

# SELECCIONES



## Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune

Diego A Franco<sup>1</sup>, Bact; Mónica L Giraldo<sup>1</sup>, Enf, PhD; Pablo J Patiño<sup>1</sup>, MD, PhD.  
<sup>1</sup>Corporación Biogénesis, Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina,  
 Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.  
 alejofr@eudoramail.com

(Recibido 9 de marzo, 2004; aceptado: 13 septiembre, 2004)



### Resumen

*La inmunoprofilaxis es una herramienta valiosa en la prevención de las enfermedades infecciosas; ésta depende de la capacidad del sistema inmune para reconocer y desencadenar una respuesta efectora y de memoria ante los estímulos antigénicos usados como vacunas. Actualmente, existe la necesidad de desarrollar y mejorar las vacunas no replicativas ya existentes de manera que modulen e incrementen la efectividad de la respuesta inmune. Los adyuvantes constituyen una opción en el mejoramiento de este tipo de vacunas ya que incorporados en la formulación de éstas aumentan, aceleran o prolongan la calidad de la respuesta inmune a antígenos específicos. Los adyuvantes pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción en dos tipos: inmunoestimuladores y sistemas de liberación. Los adyuvantes inmunoestimuladores son derivados de patógenos (lipopolisacáridos, CpG) y su función es activar las células del sistema inmune innato. En contraste, los sistemas de liberación son partículas (emulsiones, micropartículas, ISCOMs) encargadas de entregar el antígeno asociado a una célula presentadora de antígeno. El descubrimiento y desarrollo de nuevos adyuvantes abre la posibilidad de implementar en un futuro vacunas terapéuticas y profilácticas contra el cáncer y enfermedades infecciosas agudas y crónicas que sean más eficaces y seguras para ser utilizadas en humanos y especies animales de importancia económica.*

**Palabras Clave:** *adyuvantes inmunoestimuladores, sistemas de liberación, vacunas.*

### Introducción

En 1796 Edward Jenner dió un salto enorme en la lucha contra las enfermedades infecciosas al demostrar la capacidad que posee el ser humano de desarrollar una respuesta protectora frente a una infección, al inocular en un niño el contenido de las lesiones vesiculares de una ordeñadora que padecía una enfermedad causada por viruela de bovinos, el menor no desarrolló viruela humana a pesar de la exposición al agente infeccioso por medio de la variolización. A esta práctica se le denominó vacunación y dió inicio a la inmunoprofilaxis en la era moderna (58), desde entonces investigadores de todo el mundo han tenido como objetivo el desarrollo de nuevas y más eficaces vacunas para el control de las enfermedades infecciosas (2). La vacunación profiláctica es una de las estrategias de salud pública con mayor impacto puesto que ha permitido el control e incluso la

erradicación de múltiples enfermedades infectocontagiosas (60).

La inmunización implica el reconocimiento de una parte del antígeno que induce una respuesta inmune efectora y de memoria. Para lograrlo se han utilizado diferentes tipos de vacunas, compuestas por microorganismos vivos atenuados, patógenos replicativos y no replicativos y patógenos inactivados o sus subunidades. Las más seguras para ser utilizadas en humanos son aquellas que contienen patógenos inactivados o sus subunidades (60), debido a que carecen de virulencia; generalmente son bien toleradas, y pueden administrarse a pacientes inmunocomprometidos (54). Sin embargo, estas vacunas tienen menos inmunogenicidad que las replicativas por lo cual es necesario el uso de una

sustancia adyuvante para inducir una respuesta inmune adecuada (60).

Los adyuvantes hacen parte de un grupo de compuestos estructuralmente heterogéneos, utilizados para incrementar la respuesta inmune a vacunas no replicativas (29). La palabra adyuvante se deriva del verbo en latín *adyuvare* que significa ayudar o auxiliar (78). A mediados de 1920, partiendo de la observación que los caballos que desarrollaban abscesos en el sitio de inoculación de toxoide diftérico presentaban títulos más elevados de antitoxinas comparado con los caballos que no desarrollaban abscesos, se llegó a la conclusión que la diferencia entre ambos grupos radicaba en la presencia de sustancias extrañas contaminantes que al ser inyectadas junto con el toxoide aumentaban el título de anticuerpos antitoxinas (78); estas sustancias se denominaron adyuvantes inmunológicos (21, 23).

Durante varias décadas se ha evaluado la actividad adyuvante de cientos de componentes sintéticos y naturales (78) (véase Tabla 1); sin embargo, pocos de ellos son aceptados para uso en humanos debido a sus efectos tóxicos, al estrecho margen de seguridad y a la inducción de reacciones alérgicas e inflamación grave localmente (13, 47). Según los estándares de inmunización profiláctica, para individuos sanos sólo son aceptados los adyuvantes que demuestren efectos adversos mínimos (47). Adicionalmente, los adyuvantes deben ser: biodegradables, estables, de fácil fabricación, bajo costo, aplicables a una amplia gama de vacunas, de administración sencilla y seguros para aplicarse a pacientes complicados e inmunocomprometidos (63).

