

Aşılar ve Aşı Adjuvanları

Aydan ERATALAY*, Filiz ÖNER*^o

Aşılar ve Aşı Adjuvanları

Özet : Yeni aşılar saf ve güvenilir olmaları açısından konvansiyonel aşılar göre üstünlüğü olan, ancak koruyucu özelliklerinin iyileştirilmesi gereken aşılardır. Bu iyileştirme adjuvan adı verilen, bir antijene karşı bağışık yanıtı arttıran maddelerin veya taşıyıcıların kullanılması ile başarılabilir.

1950'lerden beri kullanılmakta olan iki konvansiyonel adjuvan formülasyonu vardır. Bunlardan birisi mikobakteri içeren veya içermeyen mineral yağ emülsiyonları, ikincisi ise alüminyum tuzları içeren jel veya süspansiyonlardır. Bu adjuvanların pekçok yan etkileri bulunduğu için yeni adjuvanlar ve adjuvan taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Son yıllarda zayıf bağışıklık oluşturan saflandırılmış altbirim veya sentetik rekombinant antijenlerin geliştirilmesi ve alüminyum bileşiklerinin adjuvan olarak kullanılmalarındaki sorunlar modern aşılar için yeni adjuvanlar ve taşıyıcı sistemlere olan ilgiyi artırmıştır.

Yeni adjuvanlar toksik ve karsinogenik olmamalı, lokal veya sistemik reaksiyonlara sebep olmamalı ve az sayıda uygulama ile uzun süreli bağışıklık sağlamalıdır.

Bu makede altbirim ve biyoteknolojik yöntemlerle üretilen aşılar kullanılan adjuvan etkili taşıyıcı sistemler ve maddeler hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler : Aşılar, Bağışık Yanıt, Konvansiyonel Adjuvanlar, Yeni Adjuvanlar

Received : 16.02.1999

Revised : 18.11.1999

Accepted : 17.6.2000

GİRİŞ

Kazanılmış bağışıklığı sağlamak için aşılama işlemi uzun yıllardan beri kullanılmaktadır¹. Modern biyoteknolojik yöntemlerle üretilen altbirim ve rekombinant aşılar saf, daha güvenilir ve yan etkileri

Vaccines and Vaccine Adjuvants

Summary : New vaccines have some advantages due to their purity and safety characteristics, over conventional vaccines, but preventive properties need to be progressed. This can be achieved by using some materials or carriers called adjuvants which helps to increase immune response to an antigen.

There are two adjuvant formulations which have been used since 1950's. One of them is mineral oil emulsions including micobacteria or not, second one is gel or suspension formulations of aluminium salts. Studies on new adjuvants or adjuvant carriers are increasing due to the side effects of conventional adjuvants.

Recently new adjuvants and carrier systems for modern vaccines are attracting more attention because of the poor immunogenicity of pure subunit or synthetic recombinant antigens and problems with aluminium based adjuvants.

New adjuvants have to be nontoxic, noncarcinogenic, must not cause local and systemic reactions and they have to provide long term immune protection with small number of application.

In this article adjuvant carrier systems and materials used for subunit and recombinant DNA derived vaccines are reviewed.

Keywords : Vaccines, Immune Response, Conventional Adjuvants, New Adjuvants

daha düşük olan yeni aşılarıdır. Rekombinant Hepatit B aşıları piyasaya çıkmıştır; sıtma, tüberküloz, kolera, AIDS ve herpes hastalıkları için geliştirilen rekombinant aşılar ise onay almak için beklemektedir. Ancak sağladıkları bağışıklık yeterince uzun süreli olamamaktadır. Ve bu aşıların uzun dö-

* Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Sıhhiye - ANKARA.

^o Correspondence

nemli immüniteyi uyarmaları gerektiği bir gerçektir².

Aşı antijenlerinin oluşturduğu bağışık yanıtı güçlendirmek üzere aşılar eklenen maddelere veya antijeni taşıyıcı olarak kullanılan sistemlere adjuvan denir. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri ve pek çok ülkede insanlarda kullanılabilen tek adjuvan bir alüminyum hidroksit jeli olan Alum'dur. Ancak, Alum ile istenmeyen sonuçlar ortaya çıkmakta ve yeterince bağışıklık sağlanamamaktadır. Son yıllarda aşı adjuvanlarının standardizasyonuna ve yeni adjuvanların geliştirilmesine verilen önem çok artmıştır. İyi formüle edilmiş aşılardan, gelişmekte olan ülkelerin aşılama programlarının iyileştirilmesinde ekonomik ve sosyal yararları olmaktadır.

AŞILAR

Aşılar, canlı veya ölü antijenik mikroorganizmaları, bakteri toksinlerini, toksoidler, bakteri ve virüslerin belirli bölgelerinden alınmış antijenik materyalleri içeren, uygulandıkları organizmada belirli bir enfeksiyon veya intoksikasyon etkenine karşı özgül ve etkin bağışıklık sağlayan, farmasötik preparatlarıdır³⁻⁵.

AŞI ÇEŞİTLERİ

Aşı çeşitleri Tablo 1.'de özetlenmiştir.

Tablo 1 : Aşı Çeşitleri

AŞI ÇEŞİTLERİ			
TÜM ORGANİZMA AŞILARI		ALT BİRİM AŞILAR	ANTI-İDİYOTİP AŞILAR
Bakteri	Virüs	Toksoidler	
Canlı	Canlı	Polisakkaritler	
Ölü	Ölü	Proteinler	
		Peptidler	
		Rekombinant DNA Teknolojisi Ürünü Aşılar	
		DNA Aşılar	

TÜM ORGANİZMA AŞILARI

a. Bakteri Aşıları

Canlı veya ölü bakterilerden hazırlanan aşılar. Öldürme işlemi ısı veya kimyasal maddelerle muamele sonucu gerçekleştirilmektedir. Tüberkülozun önlenmesi için kullanılan BCG aşısı bu grubun kullanılan tek örneğidir^{6,7}.

b. Virüs Aşıları

Bazı virüs enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili olan aşılar. Canlı virüsler, öldürülmüş virüsler, virüs altbirimleri veya viral polipeptidler kullanılabilirler.

a) Canlı virüs aşıları

Hastalık yapma etkisi azaltılmış virüsler kullanılmaktadır. Bu aşılar enfeksiyonun doğal seyri sırasında tek doz uygulama ile antikor oluşumunu ve sitotoksik hücreleri indükleyebilmektedirler. Yarılanma ömürleri kısadır. Kızamık, kabakulak, kızamıkçık, çocuk felci (Sabin aşısı), sarı humma aşıları ve bazı adenovirüslere karşı hazırlanan aşılar canlı virüs aşılarına örneklerdir⁸⁻¹⁰.

b) Öldürülmüş virüs aşıları

Tüm virüsün ısı ya da kimyasal maddelerle inaktivasyon yoluyla, hastalık yapma etkisinin giderilmesiyle hazırlanmaktadır. Vücuda injekte edildikleri zaman virüsün yalnız yüzey antijenlerine karşı antikorlar oluşmakta ve karma aşılar içerisinde kolay katılabilmektedirler. Hücre aracılı yanıtın zayıf olması ve aşırı duyarlılık oluşturabilmeleri istenmeyen yanlarıdır. Poliovirüs (Salk aşısı), kuduz ve influenza aşıları bu grubun örnekleridir^{10,11}.

c) Virüs altbirim aşıları

Virüslerden elde edilen saflaştırılmış proteinlerdir (viral reseptörler). Öldürülmüş aşılar ile aynı özelliklere sahiptirler. Adenovirüslere karşı etkilidirler⁵.

d) Viral polipeptidler

Virüs reseptörlerinin polipeptid zincirleridir. Öldürülmüş aşılar ile aynı özelliklere sahiptirler. Hepatit B virüsüne karşı kullanılan aşı bu gruba örnektir¹².

