminyumdan daha etkili bir adjuvan olduğu gösterilmiştir³¹. Yaşlılarda yapılan klinik çalışmalarda MF59 adjuvanlı influenza aşısının (FluadTM) güvenilirliği ve etkinliği kanıtlanmış, aşı 1997'den beri pek çok Avrupa ülkesinde lisans almıştır. 20 milyon dozdan fazla uygulanmış olan bu aşı ciddi yan etkilere neden olmamıştır³². MF59 adjuvanlı influenza aşısının diğer aşılara göre pandemi yapan influenza suşlarına karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir². Bir başka klinik çalışmada MF59 adjuvanlı hepatit B aşısının alüminyum adjuvanlı aşılara oranla 100 kat daha potent olduğu tespit edilmiştir³³. Yenidoğanlarda yapılan HIV aşısı çalışmasında MF59 güvenilir ve iyi tolere edilebilir bulunmuştur³⁴. Özetlenecek olursa MF59, insanlarda iyi tolere edilebilen, güvenilir ve etkin bir aşı adjuvanı gibi görülmektedir.

Sitokinler

İmmün sistemi uyarıcı etkilerinden dolayı pekçok sitokin adjuvan olarak denenmektedir. Ancak protein yapısında olmaları nedeniyle stabilite problemleri vardır ve yarı ömürleri

kısadır. Ayrıca üretimleri pahalıdır ve hepsi doz bağımlı toksisite gösterir². Sitokinler içinde en sık kullanılan granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)'dür. Primer immün yanıtı APC'leri aktive ederek güçlendirir. Pratikte adjuvan olarak kullanımları, tekrar doz gerektirmeleri ve sistemik toksisiteleri nedeniyle sınırlıdır.

IL-12

IL-12 hücrel immün cevabın başlatılması ve regülasyonunda anahtar rolü olan bir sitokindir. Bakteriler ve intrasellüler parazitlere cevap olarak makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve B lenfositler tarafından salgılanır. Bir dizi zincirleme reaksiyon sonucunda IL-12 salgılanması yardımcı T hücrelerinden IFN- γ ve IFN- α üretimine neden olur³⁵.

Farklılaşmamış T hücrelerinin Th1 ve sitotoksik T hücrelerine farklılaşmasında IL-12'nin önemli rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle IL-12 öncelikle HIV pozitif hastaların tedavisinde denenmiştir. İmmün özelliklerinden ötürü, özellikle hücrel immün cevap istenen aşılarda adjuvan olarak denenmektedir. Farelerde DNA aşuları ile yapılan araştırmalardan (özellikle yeni tüberküloz aşuları) olumlu sonuçlar alınmaktadır³⁵.

Bunlarla birlikte IL-12'nin sistemik kullanımıyla ilgili çok sayıda toksik olay bildirilmiştir. 1995'de böbrek kanseri tedavisiyle ilgili bir çalışmada 10 hastada ciddi yan etkiler görülmüş, bunlardan bir tanesi bu nedenle ölmüştür. Bu nedenle çalışma iptal edilmiştir³⁶. Yan etkiler doz miktarı ve sıklığı ile ilişkili tespit edilmiştir. Yeni çalışmalar, özellikle kanser ve HIV tedavisi çalışmaları bu yüzden düşük dozlarda başlatılmakta ve zamanla doz arttırılmaktadır.

IL-12 intranasal uygulandığında daha az IFN- γ üretimine dolayısıyla daha az sistemik yan etkiye neden olmakla birlikte, yeterli adjuvan etki sağlamaktadır. Marinaro ve arkadaşları³⁷ kolera toksini ile IL-12'yi intranasal verdiklerinde, sadece kolera toksini verildiğinde oluşan humoral immün cevabın, hücrel immün cevaba kaydığını tespit etmişlerdir. Yine aynı grup IL-6, IL-12 ile tetanos toksoidini (TT) birlikte intranasal olarak kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada IL-12 ile TT birlikte verildiğinde sadece TT spesifik IgG ve IgA değil aynı zamanda mukozal s-IgA da artış saptanmıştır. IL-6 ve IL-12

birlikte kullanıldığında TT'ye karşı olan antikor üretimindeki artış saptanamamıştır³⁸. Buna benzer diğer çalışmalarda da s-IgA artışı IL-12 kullanıldığında sağlanmıştır. Bu bulgular IL-12'nin mukozal adjuvan olarak en umut verici bir sitokin olduğunu göstermektedir.

