

# MF59 佐剂的研究进展

李卓凡 综述, 李卫东<sup>△</sup> 审校

(中国医学科学院/北京协和医学院/医学生物学研究所, 昆明 650118)

**关键词:** MF59; 佐剂; 作用机制**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.035**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)18-2596-03

MF59 佐剂的研究始于 20 世纪 80 年代末期。在当时重组 DNA 背景下,许多新的蛋白质抗原都可以用于疫苗制备。Chiron 疫苗公司研制的 HBV 重组疫苗的成功尤其推动了这种微生物加铝佐剂的疫苗模式<sup>[1]</sup>。但 HBV 是 1 种特殊的,可以自发形成高免疫原性病毒样颗粒的抗原,而其他大多数重组抗原均是可溶解的单体,并且在和铝佐剂结合后只有很弱的免疫原性。这些抗原需要比铝佐剂效力更强的佐剂来获得保护性的免疫力,如弗氏佐剂。因此,研制 1 种既能提高抗原的免疫原性,又可以避免像弗氏佐剂一样的反应原性佐剂就成了问题的关键。而 20 多年后, MF59 成为第 2 个成功上市的佐剂,说明了这一工作的成功。

## 1 MF59

**1.1 乳剂作为佐剂** 将乳剂用于佐剂已有很长的历史。Freund 等<sup>[2]</sup> 在 70 多年前证明了矿物油(石蜡)与结核分枝杆菌结合具有佐剂的作用,即弗氏完全佐剂。而之后油包水(w/o)不含细菌成分的乳剂(弗氏不完全佐剂)被用于兽用疫苗。尽管弗氏不完全佐剂也曾被用于人用疫苗(如流感疫苗),但其反应原性限制了广泛的使用。乳佐剂的早期应用为 MF59 的研制提供了一定的思路,即油相需要生物可降解,表面活性剂需具有可安全应用的历史背景。水包油(o/w)乳剂可将油相比比例降低,从而显著增加人体对佐剂的耐受性,同时也可降低佐剂的黏度。因此,在 20 世纪 80 年代末, o/w 乳剂作为佐剂开始被应用于免疫增强剂<sup>[3-4]</sup>。

**1.2 表面活性剂** 药物乳剂是 1 种内部不稳定的分散体,需要加入表面活性剂降低界面张力,防止液滴凝结。表面活性剂通常含有疏水性和亲水性 2 种组分,定位于界面上。尽管带电的表面活性剂是乳剂稳定剂的最佳选择,但非离子性表面活性剂因其低毒性和对添加剂的低敏感性而更广泛地使用。表面活性剂根据其亲水性与疏水性的比例(HLB、1~20),可以定义其相对的水相或油相的亲合力。聚山梨醇酯(Tween)是 HLB 在 9~16 的表面活性剂,而失水山梨醇酯(Span) HLB 为 2~9。HLB 值高与低的表面活性剂的组合是常用的乳剂稳定剂。因此,表面活性剂的选择是 MF59 研制的重要步骤,使其成为微小的、稳定的液滴,能够被过滤除菌<sup>[5]</sup>。

**1.3 角鲨烯** MF59 中的油相组分是角鲨烯,是 1 种自然生成的三萜烯烃,组分单一(C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>)但结构复杂,在许多植物、动物以及人体中都有分布。角鲨烯是生物合成人体甾类激素途径的中间物,是合成胆固醇的前体物质。角鲨烯在人体肝脏中合成(>1 g/d)并通过血液循环,在皮肤分布最多,是皮脂分泌物的主要组分。同时,在脂肪组织、肌肉和淋巴结中,大量的角鲨烯在自然情况下均有分布。因此,角鲨烯是兼具生物可降解性和生物兼容性的组分,也是人类饮食的 1 种正常组分,人类

正常摄入 50~200 mg/d。

**1.4 MF59 的生产** MF59 基本生产步骤是将 Span85 分散在含有角鲨烯和 Tween80 的缓冲液中,之后高速搅拌至乳状。之后,将乳剂反复用微射流机流射以形成 o/w 乳剂的微粒(160 nm),再过滤除菌。MF59 乳剂制备后可保持稳定达 3 年以上。

## 2 MF59 的作用机制

**2.1 MF59 不在注射部位形成抗原库** 早期用于疫苗生产的乳佐剂是 w/o 的形式,通常包含不可降解的油脂,可在注射部位有效地形成 1 个抗原库<sup>[6]</sup>。在针对 MF59 的机制研究中,研究者用放射性物质(<sup>1125</sup>Ag、<sup>3</sup>Hsqualene)标志抗原(gD2)和角鲨烯,观察了其在兔的肌肉注射部位的运输情况。这些研究显示,被标志的角鲨烯中只有 10% 在注射 6 h 后仍在注射的点上,并在 120 h 后降低至 5%。同时,尽管在 6 h 后有 25% 的 gD2 抗原仍在注射点,120 h 后降低至 0.05%。因此,说明 MF59 不同于 w/o 形式的佐剂,并未在注射部位形成抗原库。抗原和佐剂以不同的动力学速率被相对快速地清除<sup>[7]</sup>。