ALT BİRİM AŞILAR

İmmünojen olarak saflaştırılmış mikrobiyal bileşenlerin kullanıldığı aşılar. Altbirim aşılarla uyarılan bağışık yanıtı etkileyen 5 ana faktör vardır:

1. İmmünojenin doğası ve dozu
2. Formülasyonda kullanılan adjuvan veya taşıyıcılar
3. Bağışıklama programı
4. Uygulama yolu
5. İmmünize edilen bireyin immün durumu (yaş, genetik yapı ve immün sistemde önceden var olan eksiklikler)¹³.

a. Toksoidler

Bu gruptaki aşılar ekzotoksinlerin ve endotoksinlerin formaldehitte belirli ısıda bir süre tutularak uzaklaştırılması sonucu toksik etkileri giderilmiş preparatlardır¹⁰. Toksoidler grubundaki ilk altbirim aşılar difteri ve tetanoz aşılarıdır. Bu hastalıkların etkenleri, virülans faktörleri güçlü olan endotoksinlerdir. Bu proteinlerin formalin ile toksisitesi yok edilerek nötralize edici antikorların üretimini uyaran toksoidler elde edilmektedir⁴. Toksoidler, antitoksoid antikorları uyarak bağışıklık kazandırır. Bunlar aynı zamanda toksine bağlanabilmekte ve onun toksik etkilerini nötralize edebilmektedirler. Toksoid aşıların üretiminde epitop yapısını aşırı bozmaksızın detoksifikasyonun sağlanabileceği koşullar iyi kontrol edilmelidir¹⁴.

b. Polisakkaritler

Bazı patojenik bakterilerin virülansı başlıca hidrofilik polisakkarit kapsüllerinin antifagositik özelliklerine bağlıdır¹⁴. Kapsüller polisakkaritler tuz çözeltileri kullanılarak bakterilerden ekstraksiyon yoluyla veya bakterinin yetiştirildiği kültür ortamından elde edilirler⁴. Bakterilere karşı koruyucu bağışıklığı uyaran, çok immünojenik yapılardır. Hemofilus influenza tip b (Hib) pnömokoku kapsül polisakkariti ile hazırlanan aşılar, bu gruba örnek verilebilir^{15,16}. Polisakkarit aşıların sakıncası; T_H (yardımcı T hücresi) hücrelerini aktive edememeleridir. Bu nedenle araştırmacılar, bağışık yanıtta T_H'lerin de yer alması için polisakkarit antijeni

bazı protein taşıyıcılar ile konjuge etmişlerdir. Örneğin; Hib kapsüler polisakkariti, tetanoz toksoidi gibi bir protein taşıyıcıyla kovalanarak bağlanmış. Bu konjugatın polisakkarit antijenin tek başına gösterdiği bağışık yanıtından daha güçlü bir bağışık yanıtı yol açtığı gözlenmiştir¹⁷.

c. Proteinler

Rekombinant bir immünojeni içeren ve ticari ürün olarak bulunan ilk aşı Hepatit B aşısıdır (Rekombivax HB, Merck) ve FDA tarafından 1986 yılında ruhsat almıştır. Bu aşı Hepatit B virüsünün yüzey antijeni (HBsAg)'nden oluşmakta ve koruma mekanizması nötralize edici antikorların üretilmesine dayanmaktadır¹⁸. Diğer bir örnek; immünojen olarak rekombinant HIV-1 kuşatıcı glikoprotein antijenini (gp 160 ve gp 120) içeren AIDS aşısıdır. Ancak bu aşı üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir⁴. Rekombinant protein aşıların sakıncası; organizma tarafından ekzojen antijen olarak değerlendirilmeleri ve bu nedenle de hücresel yanıtı yeterli derecede uyarmamaları, yalnız humoral bağışıklığı uyarmalarıdır¹⁹.

d. Peptidler

İnfeksiyon etkenlerinin (veya antijenlerin) immünojenik bileşenlerini oluşturan proteinlerin rekombinant DNA teknolojisi ile sentezleri sonucu elde edilen polipeptidlerin aşı olarak kullanılması da son yıllarda üzerinde durulan aşı çalışmalarındandır²⁰. Bu tip aşılar seçici olmaları, kimyasal olarak tanımlanmış ve emniyetli olmaları nedeniyle üstünlüklere sahiptirler. Kimyasal olarak saflaştırılmış peptid aşılar otomatik aletlerde büyük miktarlarda üretilirler. Ayrıca bu tip aşılar denatürasyona dayanıklıdır, kolaylıkla saklanabilir ve buzdolabı gerektirmeden taşınabilirler²¹. Bu gruptaki aşılar arasında hepatit B, sıtma, difteri, influenza ve AIDS aşılarını sayabiliriz¹⁹.

e. Rekombinant DNA Teknolojisi Ürünü Aşılar

Rekombinant aşılar canlı, hastalık yapma etkisi azaltılmış organizmaların genomları içerisine immünojenik proteinleri kodlayan genlerin sokulması yoluyla geliştirilmiş aşılar⁴. İlk rekombinant aşı

hepatit B aşısıdır. Bu aşı maya hücrelerinde HBsAg'nin major yüzey antijen geninin klonlanmasıyla geliştirilmiştir¹⁹.

Önemli antijenik kısımlar, hastalığa neden olan organizmadaki antijenin yapısına çok benzer bir konformasyonda bağışıklık sistemine sunulmaktadır. Tek başına saflaştırılmış antijen sıklıkla doğal konformasyonunu kaybetmekte ve zayıf bir immünolojik yanıtı sebep olmaktadır²². Bu yanıtı artırmak üzere uygun adjuvanların formüle edilmesi gerekmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş ve kullanılmakta olan Hepatit B aşısının yanısıra AIDS²³⁻²⁶, sıtma²⁷⁻²⁸, hemofilus influenza tip b²⁹ ve tüberküloz^{6,30} olmak üzere daha pekçok hastalık için rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir³¹.

f. DNA Aşılar

DNA aşıları ilk olarak 1992 yılında tanımlanmışlardır³². Bu aşılar sitolitik T hücreleri, T-yardımcı hücreleri ve antikorları da içeren geniş spektrumlu bir bağışıklığı indüklerler³³⁻³⁵. Genetik bağışıklık antijeni kodlayan DNA'yı taşıyan plazmidlerin doğrudan kas veya deri içerisine verilmesiyle sağlanır ve bu durum gen ürününün konakçı hücrede önce antijeni daha sonra da antikorunu üretmesine neden olur^{36,37}. DNA aşılarının uygun taşıyıcı sistemler içerisinde verilmeleri amacıyla taşıyıcı sistemler olarak gen tabancası^{38,39}, canlı vektörler^{36,40} viral olmayan sentetik mikropartiküler sistemler ve adjuvan taşıyıcılar üzerinde çalışılmaktadır.

Bu çalışmalarda bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Yüksek canlıların kas hücrelerine DNA'nın taşınması zordur. Yerel reaksiyonlar, sistemik toksisite, genetik toksisite, DNA'nın stabilitesi ve saflığı DNA aşılarının uygulanmasında bağışık yanıtın yeterli olmasını engellemektedir³⁷.

Ancak DNA immünizasyonunun klasik immünizasyona göre birtakım üstünlükleri de vardır: Antijenler intrasellüler olarak ifade edilir, sınıf I MHC moleküllerine sunulur, böylece sitotoksik T

hücrelerini (T_C) stimüle edebilir ve uzun dönemli immünite sağlanabilir⁴¹. Soğuk zincir gerektirmemeleri az gelişmiş ülkeler için bir üstünlüktür⁴².