IL-15

IL-15, granülosit-koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör, IL-2,3,6,7 ve insan büyüme faktörünün de dahil olduğu sitokin ailesinin bir üyesidir. IL-15 pek çok hücre tipi üzerinde etkilidir. T hücrelerinin proliferasyonunu, sitokin üretimini artırır ve apoptozisten korur. Ayrıca T hücrelerinin hareketini ve kemotaksisini stimüle eder³⁵. B hücre proliferasyonuna neden olur. İmmünolojik hafıza gelişmesinde çok önemli rol oynar. Bu yüzden sistemik verilen IL-15 aşılama karşı gelişen sitotoksik T hücre cevabının hem şiddetini artırır hem de süresini uzatır³⁵.

Yayınlanmış bulgular immünojenlerle birlikte sistemik ya da mukozal IL-15 kullanımının daha güçlü hücrel ve humoral yanıt oluşturduğunu gösterir³⁵. GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-7 gibi sitokinler mukozal kullanıldıklarında sistemik toksisiteyi görülmektedir. Mukozal kullanımda pek çok çalışmada; örneğin cinsel yolla HIV bulaşmasını önlemek için mukozal sitotoksik T hücre ve antikor yapımını uyarma çalışmalarında adjuvan etkileri umut vericidir. Ayrıca vajinal HSV2 enfeksiyonu olanlara intravajinal rekombinant IL-15 uygulandığında HSV2 titrelerinde anlamlı düşüş saptanmıştır³⁹. Ancak yine de mukozal adjuvan olarak kullanılmaları için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Polisakkaritler

Compositae ailesinden bitkilerin köklerinden elde edilen bir karbonhidrat olan inülin parenteral olarak renal fonksiyon testlerinde kullanılan bir maddedir. Yüksek dozlarda fizyolojik diürez yapar. Lineer bir yapıya sahiptir ve fruktoz ve çok az miktarda glukozdan oluşur⁴⁰. Kendisi antijenik değildir ancak mikropartikül olarak kullanıldığında güçlü bir hücrel ve humoral adjuvandır^{3,40}.

Mikropartikül inülin (MPI) alternatif kompleman yolunu aktive ederek doğal immüniteyi uyarır². MPI difteri, tetanoz toksoidi, respiratuvar sinsitiyal virus, HPV E2 proteini, herpes virus 2

glikoprotein D, HbsAg, influenza hemagglütinin, Haemophilus influenzae, Plasmodium falciparum gibi pek çok antijen ile yapılan hayvan deneylerinde adjuvan olarak başarılı bulunmuştur^{3,40}. Hem hücrel hem de humoral immün yanıtı artırır. Ciddi sistemik veya yerel yan etkisi yoktur. Sadece çok yüksek dozlarda, subkutan kullanıldığında küçük granülömler gözlenmiştir. Bu diğer hücrel immün yanıt artırıcı adjuvanlar için alışılmadık bir durumdur. Vücutta basit şekerler olan fruktoz ve glukoz metabolize olur, bu yüzden alüminyum adjuvanlarında karşımıza çıkan güvenlik problemleri yoktur³.

İnülinler diğer adjuvanlarla birlikte kullanılabilir, bu sayede değişik oranlarda hücrel ve humoral immün yanıt elde edilebilir. Örneğin alüminyum hidroksit ile kombine formuna "algammulin" denir. Bir çalışmada algammulin bir tür deniz salyangozu antijeni olan Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) ile kullanılmış ve KLH' ya karşı sadece alüminyuma göre 17 kat fazla immün yanıt alınmıştır. Algammulin adjuvanı ile artmış hücrel immün yanıt, azalmış IgE tespit edilmiştir⁴¹.

