

## **Adjuvansi u vakcinama registrovanim za primenu kod ljudi**

**Brankica Filipić\*, Zorica Stojić-Vukanić**

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i  
imunologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

\*Autor za korespondenciju: Brankica Filipić, e-mail: brankica.filipic@pharmacy.bg.ac.rs

---

### **Kratak sadržaj**

Vakcinacija je jedna od najznačajnijih strategija za prevenciju infektivnih oboljenja, a razvoj subjediničnih vakcina doveo je do potrebe za primenom adjuvanasa u vakcinama. Naziv adjuvans potiče od latinske reči *adjuvare* što znači „pomoći”. Adjuvansi su supstance koje se primenjuju u vakcinama više od 90 godina, a dodaju se da bi se povećala imunogenost antigena koji imaju nizak imunostimulatorni potencijal. U vakcinama za primenu kod ljudi, najduže se kao adjuvansi koriste soli aluminijuma, ali je poslednjih decenija nekoliko novih adjuvanasa uključeno u vakcine koje su odobrene za primenu. Adjuvantni sistem AS04, ulazi u sastav vakcina protiv humanog papiloma virusa (Cervarix®) i hepatitis B virusa (Fendrix®) i sadrži aluminijum hidroksid i TLR4 agonist, monofosforil lipid A. Zatim, adjuvansi na bazi emulzije (MF59 i AS03) su sastavni deo vakcina protiv gripa (Fluad®, Focetria® i Pandemrix®). Kombinacija dva imunostimulatorna molekula, označena kao AS01, ulazi u sastav vakcine protiv herpes zoster virusa i malarije dok se adjuvansi na bazi virozoma koriste u vakcinama protiv hepatitisa A (Epaxal®) i gripa (Inflexal® V, Invivac®). Daljim razvojem adjuvanasa, i ispitivanjem njihovog mehanizma delovanja oni će se umesto empirijski, sve više koristiti racionalno i ciljano, čime će se postići bolji imunogeni profil vakcina, bez narušavanja njihovog bezbednosnog profila.

**Ključne reči:** adjuvansi, vakcine, imunogenost

---

## 1. Uvod

Vakcinacija predstavlja jedno od najznačajnijih dostignuća u medicini čija je primena u velikoj meri doprinela kontroli i prevenciji infektivnih bolesti. Osnovni princip vakcinacije je indukcija imunskog odgovora domaćina prema antigenu koji se nalazi u vakcini i obezbeđivanje dugotrajne specifične zaštite koja sprečava nastanak infekcije ili razvoj bolesti (1). Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije imunizacijom se sačuva 5 života svakog minuta (2). Istorijski, početak razvoja vakcina vezuje se za 18. vek i engleskog lekara Edvarda Dženera koji je prvi sproveo vakcinaciju protiv velikih boginja (3). Prvobitne vakcine zasnivale su se na primeni živih atenuisanih ili inaktivisanih mikroorganizama (4). Međutim, iako se zbog dobre efikasnosti i visoke imunogenosti žive atenuisane i inaktivisane vakcine primenjuju i u 21. veku, postoji rizik od povratka virulencije patogena ili nekompletne inaktivacije mikroorganizama, što dovodi u pitanje bezbednosni aspekt primene ovih vakcina, zbog čega se ne primenjuju kod imunokompromitovanih osoba, osoba sa transplantiranim organima, trudnica ili populacije starijeg doba (5). Usled toga, nove strategije u oblasti vakcinacije usmerene su ka, takozvanim, subjediničnim vakcinama, koje sadrže samo deo patogena, čime je postignuta veća bezbednost, ali slabija imunogenost i posledično manja efikasnost ovakve imunizacije (2). Kako primena samo određenog dela patogenog mikroorganizma najčešće nije dovoljna da se postigne adekvatna zaštita, vakcinama su dodati adjuvansi koji imaju sposobnost da pojačaju imunski odgovor (6).

Inicijalni razvoj adjuvanasa u periodu između 1920. i 1940. godine bio je usmeren na primenu u vakcinama koje su sadržale bakterijske toksoide. Različite supstance, poput agara, lecitina, skroba, saponina, soli kalcijuma i magnezijuma, čak i mrvica hleba, testirane su sa ciljem da se ispita njihov imunostimulacioni efekat (7).