ANTI-İDİOTİP AŞILAR

Bir bireyin her bir B hücre klonu tarafından üretilen antikorlarının değişken bölgelerinin aminoasit sakanları farklı sabit bölgeleri ise birbirinin benzeridir. İdiotip sözcüğü; bir bireyin yalnız bir antikor sınıfında bulunan özgül bölgeleri tanımlamaktadır. Bağışıklandırmadan sonra, bir X-antijenine karşı oluşan antikor (Ab1), X-antijeni üzerindeki epitopa uyan bölgeler taşır ve bu antikorlara idiotip antikorlar denir. Bu antikorlar bir anti-anti X-antikoru (Ab2) için antijen olarak davranmakta ve bunlara anti-idiotip antikorlar adı verilmektedir²⁰.

Bazı mikroorganizmalarda, özgül antikorların idiotiplerine karşı anti-idiotip antikorlar hazırlanmaktadır. Bu antikorlar, ilk antikoru oluşturan antijenin benzeridir. Bu nedenle anti-idiotip antikorlarla yapılan bağışıklandırmalarda, ilgili antijen bulunmaksızın antikor yanıtı meydana getirilir. Bu yöntemle kuduz virüsüne karşı, kuduz virüsü injekte edilmeden antikor yanıtı sağlanabilmiştir¹⁰.

BİR AŞININ İMMÜNOJENİTESİNİ ETKİLEYEN ETKENLER

Bir aşının yanıt oluşturabilmesi pek çok etkene bağlıdır. Bunları kısaca şöyle sıralayabiliriz:

- Uygulama dozu ve uygulama yolu
- Primer ve sekonder bağışıklama zamanları
- Adjuvan
- Antijenin özellikleri

Bu grupta eczacılık yönünden aşı formülasyonunda önem taşıyan konuların başında adjuvanlar gelmektedir.

AŞI ADJUVANLARI

TANIMI

Adjuvan latince "Adjuvare" yardım etmek

sözcüğünden gelmekte ve bir antijene karşı hü-moral veya hücreyel bağışık yanıtı artırabilen yar-dımcı maddeleri adlandırmakta kullanılmaktadır⁴³. Son yıllarda biyosentetik, rekombinant ve diğer mo-dern teknolojileri kullanarak geliştirilen saf-laştırılmış altbirim veya sentetik aşılarda zayıf im-münojenler ve bağışık yanıtı uyarmak için iyi bir adjuvana gereksinim vardır⁴⁴⁻⁴⁶. Adjuvanlar eski ve yeni aşılarda erken ve uzun dönemli bağışık yanıtı artırmakta kullanılmaktadır⁴³. Bir aşılama pratik ve ekonomik nedenler ile en az sayıda enjeksiyonla uzun süreli aktif profilaktik bağışıklık sağlanmış ol-malıdır. Bu nedenle adjuvanların aşılardaki işlevi çok önemlidir.

Adjuvan etki ilk kez 1916 yılında Le Moignac ve Pinay tarafından mineral yağ içerisinde Salmonella typhimurium süspansiyonu kullanılarak gös-terilmiştir. Bu tarihten sonra, antikor oluşturan bir-çok madde ve formülasyon adjuvan etkileri yö-nünden araştırılmıştır.

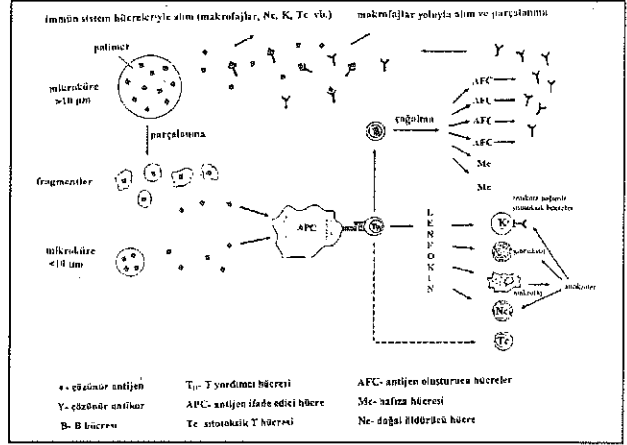
Adjuvan araştırmalarındaki ikinci önemli adım Glenny ve arkadaşları tarafından atılmıştır. Glenny 1926 yılında alum ile çöktürülmüş difteri tok-soidinin, toksoidin çözeltisine göre çok daha etkili olduğunu göstermiştir⁴⁷. Bu bulgu alüminyum pre-paratlarının adjuvan olarak geliştirilmesini sağ-lamıştır.

ADJUVANLARIN ETKİ MEKANİZMASI

Adjuvanların hücreyel ve moleküler düzeyde farklı etki mekanizmaları vardır⁴⁸. Bunlar; antijenin yavaş salımı için depo etki, antijen ifade edici hücrelere (APCs) hedefleme, bu hücrelerin (APCs) ak-tivasyonu, sitokinlerin uyarılması⁴⁹, antijen mo-leküllerinin konformasyonel değişikliklere uğ-ratılması veya moleküllerin net polar yüklerinin değiştirilmesi şeklinde olmaktadır. Bir etki şekline göre de bazı adjuvanlar antijen moleküllerini de-natüre etmekte ve onları partiküler bileşiklere dö-nüştürmektedirler. Böylece onların makrofajlar ta-rafından tanınması kolaylaşmaktadır⁵⁰. Şekil 1'de partiküler taşıyıcı sistemlerin bağışık sistem ile et-kileşme mekanizmaları görülmektedir.

Antijenin bir yüzeye bağlanması veya antijen ad-

sorpsiyonu için özel bir yüzeyin olması, ad-juvanların biyolojik aktivitesi için önemli olarak gö-rülmektedir. Biyolojik aktivite; antijenin sunumu, ta-nınması, antijen-antikor etkileşimi ve konakçı proteinlerinin inflamatuvar veya bağışık yanıtı aktive etmesi şeklinde ilerlemektedir⁴⁸.



Şekil 1: Partiküler Taşıyıcı Sistemlerin Bağışık Sistem İle Etkileşimleri⁴⁷

İmmün yanıtta rol alan 2 önemli hücre grubu B ve T hücreleridir. Antijenler B veya T hücre yanıtını uya-rarak bellek ve efektör hücrelerin üretimini sağ-larlar⁵¹.

Bellek hücreleri; lenfositlerin spesifik antijenlerle ak-tive edilmesinden sonra üretilir ve enfeksiyonu ön-lemezler. İnfeksiyon ve patolojisi arasındaki zaman sekonder efektör hücre yanıtı için gereken za-mandan daha uzun olduğu zaman koruma sağ-layabilirler. Enterik hastalıklara ve solunum yolu hastalıklarına neden olan bakteri ve virüslerin hızlı replikasyonlarını kontrol edemezler. Primer yanıt esnasında şekillenmeye başlarlar.

Efektör T ve B hücreleri, bellek hücrelerinden daha hızlı üretilir ve enfeksiyonun tedavisinden so-rumludurlar.

KONVANSİYONEL ADJUVANLAR

Uzun yıllardan beri kullanılmakta olan iki ad-juvandan birisi mineral yağ emülsiyonu ikincisi ise alüminyum tuzları (Alum)'dır⁵²⁻⁵⁴.

Alum Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılabilen tek adjuvandır⁵⁵. İnsanlarda en fazla kullanılan alüminyum tuzları alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat'tır. Etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmış değildir, ancak injeksiyon bölgesinde antijenin depolanması ve buradan uzun sürede salınması şeklinde açıklanmaktadır⁵⁶. Bir diğer mekanizma, bu adjuvanların lokal inflamatuvar reaksiyonu indüklemesi ve makrofajlar ve diğer bağışık sistem hücrelerinin uyarılmasıdır. Antijen sunan hücreler (APC) içerisine antijenin alımı kolaylaştırılmakta ve hem humoral hem de hücre sel bağışık yanıt uyarılmaktadır^{47,49,56}.