İnülinlerin üretimleri doğal ve basittir, hiçbir toksik madde içermez. Hem hücrel hem de humoral immüniteyi güçlü bir şekilde uyarırlar. Çok az ve hafif yan etkileri vardır. Vücuttan zararsız, basit şekerler olarak atılır. Maliyet etkindirler. Bu nedenlerden dolayı inülin bazı maddelerin ideale yakın, güvenilir ve efektif adjuvanlar olduğu söylenebilir. İnsan aşılarda kullanım çalışmaları devam etmektedir.

Nükleik asitler

DNA'nın immünoestimulan etkisinin keşfiyle DNA-bazlı adjuvan araştırmaları başlamıştır. Ortasında CpG dinükleotidi bulunan altı deoksinükleotid uzunluğunda DNA molekülü bir CpG motifi olarak adlandırılır. CpG motifi bakteriyel DNA'da memeli DNA'sına göre 20 kat daha fazla bulunur. Bakteri hücrelerindeki bu sık tekrarlı CpG motifi memeli hücrelerindeki TLR'ler tarafından (innate immünite) yabancı ve tehlikeli olarak hemen tanınır ve immün sistem hücreleri tarafından interferonlar (α ve β) ve IL-12 salgılanır. Böylece hücrel immün yanıt uyarılırken allerjik cevap da baskılanır. Bu durum CpG motifi içeren DNA moleküllerinin terapötik uygulamalarda ve aşılarda adjuvan olarak kullanılabilmesinin bir göstergesidir^{42,43}.

DNA aşı vektörleri, immüno stimulan deoksinükleotidler (ODN) ve ODN-antijen konjugasyonları DNA aşılarda üzerinde en çok çalışılan üç yöntemdir. Bu üç yöntemin de ortak noktası non-metile CpG motifinin adjuvan olarak kullanılmasıdır. Daha çok kanser ve viral enfeksiyonlara karşı geliştirilmeye çalışılan DNA aşılarının içine CpG motifi içeren plazmid DNA zinciri eklemek, büyük hayvanlarda ve insanlarda yeterince etkili olmadığı kanıtlanmış olan bu tür aşılarda etkinliklerini önemli derecede arttırmıştır. Ancak yine de bu konuda ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Partikül antijen taşıma sistemleri

Bu grupta çok sayıda adjuvan vardır. Protein subünit ve DNA aşılarının taşınmasında kullanılırlar.

Lipozomlar

İki tabakalı lipidlerin oluşturduğu bir dış kabuk ve hidrofilik iç kompartmanı olan küresel yapılardır. Bu yapılar narkotiklerin lipid tabakasındaki etkilerini gözlemlemek için geliştirilmiş bir modelken antijen taşıma ve adjuvan özelliklerinin keşfedilmesiyle ilaç ve antijen taşınması ile gen tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Enfeksiyon ve otoimmün hastalık tedavisinde, kanser, deri hastalıklarında ve ayrıca astım ve artitte denenmiştir^{44,45}.

Yapısal özelliği sayesinde enkapsüle ettiği antijeni hızlı ekstrasellüler yıkımdan korur. Bu sayede gerekli antijen dozu azalır ve aşı etkinliği artar. Dış yapısına yerleştirilen doku spesifik antikolar ve ligandlar sayesinde doku hedefi sağlanabilir. Böylece aşı yan etki sıklığı azalır. Bu özellikle ciddi yan etkileri olan kanser aşılarda için önemlidir^{45,46}.

Lipozomlar, DNA ve protein ile birlikte "codelivery" sistemi olarak kullanılabilir. DNA sayesinde MHC tip1, protein sayesinde MHC tip2 prezentasyonu olur ve hem CD8(+) hem de CD4(+) hücreleri aktive olur. Bununla birlikte bu sistemin üretimi, stabilitesi ve kalitesi şu an için aşılması gereken en önemli problemler olarak karşımızda durmaktadır⁴⁶.