**Tabla 1.** Clases de adyuvantes.

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Sales minerales                   | Fosfato de Aluminio*<br>Fosfato de Calcio*<br>Hidróxido de aluminio*  |
| Adyuvantes<br>inmunoestimuladores | Saponinas (QS21)<br>DNA bacteriano (oligonucleótidos CpG)<br>Lipopolisacáridos (LPS)<br>Monofosforil lípido A (MLP)<br>Citoquinas (IL-2, IL-12, GM-CSF) |
| Partículas<br>lipídicas           | Liposomas<br>Virosomas*<br>ISCOMS<br>Emulsiones (Adyuvante de Freund, SAF, MF59*)<br>Cochleates   |
| Partículas<br>adyuvantes          | Partículas de Polaxamer<br>Partículas semejantes a los virus<br>Micropartículas<br>polilactide-co-glicosides  |

Con excepción de los Cochleates todos estos adyuvantes han sido evaluados en ensayos clínicos. Sin embargo, sólo los señalados \* son corrientemente incluidos en vacunas aprobadas para su uso en humanos (64)

El mecanismo de acción de la mayoría de las sustancias adyuvantes no se ha dilucidado completamente (78), debido en parte a que es difícil diferenciar *in vivo* el efecto primario del adyuvante del efecto provocado por los otros componentes de la vacuna (13, 47, 63). A pesar de esto, se han identificado algunos mecanismos de acción por los cuales los adyuvantes mejoran la calidad de la respuesta inmune a los antígenos específicos de la vacuna. Las sustancias adyuvantes pueden actuar incrementando la inmunogenicidad de los antígenos, aumentando la velocidad y la duración de la respuesta inmune (47), modificando el balance Th1/Th2 (81), modulando la avidéz, especificidad, isotipo o la distribución de las subclases de anticuerpos, estimulando la inmunidad mediada por células, promoviendo la inmunidad de mucosas, incrementando la capacidad de respuesta en el sistema inmunológico inmaduro o senescente y disminuyendo la cantidad del antígeno necesario para inducir una respuesta inmune adecuada (47). Además, los adyuvantes pueden aumentar la infiltración celular y la inflamación, permitiendo particularmente el tráfico de las células presentadoras de antígenos (CPA) hacia el sitio de aplicación, promoviendo en ellas la expresión de señales coestimuladoras, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o la activación de vías de señalización relacionadas con la presentación antigénica (63). Adicionalmente, la activación del sistema inmune innato contribuye al direccionamiento de la respuesta inmune específica mediante la secreción de mediadores inflamatorios y citoquinas que en última instancia conducen a la activación de los linfocitos T y B (47).

Durante décadas se han utilizado fracciones de microorganismos como adyuvantes inmunológicos sin que se conociera su mecanismo de acción, no obstante, ahora se postula que tales fracciones poseen patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs) (15). Estas son estructuras moleculares comunes a grupos de microorganismos y relacionadas con los mecanismos de supervivencia de los mismos, por lo cual no han estado sometidos a presión selectiva durante la evolución. Los peptidoglicanos de bacterias gram positivas y los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas son ejemplos de este tipo de moléculas (15). Los PAMPs se caracterizan por su habilidad de activar células del sistema inmune innato (47), principalmente las células dendríticas CD (52) y otras CPA (47). Los PAMPs interactúan con los receptores de patrones de reconocimiento (PPR) que se expresan en dichas células y entre los que se destacan la familia

de los receptores tipo Toll TLR (4). Es así como el estudio del mecanismo de acción de los adyuvantes es importante no sólo para la aplicación en la inmunoprofilaxis de enfermedades infecciosas, sino además, porque constituyen una herramienta para comprender el proceso de activación y regulación del sistema inmune innato, el cual ha cobrado vigencia en los últimos años debido a su conservación evolutiva y capacidad para discriminar entre las moléculas propias de las no propias (4, 63).

Con este artículo se pretende revisar las características químicas y los mecanismos por los cuales los adyuvantes contribuyen al desarrollo de la respuesta inmune. De igual manera, se describirán aspectos generales de su utilización en humanos.

#### *Sales minerales*

El hidróxido y el fosfato de aluminio genéricamente llamados Alum (3), son sales con propiedades físicas diferentes que están disponibles para ser utilizadas en la producción de vacunas para humanos (30). El fosfato de aluminio o hidroxifosfato, posee un punto isoeléctrico usualmente entre 4.5 y 6.0 relacionado inversamente con el grado de sustitución de fosfatos por hidroxilos; al estar cargado negativamente, a un pH de 7.4, absorbe los antígenos cargados positivamente gracias a fuerzas de atracción electrostática (57). Por otra parte el hidróxido de aluminio tiene un punto isoeléctrico de 11.4 y a un pH de 7.4 absorbe los antígenos cargados negativamente por atracción electrostática (57). En general los antígenos de la vacuna se unen establemente a las sales de aluminio por estas interacciones formando una suspensión macroscópica (54).

El Alum ha sido usado por muchos años en el campo de las vacunas, no obstante, su mecanismo de acción no se conoce en su totalidad. Originalmente se creyó que generaba un efecto de depósito, resultando en la persistencia del antígeno en el sitio de inyección; aunque, estudios más recientes que involucran antígenos marcados con isótopos radioactivos muestran que el Alum no induce la formación de depósitos en el sitio de aplicación (28); además, el líquido intersticial es capaz de disolver las sales de aluminio *in vivo* e *in vitro* después de su administración intramuscular (30, 60). El hidroxifosfato exhibe una disolución y una absorción más rápida que los cristales de hidróxido de aluminio (30).

La habilidad del cuerpo para eliminar los adyuvantes que contengan aluminio puede ser en parte la responsable del excelente registro de seguridad de estos compuestos (30). Adicionalmente, el Alum permite la captación eficiente de los antígenos por las CPA debido a la naturaleza de sus partículas y a su tamaño (<10  $\mu\text{m}$  de diámetro); también estimula linfocitos B, CD, induce eosinofilia y promueve la activación de los macrófagos (27). Trabajos recientes *in vitro* indican que el Alum regula señales de coestimulación en monocitos humanos y promueve la liberación de IL-4 (74).