Alum yaygın olarak kullanılmakla birlikte bazı sorunlar söz konusudur. Bunlar şöyle sıralanmaktadır;

- Tüm protein ve peptidler alum üzerine iyi adsorbe olmamaktadır
- Alum üzerine adsorbe olan aşılarda saklanması zordur, liyofilizasyon olanaksızdır
- Alüminyumla ilgili patolojik durumlar ve IgE oluşumu bildirilmektedir
- Yalnız B hücre yanıtını uyarması nedeniyle bağışık yanıt zayıf olmaktadır⁵⁷.

Yağ emülsiyonları da iyi adjuvan etki göstermektedir. Buna en eski örnek Freund's adjuvanı olup sürfaktan olarak Arlacel A, yağ fazı olarak da mineral yağ içeren bir emülsiyondur. IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) ve CFA (Complete Freund's Adjuvant) olarak iki şekilde bulunur. CFA hem humoral hem hücre sel bağışık yanıtı arttırmakta ve inaktive edilmiş mikobakteri içermektedir⁵⁸

Güçlü adjuvan etkisi olan IFA'nın ise doku hasarı yaptığı, tümörleri indükleyebildiği, bakterilerle formüle edildiğinde virüslere göre çok daha toksik olduğu bildirilmektedir^{49,59,60}.

YENİ ADJUVANLAR

Yeni adjuvanlar dispers sistemler şeklinde taşıyıcılar veya moleküler sistemler olarak iki grupta toplanmaktadır. Bu sistemler sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2 : Aşı Adjuvanı Olarak Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

Adjuvan	Kaynak
Alum	49,61
Komple olmayan Freund's adjuvan (IFA)	49
Komple Freund's adjuvan (CFA)	62
Lipozomlar	49,63-65
Lipozomlar (MPL içeren) + Alum	49
Treonil MDP+yağ+pluronik blok polimer (Syntex adjuvan formülasyonu)	49
MPL+yağ+hücre duvarı	49,66
Immün stimüle edici kompleksler (ISCOMS)	49,67-70
Lipozomlar (MTP-PE içeren)	49
Aluminyum + insan büyüme faktörü	49
Lipoküreler	49,71
Mikroküreler	449,72-74
Emülsiyonlar	75-77
Niozomlar	31,78

Tablo 3: Aşı Adjuvanı Olarak Kullanılan Moleküler Sistemler

Adjuvan	Kaynak
Monofosforil Lipid A (MPL)	49
Muramil tripeptid-fosfatidiletanolamin (MTP-PE)	49
Muramil dipeptid (MDP)	49,79
MDP+IFA	49
Interferon-alfa	49
Interferon-gamma	49,80
Klebsiella pneumoniae glukoproteini	49
QS-21 (saponin - Quil A'nın benzeri bileşeni)	49
Interlökin-1 (IL-1)	49
Noniyonik blok polimer (L 180)	49,81,82
Guanosin analogları	49
Kolera toksini	49,83
Kolesterol türevleri	49
Virüs zarf proteinleri	49
Tween	49
E Vitamini	49,84
Interlökin-2 (IL-2)	49
Lipopeptidler	49,85,86
Saponinler	49
Sitokinler	56
Lipid A	87

1) TAŞIYICI SİSTEMLER

a. Emülsiyonlar

Mineral yağ emülsiyonları adjuvan aktivitesi bilinen en eski formülasyonlardır⁴³. Ancak mineral yağ emülsiyonlarının adjuvan olarak kullanılmasında bazı sorunlar vardır. Mineral yağ metabolize olmamakta ve injeksiyon yerinde kalmaktadır. Çalışmalar adjuvan preparatlarında kullanılmak üzere hegzadekan, skualan, susam yağı, yerfıstığı yağı gibi alternatif yağ fazlarına yoğunlaşmıştır. Bitkisel yağlarla yapılan çalışmalar başarısız olmuştur. Çünkü bu yağlar dayanıklı değildir ve mineral yağlara göre daha düşük antikor yanıtı oluşturmaktadırlar.

Emülsiyonların adjuvan aktivitesinden sorumlu birçok mekanizma öne sürülmüştür. Ancak en kabul göreni; emülsiyonun antijen için bir depo fonksiyonu yapması ve buradan antijenin uzun zaman içinde yavaş salımının sağlanmasıdır^{31,88}.

b. Mikroküreler

Parenteral yolla uygulanan biyoparçalanabilir mikroküreler hem antijen deposu oluşturdukları, hem de bölgesel inflamatuvar reaksiyonu uyardıkları için uygun taşıyıcı sistemlerdir⁸⁹. Biyoparçalanabilir mikrokürelerden makromoleküllerin salımı mikropartiküllerin yapısından, morfolojisinden ve polimerin özelliklerinden etkilenmektedir.

İnjesiyon bölgesinde mikrokürelerden antijen salımı, CFA emülsiyonları veya alum-adsorbe edilmiş sistemlerdeki gibi yavaş olmaktadır⁹⁰. Mikroküre büyüklüğü önemli bir parametredir. Küçük partiküller (< 10 µm) fagositoz yoluyla makrofajlar içerisine doğrudan alınabilmekte, 10 µm'den büyük mikroküreler ise, fagositoz gerçekleşmeden yıkıma uğramaktadır. Bu partiküller injeksiyon bölgesinde kalmakta, antijen difüzyon ile veya polimer erozyonu ile salınmaktadır⁴⁷.

c. Lipozomlar

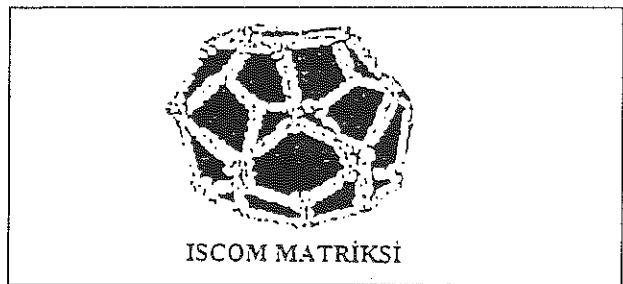
Lipozomlar; antijeni yavaş salan depo sistemler olarak adjuvan etki göstermektedir. Adjuvan etki ay-

rica lipozomal membranların net yükleri, hapsedilmiş ve yüzeye adsorbe olmuş antijenin durumu, fosfolipitlerin tipi, akıcılığı, faz geçiş sıcaklıkları, lipozomun tipi ve fosfolipid : antijen oranlarından da etkilenmektedir⁹¹.

Lipozomların biyoparçalanabilir ve immünolojik olarak inert olmaları, toksik olmamaları ve hazırlanmalarının kolay olması adjuvan taşıyıcı sistem olarak kullanılmasında avantaj yaratmaktadır^{58,64}. Tek bir lipozom içerisinde birden fazla antijen hapsedilebilmekte ve uzun süreli ve yüksek titreli antikor yanıtı alınmaktadır⁶⁵. Ancak lipozomların stabilite sorunları önemli bir engel oluşturmaktadır.

d. Iscom

Iscom; saponin yapısında bir adjuvan olan Quil-A, kolesterol ve amfifilik bir antijenin yaklaşık olarak 1:1:1 molar orandaki karışımıdır⁷⁰. Antijenin amfifilik yapıda olması Quil-A/Kolesterol matriksi ile etkileşmesi için önemlidir. Şekil 2.'de Iscom matriksinin yapısı görülmektedir. Iscom matriksinin stabilitesi ve boyutunun ufak oluşu, dolaşımında uzun süre kalmasına imkan verir. Diğer bir üstünlüğü; büyük miktarlarda üretime uygun olmasıdır⁹². Iscom'un sitotoksik T-lenfositlerini (T_c) indüklediği ve injeksiyondan sonra herhangi bir yan etki oluşturmadığı gösterilmiştir⁷⁰. Iscom'lar yalnız veteriner aşılarda kullanılmaktadır⁴³.