Virozomlar

İlk kez 1975 yılında Almeida ve arkadaşları⁴⁷ tarafından tanımlanmıştır. Genel ilke genetik materyal içermeyen virus partiküllerinin (viral zarf), antijenleri hedef dokulara taşımak için

kullanılmasıdır. Zarflı virusların dış membranını virusun genetik materyalinden birtakım yöntemlerle ayırarak lipozom benzeri bir yapı oluşturulur. Oluşan yapı viral genom içermez dolayısıyla enfeksiyon riski yoktur. Ancak viral adezyon molekülleri bulunduğundan immün sistem tarafından kolayca tanınır. APC'ler tarafından endositozla hücre içine alınır. Burada virozom ve endozomal membranların füzyonu sonucu hemaglutinin ve aşı antijenleri ortaya çıkar⁴⁴. Hemaglutininin sitotoksik T hücre aktivasyonuna, aşı antijenleri ise yardımcı T hücre aktivasyonuna neden olur. Bunlardan başka virozomlar direkt olarak B lenfositleri aktive ederek IgG sentezinde artışa neden olabilir. Buna virozomların B lenfositler üzerindeki "süperstimülasyon" etkisi denir⁴⁸. Oluşan immün yanıt hızlı ve güçlüdür. Virozomlar sadece elde edildikleri virüslere karşı immünite oluşturmak için kullanılmaz. Aynı zamanda pekçok diğer aşı antijeni, ilaç, nükleik asit için taşıyıcı sistemlerdir⁴⁴.

Halen lisanslı olarak aşılarda kullanılan tek virozom influenza virusundan elde edilen virozomdur (Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes -IRIVs)⁴⁶. İnfluenza virüsünden başka pekçok zarflı virus de örneğin Sendai virus, Epstein-Barr virus, veziküler stomatitis virüsü, Sindbis virus, Herpes simplex virus, Newcastle hastalığı virüsü virozom oluşturmak için denenmektedir. IRIV influenza virüs hemaglutinin proteini (HA) taşıdığından hedef hücrelerde hem yapışma hem de füzyon özelliklerine sahiptir. Dolayısıyla üretildikleri influenza virüsüne karşı da taşıdıkları yabancı antijenler için de iyi bir taşıyıcı sistemdir.

Şu anda lisanslı olarak kullanılan iki virozomal aşı vardır. Bunlardan birincisi hepatit A aşısı olan Epaxal® olup 1996'da lisans alan ilk virozomal aşıdır. Formalinle inaktive edilmiş pürüfiye Hepatit A (RG-SB) ve IRIV içerir. Klinik çalışmalar aşının iyi tolere edildiğini ve yirmi yıla yakın koruyuculuk sağladığını ortaya koymuştur⁴⁹. İkinci aşı ise trivalan-IRIV influenza aşısı olan Inflexal V® olup 1997'de lisans almıştır. Klinik çalışmalar tüm yaş gruplarında iyi tolere edildiğini ve immünojenik olduğunu ortaya koymuştur⁴⁹. Bu iki aşının başarısı diğer virozomal aşılarda geliştirilmesi için motivasyon kaynağı olmuştur. Hem hücresel hem de humoral immün sistemi efektif şekilde uyarılmaları sadece enfeksiyonlardan korunmada değil aynı zamanda kronik enfeksiyonların tedavisinde ve kanser tedavisinde de kullanılmalarını gündeme getirmiştir. Bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir.

Virus-benzeri partiküller

Virus-benzeri partiküller (Virus Like Particules-VLPs) inert, boş viral kapsid ya da kapsid proteinleridir. DNA yada RNA içermezler ama viral yapı korunmuştur. Bu sayede viral enfeksiyon taklit edilebilir. VLPs antijenleri immün sistem tarafından kolayca tanınır ve güçlü bir immün cevap gelişir. Viruslardan ya da non-viral kaynaklardan genetik mühendisliği ile rekombinant teknoloji kullanılarak üretilirler. Parenteral, mukozal ya da transkütanöz kullanılabilir^{50,51}.