La principal limitación de las sales de aluminio es su capacidad de inducir respuestas inmunes caracterizadas por la producción de inmunoglobulina E (IgE) asociada con reacciones alérgicas en humanos (53). Además, algunos estudios comparativos muestran que el Alum es un adyuvante débil tanto para la inducción de anticuerpos como para la inducción de la inmunidad mediada por células (27). Sin embargo, son actualmente uno de los adyuvantes aprobados por la *Food & Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos para ser usadas en vacunas humanas debido a su seguridad, bajo costo y su capacidad adyuvante con un gran número de antígenos (27).

#### *Adyuvantes inmunoestimuladores*

*Lipopolisacáridos.* Una clase de adyuvantes inmunoestimuladores es el LPS, componente natural de la pared celular de bacterias gram negativas y poderoso estimulante de las células del sistema inmune (13). El LPS es una endotoxina con carácter anfipático, presenta carga negativa y se consideran tóxicos para el hombre por su capacidad de inducir choque séptico. Se compone de dos partes; el lípido A, formado por dos N-acetilglucosaminas (NAG) fosforiladas y unidas a seis o siete cadenas saturadas de ácido graso, que sirven para anclar toda la estructura en la membrana externa de las bacterias gram negativas; y una cadena de polisacárido, en la que se distinguen dos zonas: un núcleo, formado por ácido 2-ceto-3-deooctanóico, heptosa, glucosa y glucosamina, que está unida a una de las NAG del lípido A; y por el antígeno O, una serie de tres a cinco monosacáridos que se repiten de manera distinta según las especies, siendo este el principal inductor de la respuesta inmunológica. El lípido A también puede ser responsable de la actividad endotóxica de las bacterias gram negativas y posiblemente su modificación biosintética sea una estrategia para obtener una especie de LPS más conveniente para ser incluida en la formulación de las vacunas (76).

Cuando el LPS ingresa al organismo es transportado y concentrado en el plasma por la proteína fijadora de LPS (LBP) dando lugar a la formación del complejo LPS/LBP (1) que se une con el CD14, una proteína de membrana que actúa como principal receptor para el LPS en la superficie de células mononucleares. Aunque CD14 carece de dominio citoplásmico, existe un correceptor para el LPS que permite la transducción de señales citoplasmáticas, conduciendo en última instancia, a la producción de citoquinas como el TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10 e IL-15, este correceptor es el TLR-4 (*Toll-Like Receptor-4*) (1). Evidencias recientes, sugieren que la activación del sistema inmune por LPS ocurre como consecuencia de su interacción con los TLR, especialmente con TLR-2 (50) y el TLR-4 (10) considerados como elementos importantes en la respuesta inmune innata. Estos receptores inducen la activación celular gracias a que permiten la activación del NF- $\kappa$ B (36) y de la vía de las MAP quinasas (45), lo cual regula la expresión genética y estimula la producción de las mencionadas citoquinas proinflamatorias así como también de quimioquinas (36).

La principal limitación en el desarrollo de vacunas contra bacterias gram negativas es la actividad endotóxica de los LPS (70), los cuales pueden modular la respuesta inmune de diferentes maneras. Por un lado pueden funcionar como adyuvante natural incrementando los niveles de anticuerpos contra proteínas externas de la membrana de bacterias gram negativas (69) y por otra parte, su toxicidad puede dar lugar a una hiperactivación significativa que pueden limitar el uso y la aceptación de vacunas que contengan LPS, como es el caso de la vacuna de *Bordetella pertussis* (49).

*Monofosforil lípido A.* El monofosforil lípido A (MLP), derivado de LPS y obtenido a partir de *Salmonella minnesota* también pueda actuar como adyuvante inmunoestimulador y debido a su baja toxicidad representa una mejor alternativa en el desarrollo de vacunas para humanos (11). Aunque el mecanismo de acción del MPL no se ha definido claramente, es probable que sea similar al de los LPS (63) y se sugiere que el TLR-2 también puede estar involucrado en la activación de las CPA por MLP (11).

En estudios preclínicos con MPL se ha demostrado un incremento de la capacidad inmunoestimuladora de linfocitos B y macrófagos conduciendo a la síntesis y liberación de citoquinas, particularmente de IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5 (63) e IL-2 (75) sin modificar el balance Th1/Th2 (63). Además en modelos animales se ha

observado que las células dendríticas tratadas con MPL presentan un incremento en su maduración y migración, así como un aumento en la producción de IFN $\gamma$  y bajos niveles de IL-4 e IL-5 por las células T, promoviendo principalmente una respuesta Th1 e induciendo una respuesta humoral caracterizada por predominio de IgG2a e IgG1 (11). Clínicamente, el MPL se ha utilizado en formulaciones complejas, incluyendo liposomas, emulsiones y combinado con otros adyuvantes como el Alum y el QS21, el problema de estas combinaciones es la dificultad de discriminar entre la contribución del MPL y el efecto adyuvante total (73).