Şekil 2: ISCOM Matriksinin Yapısı⁶⁹

e. Niozom

Niozomlar alkil veya dialkil poligliserol eter yapısında sentetik noniyonik sürfaktanlar ile hazırlanan tek veya çok tabakalı veziküllerdir^{93,94}.

Niozomların CFA'ya göre IgG2a'yı daha fazla uyardığı, ancak IgG1 için zayıf bir etki gösterdiği bulunmuştur. Niozomlar immünolojik seçicilik, düşük toksisite ve dayanıklılık açısından diğer adjuvanlara üstünlük göstermektedir^{31,78,95}.

2) MOLEKÜLER SİSTEMLER

a. E Vitamini

Hogan ve arkadaşları⁸⁴ tarafından yapılan bir çalışmada E.coli J5 aşısında E Vitamininin adjuvan etkisi incelenmiştir. E Vitamininin kendisi güçlü bir adjuvan etki yapmamakta fakat diğer adjuvanların etkisini güçlendirmektedir. Tek başına E Vitamini serum IgM titresini artırmış, Freund's adjuvan ile E Vitamini karışımının oluşturduğu IgG titresini ise yalnız Freund's ile olan titreden daha yüksek bulunmuştur.

b. Interlökin-2

Hayvanlara injekte edilen IL-2 sulu çözeltilerinin Kuduz, Haemophilus pleuropneumoniae ve Herpes simplex'e karşı bağışıklığı artırdığı gösterilmiştir. IL-2 farklı yollarla uygulandığı zaman iki farklı etki mekanizması ile adjuvan etki gösteren bir sitokindir. Antijen verildikten sonraki birkaç gün için, günde 1 veya 2 kez uygulama ile bağışıklık sağlanmıştır. Ayrıca IL-2 antijen ile birlikte yağ içerisinde emülsifiye edilip uygulandığı zaman tek dozda bile etkili bulunmuştur⁵⁶.

c. Lipid A

Lipid A hidrofobik ve amfifilik özellikte bir madde olup, tek başına veya bir antijenle birlikte uygulandığında sitokin cevabı oluşturmaktadır. Bu sitokinler daha sonra makrofajları aktive etmekte ve adjuvan özellik ortaya çıkmaktadır⁸⁷.

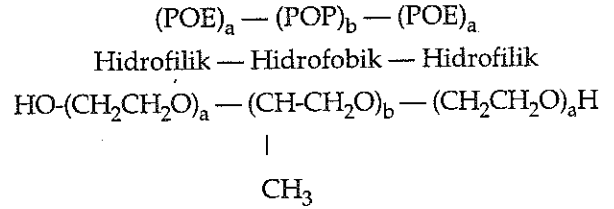
d. Lipopeptidler

Lipopeptidler bakteri hücre duvarının toksik ve immünojenik olmayan analoglarıdır. Amfifilik olmaları adjuvan özelliğinin sağlanmasında önem taşımaktadır. Lipopeptidler çok kolaylıkla uygulanabilir ve ticari olarak mevcuttur⁶².

e. Noniyonik Blok Kopolimerler

Pluronikler adıyla da bilinen noniyonik blok kopolimer (poly(oxyethylene) (POE) ve poly(oxypropylene) (POP) sürfaktanlar güçlü B hücresi etkinliği sağlamaktadır. Pluronik polioller kimyasal olarak benzer, fizikokimyasal olarak farklı yüzey etkin özellik göstermektedirler. Hidrofilik polioksietilen ve lipofilik polioksipropilen kopolimerlerinden oluşmuşlardır. Bunlardan birisi olan L121 bir S/Y/S emülsiyonu içerisinde injekte edildiği zaman farede BSA (sığır serum albümini)'ya karşı antikor oluşumunu artıran güçlü bir adjuvan etki göstermiştir. L101 ise antikor oluşumunu indüklemekte daha az, granulomatoz reaksiyonu indüklemekte ise daha fazla etkili bulunmuştur⁹⁶. POE ve POP triblok kopolimerlerine ait genel yapı Şekil 3.'de görülmektedir.

Noniyonik blok kopolimer sürfaktanlar adhesiv özellikte olup, hidrofilik bileşenleri ile antijene ve kompleman bileşenlerine, hidrofobik kısımları ile de yağa bağlanırlar. Bu düzenleniş antijenin bağışık sisteme sunumunu kolaylaştırır ve etkisini artırır⁸².



Şekil 3: POE ve POP Triblok Kopolimerlerine Ait Genel Yapı⁹⁷

Hidrofilik POE bölgeleri içeren triblok kopolimerler merkezi bir hidrofobik POP kısmı bulundurulur. Sulu süspansiyon şeklindeki formülasyonları adjuvan olarak araştırılmıştır⁹⁷. L-121 ve L-180 gibi triblok kopolimerler çeşitli antijenler için güçlü adjuvan etki gösterirken, L-122, L-181.5 ve L-182.5 gibi POE içeriği ve molekül ağırlığı artmış olanlar antijenlere karşı bağışık yanıtı uyandırmamaktadır. İçeriğinde NBP (Noniyonik blok polimer sürfaktan) bulunan ve piyasaya sunulmuş olan etkili iki adjuvan formülasyonu bulunmaktadır. Bunlar; SyntexR ve TitermaxR adı ile bilinmektedir⁹⁸.

Molekül ağırlığı (MA) farklı, yapısı benzer olan ko-

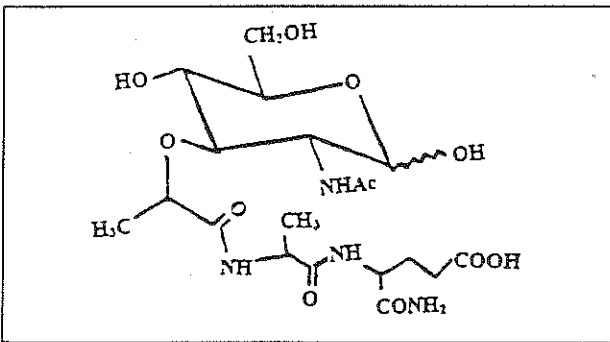
polimerler farklı bağışık yanıtlar verebilmektedir. Molekül ağırlığı daha büyük olan L121 (HLB=0.5) ile aynı antijenlere karşı hem primer hem de sekonder yanıt oluşumu gözlenmiş, MA'lığı küçük olan L101 (HLB=1.0) ile ise yalnız DTH (Gecikmiş tip hipersensitivite) reaksiyonu gözlenmiştir. Yapılarındaki benzerliğe karşın etkideki farklılık molekül üzerindeki etkin bölgenin bağışıklık sistemin uyarılmasından sorumlu olmadığını göstermektedir⁹⁷.

L121 güçlü bir adjuvan etki gösterirken, L101 granuloma oluşumuna neden olmuştur. Bu durumda adjuvan etki tam olarak inflamatuvar reaksiyona göre açıklanamamaktadır. HLB değeri ikiden küçük olan sürfaktanlar güçlü adjuvan aktivite gösteren lipofilik maddeler olup, Y/S emülsiyonunda yağ damlacıkları tarafından makromoleküllerin alınmasına yardımcıdırlar⁹⁶.

f. MDP

MDP (N-acetylmuramyl-L-alanine-D-isoglutamine); birkaç mycobacterium türünün hücre duvarında bulunan peptidoglikan yapısında bir bileşiktir ve adjuvan olarak kullanılmaktadır. Şekil 4.'de MDP'nin kimyasal yapısı görülmektedir.