**2.2 MF59 激发注射部位的抗原提呈上升** 早期有研究应用免疫荧光共聚焦的方法评估了小鼠中佐剂和抗原在注射部位附近组织的分布情况(DiI squalene、FITC gD2)<sup>[8]</sup>。肌肉注射 3 h 后, MF59 大部分在细胞外,少量可在引流淋巴结的膜下检测到,说明存在一定程度的胞外运输,可能直接通过淋巴管进行。注射后 48 h, MF59 和抗原 gD2 大部分出现在注射部位的细胞内。与此同时,48 h 时在引流淋巴结内也出现了 MF59 数量增多的情况。在 T 细胞附近的副皮质区域也发现了含有 MF59 的细胞。MF59 很可能是在细胞内被运输至淋巴结,这是 MF59 作用机制中最重要的 1 个途径。肌肉注射后, MF59 和抗原在细胞内的共定位观察到 MF59 可以起到运输系统的作用,激活附近的细胞对抗原进行提呈。注射部位含有抗原的细胞对 DEC205 和 MHC II 型细胞呈阳性反应,证明这些细胞是前树突状细胞。关于 MF59 是运输系统的假设在对分离出的人的免疫细胞进行细胞内研究时得到了证明。研究说明, MF59 可以直接增强吞噬作用和胞饮作用并促进抗原提呈细胞对抗原的提呈作用。并且据推测, MF59 能够作用的主要细胞类型是单核细胞,可以被募集至佐剂作用的部位,吸收抗原并参与佐剂引起的针对树突状细胞表型的分化<sup>[9]</sup>。

**2.3 MF59 召集免疫细胞到注射部位** MF59 注射后,通过对肌肉细胞的分离,密度梯度纯化及流式细胞分析,显示出其对于单核细胞的召集作用<sup>[10]</sup>。MF59 注射后 2 d,分离出的肌肉部位的单核细胞增加了 7 倍,之后缓慢减少。这些细胞中很大一部分是 F4/80 阳性的巨噬细胞,少部分是 CD11c 阳性的树突状细胞。目前的猜测是 MF59 的注射促进了趋化因子的分

泌,从而召集了外周血中的单核细胞。1 项研究显示,CCR2 阴性小鼠中的细胞流动与 CCR2-/(无主要趋化因子受体)敲除的小鼠有显著区别。CCR2 是单核细胞趋化蛋白 1~5 受体(MCP-1~MCP-5),表达于单核细胞上。因此,在 CCR2 敲除的小鼠上检测到细胞流动的增加是 MF59 对于细胞召集的有力说明。这项假说被另 1 个将 MF59 用作佐剂的团队进一步印证。Hui 等<sup>[11]</sup>的试验显示了缺乏 ICAM-1 分子的小鼠对镰状疟原虫疫苗的中和抗体滴度远低于正常对照组小鼠。ICAM-1 在细胞黏附及血细胞外渗中起重要作用,因此这是细胞渗透的重要中介。ICAM-1 依赖的免疫反应是 MF59 类似的乳佐剂特异性的,未在 MPL 类似的免疫增强佐剂中发现。

**2.4 MF59 募集中性粒细胞和单核细胞进行抗原提呈并运输至引流淋巴结** Calabro 和同事将荧光标志的佐剂和模式抗原卵清蛋白(OVA)注射至小鼠体内并用流式细胞法分析肌肉和淋巴结细胞。他们检测到不同类型的免疫细胞在肌肉细胞中的重复波动,包括粒细胞和嗜酸性细胞等,及潜在的抗原提呈细胞,如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞。这些细胞会在 2~3 周内将佐剂和抗原一同运输至引流淋巴结<sup>[12]</sup>。

**2.5 MF59 促进抗原在淋巴结和滤泡树突状细胞的停留** 有报道,在研究 MF59 对疫苗抗原的促进作用时,用免疫荧光共聚焦的方法研究了抗原向小鼠淋巴结的运输情况。他们在小鼠免疫后 1、6 h 和 7 d 时取引流淋巴结观测。1 h 后,抗原就可在淋巴结的被膜下窦和髓室被检测到,至二免后,抗原全部保存在滤泡树突状细胞。同时,也检测到生发中心 B 淋巴细胞对抗原特异性抗体的大量分泌,而不加 MF59 的组别并无此现象,这说明 MF59 对于抗原在淋巴结中保存并提呈起到了直接作用<sup>[13]</sup>。