*QS21.* Otro grupo de adyuvantes inmunoestimuladores es el de los terpenoides glucósidos o saponinas, derivados de *Quillaja saponaria* (Quil A). Estas moléculas han sido utilizadas como adyuvantes durante muchos años en vacunación profiláctica de animales a pesar de que son agentes activos de superficie y pueden causar *in vitro* hemólisis de glóbulos rojos; aparentemente, este efecto indeseable no está relacionado con la acción del adyuvante (34). En 1995 se aisló la fracción pura de Quil A de baja toxicidad (QS21) responsable de la actividad adyuvante (56). Se ha demostrado que QS21 forma poros al interactuar con el colesterol en las membranas celulares (24), aunque no se sabe si la formación de estos poros está relacionada con la acción adyuvante; parece ser este el mecanismo más probable que da lugar a la entrada de los antígenos al citoplasma para inducir la activación de los linfocitos T citotóxicos CTL (63). Además, el QS21 es un potente inductor de la liberación de inmunoglobulinas IgG2a y de citoquinas Th1 como el IFN $\gamma$  y la IL-2 (34). Es probable que el QS21 sea el adyuvante más efectivo contra patógenos que requieran una potente respuesta inmune que involucre los CTL (63) pero su efecto hemolítico restringe su uso en humanos (34).

*CpG DNA.* Actualmente hay un interés especial en las vacunas a partir de moléculas de DNA ya que inducen una potente inmunidad celular que usualmente no se alcanza con las vacunas no replicativas (47). La inmunización con ácidos nucleicos es un procedimiento que consiste en la inyección de DNA de un plásmido bacteriano en el que se ha insertado una secuencia que codifica para un antígeno específico, convirtiendo de esa manera al vacunado en un "biorreactor" que produce el antígeno directamente en sus células (68). El DNA bacteriano, pero no el de vertebrados, estimula *in vitro* las células del sistema inmune, debido a la presencia de islas CpG dinucleótidos no metiladas (44).

Las secuencias CpG no metiladas flanquean secuencias selectivas que son reconocidas por células del sistema inmune innato incluyendo macrófagos y células dendríticas por medio del TLR-9 (12, 37). Las CpG parecen tener un potencial significativo para la modulación de una respuesta inmune ya existente (14); además, estimulan la conversión de las CD inmaduras en CPA maduras (16) y la activación de los linfocitos B y las células NK (79).

El mecanismo exacto de captación celular y activación inmune por CpG sigue siendo confuso; aunque pueden estar involucradas la endocitosis no específica y la maduración endosomal que parecen necesarias para la activación de la vía de las quinasas (66) llevando en última instancia, al desarrollo de una potente respuesta inmune Th1 (67) caracterizada principalmente por la liberación de quimioquinas y citoquinas (5) como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, la transcripción del RNAm de citoquinas proinflamatorias (31), así como la expresión de moléculas coestimuladoras (16, 72) y del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (14), todo lo cual parece estar mediado por su unión al TLR-9 (8, 79).

El efecto adyuvante de las secuencias CpG parece estar maximizado por su conjugación con antígenos proteicos (18) o su combinación con sistemas de liberación. Reportes recientes indican que los efectos de este potente adyuvante pueden alcanzar ensayos clínicos en humanos (32) ya que son bien tolerados y generalmente no producen reacciones alérgicas (67); sin embargo la seguridad de las CpG DNA, necesita ser firmemente establecida en la clínica, debido a la inducción de autoinmunidad órgano-específica en varios modelos animales (9) y otros cambios patológicos cuando son administrados repetidamente a altas dosis (37) Aunque es temprano para decir en que situaciones se pueden utilizar los oligonucleótidos CpG, éstos han probado ser más ventajosos en algunas situaciones, especialmente en la inmunoprofilaxis de las enfermedades infecciosas (79) por su aparente habilidad de manipular la respuesta inmune selectiva Th1 (47) y por su capacidad de ser conjugados con diferentes tipos de antígenos (38, 67, 71).

*Citoquinas.* Algunas citoquinas son consideradas adyuvantes inmunoestimuladores, ya que estas tienen la habilidad de modificar y redireccionar la respuesta inmune. Las citoquinas más extensamente evaluadas como adyuvantes son IL-1, IL-2, IL-12, IFN $\gamma$  y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos,

GM-CFS (42); todas ellas exhiben toxicidad a dosis relativamente bajas y por su naturaleza proteica son inestables, tienen una vida media muy corta y son costosas. Por lo tanto, es poco probable que las citoquinas sean aceptadas para su uso rutinario en la vacunación profiláctica; aunque, hay avances considerables para su utilización en la inmunoterapia del cáncer (59).

#### *Partículas adyuvantes*

Existen múltiples vehículos capaces de transportar antígenos que facilitan el desarrollo de una respuesta inmune (35); entre los mejor evaluados para su uso como adyuvantes se encuentran liposomas, ISCOM, emulsiones, micropartículas, virosomas y partículas semejantes a los virus, las cuales poseen dimensiones comparables a las de estos agentes infecciosos (véase Tabla 2) y por esta razón son captadas de una manera más natural por CPA facilitando la inducción de una potente respuesta inmune (63).

**Tabla 2.** Dimensión aproximada de las partículas adyuvantes.

| Partículas adyuvantes | Tamaño            |
|-----------------------|-------------------|
| Micropartículas       | 100 nm-10 $\mu$ m |
| Liposomas             | 50 nm-10 $\mu$ m  |
| Virosomas             | 50 nm-10 $\mu$ m  |
| MF59                  | 200 nm            |
| ISCOM                 | 40 nm             |

Comparación entre el tamaño aproximado de las micropartículas con las dimensiones de los patógenos (64).