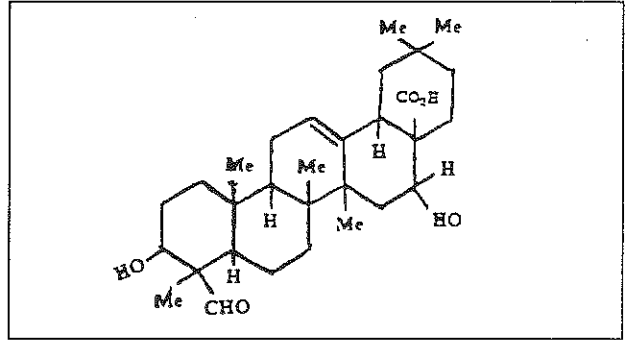
MDP monomerik yapıda, suda çözünen bir moleküldür ve B hücreleri, T hücreleri ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücreleri ile etkileşmektedir. MDP'nin etkinliği ve özgüllüğü modifiye edilebilmektedir⁷⁹.



Şekil 4. : MDP'nin Kimyasal Yapısı⁹⁷

g. Saponinler

Saponinler bitkilerde görülen yüzey etkin özellikte maddelerdir. Bir Güney Amerika bitkisi olan Quillaria saponaria'nın gövdesinden ekstre edilen Quil A adlı saponinin adjuvan özelliği 50 yıldır bilinmektedir⁹⁹. Şekil 5.'de Quillaria saponaria'ya ait saponinin triterpen zinciri görülmektedir.



Şekil 5. : Quillaria Saponaria'ya Ait Saponinin Triterpen Zinciri⁹⁹

Saponinler IgG1, IgG2 cevabını ve gecikmiş tip hipersensitivite ile görülen hücre aracılı bağışıklığı uyarmaktadır.

SONUÇ

Gerek antibiyotiklerin bulunması, gerekse aşılamaadaki ilerlemeler sonucunda infeksiyon hastalıkları eski çağlara göre daha iyi kontrol altına alınabilmekle birlikte viral infeksiyonlarla ilgili sorunlar önemini korumaktadır. Bu yönde aşılara ilgili çalışmalara verilen önem gün geçtikçe artmaktadır.

Konvansiyonel aşılara görülen olumsuzluklardan hareketle geliştirilen yeni kuşak aşılara daha saf ve güvenilir yapılarıdır, ancak bağışıklandırılmaları zayıftır ve güçlü bir bağışıklık sağlayabilmek için etkili adjuvan maddeler veya taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmalar giderek artmaktadır.

Antijeni uzun süreli bağışıklık sağlayacak şekilde salan, yüksek titrede ve vücuttan kolayca yok olmayan antikor oluşumu sağlayan ve istenmeyen yan etkilere neden olmayan adjuvan taşıyıcıları yeni kuşak aşılara en önemli kısmını oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Gökhan N, Çavuşoğlu H, "Bağışıklık ve Allerji", in Guyton AC (ed), *Tıbbi Fizyoloji*, Ankara, Alemdar Ofset, pp. 87-101, 1989 (çeviri).
2. La Montagne JR, Rabinovich R, "Challenges and Opportunities in Vaccine Research", in Ciardi JE (ed), *Genetically Engineered Vaccines*, New York, Plenum Press, pp.293-299, 1992.
3. Reynolds CEF (ed), *Martindale The Extra Pharmacopoeia*, London, The Pharmaceutical Press, Twenty ninth Edition, pp.1155-1177, 1989.
4. Klegerman ME, "Vaccines", in Klegerman ME, Groves MJ (eds.), *Pharmaceutical Biotechnology*, Buffalo Grove, IL, Interpharm Press, pp.64-76, 1992.
5. Ada GL, "Human Vaccines", in Brown F (ed), *Recombinant Vectors in Vaccine Development*, Switzerland, Int.Association of Biological Standardization, pp.181-188, 1994.
6. Stover CK, Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, New Use of BCG for Recombinant Vaccines, *Nature*, 351, 456-460, 1991.
7. Bellanti JA, Robbins JB, "Immunoprophylaxis: The Use of Vaccines", in Bellanti JA (ed), *Immunology III*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 508-532, 1985.
8. Mekalanos JJ, Sadoff JC, Cholera Vaccines: Fighting an Ancient Scourge, *Science*, 265, 1387- 1389, 1994.
9. Katz SL, Gellin BG, Measles Vaccine: Do We Need New Vaccines or New Programs, *Science*, 265, 1391-1392, 1994.
10. Gülmezoğlu E, Ergüven S, "Aşılar ve Serumlar", Gülmezoğlu E, Ergüven S (eds.), *İmmünoloji*, Ankara, Feryal Matbaacılık, pp.117-198, 1994.
11. Siber GR, Pneumococcal Disease: Prospects for a New Generation of Vaccines, *Science*, 265, 1385-1387, 1994.
12. Castresana-Isla CJ, Herrera-Martinez G, Vega-Molina J. Erythema Nodosum and Takayasu's Arteritis After Immunization With Plasma Derived Hepatitis B Vaccine, *The Journal of Rheumatology*, 20(8), 1417-1418, 1993.
13. Newman MJ, Powell MF, "Immunological and Formulation Design Considerations for Subunit Vaccines", in Powell MF, Newman MJ (eds.), *Vaccine Design*, New York, Plenum Press, pp.1-42, 1995.
14. Kuby J, "Vaccines", in Kuby J (ed), *Immunology*, New York, Freeman and Company, pp.443-457, 1997.
15. Gilbert GL. New Vaccines For Haemophilus Influenzae Type b Disease, *The Medical Journal of Australia*, 156, 518-520, 1992.
16. Kroll JS. Haemophilus Influenzae Type b Vaccine, *Irish Medical Journal*, 84(3), 78, 1991.
17. Eby R, "Pneumococcal Conjugate Vaccines", in Powell MF, Newman MJ (eds.), *Vaccine Design*, New York, Plenum Press, pp. 695-714, 1995.
18. Chiramonte M, Majori S, Ngatchu T, Moschen ME, Baldo V, Renzulli G, Simoncello I. Two Different Dosages of Yeast Derived Recombinant Hepatitis B Vaccines: a comparison of immunogenicity, *Vaccine*, 14 (2), 135-137, 1996.
19. Cease KB, Margalit H, Cornette JL, Putney SD, Robey WG, Ouyang C, Streicher HZ, Helper T-cell Antigenic Site Identification in the Acquired Immunodeficiency Syndrome Virus gp 120 Envelope Protein and Induction of Immunity in Mice to the Native Protein Using a 16-residue Synthetic Peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 4249-4253, 1987.
20. Arda M, "Biyoteknolojik Aşılar", Arda M (ed), *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)*, Ankara, Armonî Ltd. Şti., pp. 121-143, 1994.
21. Nardelli B, Tam JP, "The MAP System", in Powell MF, Newman MJ (eds.), *Vaccine Design*, New York, Plenum Press, pp.803-816, 1995.
22. Graham BS, Matthews TJ, Belshe RB, Clements ML. Augmentation on Human Immunodeficiency Virus Type I Neutralizing Antibody by Priming With gp 160 Recombinant Vaccinia and Boosting with rgp 160 in Vaccinia-Naive Adults, *J. Infect. Dis.*, 167, 533-537, 1993.
23. Letvin LN. Vaccines Against Human Immunodeficiency Virus-Progress and Prospects, *New Eng. J. Med.*, 329 (4), 1400-1405, 1993.
24. Putney S. How Antibodies Block HIV Infection: Paths to an AIDS Vaccine, *TIBS*, 17, 191-196, 1992.
25. Chowdhury IH, Koyanagi Y, Takamatsu K, Yoshida O. Evaluation of Anti- Human Immunodeficiency Virus Effect of Recombinant CD4-Immunoglobulin. In Vitro: a good candidate for AIDS treatment, *Med. Microbiol. Immunol.*, 180, 183-192, 1991.
26. Brown AI, Singharaj P, Webster HK, Pipithkul J, Gordon DM. Safety, Immunogenicity and Limited Efficacy Study of a Recombinant Plasmodium Circumsporozoite Vaccine in Thai Soldiers, *Vaccine*, 12 (2), 102-108, 1994.
27. Nussenzweig RS, Long CA. Malaria Vaccines: Multiple Targets, *Science*, 265, 1381-1383, 1994.
28. Gilbert GL. New Vaccines for Haemophilus Influenzae Type b Disease, *Med. J. Aust.*, 156 (20), 518-520, 1992.
29. Aldovini A, Young RA. Humoral and Cell-Mediated Immune Responses to Live Recombinant BCG-HIV Vaccines, *Nature*, 351, 479-482, 1991.
30. Glick BR, Pasternak JJ, "Vaccines and Therapeutic Agents", *Molecular Biotechnology*, USA, ASM Press Washington, DC, pp.207-233, 1994.
31. Eratalay A., Öner F., Özcengiz E., Hıncal A.A., Adjuvant Carriers for Recombinant Hepatitis B Virus Surface Antigen, *Proc.2nd World Meeting APGI/APV*, pp.1127-1128, 1998.