Sam termin adjuvans potiče od latinske reči *adjuvare* što u prevodu znači „pomoći” i prvi put ga je upotrebio francuski veterinar Gaston Ramon, koji je definisao adjuvans kao „supstancu koja primenjena u kombinaciji sa specifičnim antigenom indukuje jači imunski odgovor nego sam antigen” (8). On je uočio da je nivo antitela na tetanus i difteriju bio viši kod konja kod kojih je na mestu injektovanja inaktivisanog toksina indukovano apsces. Razvoj apscesa Ramon je postigao injektovanjem skroba ili mrvica hleba, i time je potvrđena hipoteza da supstance koje indukuju razvoj lokalne inflamacije na mestu injektovanja antigena doprinose povećanoj produkciji antitela (5). Negde u isto vreme, 1926. godine, Glenney i saradnici su otkrili adjuvantni efekat soli aluminijuma (9). Soli aluminijuma smatraju se jednim od najznačajnijih adjuvanasa koji su razvijeni, i prvi put je aluminijum kao adjuvans upotrebljen u humanim vakcinama 1932. godine.

Sa istorijskog aspekta, mogu se razdvojiti četiri razdoblja u razvoju adjuvanasa: (1) inicijalni razvoj adjuvanasa za vakcine sa bakterijskim toksoidima u periodu između 1920. i 1940. godine; (2) šira upotreba ulja i aluminijuma kao adjuvanasa u periodu

između 1940. i 1970. godine; (3) razvoj sintetskih adjuvanasa i depo sistema između 1970. i 1990. godine i (4) racionalni dizajn adjuvanasa koji aktiviraju urođeni imunski sistem od 1990. godine do danas (7). Tek početkom 1990-ih godina registrovane su vakcine, prvenstveno namenjene za primenu kod životinja, sa novim adjuvansima, koji pripadaju različitim klasama jedinjenja kao što su mineralne soli, produkti mikroorganizama, emulzije, saponini, citokini, polimeri, mikročestice i lipozomi (10, 11). Dodavanje adjuvansa vakcinama ima za cilj da brže i jače indukuje zaštitni imunski odgovor kao i da smanji količinu antigena i broj imunizacija potrebnih da se postigne efikasan imunski odgovor (12). Izbor adjuvansa koji će biti adekvatan u formulaciji određene vakcine zavisi od brojnih parametara, kao što su fizičke i hemijske karakteristike antigena, tip imunskog odgovora koji se želi postići imunizacijom, starost ciljane populacije i put primene vakcine (13).

## 2. Klasifikacija adjuvanasa

Podela adjuvanasa može se izvršiti na osnovu nekoliko kriterijuma, a najčešće se uzimaju u obzir fizičko-hemijske karakteristike, poreklo i mehanizam dejstva. Prema mehanizmu dejstva, adjuvansi su najčešće podeljeni u dve glavne klase, nosače (oslobađajuće sisteme) i imunostimulatore (14), ali postoje i adjuvansi koji su kombinacija ove dve klase.

*Nosači (oslobađajući sistemi)* se definišu kao komponente koje prikazuju antigene iz vakcine imunskom sistemu na optimalan način u cilju pojačanja imunskog odgovora prema antigenu. Pored toga, nosači dovode do lokalnog proinflatornog odgovora i nakupljanja ćelija urođene imunosti na mestu injektovanja vakcine. Primeri adjuvanasa nosača su mineralne soli (soli aluminijuma), emulzije (MF59, AS03), lipozomi (AS01) i virozomi (11, 15, 16).

*Imunostimulatori* su supstance koje aktiviraju urođeni imunski sistem, najčešće vezivanjem za receptore koji prepoznaju molekulske obrasce patogenih mikroorganizama (engl. *pattern-recognition receptors*; PRR). Ovi receptori obuhvataju nekoliko različitih familija proteina, od kojih su najzastupljeniji receptori slični Tollu (engl. *Toll-like receptors*; TLRs). PRR su ispoljeni na površini, u endozomu ili citozolu ćelija urođenog imunskog sistema, kao što su dendrične ćelije (DC), makrofagi, urođenoubilačke ćelije i neutrofili, ali ih ima i na B ćelijama i mnogim drugim ćelijama u organizmu. Imunostimulatori su lipid A, monofosforil lipid A (MPL), saponini (QS-21), bakterijski egzotoksini i drugi (2, 11, 17).

Mnogi novi adjuvansi u vakcinama koje su u različitim fazama kliničkih ispitivanja su kombinacija i nosača i imunostimulatora (11). U Tabeli I dat je pregled adjuvanasa registrovanih za primenu u humanim vakcinama (18).

Tabela I Adjuvansi registrovani za primenu u humanim vakcinama.  
 Table I Adjuvants in licensed vaccines for human use.