*Liposomas.* Los liposomas se definen como microesferas huecas con una o varias bicapas lipídicas y cuyo tamaño puede variar de 50 nm a varios micrómetros (35). El interés por los liposomas radica en su membrana constituida de colesterol y fosfolípidos (como la fosfatidilcolina y el dicetilfosfato) cuya estructura, composición y proporción es prácticamente igual a las membranas celulares, de manera que al ser introducidos dentro del hospedero éste no desarrolla una respuesta inmune de rechazo (7). Los liposomas son pequeños depósitos que pueden contener antígenos, drogas, genes, citoquinas o adyuvantes, modulando la respuesta inmune celular y humoral de acuerdo a la respuesta deseada (26).

Actualmente los liposomas más evaluados en las formulaciones de las vacunas no replicativas, son los virosomas, proteosomas y los Cochleates (35). Los virosomas son semejantes a pequeñas vesículas

unilaminares basadas en proteínas virales de membrana y algunos contienen hemaglutinina (HA) del virus de la influenza; ésta permite la unión del virosoma con los residuos de ácido siálico presentes en las CPA. Después de la captación y la endocitosis, el endosoma se torna ácido induciendo un cambio conformacional en HA, lo cual permite la fusión del virosoma con la membrana endocítica y da lugar a la presentación en CMH tipo II; la co-incorporación de otro antígeno de membrana al virosoma generalmente induce un aumento en la respuesta inmune contra este antígeno (35). Las vacunas que contienen virosomas están siendo evaluadas actualmente en ensayos clínicos (25).

Trabajos recientes han desarrollado una nueva clase de vehículos transportadores de antígenos denominados Cochleates (35). Los Cochleates son bicapas laminares no vesiculares, constituidas por fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y colesterol cargados negativamente. Al adicionar iones de calcio, estos se intercalan entre las bicapas laminares enrollándolas y dando lugar a la formación de un espacio interno en donde cargan las proteínas o el DNA (35). Éstas son altamente eficaces cuando se administran por vía parenteral o en las mucosas y tienen la capacidad de estimular una fuerte respuesta inmune humoral y celular (41). Otro tipo de liposomas son los proteosomas, pequeñas vesículas de origen bacteriano preparadas a partir de la solubilización de su membrana celular externa (47); en asociación con proteínas virales inducen una fuerte respuesta inmune Th1, lo cual sugiere que son altamente efectivos y excelentes candidatos para ser usados en la formulación de una vacuna en las que sea deseable este tipo de respuesta inmune (39).

*ISCOMs.* Las fracciones inmunoestimuladoras de Quil A incorporadas a partículas lipídicas incluyendo colesterol, fosfolípidos y antígenos de la membrana celular constituyen los llamados complejos inmunoestimuladores (ISCOMs). Típicamente la composición de estos consiste en 60-70% de Quil A, 10-15% de lípidos y 5-20% de proteínas (35). Son estructuras esféricas con un tamaño miceliar aproximado de 40 nm (46) y contienen antígenos anfipáticos semejantes a las proteínas de membrana (35). No obstante, un problema potencial con los ISCOMs es que la inclusión de los antígenos dentro del adyuvante es técnicamente difícil y puede requerir grandes modificaciones en el antígeno (33); aunque se ha postulado que la interacción física de los ISCOMs con el antígeno es probable que no sea un prerrequisito para la actividad adyuvante (35) ya que simplemente

mezclándolos se obtiene un aumento de la respuesta inmune (80). Las principales ventajas de las preparaciones de ISCOMs es que esta formulación se dirige directamente a las CPA y hay reducción considerable en la dosis necesaria de Quil A. Además, dentro de la estructura del ISCOMs el Quil A se une al colesterol y no queda libre para interactuar con la membrana celular con lo cual se reduce considerablemente el efecto hemolítico de las saponinas, mientras se mantiene su actividad adyuvante (65).

Los ISCOMs son capaces de generar un amplio rango de respuestas inmunes, incluyendo la inducción de una respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T CD4+ y los T CD8+, la activación de las CPA, el incremento en la expresión de MHC tipo II y la producción de citoquinas especialmente IL-12 e IFN $\gamma$ . El tipo de respuesta inmune que se genera después de la inmunización con un ISCOMs probablemente depende del antígeno y de la ruta de inmunización utilizada (35). Sin embargo, la eficacia para la inducción de CTL y el perfil de seguridad de los ISCOMs necesitan establecerse en humanos (47).

Varios estudios en modelos animales demostraron que la formulación de la vacuna para influenza que contenía ISCOMs era más inmunogénica que una subunidad clásica de vacuna (22) y que además tenía la capacidad de inducir una potente respuesta Th1 (77). Una formulación similar utilizada en ensayos clínicos en humanos mostró una potente inducción de una respuesta mediada por CTL (20). Hasta el momento la única vacuna licenciada para utilizar ISCOM es la vacuna anti-influenza en caballos y los estudios en humanos se encuentra en fases iniciales en donde se describe pocas reacciones colaterales (35).

*Micropartículas.* Las micropartículas son otro tipo de adyuvantes con los cuales se puede controlar la velocidad de la liberación de los antígenos (47). Los efectos de las micropartículas así como su compatibilidad de tejido y biodegradabilidad, hacen de ellas un sistema valioso de liberación para péptidos sintéticos inmunógenos con propiedades inmunogénicas (48).