32. Tang DC, Devit M, Johnston JA, "Genetic Immunization is a Simple Method for Eliciting an Immune Response", *Nature*, 356, 152-154, 1992.
33. Kowalczyk DW, Ertl HCJ, "Immune Responses to DNA Vaccines", *Cell. Mol. Life Sci.*, 55, 751-770, 1999.
34. Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, Hassett DE, "DNA Immunization: mechanistic studies", *Vaccine*, 17, 612-619, 1999.
35. Davis HL, "Immune Responses With Direct Gene Transfer: DNA Vaccines and Implications for Gene Therapy", in Gregoriadis and McCormack (eds.), *Targeting of Drugs 5: Strategies for Oligonucleotide and Gene Delivery in Therapy*, New York, Plenum Press, pp.21-27, 1996.
36. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based Immunization Induces Continuous Secretion of Hepatitis B Surface Antigen and High Levels of Circulating Antibody, *Human Mol. Gen.*, 2 (11), 1847-1851, 1993.
37. Powell MF. Drug Delivery Issues in Vaccine Development, *Pharm. Res.*, 13 (12), 1777-1784, 1996.
38. Fuller DH, Haynes JR. A Qualitative Progression in HIV Type 1 Glycoprotein 120-Specific Cytotoxic Cellular and Humoral Immune Responses in Mice Receiving a DNA-Based Glycoprotein 120 Vaccine, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 10 (11), 1433-1441, 1994.
39. Tang D, DeVit M, Johnston SA. Genetic Immunization is a Simple Method for Eliciting an Immune Response, *Nature*, 356, 152-154, 1992.
40. Yasutomi Y, Robinson HL, Lu S, Mustafa F, Lekutis C. Simian Immunodeficiency Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Induction Through DNA Vaccination of Rhesus Monkeys, *J. Virol.*, 70 (1), 678-681, 1996.
41. Rhodes GH, Abai AM, Margalith M, Rundell AK, Morrow J, Parker SE, Dwarki VJ, "Characterization of Humoral Immunity After DNA Vaccination", in Brown F (ed), *Recombinant Vectors in Vaccine Development*, Basel, *Dev. Biol. Stand.*, Vol: 82, pp. 229-236, 1994.
42. Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ, Potential DNA Vaccine Integration into Host Cell Genome, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 772, 30-39, 1995.
43. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Efrain SB, Gupta CK. Adjuvants - A Balance Between Toxicity and Adjuvanticity, *Vaccine*, 11 (3), 293- 306, 1993.
44. Rabinovich NR, McInnes P, Klein DL, Hall BF. Vaccine Technologies: View to the Future, *Science*, 265, 1401-1404, 1994.
45. Roy S, Gupta BK. In Vitro-In Vivo Correlation of Indomethacin Release From Prolonged Release W/O/W Multiple Emulsion System, *Drug Dev. Indust. Pharm.*, 19 (15), 1965-1980, 1993.
46. Perraut R, Hundt E, Garraud O, Enders B, Gysin J. Comparison of the Effects of Adjuvants and Adjuvant Doses on the Quantitative and Qualitative Antibody Response to Selected Antigens in New World Squirrel Monkeys Saimiri Sciurew, *Vaccine*, 11 (7), 730-736, 1993.
47. Kissel T, Koneberg R, "Injectable Biodegradable Microspheres for Vaccine Delivery", in Cohen S, Bernstein H (eds.), *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, New York, Marcel Dekker Inc., pp. 51- 87, 1996.
48. Woodard LF. Surface Chemistry and Classification of Vaccine Adjuvants and Vehicles, *Bacterial Vaccines*, 281-306, 1990.
49. Alving CR, Glass M, Detrick B. Summary: Adjuvants/ Clinical Trials Working Group, *AIDS Res. Human Retroviruses*, 8 (8), 1427-1430, 1992.
50. Vanselow BA, The Application of Adjuvants to Veterinary Medicine, *Vet. Bull.*, 57, 881-896, 1987.
51. Goodman JW, "Immunogenicity & Antigenic Specificity", in Stites DP, Terr AI (eds.), *Basic and Clinical Immunology*, USA, Prentice-Hall International Inc., pp.101-108, 1991.
52. Allison AC, Byars NE. Immunological Adjuvants, *Adv. Exp. Med. Biol*, 327, 133- 141, 1992.
53. Rickman LS, Gordon DM, Wistar R, Krzych U, Gross M, Hollingdale M, Egan JE, Chulay JD, Hoffman SL. Use of Adjuvant Containing Mycobacterial Cell-Wall Skeleton, Monophosphoryl Lipid A and Squalane in Malaria Circumsporozoite Protein Vaccine, *The Lancet*, 337 (27), 998- 1001, 1991.
54. Stewart-Tull D, "The Future Potential for the Use of Adjuvants in Human Vaccines", in Hincal AA, Kaş HS (eds.), *Biomedical Science and Technology: Recent Development in the Pharmaceutical and Medical Sciences*, New York and London, Plenum Press, pp.1 29-136, 1998.
55. *Bulletin of The World Health Organization*, Immunological Recognition and Effector Mechanisms in Infectious Diseases, 58 (5), 671-680, 1980.
56. Heath AW, John HL. Playfair. The Potential of Cytokines as Adjuvants, *AIDS Res. Human Retroviruses*, 8 (8), 1401- 1403, 1992.
57. Edelman R. Vaccine Adjuvants, *Rev. Infect. Dis.*, 2, 370-383, 1980.
58. Giudice GD. New Carriers and Adjuvants in the Development of Vaccines, *Cur. Opin. Immunol.*, 4, 454-459, 1992.
59. Lascelles AK, Eagleson G, Beh KJ, Watson DL. Significance of Freund's Adjuvant/Antigen Infection Granuloma in The Maintenance of Serum Antibody Response, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 22, 15-27, 1989.
60. Byars NE, Allison AC. Adjuvant Formulation for Use

