

Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias

✉ Julio C Aguilar Rubido, María de Jesús Leal Angulo

División de Vacunas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.
Telf.: (53-7) 21 8164; Fax: (53-7) 33 6008; E-mail: julio.aguilar@cigb.edu.cu

RESUMEN

En general, los antígenos solubles puros, recombinantes o sintéticos han resultado seguros, pero con una menor inmunogenicidad en comparación con aquellos del organismo de origen. Es por eso que la búsqueda de adyuvantes nuevos y atóxicos, así como el desarrollo de nuevos sistemas de envío de antígenos, son necesidades de la investigación en el campo de las vacunas. El desarrollo de vacunas efectivas contra la gran cantidad de patógenos que permanecen en las superficies mucosales o que tienen en ellas su puerta de entrada, requiere adyuvantes que potencien respuestas locales. Otras razones económicas y logísticas apoyan el desarrollo de adyuvantes para las vacunas mucosales. En la actualidad, existe un número creciente de reportes sobre el uso de diferentes adyuvantes y sobre estrategias de adyuvación para vacunas basadas en la inoculación de ADN, lo que incrementa sus potencialidades profilácticas y terapéuticas. Los adyuvantes también se han utilizado como elementos indispensables en las estrategias novedosas de vacunación contra enfermedades alérgicas, autoinmunes y contra el cáncer, lo que, sin dudas, abre nuevas posibilidades en el desarrollo de vacunas.

Palabras claves: adyuvantes, inmunidad de mucosas, respuesta inmune, vacunas

Biotecnología Aplicada 2000;17:147-160

ABSTRACT

Vaccine adjuvants: current state and new trends. In general, the pure soluble, recombinant or synthetic antigens have resulted safe, but less immunogenic than those in the organism of origin. Thus, the search for new and non-toxic adjuvants and immunostimulants, as well as the development of new antigen delivery systems, is one of the first lines of current investigation in the field of vaccines. Adjuvants that enhance local responses are required for the development of effective vaccines against most pathogens infecting mucosae, and also against those having a door of entry in mucosae. Other economic and logistic reasons have also encouraged the development of such adjuvants. A lot of adjuvant strategies for enhancing the immune response against DNA-based vaccines have recently been reported, which increases the potential in the design of prophylactic and therapeutic vaccines. Adjuvants have also been used as main elements in novel vaccine strategies against cancer, allergies and autoimmune diseases, opening new possibilities for the development of vaccines.

Keywords: adjuvants, immune response, mucosal immunity, vaccines

Introducción

La meta principal de la vacunación contra enfermedades infecciosas, es el establecimiento de una resistencia de larga duración contra la infección luego de una o pocas inmunizaciones. En el caso de las vacunas vivas atenuadas como las que se emplean contra la varicela y la poliomielitis, esta meta se ha alcanzado con éxito, mientras que las vacunas que contienen microorganismos inactivados o sus subunidades son menos inmunogénicas y, con frecuencia, se administran con un adyuvante [1].

Los adyuvantes son sustancias o procedimientos que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune específica contra los antígenos inoculados. La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa ayudar, asistir [2].

Los adyuvantes inmunológicos se comenzaron a desarrollar a partir de la segunda década del siglo xx, cuando Ramon y colaboradores observaron que los caballos que desarrollaban abscesos en el sitio de inyección del toxoide diftérico, generaban mayores títulos de anticuerpos específicos que aquellos que no los tenían. Posteriormente, se reportó que los abscesos generados por la inyección de sustancias extrañas junto con el toxoide, aumentaban la respuesta antitoxina en caballos [3, 4].

En 1926, Glenny demostró la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio mediante el uso de una vacuna de toxoide diftérico precipitado en alúmina [5]. En la actualidad, los adyuvantes de aluminio (fosfato e hidróxido de aluminio) continúan siendo los adyuvantes inmunológicos más ampliamente usados y los únicos presentes en las vacunas licenciadas en los Estados Unidos [6].

En 1936, Freund desarrolló una emulsión de agua en aceite mineral que contiene micobacterias muertas, lo que actualmente se conoce como adyuvante completo de Freund (ACF) [7]. El ACF es uno de los adyuvantes más poderosos, pero es muy reactogénico para ser usado con fines clínicos. Aun así, el adyuvante incompleto de Freund (AIF) —la emulsión sin la adición de la micobacteria muerta— ha sido empleado en formulaciones vacunales en humanos [8].

En 1956, Johnson demostró la actividad adyuvante de la endotoxina lipopolisacáridica (LPS) proveniente de una bacteria gramnegativa [9]. Estos estudios son la base del uso actual del LPS detoxificado o de sus componentes como candidatos de adyuvantes para uso en humanos [10].

En 1974, Lederer y colaboradores identificaron el muramildipéptido (MDP) como un componente con

actividad adyuvante de la micobacteria presente en el ACF [11]. Más recientemente, otros compuestos de origen bacteriano han sido identificados y caracterizados, y se ha comprobado su función inmunomoduladora e inmunopotenciadora como parte del ACF [12].

Se conoce que cientos de compuestos naturales y sintéticos poseen actividad adyuvante. Estos adyuvantes, que pueden ser usados para adicionar o reemplazar a la alúmina en vacunas humanas, han estado en desarrollo y evaluación preclínica durante décadas. Varios de ellos han demostrado ser más efectivos que la alúmina y potencian respuestas inmunes mediadas por anticuerpos, así como respuestas celulares intensas [2].

En la actualidad, se consolidan estrategias más racionales en el diseño de vacunas. Éstas requieren la identificación de epítomos apropiados y el desarrollo de formulaciones que permitan generar una respuesta inmune protectora con esos epítomos. La función de los adyuvantes inmunológicos en el diseño racional de vacunas, es dirigir y optimizar respuestas inmunes apropiadas hacia epítomos vacunales protectores [2].

Este trabajo de revisión intenta abordar el estado actual de desarrollo y los principales resultados obtenidos con los adyuvantes, a partir de las ventajas que proporcionan y de su selección sobre la base de sus propiedades físicoquímicas, inmunológicas y toxicológicas. Se mencionan, además, las tendencias en el desarrollo de adyuvantes que vislumbran nuevos campos en la investigación sobre vacunas.

Adyuvantes vacunales

Ventajas de su uso

Entre las ventajas del uso de adyuvantes se hallan: (i) su capacidad de potenciar la inmunogenicidad de antígenos con un grado de pureza elevado o recombinantes; (ii) la reducción de la cantidad de antígeno y del número de reinmunizaciones requeridas para proveer una inmunidad protectora; (iii) el aumento de la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos y las personas inmunocomprometidas, y (iv) permitir el envío mucosal de vacunas dirigidas a incrementar la respuesta inmune a nivel de mucosas [13-15].

A diferencia de la presentación del antígeno en su entorno microbiano natural, el uso de adyuvantes permite una forma menos tóxica y más segura de inoculación. Su utilización desborda el universo de las vacunas preventivas y se introduce en las formulaciones vacunales con objetivos terapéuticos [16].

Selección

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran: el tipo de respuesta deseada o que se quiere evitar, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales inducidos por el adyuvante [17, 18].

La disponibilidad clínica de adyuvantes adecuados, seguros y efectivos es decisiva en el desarrollo de las nuevas vacunas. De forma ideal, los adyuvantes deben ser materiales baratos, no tóxicos y poco inmunogénicos. Además, deben ser estables, biodegradables y, preferiblemente, deben promover inmunidad tanto humoral como mediada por células, en dependencia del requerimiento de protección del patógeno [19].

La generación de una respuesta inmune protectora a nivel de mucosas, es de gran interés para quienes estudian las enfermedades que afectan las mucosas o que tienen en ellas su puerta de entrada. Existen diferencias en la efectividad de los adyuvantes por las diferentes rutas, debido a que las vías mucosales tienen características fisiológicas que las diferencian entre sí y de las rutas sistémicas. De ahí que el desarrollo de vectores, sistemas de envío de antígenos y otros compuestos con actividad adyuvante tiene en cuenta las características de la ruta por la cual ha de ser inoculado [20].

Seguridad

Los beneficios de la incorporación de adyuvantes en formulaciones vacunales para potenciar su inmunogenicidad, deben ser sopesados con el riesgo de reacciones adversas que estos compuestos pueden inducir [21, 22].

El marcado efecto inmunopotenciador de la mayoría de los adyuvantes está relacionado directamente con su toxicidad. La introducción de adyuvantes potentes en los ensayos clínicos, comenzó en relación con las vacunas preventivas y terapéuticas en las que los adyuvantes de aluminio son inefectivos. Uno de los objetivos del desarrollo actual en materia de adyuvantes, consiste en disminuir al máximo su toxicidad sin afectar el efecto inmunopotenciador [23].

Las regulaciones establecidas para el uso de los adyuvantes novedosos en humanos son rigurosas, comparado con las que se aplican para las vacunas veterinarias. Los animales afectivos son diferenciados de los demás [24].

Las reacciones adversas asociadas a los adyuvantes se clasifican en locales y sistémicas. Las reacciones adversas locales incluyen dolor, inflamación local, necrosis en el sitio de la inyección o en zonas adyacentes, linfadenopatías regionales y, en raras ocasiones, la inducción de granulomas y la formación de abscesos estériles. Las reacciones sistémicas observadas incluyen náuseas, fiebre, artritis por adyuvante y uveítis, anafilaxis, toxicidad específica de órgano e inmunotoxicidad, como por ejemplo, liberación de citocinas, inmunosupresión y enfermedades autoinmunes [25, 26].

La evaluación toxicológica sistemática, como la requerida para productos farmacéuticos, no es rutinaria en el caso de vacunas que tienen compuestos de aluminio como adyuvante. Aunque el uso de estos compuestos ha sido asociado con algunas reacciones locales [21, 22], la vasta experiencia con este tipo de adyuvantes en vacunas indica que la observación del animal posinyección y del sitio de inyección es generalmente adecuada desde un punto de vista de la seguridad preclínica, sin la necesidad de una toxicología formal, a menos que exista algún problema especial con el antígeno. A diferencia de los compuestos de aluminio, muchos de los adyuvantes en investigación deben ser objeto de un estudio toxicológico más intensivo. Para algunos adyuvantes, existen datos históricos que constituyen pruebas de seguridad adicionales previo a la evaluación de la formulación antígeno-adyuvante en humanos [21, 22].