Adjuvans	Sastav	Vakcina	Mehanizam dejstva	Referenca
Aluminijum	Soli aluminijuma pomešane sa antigenom (adsorpcija)	Brojne vakcine registrovane za primenu kod ljudi (DTP, Hib, Hepatitis B, pneumokokna vakcina)	Stimulacija lokalnog inflamatornog odgovora; poboljšana prezentacija antigena od strane APC; povećana produkcija antitela	19, 20, 21
AS04 („Adjuvant System 04”)	Kombinacija adjuvanasa: Al-hidroksid i monofosforil lipid A (MPL) dobijen iz LPS-a <i>Salmonella minnesota</i>	Vakcina protiv humanog papiloma virusa (Cervarix <sup>®</sup> ); vakcina protiv hepatitisa B virus (Fendrix <sup>®</sup> )	Aktivacija APC; lokalno povećanje sinteze i sekrecije citokina; povećana produkcija antitela	20, 22
MF59	Skvalen, polisorbitat 80, sorbitan trioleat	Vakcina protiv gripa (Fluad <sup>®</sup> ), H1N1 vakcina (Focetria <sup>®</sup> )	Povećana aktivacija APC; stimulacija preuzimanja antigena i migracije ćelija do limfnih čvorova	21, 23
AS03 („Adjuvant System 03”)	Skvalen, vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), polisorbitat 80	Vakcina protiv gripa (Pandemrix <sup>®</sup> )	Podstiče lokalnu produkciju citokina i nakupljanje ćelija urođene imunosti	5, 24
AS01 („Adjuvant System 01”)	Na bazi lipozoma; sadrži dva imunostimulatora- MPL i saponin QS-21	Vakcina protiv Herpes zoster virusa (Shingrix <sup>®</sup> ); Vakcina protiv malarije (Mosquirix <sup>®</sup> )	Lokalno nakupljanje ćelija urođene imunosti	11, 25
Virozomi	Vezikule kod kojih je antigen ugrađen u fosfolipidni dvoslojni omotač ili može biti unutar vezikule	Vakcine protiv gripa (Inflexal <sup>®</sup> V i Invivac <sup>®</sup> ); vakcina protiv hepatitisa A (Epaxal <sup>®</sup> )	Podstiče preuzimanje antigena od strane APC	20, 21, 26

LPS-lipopolisaharid; APC-antigen prezentujuće ćelije; DTP-vakcina protiv difterije, tetanusa i velikog kašlja; Hib-vakcina protiv oboljenja koje izaziva *Haemophilus influenzae* tip b.

## 2.1 Jedinjenja aluminijuma kao adjuvansi

Jedinjenja aluminijuma kao adjuvansi u humanim vakcinama se koriste od 1932. godine (27). Prvi upotrebljen adjuvans na bazi aluminijuma bio je aluminijum kalijum sulfat, koji je zbog slabe reproducibilnosti u potpunosti zamenjen aluminijum hidroksidom i aluminijum fosfatom, koji se mogu pripremiti standardizovanim metodama i za koje se antigen vezuje direktnom adsorpcijom (28). Adjuvansi na bazi aluminijuma često se zajedničkim imenom označavaju kao *alum*, iako je zapravo termin alum hemijsko ime za so aluminijum kalijum sulfata (29). Ovi adjuvansi ulaze u sastav vakcina koje se primenjuju protiv hepatitisa A, hepatitisa B, difterije/tetanus/pertusisa (DTP), humanih papiloma virusa (HPV), *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) i pneumokoka (2).

Mehanizam dejstva aluminijuma, kao i većine adjuvanasa, nije u potpunosti razjašnjen. Istraživanja na miševima pokazala su da adjuvansi na bazi aluminijuma pre svega indukuju imunski odgovor koji je posredovan pomoćničkim T (engl. *T helper*; Th) limfocitima tipa 2 koji karakteriše sinteza i sekrecija antitela i većinski je usmeren ka uklanjanju ekstraćelijskih patogena. Sa druge strane, adjuvansi na bazi aluminijuma nisu efikasni u indukciji Th1 imunskog odgovora koji je zajedno sa citotoksičnih T limfocitima usmeren ka uklanjanju intraćelijskih patogena, zbog čega se adjuvansi na bazi aluminijuma ne mogu primeniti u svim vakcinama (30). Ipak, uprkos nedovoljnom razumevanju efekta aluminijumskih adjuvanasa, upotreba aluminijuma u vakcinama je opravdana time što se pokazao kao bezbedan i stabilan adjuvans, lako se priprema, a pored toga, ne postoji još uvek odgovarajuća zamena (31).