Aşılama tarihinde konuyla ilgili en önemli VLP, 15 yıldır kullanılmakta olan rekombinant teknoloji ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* mantarlarından elde edilen Hepatit B yüzey antijenleridir (HbsAg). Son olarak FDA, 2006 yılında alüminyum adjuvanla miks olarak kullanılan VLP içeren insan papilloma virus (HPV) aşısına onay vermiştir.

Kronik hepatit B tedavisinde de terapötik aşı olarak VLPs denenmektedir. Fareler üzerinde yapılan prelinik deneylerde diğer aşılarla oranla yüksek immünojenite, artmış hücresel ve humoral (IgG2a) cevap tespit edilmiştir. NASVAC adı altında yürütülen bir çalışmada insanlarda hepatit B viral yüzey (HbsAg) ve kor antijenleri (HbcAg) birlikte nazal olarak uygulanmaktadır. Henüz bitmiş olan çift kör, randomize plasebo kontrollü faz 1 çalışması olan bu çalışma aşının güvenilirliğini ve immünojenitesini (çok düşük doz; 50 µg kullanılmış olmasına rağmen) ortaya koymuştur³.

Polimerik mikrosferler

Partiküllü ve polimerik sistemler içinde poli (DL-lactide-co-glycolide) mikrosferler uzun yıllardır kapsamlı şekilde incelenmiştir. Nanometre-mikrometre boyutlarında biyoyumlu ve biyoparçalanabilir, sferik (yuvarlak) yapıda maddelerdir. Değişik türde pekçok antijeni adsorbe edip taşıyabilirler. Antijen konsantrasyonuna göre onun salınma hızını ayarlayarak parçalanmasını kontrol edebilirler^{3,52}.

Polilaktid ko-glikolid (PLG) mikropartikülü en sık kullanılan polimerik mikrosferlerin başıda gelir. PLG uzun yıllardır cerrahi dikiş materyallerinde ve kontrollü salınım ilaç sistemlerinde kullanılmaktadır². Katyonik ya da anyonik PLG preparatları ile çok çeşitli türde (plazmid DNA, rekombinant protein, immünoestimulan oligonükleotidler) antijen adsorbe edilip APC'lere sunulur. Bu sayede

alüminyuma oranla çok daha güçlü immün yanıt elde edilir. Alüminyumun aksine hayvanlarda yapılan deneylerde sitotoksik T hücre yanıtı da gösterilmiştir^{2,53}. Özellikle DNA aşıları için önemli bir adjuvandır.

Nano-beads

Bunlar solid, inert üzerlerinde antijen adsorbe edilmiş taneciklerdir. Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda çapları 1 µm ve <0.5 µm olan partiküllerin CD8(+) T hücrelerini stimüle ettikleri gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise nanometrik büyüklükteki (0.04-0.05 µm) taneciklerin hem humoral hem de CD8(+) immün cevabı arttırdığı bildirilmiştir⁵⁴.

Nano-bead adjuvanlar hayvanlarda yapılan çalışmalarda alüminyumun aksine humoral yanıtın yanında daha güçlü hücresel yanıt da oluşturmuştur. Dolayısıyla nano-bead adjuvanlar intrasellüler patojenlerin hem profilaksisinde hem de tedavisinde insanlarda ve hayvanlarda kullanılabilir. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir⁵⁴.