Como parte de la evaluación inicial, se deben realizar estudios preclínicos con el adyuvante por separado, como los estudios toxicológicos de dosis únicas y

repetidas, incluida la ruta de inoculación que se pretende para el uso clínico. Usualmente, se dispone de información sobre estudios toxicológicos con el adyuvante solo, incluso en más de una especie, realizados por los fabricantes del adyuvante. Además de los estudios preclínicos realizados con el adyuvante solo, el producto combinado antígeno-adyuvante debe ser caracterizado en un estudio de seguridad que cuente con buenas prácticas de laboratorio y obtenga datos relevantes, como mínimo, para apoyar la iniciación de los estudios de fase I en humanos [27].

Esta evaluación debe ser conducida en una especie animal pequeña en que el antígeno sea inmunogénico, y que pueda ser inmunizada por la misma ruta anticipada para uso en humanos. La dosis o frecuencia de inmunizaciones con el candidato vacunal, debe ser igual o mayor que aquellas que van a ensayo clínico en cuanto a cantidad, y similar en cuanto a frecuencia e intervalos. Lo expuesto anteriormente es un mandato de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, con el objetivo de ofrecer la mejor oportunidad para identificar problemas potenciales de seguridad [27].

Los puntos de mayor interés para avalar la seguridad, donde no se incluyen todos los aspectos de rutina de un estudio toxicológico, se muestran en la Tabla. Hay que destacar que los estudios preclínicos pueden ser usados para seleccionar dosis apropiadas e identificar situaciones donde se deben garantizar con cuidado rangos de dosis para los estudios de fase I. Además, estos estudios pueden avalar nuevas dosis y esquemas, o detectar situaciones especiales durante el desarrollo del producto [28].

Ya se han evaluado diversos adyuvantes en humanos, tanto en voluntarios sanos como enfermos. Estos adyuvantes se han relacionado con el desarrollo de vacunas, tanto preventivas como terapéuticas, contra diferentes enfermedades y microorganismos [27]. Una información más detallada acerca de la toxicidad de los distintos adyuvantes, se puede encontrar más adelante junto a la descripción de los tipos de adyuvantes y sus mecanismos de acción.

Clasificación

Los adyuvantes inmunológicos pueden ser clasificados atendiendo a su fuente de origen, mecanismos de acción y propiedades físicoquímicas [2].

Según Edelman [23], los adyuvantes pueden ser separados en tres clases amplias: (i) inmunostimulantes activos, que son agentes que aumentan la respuesta inmune específica contra el antígeno; (ii) portadores,

que son proteínas inmunogénicas que proporcionan ayuda de células T; y (iii) adyuvantes tipo vehículo, como las emulsiones oleosas y los liposomas, que sirven como matriz para el antígeno y para la inmunostimulación. Esta clasificación tiende a confundir por la propia forma en que se dividen.

También se han dividido en adyuvantes mucosales y sistémicos, teniendo en cuenta que las características fisiológicas en cuanto a la toma y procesamiento del antígeno para ambas vías de inoculación generan procedimientos diferentes de adyuvación [16].

Otra clasificación aceptada los divide en: sales de aluminio y otros adyuvantes minerales; agentes tensoactivos; derivados de bacterias; vehículos y materiales de liberación lenta, y citocinas [18].

Una clasificación reciente de los adyuvantes [29] considera su separación en los grupos siguientes: adyuvantes de tipo gel, agentes tensoactivos, productos bacterianos, productos basados en aceites y emulsiones, adyuvantes particulados, proteínas de fusión y lipopéptidos. De acuerdo con la definición general de adyuvantes, a esta lista se pudieran adicionar los inmunomoduladores e inmunostimulantes como las citocinas y otros compuestos naturales que activan el sistema inmune innato y que no están incluidos en ninguno de los grupos destacados.

Limitaciones

A pesar del progreso actual en la definición y comprensión de la naturaleza y mecanismos de acción de los adyuvantes, aún existen limitaciones con respecto a su uso.

Entre las limitaciones más frecuentes se encuentran su grado de toxicidad, pirogenicidad, estabilidad, degradación *in vivo* y rápida excreción. Se han encontrado restricciones de tamaño, carga e hidrofobicidad en la incorporación de proteínas y péptidos. Además, se conoce que ocurren modificaciones epitópicas durante la formulación o conjugación. En el caso de las proteínas transportadoras, una inmunidad preexistente contra ellas es una limitante para su uso repetido y eficiente. Aún está por demostrar para muchos adyuvantes si estos problemas se pueden superar [29].

Cada adyuvante posee un perfil de respuesta inmunológica característico. La ineficiencia de los adyuvantes de aluminio para inducir ciertos isotipos y subclases, así como su incapacidad para generar células T citotóxicas y proveer una buena respuesta inmune contra antígenos polisacáridicos u otros antígenos T-independientes, limita su aplicabilidad, especialmente en aquellos casos donde estas caracte-

Tabla. Puntos de mayor interés en los análisis de seguridad preclínica de un adyuvante.

Valores de laboratorio	Panel de ensayos séricos pre y posvacunación. Pruebas de funcionamiento hepático y renal, creatina-quinasa y hematología (conteo completo de células de la sangre). La inmunogenicidad se puede determinar para correlacionarla con otros hallazgos, aunque no sea definitiva.
Observaciones	Observación del sitio de la inyección anterior y durante tres días después de cada inyección. Observación del funcionamiento del miembro vacunado durante tres días al menos.
Patología	Evaluación por cuantificación de las reacciones inflamatorias. Además, se debe realizar una necropsia completa con descripción de los órganos, peso e histopatología si se considera necesario para un estudio en particular. Considerar los datos disponibles en la literatura.*
Otros	Evaluación especial de ciertos parámetros específicos del producto o clase, por ejemplo, análisis de inducción de uveítis —si fuese aplicable. Los estudios preclínicos pueden ser usados para la selección de rangos de dosis o para resolver problemas de desarrollo del producto.

*Si se dispone en la literatura de datos clínicos favorables y de un estudio toxicológico bien fundamentado con el mismo adyuvante —solo o combinado con otros antígenos—, y si el antígeno en cuestión no posee ningún riesgo adicional, es menos crítica la necesidad de un estudio toxicológico preclínico que incluya la necropsia completa antes de la fase I. En el desarrollo clínico inicial del producto, se recomienda la inclusión de grupos controles con el antígeno solo y/o adyuvado con alúmina.

rísticas sean un requisito indispensable para una buena protección [17].

Principales tipos de adyuvantes y sus mecanismos de acción

De acuerdo con las clasificaciones existentes sobre adyuvantes, a continuación se expone una descripción de las características físicoquímicas e inmunológicas de los principales grupos de adyuvantes, y al mismo tiempo se describen sus mecanismos de acción.

Adyuvantes de uso sistémico

Adyuvantes de tipo gel. Desde los experimentos de Glenny y colaboradores [5] en 1926, las sales de aluminio —principalmente aquellas de fosfato o hidróxido— han sido ampliamente utilizadas para inmunizar humanos y animales. Estos compuestos son los únicos adyuvantes de aprobación general para su uso clínico [17].

Los compuestos basados en aluminio, a pesar de ser considerados seguros, son adyuvantes débiles y muy poco consistentes en su capacidad de estimular respuestas inmunes mediadas por células, especialmente respuestas de células T citotóxicas [30-32].

Los primeros estudios acerca del modo de acción de los adyuvantes de aluminio, evidenciaron la formación de un depósito en el sitio de la inyección [33], donde el antígeno es liberado lentamente. Investigaciones más recientes sugieren que el antígeno soluble atrapado en el gel permite prolongar el tiempo de interacción entre él, las células presentadoras de antígenos (CPA) y los linfocitos. El mecanismo de adyuvación también abarca la estimulación de células inmunocompetentes a través de la activación del complemento, la inducción de eosinofilia en el sitio de inyección [34], la activación de macrófagos y la toma eficiente de partículas de antígeno por las CPA —dada su naturaleza particulada y su tamaño inferior a 10 µm [35].

Aunque los efectos colaterales son relativamente pocos, se han observado mucho más granulomas en el sitio de inyección por vía subcutánea o intradérmica que por la ruta intramuscular [36, 37].

Entre otras limitaciones se encuentran: la generación de reacciones locales, la producción de anticuerpos de tipo IgE y la ineffectividad para algunos antígenos [32, 35, 36, 38-40]. También hay reportes de la neurotoxicidad del aluminio y se plantea que pudiera desempeñar algún papel en la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de encefalopatía asociado a diálisis [40]. Se conoce, además, que la alúmina no es biodegradable y se detecta en el sitio de la inoculación al año de haber sido inyectada [35, 41].

En vacunas para uso en humanos, los adyuvantes de aluminio fueron usados inicialmente contra tétanos, difteria, pertusis y poliomielitis. Aunque algunos componentes de *Bordetella pertussis* pueden ocasionar efectos colaterales, se ha demostrado una reducción significativa de dichos efectos con la adsorción a adyuvantes de aluminio [36].

En vacunas veterinarias, estos adyuvantes han sido utilizados ampliamente contra agentes virales y bacterianos, así como en vacunas antiparasitarias. Existen algunas similitudes entre la respuesta inmune —estimulación de IgE y eosinofilia— inducida por algunos helmintos y la provocada al inmunizar con

adyuvantes de aluminio. Dichas similitudes hacen que estos adyuvantes sean candidatos interesantes para vacunas antiparasitarias [36].