### 3 MF59 与流感疫苗的结合

从 1990 年开始,许多公司致力于研究新型的疫苗佐剂,类型包括乳佐剂、免疫刺激复合物、脂质体和微粒<sup>[14]</sup>。Syntex 公司研制的 o/w 乳佐剂包含角鲨烯和 1 种化学合成的免疫增强剂,N-乙酰胞壁酸-L-苏氨酸-D 谷氨酰胺。N-乙酰胞壁酸-L-苏氨酸-D 谷氨酰胺是 MDP 的衍生物,是分枝杆菌细胞壁中最有效的佐剂成分。但该佐剂的反应原性太强被放弃。之后 Chiron 疫苗公司用角鲨烯和 1 种化学合成的 MDP(胞壁酰三肽磷脂酰乙醇胺,MDP-PE)做流感疫苗佐剂(MF59),也因反应原性被放弃。但根据其临床前及临床研究,MDP-PE 并不是 MF59 作为流感疫苗佐剂所必须的成分<sup>[15-16]</sup>。因此,MF59 的成分确定为角鲨烯 1 种组分,并只针对 1 种目标人群是老年人的流感疫苗。

自 MF59 1997 年批准上市,大量的临床研究和上市后的监控研究均证明了 MF59 的安全性和可靠性,在应对 2009 年 H1N1 流感大流行时,也证明了其广泛使用时的可靠性。最近,在连续 3 个流感流行季节展开的大规模(>170 000 例)具有前瞻性的观察项目后,添加 MF59 佐剂的流感疫苗将 65 岁以上因为流感和肺炎而入院的老人的数量降低了 23%<sup>[17]</sup>。

但目前在美国,有许多伊拉克退伍士兵在退伍之后患有“海湾战争综合征”的情况被与其曾接种含有角鲨烯的流感疫苗的经历联系起来,引起了一些质疑。而关于佐剂中的角鲨烯是否能够引起角鲨烯特异性的抗体,目前还存在争议<sup>[18]</sup>。

### 4 MF59 和其他疫苗的研究进展

除了在流感疫苗上的成功使用,MF59 在其他疫苗的临床

前研究中也表现出了免疫增强的作用。许多临床研究的疫苗都已经加入 MF59 佐剂之后的评价研究,如 HIV、CMV、HSV、HBV、HCV 等。

MF59 在单纯疱疹病毒疫苗(HSV-2)的 3 期保护效力试验被评价为无法提供持续的保护效力。在之前的研究中,HSV-2 同样没有显示出治疗性疫苗的保护效力,但错误的要求交叉保护性才是失败的关键<sup>[19]</sup>。1 个加入 MF59 佐剂的疫苗进入临床研究的原因是其能够引起高滴度的中和抗体和效应 T 细胞的反应。如果能够以这种简单的标准来评价疫苗,就能够达到疫苗研制的初衷<sup>[20]</sup>。但高滴度的中和抗体无法提供对 HSV-2 感染的保护,且性传播疾病通常暴露在高病毒载量环境下。

### 5 结 语

MF59 能够成为继铝佐剂之后第 2 个成功上市的佐剂,与研发者独特的眼光密不可分,也有从之前的佐剂研发失败的经历中获得的宝贵经验,也有一定的运气成分——与已上市的流感疫苗的联系促成了这一成就。研究者在尝试将更多的疫苗与 MF59 佐剂结合起来,但这一路途必然艰巨而不可知。无论如何,MF59 佐剂在其安全性方面从未失败过,在其评价的试验中均表现出良好的耐受性。在今后的发展中,MF59 将继续被其他疫苗所利用,例如 CMV,也会在 HIV 疫苗的效力试验中作为单独的免疫增强剂<sup>[21]</sup>。近期,MF59 也将应用于流感四价疫苗中。

### 参考文献

- [1] Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, et al. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast[J]. *Nature*, 1982, 298(5872): 347-350.
- [2] Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil [J]. *Experimental Biology & Medicine*, 1937, 37(3): 509-513.
- [3] Masihi KN, Lange W, Brehmer W, et al. Immunobiological activities of nontoxic lipid A: enhancement of nonspecific resistance in combination with trehalose dimycolate against viral infection and adjuvant effects[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1986, 8(3): 339-345.
- [4] Allison AC, Byars NE. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity [J]. *J Immunol Methods*, 1986, 95(2): 157-168.
- [5] Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, et al. MF59 Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines[M]//Vaccine Design. Springer US, 1995: 277-296.
- [6] Freund J. The mode of action of immunologic adjuvants [J]. *Bibl Tuberc*, 1956, 7(10): 130-148.
- [7] Dupuis M, McDonald DM, Ott G. Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice[J]. *Vaccine*, 1999, 18(5/6): 434-439.
- [8] Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, et al. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection

- [J]. Cell Immunol, 1998, 186(1): 18-27.
- [9] Monaci E, Mancini F, Lofano G, et al. MF59-and Al(OH) 3-Adjuvanted staphylococcus aureus (4C-Staph) vaccines induce sustained protective humoral and cellular immune responses, with a critical role for effector CD4 T cells at low antibody titers[J]. Front Immunol, 2015, 6: 439.
- [10] Dupuis M, Denis-Mize K, Labarbara A, et al. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(10): 2910-2918.
- [11] Hui G, Hashimoto C. The requirement of CD80, CD86, and ICAM-1 on the ability of adjuvant formulations to potentiate antibody responses to a Plasmodium falciparum blood-stage vaccine [J]. Vaccine, 2007, 25(51): 8549-8556.
- [12] Nouri A, Laraba-Djebari F. Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against Androctonus australis Hector envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants[J]. Vaccine, 2015, 33(43): 5756-5763.
- [13] Cantisani R, Pezzicoli A, Cioncada R, et al. Vaccine adjuvant MF59 promotes retention of unprocessed antigen in lymph node macrophage compartments and follicular dendritic cells[J]. J Immunol, 2015, 194(4): 1717-1725.
- [14] Vogel FR, Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients[J]. Pharm Biotechnol, 1995, 6(6): 141-228.
- [15] Keefer MC, Graham BS, McElrath MJ, et al. Safety and immunogenicity of Env 2-3, a human immunodeficiency virus type 1 candidate vaccine, in combination with a novel adjuvant, MTP-PE/MF59. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. AIDS Res[J]. Hum Retroviruses, 1996, 12(8): 683-693.
- [16] Kahn JO, Sinangil F, Baenziger J, et al. Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers[J]. J Infect Dis, 1994, 170(5): 1288-1291.
- [17] Mannino S, Villa M, Apolone G, et al. Effectiveness of adjuvanted influenza vaccination in elderly subjects in northern Italy[J]. Am J Epidemiol, 2012, 176(6): 527-533.
- [18] Asa PB, Cao Y, Garry RF. Antibodies to squalene in Gulf War syndrome[J]. Exp Mol Pathol, 2000, 68(1): 55-64.
- [19] Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic herpes simplex virus vaccines [J]. Herpes, 2004, 11(Suppl 3): A161-169.
- [20] Corey L, Langenberg AG, Ashley R, et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection; two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group[J]. JAMA, 1999, 282(4): 331-340.
- [21] Fu TM, An Z, Wang D. Progress on pursuit of human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease[J]. Vaccine, 2014, 32(22): 2525-2533.

(收稿日期: 2016-02-23 修回日期: 2016-05-06)

## • 综 述 •

# 结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂相关审评要点

刘容枝 综述, 李耀华<sup>△</sup> 审校

(国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心, 北京 100044)

**关键词:** 结核分枝杆菌复合群; 耐药基因突变; 企业参考品; 分析性能评估

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 18. 036

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2016)18-2598-03

结核病是当前危及人类生命的主要杀手。据世界卫生组织估计, 2012 年全球约有 45 万耐多药结核病 (MDR-TB) 患者, 17 万人死于 MDR-TB, 全球 1/4 的 MDR-TB 患者在中国<sup>[1-3]</sup>。鉴于全球耐药结核病的严峻形式, 世界卫生组织于 2014 年推出了《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》(下称《手册》), 旨在指导耐药结核病的预防、诊断和治疗<sup>[4-5]</sup>。耐药结核病是指由耐药结核分枝杆菌复合群引起的结核病。实验室药敏试验是确诊耐药结核病的唯一方法。但是, 传统的实验室药敏试验周期过长, 容易延误治疗。基因型 DST (结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂) 采用分子生物学方法检测结核分枝杆菌复合群基因组中与特定耐药相关的突变, 可以快速鉴定是否存在耐药相关的突变或耐药, 一般在 24 h 内就可出结

果, 可有效弥补传统药敏试验周期长的缺陷<sup>[6-8]</sup>。迄今为止, 国内外已有多种结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂获准上市。为了规范和指导此类试剂的注册申报, 下面总结了此类试剂申报中两项重要的技术性文件 (企业参考品和分析性能评估资料) 的审评要点。

## 1 企业参考品

企业参考品主要包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品<sup>[9-11]</sup>。申请人应详细说明企业参考品中每种菌株/核酸的来源、突变类型、浓度和制备方法等信息。

**1.1 阳性参考品** 申报产品可检测的所有突变类型均应设置不同浓度的阳性参考品。阳性参考品的突变类型应经过测序