El poliéster biodegradable y biocompatible, polilactide-co-glicosides (PGL) fue el primer candidato para el desarrollo de micropartículas como adyuvantes, ya que éste ha sido usado por muchos años como material de suturas y sistema controlado de liberación de medicamentos en humanos (51). Probablemente el efecto adyuvante de estas partículas es una consecuencia de su captación por CD, macrófagos y

nódulos linfoides locales después de su inyección intramuscular, siendo muy efectivo para la inducción de una respuesta inmune mediada por CTL (47) y para la producción de altos títulos de anticuerpos específicos (55); este efecto es alcanzado posiblemente por la encapsulación de antígenos en micropartículas de PGL, aunque no está muy claro su mecanismo de acción (47).

Las micropartículas catiónicas con plásmidos absorbidos pueden ser usadas para aumentar dramáticamente la potencia de las vacunas de DNA (40, 62). Estas micropartículas absorben eficientemente el DNA y tienen la capacidad de liberar varios plásmidos simultáneamente, aumentando considerablemente los niveles de anticuerpos séricos y la respuesta mediada por CTL en varios modelos animales (61). Las micropartículas aniónicas similares pueden ser usadas para la liberación efectiva de proteínas absorbidas y han demostrado ser efectivas para la inducción de CTL en ratones (61).

*Emulsiones.* El adyuvante Freund's es un potente inmunoestimulante constituido por agua disuelta en aceite mineral que contiene Micobacterias muertas (47), sin embargo posee gran toxicidad, por lo cual no puede ser usado en el humano. A partir de éste se desarrolló en 1980 una formulación adyuvante de aceite en agua SAF utilizando aceite biodegradable (escualeno) (6), que además contenía un surfactante no iónico y derivados de muramil dipéptido que probaron ser tóxicos para su uso en humanos (63). Posteriormente se desarrolló una solución de aceite en agua utilizando escualeno sin la presencia de inmunoestimuladores adicionales (MF59), éste poseía un perfil de seguridad aceptable y una potente actividad adyuvante (63), confirmada con la vacuna de influenza (FLUAD)<sup>TM</sup> aplicada a sujetos ancianos en ensayos clínicos (43) y en modelos animales (17). Este hecho permitió la aprobación de este producto en Italia en 1997 y en otros países adicionales en el 2000 (47). La experiencia en la clínica; más de 18.000 sujetos inmunizados y controlados bajo ensayos clínicos infectados con VIH, virus del herpes simple, citomegalovirus e influenza han demostrado que el MF59 es lo suficientemente seguro y bien tolerado para ser usado en humanos y en recién nacidos (64). Además, la potencia de MF59 para hepatitis B ha sido confirmada en pruebas clínicas, es las cuales MF59 mostró ser 100 veces más potente que las vacunas comerciales que contenían aluminio como adyuvante (17). Estudios con MF59 marcado con fluorescencia confirmaron la habilidad del adyuvante para estimular macrófagos y CD en el sitio de inyección y en los

nódulos linfoides locales (19). El MF59 puede ser recomendado para una potente inducción de anticuerpos y también puede ser usado como sistema de liberación para adyuvantes inmunoestimuladores como MLP y QS21 (11).

En conclusión, podemos afirmar que los recientes avances y descubrimientos en las vías de señalización proinflamatorias y la respuesta inmune innata y celular pueden conducir al diseño y mejoramiento de los adyuvantes, particularmente, adyuvantes que tengan la capacidad de desarrollar respuestas inmunes protectoras tipo Th1 y que sean capaces de aumentar, mejorar y prolongar la respuesta inmune, específicamente la mediada por células. Considerando la complejidad de la respuesta inmune antígeno específica y todas las vías de activación del sistema inmunológico implicadas, se podrían tomar estas como punto de referencia para el desarrollo de nuevos y mejores adyuvantes, este tipo de estudio conduciría a un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los adyuvantes corrientemente utilizados y permitiría hallar nuevas vías de señalización y receptores específicos que puedan ser blanco de nuevas moléculas adyuvantes optimizando la inducción de la respuesta inmune a los antígenos específicos de las vacunas y generando una inmunidad protectora.

El estudio de los productos naturales, sistemas de liberación, sales minerales y moléculas inmunoestimuladoras de diversas fuentes desprovistas de propiedades biológicas adversas, ofrece amplias perspectivas para la búsqueda de nuevas sustancias con actividad inmunopotenciadora que puedan ser usadas con seguridad como moléculas adyuvantes en las vacunas para humanos y animales. También se hace necesaria la valoración de nuevos adyuvantes inmunoestimuladores que busquen incrementar la efectividad y seguridad de las vacunas recombinantes o sintéticas ya que estas poseen una baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas formuladas tradicionalmente; además, se requiere el desarrollo de sistemas liberación más sitio específicos que permitan implementar la inmunización en mucosas y mejorar la inmunización parenteral y oral.

### **Perspectivas de adyuvantes en vacunación profiláctica**

Los adyuvantes han contribuido a la comprensión de mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune, como la presentación antigénica, las señales coestimuladoras necesarias para la activación de dicha

respuesta y las vías de señalización conducentes a la síntesis y secreción de citoquinas reguladoras. En la medida en que se comprende más y mejor al sistema inmune se pueden elaborar de manera racional adyuvantes que favorezcan, con menos efectos adversos, una respuesta inmune más potente.

Años atrás la inmunización se basaba en métodos empíricos o en pruebas de ensayo y error que trataban de establecer cuales serían las características de los adyuvantes y antígenos utilizados en una preparación inmunoproliférica para inducir protección efectiva y duradera; además, se buscaba dilucidar específicamente el papel del adyuvante en dicho proceso. En la actualidad, el campo de investigación en sustancias adyuvantes ha avanzado rápidamente, reflejándose en un creciente número de nuevos

adyuvantes y en un mejor entendimiento de su mecanismo de acción. Además, se requiere de más y mejores vacunas contra diversas enfermedades y se necesita incrementar la seguridad y la eficiencia de las ya existentes, reducir los costos y mejorar su vía de administración para que sean más aceptables y toleradas.