Toll-like reseptörler

Toll-like reseptörler transmembran sinyal proteinleridir. Mikroorganizmalara karşı gelişen adaptif immünitinin uyarılması ve regülasyonunda temel bir rol oynar. Enfeksiyona karşı immün yanıtın erken evrelerinde yaşamsal rolü vardır^{55,56}. İlk kez bir meyva sineği olan *Drosophila melanogaster*'de tespit edilmiştir. Fungal invazyonu tespit eden ve buna yönelik immün cevabı başlatan reseptör olarak tanımlanmıştır. Daha sonra insanlarda, hayvanlarda hatta bitkilerde aynı aileden reseptörler tespit edilmiştir. Şu ana kadar insanlarda 10 tip TLR bulunmuştur^{3,55}. Tablo III'de TLR ligandları (PRR) ve ilgili adjuvanlar görülmektedir.

TLR'ler mikrobik invazyonu farkedene ve ona karşı geliştirilecek olan immün yanıtı kontrol eden temel oluşumlardır. Bu yüzden bazı bilim insanları onlar için "immün sistemin koçu" tanımını kullanmıştır. İmmün yanıt için bu kadar kritik öneme sahip bir reseptörün bulunması aşı çalışmalarında adjuvan olarak kullanımını gündeme getirmiştir. TLR için doğal ya da sentetik agonistler geliştirilmiştir. Daha da ilginç kullanılan pek çok adjuvan ve immünoestimulanın gerçekte TLR agonisti olduğu bulunmuştur; non-metile bakteriyel/

Tablo III. Toll-like reseptörler, ligandları ve ilişkili adjuvanlar.

TLR	Ligand	Adjuvan
TLR1	Bakteriyel/mikoplazmal lipopeptidler (TLR2)	E.coli tip 2 enterotoksin, triiasile lipopeptidler
TLR2	Peptidoglikan, lipoteikoik asit	MDP türevleri, E.coli tip2 enterotoksin, lipopentapeptid türevleri
TLR3	Bakteriyel ve viral dsRNA	Poliinosinik asit
TLR4	Konak hsp60/70, LPS, RSV füzyon proteini, MMTV zarf proteini	MDP türevleri, sentetik MPL
TLR5	Flajellin	Flajellin füzyon proteinleri
TLR6	Bakteriyel/mikoplazmal lipopeptidler (TLR2)	Diasile lipopeptidler(makrofaj aktive edici lipopeptid-2)
TLR7	Bakteriyel, viral ve konak ssRNA	İmiquimod, R-848, ssRNA
TLR8	Bakteriyel, viral ve konak ssRNA	R-848, ssRNA
TLR9	Bakteriyel ve viral CpG DNA, DNA-IgG kompleksleri, malarial hemozoin	CpG DNA
TLR10	-	-

MDP: Muramil dipeptid, dsRNA: çift sarmallı RNA, hsp60/70: sıcak şok proteini 60/70, LPS: lipopolisakarid, RSV: Respiratuar sinsityal virus, MMTV: Mouse mammary tumor virus, ssRNA: tek sarmallı RNA.

viral CpG DNA ve oligonükleotid (TLR9), LPS'ler ve türevleri (TLR4), lipopeptidler ve tripalitoil-S-gliseril sistein (TLR2), imidazokinolon (TLR7/TLR8). TLR'ler üzerinde pek çok araştırma devam etmektedir. Gelecek on yılda TLR'ler adjuvan olarak daha sık kullanılacak gibi görünmektedir. Bununla birlikte TLR'lerin overstimulasyonu FCA'lar gibi ciddi toksik etkilere neden olmaktadır. Adjuvan dozajı ve uygulama yollarının daha iyi anlaşılmasıyla bu problemler ortadan kalkacak gibi görünmektedir^{7,56,57}.

Adjuvanların tedavi amaçlı aşılarda kullanımı

Yeni geliştirilen adjuvanlar yüksek etkinlikleri nedeniyle tedavi aşılarının gelişimine büyük katkı sağlamıştır. Enfeksiyonu önlemenin yanında varolan hastalığın tedavisinde aşı kullanımı tıpta bir devrimdir. Halen tedavi edici aşı geliştirme çalışmalarının yapıldığı hastalıklar kronik enfeksiyon hastalıkları (HSV, HIV, HCV, HBV, H. pylori), malignensiler (melanoma, meme kanseri, kolon kanseri) ve allerjik ya da otoimmün (multipl skleroz, tip1 diyabetes mellitus, romatoid artrit) hastalıklardır.