Las sales de otros metales como el calcio, el hierro y el circonio, también han sido utilizadas para adsorber antígenos, pero no han tenido el amplio uso de las sales de aluminio [36]. No obstante, el fosfato de calcio ha sido empleado durante décadas para las vacunas del grupo de difteria-tétanos-pertusis [42, 43]. Aunque tiene propiedades similares a las de los compuestos de aluminio, esta sal presenta varias ventajas potenciales sobre ellos como: es un constituyente normal del cuerpo y, como tal, es bien tolerado; adsorbe eficientemente a los antígenos y permite su liberación lenta; genera niveles elevados de anticuerpos IgG; y no incrementa la producción de IgE. En varias pruebas se ha encontrado que el uso de vacunas adyuvadas con calcio es eficiente y seguro contra reacciones adversas a largo plazo que sólo pueden ser reconocidas después de muchos años. Vale la pena destacar que se han observado reacciones neurológicas esporádicas en el caso de vacunas de pertusis adsorbidas a fosfato de calcio [44], y que algunos componentes de *B. pertussis* tienen propiedades inmunomoduladoras que contribuyen al efecto adyuvante de la preparación vacunal [45].

Agentes tensoactivos. La saponina Quil A —extracto acuoso de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina—, y fracciones purificadas de ésta —principalmente QS-21—, constituyen alternativas a la alúmina con potencial para inducir respuestas celulares intensas [23, 46, 47].

Las saponinas son glicósidos tensoactivos que contienen un núcleo hidrofóbico de estructura triterpenoide, y cadenas de carbohidratos enlazadas al triterpeno que conforman regiones hidrofílicas [46]. Entre las propiedades asociadas a las saponinas de *Q. saponaria* Molina, se incluyen: un excelente efecto adyuvante para antígenos tanto T-dependientes como T-independientes, y la estimulación de isotipos asociados a respuestas de células T auxiliares de tipo 1 (Th1). Esta clase de adyuvantes induce, además, respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+, propiedad asociada usualmente con vectores virales. Las saponinas también potencian vacunas administradas por las vías mucosales [46].

La saponina Quil A ha sido empleada en varias vacunas veterinarias [48]. Es un producto heterogéneo compuesto por 23 picos diferentes de saponinas detectables por cromatografía líquida de alta presión, que se une al colesterol de la membrana de los eritrocitos y los rompe provocando efectos colaterales indeseables [21, 24, 48-51].

Estudios clínicos preliminares han demostrado la viabilidad, con un patrón toxicológico aceptable, de usar la saponina QS-21 en vacunas humanas, como alternativa a los adyuvantes tradicionales de aluminio [52].

Derivados de bacterias. Las estructuras bacterianas constituyen la principal fuente de inmunoadyuvantes. Incluso, se conoce que copias sintéticas de bajo peso molecular como el péptidoglicano de la pared celular o el lípido A de bacterias gramnegativas, son capaces de alterar el sistema inmune sin ser ellas mismas inmunogénicas. Esto se puede deber a que imitan las estructuras microbianas que proporcionan la señal de peligro para el inicio de las defensas del

hospedero [38]. Un concepto similar ha sido desarrollado recientemente por Rook [53], quien postuló que la base para el efecto adyuvante podría ser el reconocimiento de componentes microbianos definidos por receptores presentes en las células accesorias. Este reconocimiento induce a dichas células a producir citocinas que determinan la activación de las subpoblaciones de linfocitos Th1 o Th2. Las estructuras microbianas conservadas también pueden inducir la activación directa de células B o macrófagos que expresan una potente actividad coestimuladora de la expansión clonal de las células T CD4+ [54].

Entre las bacterias usadas como adyuvantes se incluyen: *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum* o *C. granulorum*, y *B. pertussis*. Lamentablemente, estos microorganismos o sus productos son considerados muy tóxicos para ser usados como adyuvantes en humanos. Se ha trabajado mucho en la purificación de los componentes activos de *Mycobacterium* spp., *B. pertussis* y *C. granulorum*. En la actualidad, se presta atención a la purificación de los componentes con poder adyuvante presentes en la micobacteria [24].

El poder adyuvante del *N*-acetilmuramilo-L-alanil-D-isoglutamina o el muramildipéptido (MDP) —el componente con actividad inmunopotenciadora más estudiado del ACF— depende de la forma en que se administre [11, 55]. En solución salina aumenta principalmente la inmunidad humoral contra un número de antígenos naturales y sintéticos de bacterias, virus y parásitos [21, 56, 57], mientras que incorporado a liposomas o mezclado con micolato de glicerol induce inmunidad mediada por células [58]. Se ha demostrado que el MDP activa varios tipos celulares (macrófagos, leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos, entre otros) e induce la secreción de una variedad de citocinas, incluidos la interleuquina 1 (IL-1), el factor de crecimiento de células B y el factor de activación de fibroblastos. El MDP provoca, además, un incremento en la producción de superóxidos, prostaglandinas y colagenasa [59]. Se han obtenido algunos derivados del MDP para retener el poder adyuvante con un mínimo de toxicidad. De ellos, uno de los más prometedores es el treonil-MDP, un adyuvante potente y apirogénico [24].

Los LPS y sus derivados son componentes de la pared celular de bacterias gramnegativas. Sus derivados son compuestos mitogénicos para las células B, estimulan a las células T para que produzcan interferón gamma (IFN- γ) y median las respuestas de hipersensibilidad tardía (DTH, según sus siglas en inglés). La estructura de estos compuestos consiste en un polisacárido hidrofílico unido a una porción hidrofóbica de naturaleza lipídica: el lípido A, que es el responsable de la toxicidad y el efecto adyuvante de los LPS. Por hidrólisis del lípido A en condiciones de mediana acidez, se puede obtener el lípido A monofosforilado, compuesto que retiene la actividad adyuvante pero muestra una menor letalidad y pirogenicidad que el lípido A [60].

Otros compuestos derivados de bacterias son los dimicolatos de trehalosa (TDM, por sus siglas en inglés). Procedentes de la pared celular, son insolubles en agua, de naturaleza anfipática, y capaces de potenciar la actividad presentadora de antígenos por media-

ción de respuestas DTH, y un incremento en los títulos de anticuerpos específicos contra el antígeno coinoculado [61].

Hace relativamente poco tiempo, se demostró el efecto adyuvante del ADN micobacteriano —compuesto presente en el lisado de micobacterias mezclado con aceite de parafina que Freund ensayó hace 60 años. Se demostró que la actividad adyuvante estaba relacionada a la existencia de motivos CpG en el ADN presente en las bacterias. Este efecto inmunoestimulador sólo era desarrollado por el ADN bacteriano y no por el de vertebrados, hecho que se relacionó con la baja metilación de aquél. En los últimos años, se ha incrementado la cantidad de datos referidos al efecto inmunoestimulador del ADN bacteriano y de los oligodesoxinucleótidos que contienen dichas secuencias inmunoestimuladoras. Ambos han demostrado que pueden inducir la proliferación de células B y la producción de inmunoglobulinas. Además, estimulan la secreción de IL-6, IFN- γ , IL-12 e IL-18, que a su vez induce la producción de IFN- γ por las células asesinas profesionales (NK, por sus siglas en inglés) [12].

Se ha reportado que los oligodesoxinucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG en los que se ha introducido un átomo de azufre en el enlace fosfodiéster, muestran una actividad inmunoestimuladora mucho mayor que los naturales [12].

Vehículos y materiales de liberación lenta.

• Emulsiones

Se encuentran en esta categoría las emulsiones de aceite como el AIF, Montanide, Adyuvante 65 y Lipovant [18]. El mecanismo de acción del AIF se atribuye a la formación de un depósito en el sitio de inyección que posibilita la liberación lenta del antígeno, con lo que se estimulan las células productoras de anticuerpos [62]. Este adyuvante no se emplea actualmente en humanos debido a que ocasiona reacciones locales colaterales como la formación de granulomas e inflamación local. Se han evaluado varios tipos de emulsiones con diferentes tipos de aceite, con el propósito de encontrar un adyuvante mejor, estable y no tóxico. Una alternativa es el Adyuvante 65, que, a diferencia del aceite mineral del ACF y el AIF, tiene un componente aceitoso que es metabolizado por el organismo [24] y ha demostrado ser seguro y potente en humanos [63-65]. También se han probado emulsiones diferentes como aceite en agua [66] y agua en aceite en agua [67]. Esta última es tan potente como el AIF, menos viscosa, más estable, fácil de administrar, y produce menos nódulos en el sitio de inyección [68, 69].

La familia de adyuvantes oleosos conocida como Montanide, ha probado ser potente en numerosas vacunas experimentales en ratones, ratas, gatos, perros y cerdos, tanto con péptidos sintéticos como con antígenos virales. Se han conducido algunos estudios preliminares con Montanide ISA 720, con la finalidad de diseñar vacunas en humanos contra el VIH y la malaria [70].

• Liposomas

Los liposomas son glóbulos sintéticos formados por capas de lípidos que encapsulan las sustancias terapéuticas, y constituyen uno de los vehículos más utilizados para las investigaciones en vacunas. Ya se ha descrito su uso en formulaciones vacunales complejas

como vehículo de otros adyuvantes e inmunomoduladores (vea los subcapítulos *Formulaciones adyuvantes*, *Derivados de bacterias* y *Sistemas sintéticos o inactivados de envíos de antígenos*). Su adyuvancia depende del número de capas [71], la carga [72], la composición [73] y el método de preparación [73, 75]. Su uso potencia tanto la inmunidad humoral como la mediada por células para antígenos de naturaleza proteica y polisacáridica [72, 75]. El tiempo de vida medio de los antígenos incorporados en liposomas en la sangre es notablemente prolongado, lo que asegura una mayor exposición de antígeno a las CPA luego de su inyección [76].

- Microesferas copoliméricas

Entre la multitud de sistemas particulados y poliméricos que se han desarrollado, el de las microesferas copoliméricas de ácido láctico y glicólico (DL-PLG) es uno de los que más se destaca. Estas microesferas son partículas biocompatibles y biodegradables capaces de incorporar en su seno diferentes antígenos, entre ellos proteínas. Con el empleo de por cientos adecuados de sus componentes, es posible controlar el tiempo de liberación de los antígenos atrapados. Su uso abarca tanto rutas sistémicas como mucosales [77, 78].