## 2.2 Aluminijumove soli kao nosači za nove adjuvanse: primer AS04

Tokom poslednje dve decenije Glaxo Smith Kline (GSK) je razvio nove adjuvantne sisteme sa ciljem da se postigne brža, bolja i duža zaštita indukcijom visokog i perzistentnog titra antitela i aktivacijom ćelijski-posredovane imunosti (32). Jedan takav sistem, označen kao adjuvantni sistem AS04, je već u kliničkoj praksi kao sastavni deo registrovanih profilaktičkih vakcina protiv HPV i hepatitis B virusa (18,32). AS04 se sastoji iz dva adjuvansa: aluminijumove soli i TLR4 agonista, MPL, prečišćenog derivata lipopolisaharida (LPS) ekstrahovanog iz R595 soja *Salmonella minnesota* (18). LPS je kompleksni molekul prisutan samo u spoljašnjoj membrani Gram-negativnih bakterija, a za biološke efekte LPS-a odgovorna je lipidna komponenta tj. lipid A. Snažna adjuvantna aktivnost LPS-a/lipida A je odavno poznata, međutim, visoka toksičnost je ograničavala njegovu primenu u vakcinama (33). Međutim, 80-ih godina dvadesetog veka detoksifikacijom LPS molekula intenzivnim tretmanom soja R595 *Salmonella minnesota* pomoću kiselina i baza dobijen je MPL koji je posedovao imunostimulatorni efekat kao i lipid A, ali je imao bolji bezbedonosni profil nego polazni molekul (34). Danas, MPL se koristi kao adjuvans u brojnim

profilaktičkim i terapijskim vakcinama koje su u razvoju i čija efikasnost se ispituje u kliničkim studijama (32).

Studije na miševima su pokazale da je MPL agonist TLR4, i da u potpunosti zadržava svoju imunostimulatornu aktivnost posredstvom TLR4 i kada se adsorbuje na soli aluminijuma (22). Nakon primene vakcine koja sadrži AS04, aktivacija TLR4 dovodi do brze (u okviru 3-6 h) sinteze i sekrecije citokina i nakupljanja ćelija na mestu primene vakcine (mišićno tkivo). U okviru prvog dana od injektovanja, uočava se povećana aktivacija monocita i dendritskih ćelija, koja je praćena aktivacijom antigen-specifičnih T i B ćelija i indukcijom snažnog i perzistentnog, kako humoralnog (sekrecija antitela) tako i ćelijskog imunskog odgovora (18).

Poređenjem aktivnosti samog MPL-a sa AS04 pokazano je da dodavanje aluminijumove soli ne dovodi do sinergističkog efekta, već da se samo produžava sinteza i sekrecija citokina koja je indukovana MPL-om na mestu injektovanja (18).

### **2.3 Adjuvansi na bazi emulzije: MF59 i AS03**

Emulzije imaju dugu istoriju primene kao adjuvansi u vakcinama za humanu i veterinarsku primenu. Freund je prvi pokazao adjuvantni efekat emulzije tipa voda-u-ulju u kombinaciji sa mikobakterijom ubijenom toplotom i ovaj adjuvans je nazvan „kompletan Freundov adjuvans” (35). Kompletan Freundov adjuvans je dugo bio zlatni standard kada su u pitanju adjuvansi na bazi emulzije. Međutim, jedan od glavnih nedostataka pri primeni ovog adjuvansa jeste indukcija jakog, dugotrajnog lokalnog inflamatornog odgovora na mestu injektovanja, usled čega je prestala njegova primena kod ljudi i životinja i čime je izgubio i status standarda za poređenje sa drugim adjuvansima (36).

Emulzija voda-u-ulju bez mikobakterije koja je poznata kao „inkompletan Freundov adjuvans” je nakon toga primenjivana u veterinarskim vakcinama. Iako je ovaj adjuvans korišćen pedesetih godina prošlog veka i u humanim vakcinama (vakcina protiv gripa), pokazano je da zbog snažnog, lokalnog inflamatornog odgovora nije pogodan za rutinsku upotrebu (37, 38).

Iako emulzije imaju dugotrajnu primenu kao adjuvansi u vakcinama, tek krajem dvadesetog veka su zvanično odobrene za primenu kod ljudi (18). Prva generacija vakcina sa emulzijama kao adjuvansima imala je u svom sastavu mineralna ulja koja se nisu mogla metabolisati, i iako su bila snažni aktivatori produkcije antitela, uzrokovala su nastanak apscesa (39). Razvojem emulzija tipa ulje-u-vodi, poput MF59 i adjuvantnog sistema AS03, u kojima se koristi mineralno ulje koje se u potpunosti metaboliše, prevaziđen je problem prethodno korišćenih emulzija i omogućena je primena adjuvanasa na bazi emulzije u inaktivisanoj vakcini protiv sezonskog gripa, zatim u vakcini protiv ptičjeg gripa (H5N1, a kasnije i drugih sojeva) i u vakcini protiv pandemijskog gripa 2009. godine (H1N1) (40).