- in Vaccines to Elicit Both Cell-Mediated and Humoral Immunity, *Vaccine*, 5, 223, 1987.
61. Seeber SJ, White JL, Hem SL. Solubilization of Aluminum-Containing Adjuvants by Constituents of Interstitial Fluid, *J. Parenter Sci. Technol.*, May-Jun 45 (3), 156-159, 1991.
 62. Claassen E, Boersma WJA. Characteristics and Practical Use of New-Generation Adjuvants as an Acceptable Alternative to Freund's Complete Adjuvant, *Res. Immunol.*, 143, 475-582, 1992.
 63. Gupta RK, Varanelli CL, Griffin P, Wallach DFH, Siber GR. Adjuvant Properties of Non-Phospholipid Liposomes (Novasomes®) in Experimental Animals For Human Vaccine Antigens, *Vaccine*, 14 (3), 219-225, 1996.
 64. Buiting AMJ, Rooijen N.van, Claassen E. Liposomes as Antigen Carriers and Adjuvants In Vivo, *Res. Immunol*, 143 (5), 541-548, 1992.
 65. Alving CR, Richards RL. Liposomes Containing Lipid A: a Potent Nontoxic Adjuvant for a Human Malaria Sporozoite Vaccine, *Immunol. Lett.*, 25, 275-280, 1990.
 66. Rickman ZS, Gordon DM, Wistar R, Krzych U, Gross M, Hollingdale MR. Use of Adjuvant Containing Mycobacterial Cell-Wall Skeleton, Monophosphoryl Lipid A and Squalane in Malaria Circumsporozoite Protein Vaccine, *The Lancet*, 337 (27), 998-1001, 1991.
 67. Lovgren K, Morein B. The ISCOM: An Antigen Delivery System With Built-In Adjuvant, *Mol. Immunol.*, 28 (3), 285-286, 1991.
 68. Morein B, Bengtsson KL. Iscoms as Delivery Systems, *Proceed. Int'l Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24, 260, 1997.
 69. Höglund S, Dalsgaard K, Lövgren K, Sundquist B, Osterhaus A, Morein B. "ISCOMs and Immunostimulation With Viral Antigens", in Harris JR (ed), *Subcellular Biochemistry*, New York, Plenum Press, pp.39-55, 1989.
 70. Morein B, Sundquist B, Höglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a Novel Structure for Antigenic Presentation of Membrane Proteins From Enveloped Viruses, *Nature*, 308, 457-460, 1984.
 71. Van Hal DA, Bouwstra JA, Junginger HE, "Nonionic Surfactant Vesicles Containing Estradiol for Topical Application", in Benita S (ed), *Microencapsulation*, USA, Marcel Dekker, Inc, pp.330-339, 1996.
 72. O'Hagan DT, Jeffery H, Roberts MJJ, McGere JP, Davis SS. Controlled Release Microparticles for Vaccine Development, *Vaccine*, 9, 768-771, 1991.
 73. 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.*, 9 (9), 2978-2986, 1991.
 74. Alpar HO, Akbuga J, Egles JE, Williamson ED. Immunological Responses Following Oral and Intramuscular Administration of PLA Microspheres Using Surfactants With Adjuvant Properties, *Proceed. Int'l Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24, pp.785-786, 1997.
 75. Moncada C, Torres V, Israel Y. Simple Method for the Preparation of Antigen Emulsions for Immunization, *J. Immunol. Meth.*, 162, 133-140, 1993.
 76. Boersma WJA, Bogaerts WJC, Bianchi ATJ, Claassen E. Adjuvant Properties of Stable Water-in-Oil Emulsions: Evaluation of the Experience With Specol, *Res. Immunol.*, Jun 143 (5), 1992.
 77. Reynolds JA, Harrington DG, Crabbs CL, Peters CJ, Luzio NR. Adjuvant Activity of a Novel Metabolizable Lipid Emulsion With Inactivated Viral Vaccines, *Infect. Immun.*, 28 (3), 937-943, 1980.
 78. Brewer JM, Alexander J. The Adjuvant Activity of Non-ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) on the BALB/c Humoral Response to Bovine Serum Albumin, *Immunology*, 75, 570-575, 1992.
 79. Alam A, Adarsh K. Capoor, Rao LV. Evaluation of Adjuvanticity of Promising New Synthetic MDP Analogues, *Immunol. Lett.*, 27, 53-58, 1991.
 80. Playfair JHL, Souza JB. Recombinant Gamma Interferon is a Potent Adjuvant for a Malaria Vaccine in Mice, *Clin. Exp. Immunol.*, 67, 5-10, 1987.
 81. Hunter RL, Bennett B. The Adjuvant Activity of Nonionic Block Polymer Surfactants, III. Characterization of Selected Biologically Active Surfaces, *Scand. J. Immunol.*, 23, 287-300, 1986.
 82. Hunter R, Olsen M, Buynitzky S. Adjuvant Activity of Non-ionic Block Copolymers. IV. Effect of Molecular Weight and Formulation on Titre and Isotype of Antibody, *Vaccine*, 9, 250-256, 1991.
 83. Hörnquist E, Lycke N. Cholera Toxin Adjuvant Greatly Promotes Antigen Priming of T Cells, *Eur. J. Immunol.*, 23, 2136-2143, 1993.
 84. Hogan JS, Weiss WP, Smith KL, Todhunter DA, Schenberger PS, Williams SN. Vitamin E as an Adjuvant in an Escherichia Coli J5 Vaccine, *J. Dairy Sci.*, 76, 401-407, 1993.
 85. Kleine B, Rapp W, Wiesmüller KH, Edinger M, Beck W. Lipopeptide-Polyoxyethylene Conjugates as Mitogens and Adjuvants, *Immunobiol.*, 190, 53-66, 1994.
 86. Wiesmüller KH, Jung G, Gillessen D, Löffl C, Bessler WC, Böltz T. The Antibody Response in BALB/c Mice to the Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Repetitive Epitope Covalently Coupled to Synthetic Lipopeptide Adjuvant, *Immunology*, 72, 109-113, 1991.
 87. Alving CR. Lipopolysaccharide, Lipid A and Liposomes Containing Lipid A as Immunologic Adjuvants, *Immunobiol.*, 187, 430-446, 1993.
 88. Garti N, Aserin A, "Pharmaceutical Emulsions, Double Emulsions and Microemulsions", in Benita S (ed), *Mic-*

- roencapsulation, USA, Marcel Dekker, Inc, pp. 411-518, 1996.
89. Maloy KJ, Donachie AM, O'Hagan DT, Mowat A. Induction of Mucosal and Systemic Immune Responses by Immunization With Ovalbumin Entrapped in Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles, *Immunology*, 81, 661-667, 1994.
 90. Sokoll K, Pszczolko H, Frank P, Hu J, Yang YP, Chang P, Klein M, Immunogenicity of Haemophilus Influenzae Proteins Encapsulated Within Biodegradable Microparticles, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24, 421-422, 1997.
 91. Gregoriadis G, Tan L, Xiao Q. "The Immunoadjuvant Actions of Liposomes: Role of Structural Characteristics", in Gregoriadis G, Allison AC, Poste G (eds.), *Immunological Adjuvants and Vaccines*, New York, Plenum Press, pp.79-94, 1989.
 92. Morein B, Bengtsson L, Iscomís as Delivery Systems, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24, 118-119, 1997.
 93. Lawrence MJ, Chauhan S, Lawrence SM, Barlow DJ, The Formation, Characterization and Stability of Non-ionic Surfactant Vesicles, *S.T.P. Pharma Sci.*, 6(1), 49-60, 1996.
 94. Vanlerberghe G, Morançois JL, Niosomes in Perspective, *S.T.P. Pharma Sci.*, 6(1), 5-11, 1996.
 95. Handjani-Vila RM, "Non-ionic Vesicles as Drug Delivery Systems", in Hincal AA (ed), *Minutes 5th Int. Pharm. Tech. Symp.*, Editions de Santé, pp.213-227, 1990.
 96. Hunter R, Strickland F, KÈzdy F. The Adjuvant Activity of Nonionic Block Polymer Surfactants, I.The Role of Hydrophile-Lipophile Balance, *J. Immunol.*, 127 (3), 1244-1250, 1981.
 97. Kline D, Hanes J, Langer R, (Adjuvant-Active Polymeric Microparticulate Vaccine-Delivery Systems), in Cohen S, Bernstein H (eds.), *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, New York, Marcel Dekker Inc., pp.349-379, 1996.
 98. Verheul AFM, Snippe H. Non-ionic Block Polymer Surfactants as Immunological Adjuvants, *Res. Immunol.*, 143 (5), 512-519, 1992.
 99. Bomford R, (Saponins as Adjuvants), in Gregoriadis G, Allison AC, Poste G (eds.), *Immunological Adjuvants and Vaccines*, New York, Plenum Press, pp.43-46, 1989.