Citocinas. Como regla general, en las clasificaciones más recientes de adyuvantes se incluyen las citocinas. El IFN- γ es una citocina pleiotrópica que puede potenciar respuestas inmunes mediadas por células T a través de la regulación positiva de la expresión de los determinantes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) [79]. Esta citocina incrementa la liberación de IL-1 y la expresión del MHC clase II en la superficie de las CPA, propiedades que pueden explicar su actividad adyuvante [38].

El factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), potencia respuestas inmunes primarias mediante la activación o reclutamiento de CPA profesionales [80]. Sin embargo, la aplicación práctica de las citocinas como adyuvantes presenta varias dificultades, ya que es posible que se requieran múltiples dosis, y si se usa una citocina de una especie diferente, ésta puede ser inmunogénica en la especie "blanco" [18].

Carbohidratos como adyuvantes. Muchos carbohidratos complejos de origen natural estimulan las células de los sistemas inmune y reticuloendotelial [81]. Entre ellos se encuentran los polímeros de plantas y hongos como los glucanos, las dextranas y los lentinanos —todos ellos polímeros de glucosa—, y los mananos, entre los que se encuentran los glucomananos y los galactomananos. Los levanos y los xilanos [82] también han evidenciado actividad potenciadora. La actividad de muchos de estos poliglicanos sobre los macrófagos —que tienen receptores de glucanos y mananos—, incluye la inducción de fagocitosis y la secreción de citocinas, leucotrienos y prostaglandinas. El lentinano, glucano común de las setas, estimula la respuesta celular y de anticuerpos contra eritrocitos de carnero, aumenta la resistencia del huésped a varios tipos de infecciones bacterianas, virales y parasitarias, y ha restaurado la disfunción inmunológica en pacientes con neoplasias [83].

Distintas pruebas *in vitro* indican que los mananos activan los monocitos y los macrófagos, con lo que

inducen la producción de IFN- γ , factor de necrosis tumoral- α , factor estimulante de la formación de colonias de monocitos y granulocitos, IL-1 β e IL-6 [84]. El acemanano es un polisacárido compuesto mayoritariamente por manosas con *O*-acetilaciones en aproximadamente 8 de cada 10 residuos. Se extrae como componente mayoritario de la sustancia mucilagínosa o gel de la hoja de *Aloe barbadensis* Miller, planta medicinal usada desde la antigüedad. Este polisacárido potencia la generación de linfocitos CTL [85], la actividad citotóxica de células NK [86] y también, modestamente, la alorrespuesta humana *in vitro*.

Recientemente, se ha demostrado la actividad adyuvante del acemanano sobre el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) por vía mucosal, al generarse no sólo niveles de anticuerpos en suero de similar intensidad que los obtenidos con alúmina como adyuvante, sino con la inducción de además respuestas intensas de IgA secretoria en mucosas adyacentes y remotas, lo cual no ocurre en las vacunas inoculadas por vía parenteral [87]. Estos resultados, así como la reconocida inocuidad del acemanano, avalan al ensayo clínico de una formulación nasal del HBsAg mezclado con el acemanano por vía intranasal, previsto para el año 2000.

Formulaciones adyuvantes. Las formulaciones adyuvantes han surgido como resultado del desarrollo en el conocimiento de los mecanismos de acción de estos compuestos. En ellas se combinan varios adyuvantes que, por lo general, poseen diferentes mecanismos de acción, con el propósito de aumentar la potencia y la calidad de la respuesta inmune contra los antígenos de interés.

Entre las formulaciones adyuvantes que tienen como base los compuestos de aluminio, Cooper y colaboradores han combinado el hidróxido de aluminio con γ -inulina —polisacárido procedente de algas— en un nuevo adyuvante denominado algamulina. Diversos antígenos comerciales han sido potenciados por la algamulina, entre los que se encuentran los toxoides diftérico y tetánico, el virus sincitial respiratorio, la proteína E7 del papilomavirus humano, la glicoproteína D del virus herpes tipo 2, el HBsAg, el virus completo de la influenza, *Haemophilus influenzae*, el conjugado peptídico del antígeno 2 de superficie de merozoítos de *Plasmodium falciparum*, el extracto de esperma de ratón (vacuna anticonceptiva), y membranas de micoplasma porcino [88-90].

Las saponinas también han sido utilizadas como parte de formulaciones adyuvantes en los complejos inmunoestimulantes (ISCOM, por sus siglas en inglés), y se ha demostrado la eficacia de combinaciones de aquéllas con microesferas, liposomas e hidróxido de aluminio [46].

Los ISCOM son partículas relativamente estables de 30-40 nm de diámetro y estructura dodecahédrica, compuestos por Quil A, lípidos y antígenos anfipáticos. Se diseñaron para combinar la presentación física óptima, desde el punto de vista inmunogénico, de los antígenos en una forma multimérica particulada submicroscópica con un adyuvante incorporado. Una amplia variedad de proteínas de parásitos, bacterias y virus han sido formuladas en ISCOM. También se han unido proteínas no anfipáticas y péptidos mediante enlaces covalentes, lo que ha gene-

rado una respuesta intensa de anticuerpos contra estos antígenos que son poco inmunogénicos en solución [91-93]. Estas estructuras han posibilitado una presentación óptima del antígeno con retención de la actividad adyuvante y una disminución de los efectos colaterales de Quil A [24]. Los ISCOM han sido utilizados en modelos animales y han inducido inmunidad, tanto sistémica como local, cuando se administran por las vías oral, respiratoria y vaginal [94].

En todos los casos evaluados, los antígenos formulados en ISCOM muestran un incremento en la respuesta de anticuerpos y en la respuesta mediada por células, en comparación con los antígenos no incorporados. En experimentos de reto antigénico, las inmunizaciones con ISCOM han protegido varias especies contra numerosos virus envueltos, incluidos los retrovirus, las bacterias y los parásitos [92, 95]. Se ha reportado que los ISCOM modulan la expresión de moléculas del MHC clase II y podrían actuar induciendo la liberación de IFN- γ [38]. También se ha establecido que son capaces de estimular las células T CD8⁺ restringidas a moléculas del MHC clase I.

Otro ejemplo de formulación es el ACF, mezcla de agua, aceite y micobacterias muertas capaz de generar uno de los mayores efectos inmunopotenciadores. Sin embargo, su uso está restringido al trabajo de laboratorio por su toxicidad [96].

Se ha demostrado que las formulaciones de vehículos como los liposomas, a los que se les adiciona o incorpora los MDP o monofosforil lípido A (MPL, según las siglas en inglés), pueden incrementar la respuesta inmune específica, tanto por vías mucosales como parenterales [24, 97].

Adyuvantes mucosales

El desarrollo de los adyuvantes para uso mucosal constituye actualmente una necesidad en el campo de las vacunas. El progreso en el conocimiento de la fisiología de las mucosas y del modo de acción de los adyuvantes, puede ayudar en el desarrollo de vacunas mucosales más efectivas. Aunque los adyuvantes mucosales se pueden clasificar dentro de los grupos anteriormente expuestos, en nuestra opinión merecen ser considerados de forma independiente. La actividad inmunopotenciadora del adyuvante o sistema de envío de antígenos a mucosas, debe tener en cuenta, en primer lugar, la penetración de los antígenos por esa vía y posteriormente, la potenciación de la inmunogenicidad de los antígenos por diferentes mecanismos que pudieran ser similares o no a los sistémicos. Se han obtenido resultados diferentes cuando se usa un mismo adyuvante, tanto por vía sistémica como mucosal. La alúmina—adyuvante sistémico más universalmente utilizado—no ha sido efectivo por vía oral y nasal con antígenos que tradicionalmente son inyectados con este adyuvante, como el toxoide tetánico [98].

Es bueno destacar que el antígeno *per se* puede poseer características que lo hagan “penetrante”, como es el caso de determinados antígenos particulados y de otros que, aunque no lo sean, tengan la capacidad de adherirse a receptores específicos, o de establecer otro tipo de interacción con células o componentes mucosales. Estas características conducen a una correcta asimilación del antígeno por vías que favorecen las respuestas mucosal y sistémica.

Se ha demostrado que las mucosas son puertas de entrada muy eficaces para ciertos patógenos. Aunque es muy difícil lograr una inmunidad de mucosa efectiva a partir de la inmunización sistémica, por la vía mucosal se logra inmunidad de mucosas y sistémica [99]. También se ha demostrado que para los patógenos que permanecen en las superficies mucosales o tienen en ellas una puerta de entrada, la protección se relaciona mejor con una respuesta local fuerte [100].

La estrategia de adyuvación por la vía mucosal, de acuerdo con las características del antígeno, exige procedimientos de unión o recubrimiento con ligandos específicos que envíen el antígeno a células especializadas del epitelio mucosal simple (células M). Además, para que el antígeno pueda cruzar las barreras que la ruta impone, se manipulan características propias del antígeno como tamaño, presencia de ligandos mucosales, carga eléctrica y lipofiliencia [20], así como el uso de sistemas de envío de antígenos que favorezcan dichas características. Una vez asimilado el antígeno, el adyuvante puede favorecer la respuesta por cualquiera de los mecanismos conocidos: adsorción del antígeno, efecto de depósito, inducción de citocinas, activación del sistema del complemento, reclutamiento de distintas poblaciones de células del sistema inmunológico, envío del antígeno a diferentes células presentadoras de antígenos, regulación de la expresión vía MHC clase I o clase II, y estimulación de la producción de diferentes subclases de anticuerpos [101], en dependencia de la estrategia de adyuvación utilizada.

Derivados de bacterias. Algunos de los inmunoes-timulantes conocidos, como el MDP, el MPL, la amina lipoidal Avridina y las conocidas toxinas de *Vibrio cholerae* (CT) y de *Escherichia coli* (HLT), son adyuvantes reconocidos para antígenos administrados por vía de mucosas [102].