Glavna komponenta emulzija tipa ulje-u-vodi (MF59 i AS03) je *skvalen* (Tabela I), organsko jedinjenje koje se potpuno metaboliše, a prekursor je u biosintezi holesterola kod ljudi (41). Pored stabilizatora emulzije, AS03, za razliku od MF59, sadrži i imunostimulator  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) (Tabela 1), zbog čega je i dobio naziv adjuvantni sistem (21).

#### 2.4 Kombinacija imunostimulatora: primer AS01

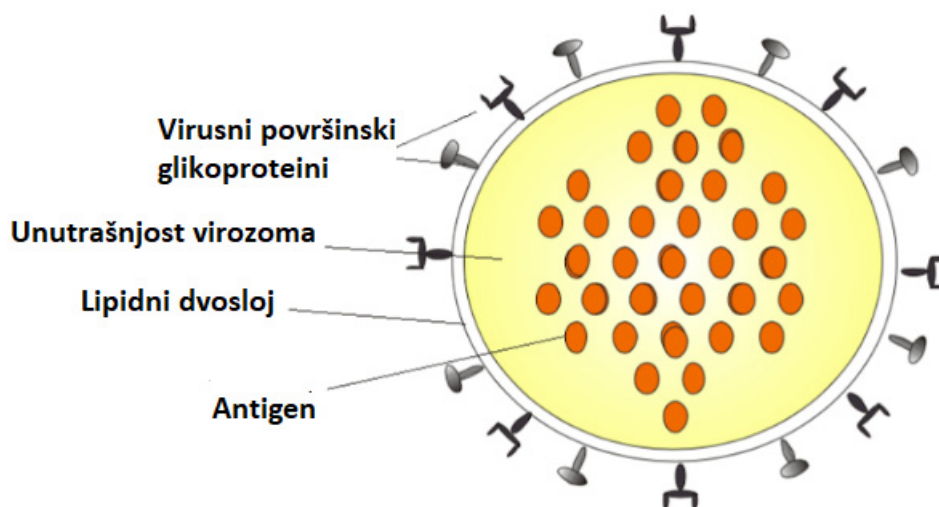
Adjuvantni sistem AS01 je jedinstven među adjuvansima jer sadrži dva različita imunostimulativna molekula: MPL i saponin QS-21. QS-21 je triterpenski glikozid izolovan iz kore čileanskog drveta *Quillaja saponaria* Molina, za koji su studije na eksperimentalnim životinjama pokazale da indukuje sintezu antigen-specifičnih antitela i stimuliše nastanak citotoksičnih T-ćelija (42). QS-21 je rastvorljiv u vodi, amfifilne prirode, i poseduje hemolitičku aktivnost. Sa ciljem da se neutrališe njegova hemolitička aktivnost, napravljena je formulacija koju čine MPL, QS-21 i lipozom i tako je dobijen adjuvantni sistem AS01 (25).

AS01 je inicijalno razvijen da bi se uz indukciju sinteze antitela podstakao i dugotrajan ćelijski imunski odgovor, sa ciljem da se dobiju vakcine efikasne protiv patogena kod kojih ćelijska imunost ima ključnu ulogu u zaštiti. Kao adjuvans, AS01 je komponenta vakcine protiv *Plasmodium falciparum* koji je uzročnik malarije (Mosquirix<sup>®</sup>) i vakcine protiv herpes zoster virusa (Shingrix<sup>®</sup>) koje se klinički primenjuju, a ispituje se njegova primena u razvoju vakcina protiv virusa humane imunodeficijencije i tuberkuloze (18). Ono što AS01 čini različitim od ostalih adjuvanasa i što je ključna prednost kombinacije ova dva imunostimulativna, je sinergistički efekat koji se postiže kada se MPL i QS-21 koriste zajedno (43).

#### 2.5 Virozomi

Tehnologija koja obuhvata primenu čestica koje se nazivaju virozomi razvijena je sa ciljem da se omogući proizvodnja efikasnih i bezbednih subjediničnih vakcina.

Almeida i saradnici su 1975. godine prvi generisali virozome ugrađivanjem proteina hemaglutinina i neuraminidaze poreklom od virusa influence u liposome (44). Virozomi suštinski predstavljaju polu-sintetski kompleks veličine 150-200 nm u prečniku, koji je dobijen rekonstituisanjem virusne čestice. Sastoje se od glikoproteina virusnog omotača ugrađenih u dvoslojni fosfolipidni omotač, ali ne sadrže genetički materijal virusa od kojeg vode poreklo, usled čega nemaju sposobnost replikacije (Slika 1) (45).