Bu konuda önemli bir nokta özellikle tedavi edici aşı kanser tedavisi ya da hayatı tehdit eden bir enfeksiyonun tedavisi için geliştiriliyorsa, kullanılacak adjuvanın kabul edilebilir toksisitesi sağlıklı bir insanı aşlamak için geliştirilmiş aşıda kullanılan adjuvanın kabul edilebilir toksisitesinden yüksek olabilmektedir. Ancak bunu belirlemek için de klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Şu anda pek çok adjuvan (QS21, sitokinler gibi) terapötik aşılar için denenmektedir ve ilk sonuçlar oldukça cesaret vericidir.

Son yıllarda adjuvan geliştirilmesi ampirik yöntemlerden daha ayrıntılı ve bilimsel yöntemlere kaymıştır. Pek çok adjuvanın etki mekanizması artık bilinmektedir. Araştırmacılar aşılarda ihtiyacı olan adjuvanları kullanılan antijene, aşının etki mekanizmasına göre pekçok adjuvan arasından seçmektedir. Önümüzdeki yıllarda, geliştirilen adjuvanlar sayesinde "zor" enfeksiyonlardan korunmak ve tedavi aşılarının geliştirilmesi mümkün olabilecek gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Vogel FR, Hem SL. Immunologic adjuvants. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (eds). Vaccines (5th ed). Philadelphia: WB Saunders, 2008: 59-71.
2. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. Pharm Res 2002; 19: 715-728.
3. Aguilar JC, Rodriguez EG. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine 2007; 25: 3752-3762.

4. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54: 1-13.
5. Glennly AT, Pope CG, Waddington H, Wallace W. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J Path Bact* 1926; 29: 38-45.
6. Rock KL, Hearn A, Chen CJ, Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 231-246.
7. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 505-517.
8. Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 2007; 25: 4575-4585.
9. Baylor N, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine* 2002; 20 (Suppl): 18-23.
10. WHO. Immunological adjuvants. Geneva: World Health Organization; 1976.
11. Morefield GL, Jiang D, Romero-Mendez IZ, Geahlen RL, Hogenesch H, Hem SL. Effect of phosphorylation of ovalbumin on adsorption by aluminum-containing adjuvants and elution upon exposure to interstitial fluid. *Vaccine* 2005; 23: 1502-1506.
12. Iyer S, HogenEsch H, Hem SL. Relationship between the degree of antigen adsorption to aluminum hydroxide adjuvant in interstitial fluid and antibody production. *Vaccine* 2003; 21: 1219-1223.
13. HogenEsch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine* 2002; 20 (Suppl): 34-39.
14. Ada G. The immunology of vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA (eds). *Vaccines* (3rd ed). Philadelphia: WB Saunders, 1999: 28-39.
15. Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine* 1993; 11: 914-918.
16. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* 1995; 13: 1263-1276.
17. Rajput ZI, Hu S-H, Xiao C-W, Arijo AG. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 153-161.
18. Kensil CR, 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.
19. Wu S, Hua ZJ, Xiao YL, et al. Effect of ginsenoside on the 3H-TdR integration of human blood lymphocyte. *Chin Med J* 1991; 104: 399-401.
20. Scaglione F, Ferrara F, Dugnani S, Falchi M, Santoro G, Fraschini F. Immunomodulatory effects of two extracts of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Drugs Exp Clin Res* 1990; 16: 537-542.
21. Cox E, Verdonck F, Vanrompay D, Goddeeris B. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Vet Res* 2006; 37: 511-539.
22. Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 465-474.
23. Parant MA, Audibert FM, Chedid LA, et al. Immunostimulant activities of a lipophilic muramyl dipeptide derivative and of a desmuramyl peptidolipid analogue. *Infect Immun* 1980; 27: 826-830.
24. Thoelen S, Van Damme P, Mathei C, et al. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine* 1998; 16: 708-714.
25. Thoelen S, De Clercq N, Tornieport N. A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system. *Vaccine* 2001; 19: 2400-2403.
26. Tong NK, Beran J, Kee SA, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. *Kidney Int* 2005; 68: 2298-2303.
27. Wheeler AW, Marshall JS, Ulrich JT. A Th1-inducing adjuvant, MPL, enhances antibody profiles in experimental animals suggesting it has the potential to improve the efficacy of allergy vaccines. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 135-139.
28. Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: 232-241.
29. Tsuboi A, Oka Y, Nakajima H, et al. Wilms tumor gene WT-1 peptide-based immunotherapy induced a minimal response in a patient with advanced therapy-resistant multiple myeloma. *Int J Hematol* 2007; 86: 414-417.
30. Granner DK. Hormones of adrenal cortex. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds). *Harper's Biochemistry* (25th ed). Stanford, Conn: Appleton and Lang, 2000: 575-587.
31. Traquina P, Morandi M, Contorni M, Van Nest G. MF59 adjuvant enhances the antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen vaccine in primates. *J Infect Dis* 1996; 174: 1168-1175.
32. Del Giudice G, Fraga E, Bugarini R, et al. Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 1010-1013.
33. Heineman TC, Clements-Mann ML, Poland GA, et al. A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant. *Vaccine* 1999; 17: 2769-2778.
34. Cunningham CK, Wara DW, Kang M, et al. Safety of 2 recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope vaccines in neonates born to HIV-1-infected women. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 801-807.
35. Stevceva L, Moniuszko M, Ferrari MG. Utilizing IL-12, IL-15 and IL-7 as mucosal vaccine adjuvants. *Lett Drug Des Discov* 2006; 3: 586-592.
36. Cohen J. IL-12 deaths: explanation and a puzzle. *Science* 1995; 270: 908.
37. Marinaro M, Boyaka PN, Finkelman FD, et al. Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses. *J Exp Med* 1997; 185: 415-427.
38. Boyaka PN, Marinaro M, Jackson RJ, et al. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J Immunol* 1999; 162: 122-128.

39. Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol* 2005; 79: 4470-4478.
40. Petrovsky N. Novel human polysaccharide adjuvants with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl): 26-29.
41. Silva DG, Cooper PD, Petrovsky N. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 611-616.
42. Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens. *Cell Immunol* 1993; 147: 148-157.
43. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-549.
44. Glück R, Burri KG, Metcalfe I. Adjuvant and antigen delivery properties of virosomes. *Curr Drug Deliv* 2005; 2: 395-400.
45. Felnerova D, Viret JF, Glück R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 518-529.
46. Leserman L. Liposomes as protein carriers in immunology. *J Liposome Res* 2004; 14: 175-189.
47. Almeida JD, Edwards DC, Brand CM, Health TD. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* 1975; 2: 899-901.
48. Rott O, Charreire J, Cash E. Desensitization of the antigen receptor primes B cells for activation by superstimulatory influenza virus. *J Inflamm* 1995-1996; 46: 51-60.
49. Glück R, Metcalfe IC. New technology platforms in the development of vaccines for the future. *Vaccine* 2002; 20: 10-16.
50. Antonis AF, Bruschke CJ, Rueda P, et al. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine* 2006; 24: 5481-5490.
51. Young SL, Wilson M, Wilson S, Beagley KW, Ward V, Baird MA. Transcutaneous vaccination with virus-like particles. *Vaccine* 2006; 24: 5406-5412.
52. Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1991; 59: 2978-2983.
53. Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, Malyala P, Chesko J, O'Hagan DT. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. *Curr Drug Deliv* 2006; 3: 115-120.
54. Scheerlinck JP, Gloster S, Gamvrellis A, Mottram PL, Plebanski M. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant. *Vaccine* 2006; 24: 1124-1131.
55. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995.
56. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2: 947-950.
57. Thompson JM, Iwasaki A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 786-794.