Aunque el MDP y el MPL han sido evaluados en formulaciones liposomales con fines terapéuticos y profilácticos, las toxinas o sus subunidades (en especial CT y CTB), son los adyuvantes mucosales más estudiados. La capacidad de CT de actuar como adyuvante oral ha sido confirmada por un gran número de investigadores [103]. La toxina del cólera no cumple con la definición clásica de un adyuvante porque estimula una respuesta inmune contra ella misma y su actividad adyuvante es dependiente de su inmunogenicidad [104]. Los efectos de CT y HLT que explican su fuerte actividad adyuvante, incluyen el incremento de la presentación de antígenos por varios tipos de células B, el incremento en la diferenciación de células B a células secretoras de IgA, la interacción con células T y la producción de citocinas [105].

Desde el punto de vista práctico, el uso de la holotoxina en humanos no es factible debido a su toxicidad. Una estrategia acertada es la destoxicación de CT por escisión de la subunidad A o por mutación del gen que la codifica. Tanto CT como CTB—subunidad no tóxica—pueden potenciar la respuesta inmune contra varios antígenos acoplados covalentemente, debido a las interacciones específicas que se establecen con las células M [106].

Sistemas de envío de antígenos a mucosas. Los sistemas de envío de antígenos, del inglés *antigen delivery systems*, han alcanzado un nivel de desarrollo suficiente que avala su introducción en la práctica de

la inmunización. Se espera que los sistemas particulados sólidos, tanto para administración parenteral como no parenteral, se encuentren dentro de los primeros productos a licenciar [107].

Por las posibilidades que brindan los sistemas de envío de antígenos en la particulación de antígenos solubles, y aprovechando las características fisiológicas de la vía mucosal, estos sistemas han sido ensayados y han mostrado actividad adyuvante. En la literatura se han clasificado como: a) sintéticos o inactivados, y b) vivos [108].

- **Sistemas sintéticos o inactivados de envío de antígenos**

Se han obtenido diferentes resultados a partir del estudio de las partículas poliméricas artificiales. Estas partículas comprenden las microesferas DL-PLG, los polímeros alternativos como polifosfocenos, los polímeros de acetato de celulosa, los iminocarbonatos, los polímeros de etilenvinilacetatos, las microesferas proteínoides, los polianhídridos y las nanosferas de dextranas, las partículas producidas a partir de materiales naturales (alginatos, gelatina y semillas de plantas), y los liposomas y sus variantes (proteoliposomas, virosomas e ISCOM) [107].

El tamaño de las partículas es uno de los factores importantes para el envío de antígenos. Para el caso de la vía mucosal de inmunización, se ha informado que las partículas de diámetro mayor de 10 µm no son absorbidas [109]. En experimentos en ratas se ha observado, luego de la administración oral, que sólo las partículas de 5 µm penetran profundo en las placas de Peyer y las de 1 µm penetran a los linfonodos y al hígado, y pasan a la circulación sanguínea [110, 111]. La extrapolación de estos resultados a humanos aún no está definida y a veces la absorción por el tracto gastrointestinal no es un requisito del poder adyuvante. Aunque se ha comprobado que se potencie la respuesta inmune con la adsorción del toxoide diftérico en semillas de plantas de hasta 2 mm de diámetro [112], la determinación de la talla óptima de los sistemas de liberación controlada para vía nasal, rectal o vaginal es motivo de investigación en la actualidad [107].

Otro factor que afecta las partículas es el balance hidrofobicidad-hidrofilicidad, que puede ser modificado para obtener una modulación de la respuesta inmune [110].

Los coqueatos proteicos son complejos de liposomas y cationes divalentes —fundamentalmente calcio— que, mediante la interacción calcio-fosfolípido, posibilitan la formación de una estructura de liposoma enrollado sobre sí mismo, lo que permite la inmunización por diferentes vías. Con esta estructura se estimula tanto la respuesta inmune de anticuerpos como la respuesta mediada por células [113].

Los liposomas y las micropartículas pueden adherirse a superficies mucosales por interacciones hidrofóbicas, pero la entrada de los antígenos a las células M es muy poco eficiente debido a que son rápidamente atrapados en los geles mucosales y muchos no llegan a alcanzar la mucosa. Las macromoléculas o partículas que se conjugan o recubren con ligandos como CTB, tienen como factor limitante la accesibilidad a los receptores [114].

El uso de ligandos unidos a partículas puede resultar en una adherencia específica a las células M, pero

sólo dentro de un rango de tallas restringido por el glicocáliz. Las partículas de 1 µm o mayores requieren ligandos dirigidos específicamente a componentes de las células M, aunque la identificación de estos componentes aún se encuentra en investigación [115].

- **Sistemas vivos de envío de antígenos**

En este grupo se puede apreciar bien que el concepto de adyuvante no se restringe a compuestos, sino que también incluye las estrategias encaminadas a desarrollar una respuesta inmune aunque no implique la adición de alguna sustancia.

Un grupo de bacterias patógenas es capaz de superar las dificultades de los sistemas no vivos al ser asimiladas eficientemente por receptores a nivel de las células M. Estas bacterias utilizan este mecanismo para infectar los tejidos mucosales y diseminarse sistémicamente antes de ser detenidas por el sistema inmune. Los patógenos bacterianos que se adhieren a la superficie de las células M, inician eventos de transducción de señales a nivel epitelial que promueven su internalización. Teniendo en cuenta esta propiedad, se han obtenido cepas atenuadas de *Salmonella typhi* ty21a para la cual se ha descrito una interacción de tipo lectina con receptores de naturaleza polisacáridica de la membrana citoplasmática de las células M. También son consideradas seguras y efectivas las cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* y poliovirus para la inmunización oral. Las cepas manipuladas genéticamente de estos microorganismos, comienzan a ser usadas en humanos como portadoras de antígenos heterólogos [116].

La biología de estos vectores vivos introduce nuevos retos. Las cepas vacunales de *V. cholerae* que no poseen los genes de la toxina aún pueden causar diarreas, al parecer porque las células epiteliales liberan citocinas en respuesta a la adherencia bacteriana [116]. La estrategia en el uso de las cepas manipuladas genéticamente de *S. typhi* y *S. typhimurium*, consiste en lograr una atenuación suficiente que brinde seguridad a la vez que conserve la adherencia a las células M y la proliferación en mucosas para mantener su inmunogenicidad. Las cepas atenuadas de *Shigella* también son internalizadas por las células M, pero no son capaces de diseminarse de una célula a la otra. Este fenómeno es la base de la atenuación, pero aún hay una liberación local de citocinas y factores quimiotácticos que puede producir la pérdida de la función normal de la barrera epitelial [117].

Los virus se encuentran también en estudio. El hecho de que el poliovirus tipo 1 y la cepa atenuada de Sabin utilicen el transporte a través de las células M para cruzar la barrera epitelial, los convierte en candidatos importantes de vacunación oral para el envío de antígenos foráneos en humanos. El virus vaccinia y otros poxvirus son asimilados por las superficies mucosales, pero su interacción con las células M no ha sido documentada [20].

Nuevas tendencias en el desarrollo de adyuvantes

Adyuvantes para la inmunización con ADN

A principios de la década de 1990, se pensó que las vacunas basadas en ADN desnudo, como su nombre lo indica, no tendrían ningún componente adyuvante ni

ninguna estrategia de adyuvación. Esta creencia se generalizó teniendo en cuenta los resultados iniciales que demostraron que es posible generar respuestas inmunes potentes cuando determinadas proteínas codificadas por vectores plasmídicos eran inoculadas en distintos modelos animales [118].

El aumento del número de antígenos evaluados con esta tecnología, permitió comprobar que no todos los antígenos tienen el mismo comportamiento y que compuestos que se usan rutinariamente en ensayos en modelos murinos —como los agentes necrosantes—, no pueden ser extrapolados a humanos por motivos obvios de reactividad. En la actualidad, existe un número creciente de reportes en los que se utilizan nuevos elementos o estrategias para inmunopotenciar los candidatos vacunales basados en ADN.

Coinoculación de plásmidos que codifican inmunopotenciadores. Aunque los mecanismos involucrados en la inducción y el mantenimiento de la respuesta inmune aún no están claros, se ha utilizado con éxito la estrategia de coinocular plásmidos que codifican citocinas y factores coestimuladores, con el objetivo de potenciar la respuesta inmune generada por el plásmido vacunal [119]. Recientemente, se ha reportado que la inoculación, en un mismo adenovirus, de genes que codifican el HBsAg y el factor coestimulador B7-1, induce una respuesta citotóxica específica mayor contra el antígeno viral con respecto a la generada por el gen de este antígeno solo [120]. También se ha demostrado que la coinoculación del plásmido de expresión de B7-2 junto al ADN vacunal del VIH-1, incrementa la respuesta celular específica contra el virus, comparado con la inoculación del ADN del VIH-1 solo. Además, se encontró que esta potenciación de la inmunidad celular por B7-2 es dependiente de IFN- γ [121]. Otros autores [122] han obtenido resultados similares que demuestran la potenciación de la respuesta citotóxica de linfocitos CD8⁺ restringidos al MHC clase I. Actualmente, se conoce que los miocitos, a pesar de expresar pobremente las moléculas del MHC, tienen la capacidad de presentar antígenos asociados al MHC clase I. Con el uso de plásmidos que codifican las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, se puede expresar una fuerte señal coestimuladora en los miocitos que no se puede generar de otro modo [123], y que induce niveles mayores de proliferación y activación de células T específicas para el antígeno introducido.

En 1995, Xiang y colaboradores [79] evidenciaron el efecto potenciador del plásmido que expresa el GM-CSF en la respuesta inmune humoral contra la proteína G del virus de la rabia, mediante la coinyección de los dos plásmidos. La potenciación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes que se observa por coinoculación con el plásmido que expresa el GM-CSF, refleja el efecto primario de esta citocina sobre la respuesta de células T auxiliaadoras, que a su vez resulta en un aumento de la activación de células B antígeno-específicas. En experimentos con líneas celulares dependientes de citocinas, la ausencia de respuesta a IL-4 indica que las vacunas de ADN inducen principalmente células Th1, como se mostró previamente, y que la citocina GM-CSF potencia este patrón de respuesta [79]. Se ha demostrado que el plásmido de expresión de la IL-12 coinoculado con otro que codifica una proteína

de VIH-1, potencia la inmunidad mediada por células específicas contra el VIH-1. Aunque los mecanismos involucrados en la inducción y el mantenimiento de la respuesta inmune no están completamente dilucidados, este tipo de estrategia puede ser fructífera [124].