La búsqueda persistente de nuevos adyuvantes y la descripción de sus diferentes mecanismos de acción puede conducir al mejoramiento o modificación de algunos de los componentes incluidos en la formulación de una vacuna para contribuir al objetivo final de ésta: inducir una inmunidad protectora. Se espera que esta búsqueda incesante conduzca al desarrollo de vacunas aptas para su utilización en humanos y que contribuyan al control de enfermedades que azotan a la humanidad.

### Summary

#### *Role of adjuvant in the modulation of immune response*

*The immunoprophylaxis is an important tool in the prevention of the infectious diseases; it depends of the capacity of the immune system to recognize and develop an effector response and immune memory against different stimulus. Currently, it is necessary to develop and improve the existent nonreplicating vaccines with the purpose to modulate and increase the immune response against a wide range of microorganisms or their antigens. The adjuvants constitutes an option to improve this type of vaccines because when they are incorporated in a vaccine formulation can enhance, accelerate or prolong the quality of the immune response to specific antigens. Adjuvants can be classified according to their action mechanisms into two types: immunoestimulatory and delivery systems. The immunoestimulatory adjuvants are derived from pathogens (lipopolysaccharides, CpG) and their function is to activate the innate immune cells. In contrast, the delivery systems are particles (emulsions, microparticles, ISCOMs) that transport and deliver an associated antigen to antigen-presenting cell. The discovery and development of new adjuvants opens the possibility to use new prophylactic and therapeutic vaccines against cancer, acute and chronic infectious diseases. These new vaccines will be more effective and safe to be used in human and animal species of economic importance.*

**Key Words:** *adjuvant immunoestimulatory, delivery systems, vaccines.*

### Referencias

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunidad frente a los microorganismos. En: Inmunología celular y molecular. 4<sup>ta</sup> ed. España: McGrawHill 2000. 355-75.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Propiedades generales de la respuesta inmunitaria. En: Inmunología celular y molecular. 4<sup>ta</sup> ed. España: McGrawHill 2000. 3-16.
3. Ada G. The immunology of vaccination. En: Orenstein WA (ed) Vaccines, Philadelphia, W.B. Saunders Company 1999. 36-40.
4. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature. 2000; 406: 782-87.
5. Agrawal S, Kandimalla ER. Modulation of Toll-like Receptor 9 Responses through Synthetic Immunostimulatory Motifs of DNA. Ann N Y Acad Sci. 2003; 1002: 30-42.
6. Allison AC, Byars NE. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotype and of cell-mediated immunity. J Immunol Methods. 1986; 95: 157-68.
7. Alving CR. Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. J Immunol Methods. 1991; 140: 1-13.
8. AM Krieg, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature. 1995; 374: 546-49.



9. AM Krieg. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000; 12: 35-43.
10. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25: 187-91.
11. Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, *et al.* The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol.* 2000; 12: 807-15.
12. Bird AP. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.* 1987; 3: 342-47.
13. Breyer I. Neutrofilos humanos inducen la liberación de lipopolisacaridos de bacterias gram negativas. *Medicina. Buenos Aires.* 1998; 58: 61-4.
14. Broide D. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol Methods.* 1998; 161: 7054-62.
15. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature.* 1997; 388: 782-87.
16. Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 1998; 160(2):870-76.
17. De Donato S, Granoff D, Minutello M, Lecchi G, Faccini M, *et al.* Safety and immunogenicity of MF59-adjuvanted influenza vaccine in the elderly. *Vaccine.* 1999; 17: 3094-3101.
18. Dennis MK, Barnhart KM, Conover J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine.* 1999; 17: 19-25.
19. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, *et al.* Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol* 1998; 186: 18-27.
20. Ennis FA, Cruz J, Jameson J, Klein M, Burt DT. Augmentation of human influenza A virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by influenza vaccine and adjuvanted carriers (ISCOMS). *Virology* 1999; 259: 256-61.
21. G Ramon. Procedres pour acroitre la production des antitoxines. *Ann Inst Pasteur. Paris* 1926; 40: 1-10.
22. G Rimmelzwaan, Baars M, van Beek R, van Amerongen G, Lovgren-Bengtsson, *et al.* Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines. *J Gen Virol* 1997; 78: 757-65.
23. G. Ramon. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vet* 1925; 101: 227-34.
24. Glaueri AM, Dingie JT, Lucy JA. Action of saponins on biological membranes. *Nature* 1962; 196: 952-55.
25. Gluck R. Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza virosomas. *Vaccine* 1999; 17: 1782-87.
26. Gregoriadis G. Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharm Res* 1998; 15: 661-70.
27. Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 32: 155-72.
28. Gupta RK, Chang AC, Griffin P, Rivera R, Siber GR. In vivo distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing 14C-labeled tetanus toxoid. *Vaccine* 1996; 15: 1412-16.
29. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, *et al.* Adjuvants a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 1993; 11: 293-306.
30. Hem SL. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine* 2002; 20 Suppl 3: S40-43.
31. Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunology* 1998; 161: 3042-49.
32. Janewayr JC, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 1998; 10: 349-50.
33. Karin LB, Morein B. The ISCOM™ technology. En: D OH (ed) *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols*, human press. New Yersey: Totowa. 2000. 239-58.
34. Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1996; 13: 51-5.
35. Kersten GF, Crommelin DJ. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* 2003; 21: 915-920.
36. Kirschning CJ, Wesche H, Ayres TM, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188: 2091-097.
37. Klinman D. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 249-58.
38. Kumar S, Jones TR, Oakley MS, Zheng H, Kuppusamy SP. CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. *Infect Immun* 2004; 72: 949-57.
39. Mark P, Jones T, Allard F, Torossian K, Gauthier J, *et al.* Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge. *Vaccine* 2001; 12: 218-25.
40. Mandip S, Briones M, Ott G, O'Hagan D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 18: 811-16.
41. Mannino RJ, Canki M, Feketeova E, Scolpino AJ, Wang Z, *et al.* Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 32: 273-87.
42. McCluskie MJ, Weeratna RD. Novel adjuvant systems. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001; 1: 263-71.
43. Menegon T, Baldo VB, Dalla Costa D, Di Tommaso A, Tribillo R. Influenza vaccines: antibody responses to split virus and MF59-adjuvanted subunit virus in an adult population. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 573-76.
44. Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; 147: 1759-64.
45. MJ. Sweet, Hume DA. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol* 1996; 60: 8-26.
46. Morein B, Hu KF, Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 1367-82.
47. O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng* 2001; 18: 69-85.