Slika 1. Struktura virozoma  
Figure 1. The structure of the virosome

Čitav spektar jedinjenja, uključujući antigene, nukleinske kiseline, lekove, tumorske antigene, antitela, može biti inkapsuliran unutar virozoma ili adsorbovan za njegovu površinu (46). Adjuvantni efekat virozoma zasniva se na njihovoj sposobnosti da pojačaju proces preuzimanja i prerade antigena od strane APC. Usled prisustva virusnih proteina omotača, virozom može „inficirati” ćeliju domaćina i isporučiti antigen u citoplazmu ili može biti fagocitovan od strane APC (47). Prednost upotrebe virozoma je u tome što su biodegradibilni, biokompatibilni i netoksični, usled čega je njihova primena odobrena od strane Američke agencije za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration*) za primenu kod ljudi jer imaju visoki bezbedonosni profil. Pored toga, virozomi ne dovode do razvoja autoimunosti ili anafilakse. Virozomi se mogu primeniti intravenski, intramuskularno, subkutano, inhalacionim putem, oralno ili topikalno tj. površinski (48).

Prva generacija virozoma već je u primeni u komercijalnim vakcinama protiv hepatitisa A (Epaxal®) i gripa (Inflexal® V i Invivac®). Pored toga, vakcine protiv malarije, hepatitisa C, karcinoma dojke, *Candida* vrsta u kojima se koriste virozomi kao adjuvansi su u različitim fazama prekliničkih i kliničkih studija (2).

### 3. Bezbednost adjuvanasa

Adjuvansi su od ključnog značaja za efikasnost mnogih vakcina i poslednjih godina ulažu se naponi kako bi se razumeo mehanizam njihovog dejstva. Međutim, istorijski gledano, istraživanja u oblasti adjuvanasa uvek su bila više usmerena na



izučavanje njihove efikasnosti da indukuju protektivnu imunost, dok se manje napora ulagalo u razumevanje mehanizama njihove toksičnosti (49). Poznato je da su neki od imunostimulatornih efekata adjuvanasa, u isto vreme odgovorni i za njihova neželjena dejstva. U tom smislu, teško je postaviti jasnu granicu između imunostimulatornog efekta i imunotoksičnosti adjuvanasa, kako bi se postigla idealna ravnoteža po pitanju efikasnosti/bezbednosti. U prošlosti, stotine imunostimulatornih adjuvanasa je testirano u vakcinama, međutim, usled toksičnosti, mnogi potencijalni adjuvansi su odbačeni, a svega nekoliko je danas registrovano za primenu u humanim vakcinama (50). Trenutno, jedan od najvećih izazova u razvoju vakcina jeste da se primeni visoko efikasana kombinacija antigen-adjuvans koja će uzrokovati minimalna neželjena dejstva.

Najčešći neželjeni efekti primene adjuvanasa su blagi i lokalnog karaktera i manifestuju se pojavom bola na mestu injektovanja, crvenila i lokalne inflamacije, a mogu biti posledica hemijske iritabilnosti ili direktne citotoksičnosti adjuvansa (51). Sistemske posledice primene adjuvanasa najčešće se manifestuju kao groznica, glavobolja, mučnina, dijareja i bol u mišićima (49).

Jedna od najvećih dilema kada su u pitanju neželjena dejstva adjuvanasa odnosi se na moguću indukciju ili pojačavanje već postojećeg autoimunskog oboljenja. Međutim, čak i ako kombinacija vakcina/adjuvans indukuje autoimunske oboljenje, to je teško dokazati (49). U toku 2010. godine, prijavljeni su slučajevi razvoja autoimunskog oboljenja narkolepsije koji su dovođeni u vezu sa primenom vakcine protiv gripa Pandemrix<sup>®</sup> koja kao adjuvans sadrži AS03. Ipak, istraživanja su pokazala da ne postoji veza između narkolepsije i Pandemrix<sup>®</sup> AS03 vakcine, ni kod dece ni kod odraslih osoba (52).

Kada se govori o bezbednosti adjuvanasa, zlatni standard predstavljaju soli aluminijuma, koje su izuzetno efikasne u pojačavanju imunskog odgovora, najduže se primenjuju i imaju najbolji bezbedonosni profil kada su u pitanju humani adjuvansi (49). U tom smislu, preporučuje se da se svaki novi adjuvans testira i poredi sa ovim adjuvansima.

Iako ne postoji apsolutna garancija kada je u pitanju bezbednost vakcina i adjuvanasa, bilo kakav rizik od teške neželjene reakcije uzrokovane modernim vakcinama je ekstremno nizak i pacijenti treba da budu potpuno sigurni u bezbednost dostupnih vakcina (49).