En estudios de coadministración de plásmidos que codifican IL-6 y hemaglutinina, inoculados con la pistola génica Accell, se confirmó protección después del reto de ratones con el virus de la influenza. Los ratones que recibieron el ADN plasmídico que expresa la hemaglutinina sólo exhibieron un aclaramiento acelerado del virus, pero no quedaron protegidos contra la infección. No se detectaron partículas virales en los pulmones de aquellos animales retados que recibieron la coinoculación del plásmido de la IL-6 [125].

Sistemas particulados y vacunas de ADN. La creación de un sistema de envío genético eficiente es un reto de la terapia génica. Recientemente, se estudió la asociación y la estabilidad de un ADN plasmídico que codifica la ovoalbúmina, y de partículas poliméricas que alcanzan un tamaño de micras: microesferas biodegradables de ácido poliláctico y coglicólico, poliDTH-carbonato (pseudopoliaminoácido) y partículas de poliestireno de alrededor de 1 μm . Estas partículas difieren en carga eléctrica e hidrofobicidad y han sido evaluadas tanto para la inmunización mucosal como parenteral. El ADN se adsorbe tanto sobre las partículas biodegradables como sobre las que no lo son. Los resultados obtenidos demostraron que se logran respuestas superiores luego de la administración de ADN asociado a partículas, comparado con la inoculación del ADN solo. La inoculación intranasal e intramuscular de ADN en sistemas particulados, ha generado respuestas similares a nivel sérico [126].

Inmunomoduladores para vacunas de ADN. Se ha evaluado en el modelo murino el efecto adyuvante del ubenimex (UBX), un inmunomodulador anticancerígeno. Se pudo obtener una respuesta inmune humoral y celular superior con el UBX así como una elevación de los niveles de IL-2 e IFN- γ y disminución de la producción de IL-4. El UBX puede tener uso clínico dada su baja inmunogenicidad y toxicidad, por lo que actúa como un adyuvante para vacunas de ADN [127].

El uso de mananos como recubrimiento de estructuras químicas como *N*-*t*-butyl-*N'*-tetradecyl-3-tetradecylamino propionamida (diC14 amidina), también ha constituido una estrategia de inmunopotenciación de vacunas basadas en ADN. El recubrimiento del diC14 con el manano aumentó significativamente la respuesta de hipersensibilidad tardía antígeno-específica inducida por el ADN. La actividad CTL también fue potenciada de forma notable por esta mezcla. El efecto inmunomodulador fue inhibido cuando se trató la mezcla con anticuerpos antiIFN- γ *in vivo*, lo cual evidencia que el IFN- γ desempeña un papel importante en la inducción de la inmunidad celular generada por las vacunas de ADN. Otros resultados muestran que el ADN vacunal incorporado en la diC14 amidina recubierta de manano, generó una respuesta de tipo Th1 [128].

También se ha evaluado la respuesta inmune contra un ADN administrado por vía intranasal e intramuscular como vacuna contra el VIH-1, con el empleo de MPL como adyuvante. Ambas vías de inmunización generan niveles similares de inmunidad celular, pero la respuesta de IgA de secreción a

nivel de intestino es mayor en el caso de los animales inmunizados por la vía intranasal. El MPL demostró su poder adyuvante por ambas vías [129].

Autoadyuvación por el ADN? La explicación al fenómeno de la respuesta intensa encontrada después de la inoculación intramuscular del ADN plasmídico vacunal en tampón fosfato (PBS) reside, en parte, en la naturaleza de la señal de "peligro" que el propio ADN vacunal induce. Las secuencias inmunoestimuladoras presentes en el ADN de los organismos procariontes (descritas en el subcapítulo *Derivados de bacterias*), son capaces de inducir la producción de citocinas como IL-12, TNF- α e IL-6 [130].

Adyuvantes y modulación de la tolerancia oral

La tolerancia oral se puede definir como la inhibición de la respuesta Th1 en la periferia, tanto por dosis elevadas de antígeno capaces de inducir anergia y/o deleción clonal, como por la inducción en mucosas de células reguladoras Th2 o Th3. Por esta razón, cualquier estrategia que favorezca la respuesta Th1 en detrimento de Th2 o Th3, debe eliminar la tolerancia oral, y viceversa [131]. En la opinión de los autores de este trabajo, estos compuestos o estrategias que potencian la tolerancia pueden considerarse adyuvantes.

Derivados de bacterias. Como se describió anteriormente, la toxina del cólera es uno de los adyuvantes mucosales más potentes. Se ha comprobado que la introducción de la CT por vía oral junto con antígenos no relacionados, elimina la tolerancia oral [132]. Sin embargo, cuando una proteína es acoplada a la subunidad B de la toxina del cólera y administrada oralmente, se produce una potenciación de la tolerancia periférica [133-135].

Los lipopolisacáridos potencian la inducción de tolerancia oral y su actividad ha sido asociada con un incremento en la expresión de IL-4, como se evidenció en el modelo de la proteína básica de la mielina [136].

Citocinas. Se ha comprobado que las citocinas administradas oralmente retienen su actividad biológica [137]. Grandes dosis de IFN- γ pueden eliminar la tolerancia oral [138] y se esperan resultados similares de la IL-12 [139]. De hecho, se ha encontrado que el uso de anticuerpos antiIL-12 potencia la tolerancia oral y está asociado con el aumento de la secreción de TGF- β y la apoptosis de las células T [140]. En experimentos recientes, la IL-12 administrada mucosalmente no inhibió la respuesta de IgA inducida por la toxina del cólera, aunque el patrón de células T auxiliaadoras sí cambió con este tratamiento [141].

En el modelo de uveítis, la IL-2 potencia la tolerancia oral y está asociada con un aumento en la producción de TGF- β , IL-4 e IL-10 en las placas de Peyer; además, se ha comprobado que la administración de IL-4 potencia la tolerancia oral a bajas dosis y está asociada a un incremento en los niveles de coproanticuerpos de tipo IgA [142].

La manipulación de la tolerancia, así como la modulación de este fenómeno, tienen un auge creciente en el tratamiento de enfermedades alérgicas y autoinmunes, y avisan nuevas aplicaciones en el campo de las enfermedades infecciosas crónicas. La adyuvación, entendida como adición de una sustancia o como estrate-

gia, constituye una posibilidad de incrementar la eficacia de este tipo de inmunomanipulaciones.

Nuevas estrategias de adyuvación en vacunas anticáncer

Tradicionalmente, las vacunas contra el cáncer han empleado células tumorales enteras administradas con adyuvantes o infectadas con virus, para incrementar su inmunogenicidad. Con la identificación de antígenos asociados a tumores y específicos de tumores, se han diseñado vacunas de epítomos específicos. Comparadas con las vacunas de células enteras, las vacunas de antígenos y epítomos son más específicas y fáciles de producir en grandes cantidades, pero pueden ser menos inmunogénicas o pueden conducir a una selección *in vivo* de variantes tumorales que no contengan esos antígenos o epítomos. Las vacunas óptimas deben generar una inmunidad tanto humoral como celular en los pacientes, y ambos parámetros se han correlacionado positivamente con la inducción de respuestas clínicas beneficiosas. La selección del adyuvante, la coestimulación y el modo de administración, determinan el éxito de las vacunaciones y pueden favorecer la inducción de respuestas celulares de tipo Th1 o Th2, o de ambos. Varias vacunas formadas por antígenos tumorales, antígenos asociados a tumores y anticuerpos antiidiotípicos que imitan antígenos asociados a tumores, han entrado recientemente en evaluación clínica de fase III [143].

El aumento de la capacidad para mediar la regresión tumoral, ha sido una meta fundamental en la inmunología tumoral. El progreso hacia este objetivo se ha acelerado recientemente por la identificación de antígenos de cáncer, y por una mejor comprensión de los mecanismos de escape tumoral y de la respuesta inmune mediada por células T. La posibilidad de generación *in vitro* de células dendríticas a partir de precursores de la sangre, ha iniciado una nueva era en la inmunoterapia del cáncer. El uso de las células dendríticas como adyuvantes de vacunas contra el cáncer, ha permitido que se obtengan respuestas inmunes medibles y, en unos pocos casos, respuestas completas en pacientes con linfomas de células B y melanomas [144].

En el caso del desarrollo de vacunas contra el cáncer de mama, ciertos gangliósidos son antígenos asociados a tumores y constituyen blancos potenciales para la inmunoterapia de este tipo de cáncer. Un problema importante del uso de estos antígenos es su poca inmunogenicidad. Se ha reportado recientemente la obtención de proteoliposomas de tamaño muy pequeño a partir de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*, en los que se han podido incorporar varios gangliósidos. Esto ha aumentado significativamente la inmunogenicidad, incluso de gangliósidos altamente tolerados [145].

Las estrategias vacunales dirigidas contra HER-2/neu, autoantígeno que se sobreexpresa en 15-30% de los adenocarcinomas humanos, así como contra otros autoantígenos tumorales, también requieren el desarrollo de métodos que sobrepongan un estado de respuesta a la tolerancia inmunológica. Recientemente, se desarrollaron candidatos vacunales basados en péptidos que han sido adyuvados satisfactoriamente con GM-CSF. Hasta el momento, todos los pacientes

inmunizados con los péptidos HER-2/neu desarrollaron respuestas específicas de células T [146].

Aunque ha habido progresos en la terapia biológica del cáncer colorrectal, aún queda mucho por hacer. Los descubrimientos continuos relacionados con la respuesta inmunológica contra los tumores, aseguran el camino de los progresos futuros. Entre las estrategias vacunales, también se ha utilizado el GM-CSF para reclutar CPA. El aumento del conocimiento sobre los antígenos apropiados para la vacunación, así como el desarrollo de estrategias que sobrepongan un estado de respuesta inmunológica al estado de tolerancia, serán pasos críticos en el éxito de estas estrategias [147].