48. Partidos CD, Vohra P, Jones DH, Farrar G, Steward MW. Induction of cytotoxic T-cell responses following oral immunization with synthetic peptides encapsulated in PLG microparticles. *J Control Release* 1999; 62: 325-32.
49. Peter van der Ley. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect Immun* 2001;69 (10): 5981-90.
50. Poltorak A, He XSI, Liu MY, Van Huffel C, Du X, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-88.
51. Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 153-57.
52. Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 392-99.
53. Relyveld EH, Bizzini B, Gupta RK. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine* 1998; 16: 1016-1023.
54. Ronald WE. New technologies for making vaccines. En: Orenstein WA (eds) *Vaccines*, Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1999; 884-96.
55. Rosas JE, Hernández RM, Gascon AR, Igartua M, Guzmán F, *et al.* Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. *Vaccine* 2001; 19: 4445-51.
56. Sean S. Structure/function studies of QS21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* 1995; 13: 1403-10.
57. Seeber SJ, White JL, Hem SL. Predicting the adsorption of proteins by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 1991; 9: 201-203.
58. Salgado H. *Manual de inmunización humana*, Medellín, Editorial médica Colombiana S.A. 2001: 279 p.
59. Salgaller ML, Lodge PA. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. *J Surg Oncol* 1998; 68: 122-38.
60. Schijns VE. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current Opinion in immunology* 2000; 12: 456-63.
61. Schijns VE. Antigen delivery system and immunoestimation. *Vet immunol Immunopathol* 2000; 12: 456-63.
62. Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, Chesko J, O'Hagan DT. Charged polylactide co-glycolide microparticles as antigen delivery systems. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4: 483-91.
63. Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1075-81.
64. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res* 2002; 19: 715-28.
65. Soltysik S, Kensil CR, Wu JY. Structural and immunological characterization of vaccine adjuvant QS-21. *Pharm Biotechnol* 1995; 6: 525-41.
66. Sparwasser T. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunology* 1998; 28: 2045-54.
67. Spiegelberg HL, Horner AA, Takabayashi K, Raz E. Allergen-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate: a novel allergoid for immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 547-51.
68. Spitz M, Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH. Adjuvant factors in DNA vaccines. *Medicina (Buenos. Aires)* 2002; 62: 99-102.
69. Steeghs LB, Kuipers HJ, Hamstra G, Alphen Lv, Ley Pvd. Immunogenicity of outer membrane proteins in an LPS deficient mutant of *Neisseria meningitidis*: influence of adjuvants on the immune response. *Infect Immun* 1999; 67: 4988-93.
70. Steeghs L, Berns M, ten Hove J, de Jong A, Roholl P, *et al.* Expression of foreign LpxA acyltransferases in *Neisseria meningitidis* results in modified lipid A with reduced toxicity and retained adjuvant activity. *Cell Microbiol* 2002; 4: 599-611.
71. Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, *et al.* Nonmethylated CpG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* 2004; 172: 1777-85.
72. Sun S, Kishimoto H, Sprent. DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. *J Exp Med* 1998; 187: 1145-50.
73. Thoelen S. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine* 1998; 16: 708-14.
74. Ulanova M, Tarkowski A, Hahn-Zoric M, Hanson LA. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect Immun* 2001; 69: 1151-59.
75. Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* 1995; 6: 495-524.
76. Van der Ley P. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect Immun* 2001; 69: 5981-90.
77. Verschoor EJ, Mooij P, Oostermeijer H, van der Kolk M, ten Haaf P, *et al.* Comparison of immunity generated by nucleic acid, MF59, and ISCOM formulated human immunodeficiency virus type 1 vaccines in Rhesus macaques: evidence for viral clearance. *J Virol* 1999; 73: 3292-3300.
78. Vogel FR. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clin Infect Dis* 2000; 30 Suppl 3: S266-270.
79. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, *et al.* Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004; 34: 251-62.
80. Winton RG, Chaplin PJ, McWaters P, Tavarnesi M, Tzatzaris M, *et al.* Local immune responses to influenza antigen are synergistically enhanced by the adjuvant ISCOMATRIX. *Vaccine* 2001; 20: 490-97.
81. Yang RB: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395: 284-88.