#### **4. Zaključak**

Već gotovo čitav vek adjuvansi se primenjuju sa ciljem da se poveća efikasnost vakcina. Do nedavno, izbor adjuvanasa je uglavnom bio empirijski, ali značajan napredak u razvoju novih adjuvanasa i stalno izučavanje i težnja da se utvrde molekularni mehanizmi njihovog delovanja postepeno doprinose razvoju njihove racionalne i ciljane upotrebe. Adjuvansi su danas postali neophodna komponenta

mnogih vakcina, jer se umesto živih atenuisanih patogena, mnogo češće koriste prečišćeni antigeni mikroorganizama sa niskim stepenom imunogenosti. Iako broj adjuvanasa u registrovanim vakcinama nije veliki, novi adjuvansi značajno su doprineli većoj efikasnosti pojedinih vakcina, bez narušavanja njihove bezbednosti. Dobar izbor kombinacije antigena i adjuvanasa imaće u budućnosti ključnu ulogu u dizajnu vakcina koje će biti efikasne i bezbedne.

## Zahvalnica

Autori se zahvaljuju COST akciji CA16231 „European Network of Vaccine Adjuvants- ENOVA”, koja im je svojim aktivnostima omogućila unapređenje znanja iz oblasti adjuvanasa.

## Literatura

1. Zepp F. Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine*. 2010;28:C14–C24.
2. Apostólico Jde S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res*. 2016;1459394. doi: 10.1155/2016/1459394.
3. Gross CP, Sepkowitz KA. The myth of the medical breakthrough: Smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. *Int J Infect Dis*. 1998;3(1):54-60.
4. Bonanni P, Santos J. Vaccine evolution. *Perspective in Vaccinol*. 2011;(1):1–24.
5. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel)*. 2015;3(2):320–43.
6. Marciani DJ. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov Today*. 2003;8(20):934-43.
7. Ott G, Van Nest G. Development of vaccine adjuvants: ahistorical perspective. In: Singh M (ed) *Vaccine adjuvants and delivery systems*. Wiley, London, 2007;pp 1–31
8. Ramon G. Sur la toxine et sur l’anatoxine diphtheriques. *Ann Inst Pasteur*. 1924;38:1–10.
9. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. Immunological notes. XVII–XXIV. *Journal Pathol Bacteriol*. 1926;29(1):31–40.
10. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:505–17.
11. Christensen D. Vaccine adjuvants: Why and how. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(10):2709–11.
12. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.
13. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*. 2013;19(12):1597-608.

14. Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med.* 2005;11(4 Suppl):S63-8.
15. García A, De Sanctis JB. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *APMIS.* 2014;122(4):257-67.
16. Kaurav M, Madan J, Sudheesh MS, Pandey RS. Combined adjuvant-delivery system for new generation vaccine antigens: alliance has its own advantage. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(sup3):S818-31.
17. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw.* 2015;15(2):51–7.
18. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol.* 2018;39:14-21.
19. Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol.* 2008;181: 3755–59.
20. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114.
21. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel).* 2015;3(2):320-43.
22. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6186-97.
23. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011;17;29(9):1812-23.
24. Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhaye S, Baras B, Jacob V, et al. Adjuvant system AS03 containing  $\alpha$ -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine.* 2011;29(13):2461-73.
25. Didierlaurent AM, Laupèze B, Di Pasquale A, Hergli N, Collignon C, Garçon N. Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2017;1:55-63.
26. Khoshnejad M, Young PR, Toth I, Minchin RF. Modified influenza virosomes: recent advances and potential in gene delivery. *Curr Med Chem.* 2007;14: 3152-6.
27. Park WH, Schroder MC. Diphtheria Toxin-Antitoxin and Toxoid: A Comparison. *Am J Public Health Nations Health.* 1932;22(1):7–16.
28. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(4):287-93.
29. HogenEsch H, O'Hagan DT, Fox CB. Optimizing the utilization of aluminum adjuvants in vaccines: you might just get what you want. *NPJ Vaccines.* 2018;(10)3:51.

30. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004;82(5):497-505.
31. Djuricic S, Jakobsen JC, Petersen SB, Kenfelt M, Gluud C. Aluminium adjuvants used in vaccines versus placebo or no intervention. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;(9):CD012805.
32. Garçon N, Tavares F. Development and Evaluation of AS04, a Novel and Improved Adjuvant System Containing 3-O-Desacyl-4'- Monophosphoryl Lipid A and Aluminum Salt. *Immunopotentiators in Moder Vaccines.* 2017;287-309.
33. Johnson AG, Gaines S, Landy M. Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of the antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1956;103(2):225-46.
34. Myers KR, Truchot AT, Word J, Hudson Y, Ulrich JT. A critical determinant of lipid A endotoxic activity. In: Nowotny A, Spitzer JJ, Ziegler EJ, editors. *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.* New York, NY: Elsevier Science Publishing Co; 1990. p. 145e56.
35. Freund J, Casals J, Hosmer E. Sensitization and antibody formation after injection of Tubercle Bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1937;37(3):509 – 13.
36. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):849-60.
37. Salk JE, Laurent AM. The use of adjuvants in studies on influenza immunization. I. Measurements in monkeys of the dimensions of antigenicity of virus-mineral oil emulsions. *J Exp Med.* 1952;95(5):429-47.
38. Miller LH, Saul A, Mahanty S. Revisiting Freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. *Trends Parasitol.* 2005;21(9):412-4.
39. Lattanzi M. Non-recent history of influenza pandemics, vaccines, and adjuvants. *Influenza Vaccines for the Future.* 2008;245-59.
40. O'Hagan DT, Tsai TF, Brito LA. Emulsion based vaccine adjuvants. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(8):1698–1700.
41. Del Giudice G, Rappuoli R. Inactivated and adjuvanted influenza vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;386:151-80.
42. Zhu D, Tuo W. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat Prod Chem Res.* 2016;3(4):e113.
43. Coccia M, Collignon C, Hervé C, Chalon A, Welsby I, Detienne S, van Helden MJ, Dutta S, Genito CJ, Waters NC, Deun KV, Smilde AK, Berg RAVD, Franco D, Bourguignon P, Morel S, Garçon N, Lambrecht BN, Goriely S, Most RV, Didierlaurent AM. Cellular and molecular synergy in AS01-adjuvanted vaccines results in an early IFN $\gamma$  response promoting vaccine immunogenicity. *NPJ Vaccines.* 2017;2:25.
44. Almeida JD, Edwards DC, Brand CM, Heath TD. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet.* 1975;2(7941):899-901.
45. Trovato M, De Berardinis P. Novel antigen delivery systems. *World J Virol.* 2015;4(3):156–68.

46. Kaneda Y. Virosome: a novel vector to enable multi-modal strategies for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(8):730-8.
47. Moser C, Müller M, Kaeser MD, Weydemann U, Amacker M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(7):779-91.
48. Rathore P, Swami G. Virosomes: a novel vaccination technology. *IJPSR.* 2012;3(10):3591–97.
49. Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs. *Drug Saf.* 2015;38 (11): 1059–74.
50. Batista-Duharte A, Martínez DT, Carlos IZ. Efficacy and safety of immunological adjuvants. Where is the cut-off? *Biomed Pharmacother.* 2018;105:616-24.
51. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 1993;11(3):293-306.
52. Weibel D, Sturkenboom M, Black S, et al. Narcolepsy and adjuvanted pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccines - Multi-country assessment. *Vaccine.* 2018;36(41):6202–11.

# Adjuvants in vaccines registered for human use

Brankica Filipić\*, Zorica Stojić-Vukanić

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of microbiology and immunology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

\*Corresponding author: e-mail: brankica.filipic@pharmacy.bg.ac.rs

---

## Summary

Vaccination is one of the most efficient strategies for prevention of infection diseases, but with introduction of sub-unit vaccines with lower immunogenicity adjuvants were needed to enhance the immune response. The term adjuvant is from Latin verb *adjuvare* which means „to aid”. Adjuvants have been used in vaccines for more than 90 years. The longest adjuvant history belongs to aluminium salts, but novel adjuvants have been introduced in licensed vaccines in last 30 years. These novel adjuvants are AS04, which consists of aluminium hydroxide and Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist monophosphoryl lipid A and is used in hepatitis B vaccine Fendrix<sup>®</sup> and HPV vaccine Cervarix<sup>®</sup>, emulsion based adjuvants which are part of several influenza vaccines-MF59 (Fluad<sup>®</sup> and Focetria<sup>®</sup>) and AS03 (Pandemrix<sup>®</sup>), AS01 liposomal adjuvant which is combination of two distinct immunostimulatory molecules and is component of herpes zoster and malaria vaccine and virosomes included in hepatitis A vaccine (Epaxal<sup>®</sup>) and influenza vaccines (Inflexal<sup>®</sup> V and Invivac<sup>®</sup>). Adjuvant development and better insight into their mechanism of action are of great importance in order to replace empirical with rational use of adjuvants, without affecting vaccine safety.

**Key words:** adjuvants, vaccines, immunogenicity

---