Conclusiones

La evolución del sistema inmune ha conllevado a una adaptación a las características de los agentes infecciosos —los cuales son generalmente particulados y en su mayoría estructuras lipídicas portadoras de proteínas organizadas—, de forma tal que brindan protección contra su genoma y lo envían a un sitio intracelular que permite su replicación. Por lo tanto, no es sorprendente que la inoculación de antígenos que son subunidades genere respuestas inmunes inapropiadas o subóptimas.

Los adyuvantes están llamados a asistir a los antígenos en la optimización de su capacidad como inmunógenos, por lo que su selección debe contemplar las características del antígeno y los mecanismos de protección contra la enfermedad en cuestión.

Los adyuvantes han sido utilizados con diversos objetivos: incrementar la inmunogenicidad de los antígenos por las vías sistémica y mucosal; aumentar el envío de antígenos a las células presentadoras profesionales; dirigir la respuesta en el sentido Th1 o Th2; promover respuestas citotóxicas; reducir el número de inmunizaciones o la cantidad de antígeno requerida para una inmunización protectora; incrementar, optimizar o dirigir el procesamiento intracelular de antígenos o ADN vacunal; aumentar la inducción de tolerancia o sobreponerla; y potenciar fuertes respuestas a nivel de mucosas, tanto adyacentes como remotas.

Aún está por ver si se pueden resolver las limitaciones de los adyuvantes que se encuentran en ensayos clínicos y preclínicos en la actualidad, dado que existe una necesidad urgente de producir vacunas efectivas, apropiadas y viables comercialmente a partir de los nuevos inmunógenos definidos y altamente puros que están disponibles a través de las nuevas tecnologías.

1. Bomford R. Will adjuvants be needed for vaccines of the future? In: Brown F, Haaheim LR, editors. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*. Dev Biol Stand Vol 92. Basel: Karger; 1998. p. 13–8.
2. Vogel FR. Adjuvants in perspective. In: Brown F, Haaheim LR, editors. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*. Dev Biol Stand Vol 92. Basel: Karger; 1998. p. 241–8.
3. Ramon G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull Soc Centr Med Vet* 1925;101:227–34.
4. Ramon G. Procédes pour accroître la production des antitoxins. *Ann Inst Pasteur* 1926;40:1–10.
5. Glenn AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J Path Bact* 1926;29:38–45.
6. Vogel FR, Powell MF. A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Publishing Corp; 1995. p. 234–50.
7. Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;37:509–13.
8. Stuart-Harris CH. Adjuvant influenza vaccines. *Bull WHO* 1969;41:617–21.
9. Johnson AG, Gaines S, Landy M. Studies on the O-antigen of *Salmonella typhosa* V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1956;103:225–46.
10. Ribí E. Beneficial modification of the endotoxin molecule. *J Biol Response Mod* 1984;3:1–9.
11. Ellouz F, Adam A, Ciobaru R, Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;59:1317–25.
12. Weiner GJ, Hsin-Ming L, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10833–7.
13. McElrath MJ. Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Seminars in Cancer Biology* 1995;6:375–85.
14. Marx PA, Compans RW, Gettie A. Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science* 1993;28:1323–7.
15. Douce G, Turcotte C, et al. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP ribosyl-transferase activity act as non-toxic mucosal adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1644–8.
16. Alving RC, Glass M, Detrick B. Adjuvants/Clinical Trials Working Group. *AIDS Res Hum Retr* 1992;8:1427–30.
17. Lindblad EB. Aluminium adjuvants. In: Stewart-Tull DES, editor. *The theory and practical application of adjuvants*. John Wiley & Sons Ltd. 1995. p. 21–35.
18. Byars NE, Allison AC. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations. In: Zola H, editor. *Laboratory Methods in Immunology*; 1990. p.39–51.
19. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis* 1980;2:370–83.
20. Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 1996;14:275–300.
21. Warren HS, Chedid LA. Future prospects for vaccine adjuvants. *CRC Crit Rev Immunol* 1986;4:369–88.
22. Edelman R, Tacket C. Adjuvants. *Int Rev Immunol* 1990;7:51–66.
23. Edelman R. An update on vaccine adjuvants in clinical trials. *AIDS Res Hum Retr* 1992;8:1409–11.
24. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 1993;11:293–306.
25. Allison AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology* 1991;28:279–84.
26. Waters RV, Terrell TG, Jones GH. Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. *Infect Immunol* 1986;51:816–25.
27. Goldenthal KL, Cavagnaro JA, Alving CR, Vogel FR. Safety evaluation of vaccine adjuvants. National Cooperative Vaccine Development Working Group. *AIDS Res Hum Retr* 1993;9:S45–9.
28. Stewart-Tull DES. Recommendations for the assessment of adjuvants. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological Adjuvants and Vaccines*. New York: Plenum Press; 1989. p. 213–26.
29. Jennings R, Simms JR, Heath AW. Adjuvants and delivery systems for viral vaccines—mechanisms and Potential. In: Brown F, Haaheim LR, editors. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*. Dev Biol Stand Vol 92. Basel: Karger; 1998. p.19–28.
30. Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implications for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J Virol* 1994;68:1418–25.
31. Traquina P, Morandi M, Contorni M, Van Nest G, MF59 adjuvant enhances the antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen vaccine in primates. *J Infect Dis* 1996;174:1168–75.
32. Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's

- complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 1996;26:2062-66.
33. Blagowechensky NN. Durée du séjour de l'antigène dans l'organisme et immunité. *Rev. Immunol. Paris.* 1938;4:161.
34. Walls RS. Eosinophil response to alum adjuvants: Involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977;156:431-5.
35. Gupta RK, Rost BE, Relyveld E, Siber GR. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press; 1995. p. 229-48.
36. Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. Advantages of aluminum hydroxide adsorbed diphtheria, tetanus and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J* 1969;1:663-6.
37. Straw BE, MacLachlan NJ, Corbett WT, Carter PB, Schey HM. Comparison of tissue reactions produced by *Haemophilus pleuropneumoniae* vaccines made with six different adjuvants in swine. *Can J Comp Med* 1985; 49:149.
38. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today* 1993;14:281-4.
39. Bomford R. Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological adjuvants and vaccines*. New York, Plenum Press, 1989. p. 35-41.
40. Goto N, Kato H, Maeyama J-I, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine* 1993;11:914-8.
41. Nixon A, Zaghouani H, Penney CL, Lacroix M, Dionne G, Anderson SA, et al. Adjuvanticity of stearyl tyrosine on the antibody response to peptide 503-535 from HIV gp160. *Viral Immunol* 1992;5:141-50.
42. Relyveld EH, Hencoq E, Raynaud M. Etude de la vaccination antidiphtherique de sujets allergiques avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bull WHO* 1964; 30:321-5.
43. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* 1995;13:1263-76.
44. Relyveld EH. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand* 1986;65:131-6.
45. Chaby R, Caroff M. Lipopolysaccharides of *Bordetella pertussis* endotoxin. In: Wardlaw AC, Parton P, editors. *Pathogenesis and immunity in Pertussis*. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 247-71.
46. Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Systems* 1996; 13:1-55.
47. Takahashi H, Takeshita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofsky JA. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 1990;344:873-75.
48. Dalsgaard K. Adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 1987;17:145-53.
49. Bomford RHR. The differential adjuvant activity of Al(OH)₃ and saponin. In: Madje J, editor. *Immunopharmacology of infectious diseases: vaccine adjuvants and modulators of non-specific resistance*. New York: Alan R. Liss; 1987. p.65-70.
50. Rönnerberg B, Fekadu M, Morein B. Adjuvant activity of non toxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in ISCOM-matrix. *Vaccine* 1995;13:1375-82.
51. Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol* 1991; 146:431-7.
52. Kensil CR, Wu J-Y, Soltyshik S. Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York, Plenum Press, 1995. p. 525-41.
53. Rook GAW. New meanings for an old word: adjuvanticity, cytokines and T cells. *Immunol Today* 1993;14:95-6.
54. Janeway CA. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;5:3-8.
55. Kotani S, Watanabe Y, Shimoto T, Narita T, Kato K, Stewart-Tull DES, et al. Immunoadjuvant activities of cells walls, their water soluble fractions and peptidoglycan subunits, prepared from various gram-positive bacteria, and of synthetic N-acetylmuramyl peptides. *Z Immunitätsforsch* 1975;149S: 302-5.
56. Audibert F, Leclerc C, Chedid L. Muramyl peptides as immunopharmacological response modifiers. In: Torrence PF, editor. *Biological response modifiers. New Approaches to Disease Prevention*. Orlando, Academic Press, 1985. p. 307.
57. Audibert F, Chedid L, Lefrancier P, Choay J. Distinctive adjuvanticity of synthetic analogs of mycobacterial water-soluble components. *Cell Immunol* 1976;21:243-45.
58. Parant MA, Audibert FM, Chedid LA, Level MR, Lefrancier PL, Choay JP, et al. Immunostimulant activities of a lipophilic muramyl dipeptide derivative and of a desmuramyl peptidolipid analogue. *Infect Immun* 1980; 27:826-30.
59. Leclerc C, Vogel F. Synthetic immunomodulators and synthetic vaccines. *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Systems* 1986;2:353-7.
60. Tomai MA, Johnson AG. T cell and interferon-g involvement in the adjuvant action of a detoxified endotoxin. *J Biol Res Modif* 1989;8:625-30.
61. Lemaire G, Tenu JP, Petit JF, Lederer E. Natural and synthetic trehalose diesters as immunomodulators. *Med Res Rev* 1986; 6:243.
62. Freund J. The mode of action of immunological adjuvants. *Adv Tuberc Res* 1956;7:50-5.
63. Hilleman MR, Woodhour AF, Friedman A, Phelps AH. Studies for safety of Adjuvant 65. *Ann Allergy* 1972;30:477-80.
64. Smith JWG, Fletcher WB, Peters M, Westwood M, Perkins FT. Response to influenza vaccine in adjuvant 65-4. *J Hyg (Camb)* 1975;74:251-5.
65. Weibel RE, McLean A, Woodhour AF, Friedman A, Hilleman MR. Ten-year follow-up study for safety of Adjuvant 65 influenza vaccine in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973;143:1053-6.
66. Woodard LF, Jasman RL. Stable oil-in-water emulsions: preparation and use as vaccine vehicles for lipophilic adjuvants. *Vaccine* 1985;3:57-61.
67. Kimura J, Nariuchi H, Watanabe T, Matuhasi T, Okayasu I, Hatakeyama S. Studies on the adjuvant effect of water-in-oil-in-water emulsion in sesame oil. I. Enhanced and persistent antibody formation by antigen incorporated into the water-in-oil-in-water emulsion. *Jpn J Exp Med* 1978;48:149-52.
68. Freestone DS, Hamilton-Smith S, Schild GC, Buckland R, Chinn S, Tyrrel DAJ. Antibody responses and resistance to challenge in volunteers vaccinated with live attenuated detergent split and oil adjuvant A2/Hong Kong/68 (H3N2) influenza vaccines. *J Hyg (Camb)* 1972;70:351-5.
70. Jones GL. Peptide vaccine derived from a malarial surface antigen: effect of dose and adjuvant on immunogenicity. *Immunology Letters* 1990;24:253-60.
71. Shek PN, Yung BYK, Stanacev NZ. Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunology* 1983;49:37-40.
72. Allison AC, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 1974;252:252-8.
73. Heath TD, Edwards DC, Ryman BE. The adjuvant properties of liposomes. *Biochem Soc Trans* 1976;4:49-52.
74. Tyrrel DA, Heath TD, Colley CM, Ryman BE. New aspects of liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1976;457:259-63.
75. van Rooijen N, van Nieuwmegen R. Use of liposomes as biodegradable and harmless adjuvants. *Methods Enzymol* 1983; 93:83-5.
76. Kramp WJ, Six HR, Kasel JA. Post-immunization clearance of liposome-entrapped adenovirus type 5 hexon. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982;169:55-9.
77. Eldrige JH, Staas JK, Meulbroek JA, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol* 1991;28:287-90.
78. Eldrige JH, Staas JK, Meulbroek JA, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable and biocompatible poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1991;59:2978-83.
79. Xiang Z, Ertl HC. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 1995; 2:129-35.
80. Heuffer C, Koch F, Schuler G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 1988;167:700-5.
81. Davis SE, Lewis BA. Physiological effects of mannans, galactomannans, and glucomannans. *Phys Effects Food Carb* 1976;6:296-311
82. Tizard IR, Carpenter RH, McAnalley BH, Kemp MC. The biological activities of mannans and related complex carbohydrates. *Mol Biother* 1989;1:290-6.
83. Susuki M, Takatsuki F, Maeda YY, Hamuro J, Chihara G. Lentinan-rationale for development and therapeutic potential. *Clin Immunother* 1994;2:121-5.
84. Sheets MA, Unger BA, Giggelman GF Jr, Tizard IR. Studies of the effect of acemannan

- on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Mol Biother* 1991;3:41-5.
85. Womble D, Helderman JH. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemannan (Carrisynt). *Int J Immunopharmacol* 1988;10:967-74.
86. McAnalley BH, Carpenter RH, McDaniel HR, inventors. Carrington Laboratories Inc, assignee. Use of acemannan. US patent 229164. 1988 Aug 5.
87. Aguilar JC, Muzio VL, Leal MJ, Guillén GE, Pentón E, Véliz G, *et al.*, inventors. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, assignee. Immunopotentiating formulations for vaccinal use. WO98/39032. 1998 Sep 11.
88. Cooper PD, Steele EJ. Algammulin: a new vaccine adjuvant comprising gamma inulin particles containing alum, preparation and *in vitro* properties. *Vaccine* 1991;9:351-7.
89. Cooper PD, McComb C, Steele EJ. The adjuvanticity of algammulin, a new vaccine adjuvant. *Vaccine* 1991;9:408-15.
90. Cooper PD. Vaccine adjuvants based on gamma inulin. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press; 1995. p.559-80.
91. Morein B, Lövgren K, Höglund S. Immunostimulating complex (ISCOM). In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological adjuvants and vaccines*. New York, Plenum Publishing Corporation, 1989. p. 153-61.
92. Claassen I, Osterhaus A. The ISCOM structure as an immune-enhancing moiety: experience with viral systems. *Res Immunol* 1992;143:531-40.
93. Larsson M, Lövgren K, Morein B. Immunopotential of synthetic oligopeptides by chemical conjugation to ISCOMs. *J Immunol Meth* 1993;162:257-62.
94. Anderson DJ. The importance of mucosal immunology to problems in human reproduction. *J Rep Immunol* 1996;31:3-19.
95. Morein B, Akerblom L. The ISCOM, an approach to subunit vaccines. In: Isaacson RE, editor. *Recombinant DNA vaccines*. Marcel Dekker Inc; 1992. p.369-73.
96. Restifo NP. The new vaccines: building viruses that elicit antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:658-63.
97. Michalek SM, Childers NK, Katz J, Denys FR, Berry AK, Eldridge JH, *et al.* Liposomes as oral adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;146:51-5.
98. Alpar HO, Bowen JC, Brown MRW. Effectiveness of liposomes as adjuvants of orally and nasally administered tetanus toxoid. *Int J of Pharm* 1992;88:335-44.
99. Bye WA, Allan CH, Trier JS. Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 1984;86:789-801.
100. Shalaby WS. Development of oral vaccine to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74:127-34.
101. Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, editors. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1996.
102. Walker RI. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 1994; 12:387-400.
103. McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992;10(2):75-88.
104. Elson CO. Cholera toxin as a mucosal adjuvant—the effect of H-2 genes. *Fed Proc* 1987;46:1778-82.
105. Snider DP. The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit Rev Immunol* 1995; 15:317-48.
106. Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector system. *Vaccine* 1993;11:1179-83.
107. Li Wan Po A, Rogers E, Sheppard M, Scott EM. Delivery systems for non-parenteral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995;18:101-9.
108. Criz S, Stanley SD, Gregoriadis G, Grimaud JA, Kourilsky P, Selkirk ME, *et al.* Report of the Expert Panel VII: vaccine delivery systems. *Vaccine* 1996;14:644-64.
109. Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staas JK, Gilley RM, Tice TR. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *J Controlled Release* 1990;11:205-14.
110. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:821-6.
111. Alpar HO, Field WN, Hyde R, Lewis DA. The transport of microspheres from gastrointestinal tract to inflammatory air pouches in the rat. *J Pharm Pharmacol* 1989;41:194-6.
112. Mirchamsky H, Hamedy M, Fateh G, Sassani A. Oral immunization against diphtheria and tetanus infections by fluid diphtheria and tetanus toxoids. *Vaccine* 1994;12:1167-72.
113. Gould-Foguerie S, Edghill-Smith Y, Khairi M, Wang Z, Das K, Feketeova E, *et al.* Lipid matrix-based subunit vaccines: a structure function approach to oral and parenteral immunization. *AIDS Res Hum Retr* 1994;10:99-103.
114. Neutra MR, Kraehenbuhl JP, Frey A. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 1996; 86:345-8.
115. Frey A, Giannasca KT, Weltzing R, Giannasca PJ, Reggio H, Lencer WI, *et al.* Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implication for microbial attachment and oral vaccine targeting. *J Exp Med* 1996;184:1045-59.
116. Mekalanos JJ. Bacterial mucosal vaccines. *Adv Exp Med Biol* 1992;327:43-50.
117. Sansonetti PJ. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. *Rev Infect Dis* 1991;13:S285-92.
118. Wolff JA, Malone RW, Williams P. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990;247:1465-8.
119. Kim JJ, Bagarazzi ML, Trivedi N, Hu Y, Kazahaya K, Wilson DM, *et al.* Engineering of *in vivo* immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes *Nature Biotechnology* 1997; 15:641-6.
120. He XS, Chen HS, Chu K, Rivkina M, Robinson WS. Costimulatory protein B7-1 enhances the cytotoxic T cell response and antibody response to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7274-8.
121. Toda S, Ishii N, Okada E, Kusakabe KI, Arai H, Hamajima K, *et al.* HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody. *Immunology* 1997;92:111-7.
122. Kim JJ, Bagarazzi ML, Trivedi N, Hu Y, Kazahaya K, Wilson DM, *et al.* Engineering of *in vivo* immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nat Biotechnol* 1997; 15:641-6.
123. Hohlfeld R, Engel AG. The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 1994; 15:269-74.
124. Tsuji T, Hamajima K, Fukushima J, Xin KQ, Ishii N, Aoki I, *et al.* Enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid-encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12. *J Immunol* 1997;158:4008-13.
125. Larsen DL, Dybdahl-Sissoko N, McGregor MW, Drape R, Neumann V, Swain WF, *et al.* Co-administration of DNA encoding interleukin-6 and hemagglutinin confers protection from influenza virus challenge in mice. *J Virol* 1998;72:1704-8.
126. Alpar HO. Particulated carriers for mucosal delivery of vaccines. *Bioch Soc Trans* 1997;25:337S.
127. Sasaki S, Fukushima J, Hamajima K, Ishii N, Tsuji T, Xin KQ, *et al.* Adjuvant effect of Ubenimex on a DNA vaccine for HIV-1. *Clin Exp Immunol* 1998;111:30-5.
128. Sasaki S, Fukushima J, Arai H, Kusakabe KI, Hamajima K, Ishii N, *et al.* Human immunodeficiency virus type-1-specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine. *Eur J Immunol* 1997;27:3121-9.
129. Sasaki S, Hamajima K, Fukushima J, Iwata A, Ishii N, Gorai I, *et al.* Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. *Infect Immun* 1998; 66:823-6.
130. Pisetsky DS. Immunostimulatory DNA: a clean and present danger. *Nature Medicine* 1997;3:829-31.
131. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997;18:335-41.
132. Elson CO, Ealding W. Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol* 1984;133:2892-7.
133. Sun JB, Holmgren J, Czerkinsky C. Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:10795-9.
134. Sun JB, Rask C, Olsson T, Holmgren J, Czerkinsky C. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding