

Papel de los adyuvantes en las vacunas frente al virus del papiloma humano

R. Cambroneró Martínez^a y A. Blanco Quirós^b

^aDepartamento Médico GSK, S.A. Tres Cantos. Madrid.

^bCatedrático de Pediatría. Universidad de Valladolid. Valladolid.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este artículo es exponer el papel que desempeñan los adyuvantes en las nuevas vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH), y la importancia de combinar el antígeno (Ag) más inmunógeno con el adyuvante más potente, con el fin de obtener la vacuna más eficaz.

Se mencionarán muchos conceptos, ya explicados en otros artículos de este suplemento, sobre las bases inmunológicas de las vacunas y de la infección por el VPH, fundamentales para entender el funcionamiento de estos adyuvantes.

Las vacunas son desarrolladas con el fin de simular la infección por un determinado microorganismo, induciendo protección y poniendo en marcha respuestas inmunes (RI) similares a las encontradas tras la infección natural. La identificación del mecanismo efector responsable de esta protección es el primer paso en el diseño de una vacuna. A continuación se seleccionará el Ag que pueda desencadenar la respuesta deseada y después se identificarán los medios para presentarlo de forma efectiva al sistema inmune (SI)¹.

Tradicionalmente, las vacunas se basaban en el empleo de virus vivos atenuados o células completas, que resultaban muy inmunógenos. Sin embargo, en las nuevas vacunas se utilizan subunidades de los patógenos o Ag sintéticos o recombinantes puros, que son más seguros pero inducen una RI más débil². Esto hace necesario el empleo de adyuvantes potentes para incrementar la respuesta del SI.

Históricamente se ha dado más importancia a la respuesta humoral inducida por la vacuna, dejando a un lado la respuesta celular, lo que llevó al desarrollo de adyuvantes que reforzaban exclusivamente la producción de anticuerpos (Acs), sin inducir una respuesta Th1 mediada por linfocitos T citotóxicos (LTC)³.

En las vacunas modernas hay un nuevo reto, ya no es suficiente con seleccionar el mejor Ag y la vía de presentación más eficaz. En la actualidad, y para prevenir patologías más complejas, se necesita optimizar al máximo la RI frente a los patógenos causantes de estas enfermedades. Por ello, para cada vacuna en particular debe combinarse el Ag más inmunógeno con el adyuvante más eficaz, capaz de potenciar al máximo la RI y mantenerla en el tiempo².

A continuación se describen algunas generalidades sobre los adyuvantes para comentar, después, los empleados en las vacunas disponibles frente al VPH, sales de aluminio y ASO⁴.

ADYUVANTES: GENERALIDADES

Origen de los adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que, añadidas a la formulación de las vacunas, potencian la inmunogenicidad de los Ag con los que son co-administrados⁴.

La investigación en este campo se ha convertido en la actualidad en algo mucho más sofisticado con el desarrollo de nuevos adyuvantes con mecanismos de acción innovadores, aunque los adyuvantes (del latín *adjuvare* que significa ayuda o refuerzo) han sido utilizados para potenciar la RI durante más de 75 años.

En 1925 Ramon fue el primero en demostrar que era posible incrementar de forma artificial los niveles antígeno-específicos del antitoxoide diftérico o tetánico⁵. La actividad adyuvante de las sales de aluminio fue demostrada en 1926⁶ con el toxoide diftérico adsorbido en aluminio. Desde entonces los compuestos basados en las sales de aluminio (principalmente hidróxido y fosfato) continúan monopolizando las vacunas usadas en seres humanos. A pesar del descubrimiento de otros adyuvantes más potentes, como el adyuvante de Freund o los lipopolisacáridos⁷⁻⁹, no se consideraron apropiados para su uso en seres humanos por su alta toxicidad, tanto local como sistémica. Esto ha llevado a que en los últimos 80 años las sales de aluminio fueran los únicos adyuvantes autorizados en vacunas para uso en seres humanos.

Correo electrónico: charo.m.cambroneró-martínez@gsk.com

Tabla 1. Principales funciones de los adyuvantes

Potenciar la inmunogenicidad de antígenos muy purificados o recombinantes
Reducir la cantidad de Ag o el número de inmunizaciones necesarias para conseguir una respuesta protectora
Aumentar la eficacia de la vacuna en poblaciones especiales: recién nacidos, ancianos o inmunodeprimidos
Actuar como sistemas de liberación de antígenos para su captación por la mucosa

Función de los adyuvantes

Un adyuvante puede ser utilizado con varios propósitos¹⁰, como se indica en la tabla 1.

Características del adyuvante ideal

Puede que el adyuvante "ideal" no exista, ya que cada adyuvante tendrá que presentar unas determinadas características en función del Ag al que se una. De forma general las propiedades deseables son las presentadas en la tabla 2^{1,10}.

Clasificación de los adyuvantes

Teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos que pueden incrementar la RI frente a un Ag y que, por tanto, pueden funcionar como adyuvantes, no existe una única clasificación, y estos pueden ser agrupados en función de su origen, mecanismo de acción o propiedades fisicoquímicas. Por eso, se han publicado diferentes clasificaciones^{1,2,10}.

Teniendo en cuenta su mecanismo de acción (lo cual es importante para las características cuantitativas y cualitativas de la RI generada), Pashine los clasifica en²:

1) Potenciadores inmunes que activan la RI innata, bien directamente (como las citocinas) o a través de receptores presentes en la superficie de las células presentadoras de Ag (CPA). Entre estos se incluye el monofosforil lípido A (MPL) y otros derivados bacterianos.

2) Sistemas de liberación que pueden concentrar y presentar Ag en patrones repetitivos, favorecer la presentación del Ag a la CPA y ayudar a co-localizar los Ag con los potenciadores inmunes. Entre estos se encuentran las sales de aluminio y la emulsión de aceite en agua MF59.

Hasta hace muy pocos años, la mayoría de la investigación en el desarrollo de nuevas vacunas se centraba, fundamentalmente, en obtener nuevos Ag protectores y en mejorar las vías de presentación de los mismos, más que en optimizar y adecuar al máximo la RI frente a estos Ag. Como consecuencia de ello, hasta hace muy poco tiempo solo estaban autorizados para su uso en seres humanos los adyuvantes del grupo de sistemas de liberación.

Era necesaria una investigación más activa en el campo de los adyuvantes que permitiera disponer de una mayor variedad y con diferente mecanismo de acción.

Como resultado de esta investigación, desde 2005 se encuentra comercializada una vacuna frente al virus de la hepatitis B adyuvada con AS04¹¹. Se trata de un adyuvante potenciador inmune con un mecanismo de acción diferente a los adyuvantes comercializados hasta el momento. Recientemente una segunda vacuna formulada con AS04, en este caso frente al VPH 16 y 18, ha recibido la autorización para su comercialización por parte de la Comisión Europea. Esta investigación debe continuar, lo que permitirá disponer de un mayor número de adyuvantes para ser

usados en las nuevas vacunas con Ag recombinantes, y adecuar esta combinación en función de los requerimientos específicos de cada vacuna en particular⁴.

ADYUVANTES UTILIZADOS EN LAS VACUNAS FRENTE AL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**Adyuvantes clásicos: sales de aluminio**

Desde el descubrimiento de su capacidad adyuvante hace más de 80 años, las sales de aluminio han sido el adyuvante de referencia, siendo hasta hace muy poco el único adyuvante autorizado para su uso en seres humanos.

Bajo el término general de sales de aluminio se engloban fundamentalmente el fosfato (fosfato de aluminio e hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo) e hidróxido de aluminio. Dos de ellas se utilizan en la formulación de las vacunas disponibles frente al VPH: el hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo, de forma aislada, en la vacuna de Sanofi Pasteur MSD (Gardasil®); y el hidróxido de aluminio combinado con MPL en la formulación de la vacuna frente al VPH 16 y 18 de GlaxoSmithKline. Los mecanismos de acción de las sales de aluminio no son del todo bien conocidos, pero se ha descrito que podría actuar mediante^{1,12}:

1) Efecto "depot", que consiste en la retención del Ag en el sitio de inyección, a una elevada concentración y por un tiempo suficiente que permita su captación por la CPA.

2) Son capaces de activar las CPA y la vía del complemento e inducen la producción de quimocinas, lo que es evidente por la respuesta inflamatoria local.

3) Inducen una eficiente captación de las partículas antigénicas adsorbidas en aluminio por parte de los macrófagos.

Aunque el mecanismo de acción de las diferentes sales de aluminio es el mismo, su eficacia parece no serlo. Así, el hidróxido de aluminio parece más potente que el fosfato de aluminio, lo que puede ser debido a su mayor capacidad de adsorción a pH neutro¹³. Una publicación reciente muestra datos en un modelo murino que también pone de manifiesto la diferente capacidad de adsorción de estas tres sales de aluminio, lo que podría influir en la diferente inmunogenicidad inducida por cada una de ellas¹⁴.

Las principales ventajas de las sales de aluminio son su seguridad demostrada, tras miles de millones de dosis administradas, y la inducción de mayores niveles de Acs y más persistentes en el tiempo, en comparación con la inmunización con vacunas solubles no adyuvadas, especialmente con los toxoides solubles¹³.

Las sales de aluminio presentan las siguientes limitaciones^{1,3,12}:

Tabla 2. Principales características que debe reunir un adyuvante

Buen perfil de seguridad
Su combinación con el antígeno debe conseguir una respuesta protectora más potente que la inducida por el antígeno solo
La eficacia debe ser conseguida utilizando un número reducido de dosis de vacunas y con una menor concentración de antígeno
Elevada estabilidad
Biodegradable y de fácil eliminación del organismo una vez finalizado su efecto adyuvante
Mínimas variaciones entre lotes que asegure una respuesta consistente
Producción a bajo coste

1) La tendencia para inducir una RI mediada por inmunoglobulina (Ig) E, lo que se correlaciona con las reacciones locales tras su inyección.

2) La incapacidad de reforzar la inmunidad humoral en ciertas vacunas en seres humanos.

3) La incapacidad para inducir una RI celular, lo que es debido a que las sales de aluminio aumentan principalmente la RI tipo Th2, pero no tienen casi efecto sobre la respuesta Th1.

Nueva generación de adyuvantes: AS04

En la figura 1 se muestran de forma esquemática y resumida los diferentes pasos desde el reconocimiento del patógeno por la CPA hasta que se desencadena la RI adaptativa, que ayudará a entender el mecanismo de acción innovador de este adyuvante.

Por todo lo que se ha comentado con anterioridad en este artículo, podemos pensar que el desarrollo y autorización de nuevos adyuvantes es, en términos generales, muy interesante para la formulación de múltiples vacunas, y en particular para el diseño de vacunas frente al VPH.

Si tenemos en cuenta conceptos ya comentados en este suplemento sobre inmunología e infección por el VPH, a la hora de prevenir dicha infección hay que tener en cuenta los mecanismos inmunes que se ponen en marcha de forma natural, así como lo esquivo que resulta este virus para el SI. El VPH ha adoptado diferentes mecanismos para evitar su detección por el SI del huésped. Esto es posible gracias al hecho de ser una infección exclusivamente intraepitelial, que no se acompaña de viremia, a que este virus induce una mínima muerte celular con escasa inflamación y a que es capaz de inhibir la secreción de citocinas antivíricas como el interferón (IFN)^{15,16}. Todo ello ha supuesto un reto a la hora de diseñar nuevas vacunas para proteger frente a esta infección.

Un paso en el desarrollo de nuevos adyuvantes lo constituye la posibilidad de combinar dos adyuvantes con mecanismo de acción diferentes, con la idea de potenciar sus efectos para reforzar y/o modular la respuesta inmune frente a un determinado Ag¹⁷. Es lo que se conoce como formulación adyuvante¹⁰.

Dentro de estas formulaciones de adyuvantes se encuentra el AS04, la única autorizada hasta el momento en dos vacunas para uso en seres humanos, ambas de GlaxoSmithKline. Una de ellas es FENDrix®, la vacuna frente al virus de la hepatitis B para pacientes en pre-hemodiálisis o en hemodiálisis^{11,18}, en el mercado desde hace varios años. Y la otra es la vacuna contra el VPH 16

y 18^{19,20}, que ha obtenido recientemente, como ya se ha comentado, la autorización para su comercialización por la Comisión Europea.

El AS04 consiste en la combinación del hidróxido de aluminio, uno de los adyuvantes clásicos ya comentados, con el MPL un adyuvante innovador. El MPL es un derivado detoxificado y purificado del lipopolisacárido de la pared bacteriana de *Salmonella minnesota*²¹. Su mecanismo de acción es novedoso para un adyuvante en vacunas para uso en seres humanos, ya que su efecto inmunomodulador lo desarrolla tras su unión a los receptores tipo Toll 4 (TLR-4)²¹. Esta unión entre el MPL y los TLR tipo 4 proporciona a la CPA una información adicional, incrementando su eficacia en la presentación del Ag a los linfocitos T^{22,23}.

Los receptores tipo Toll son un componente esencial de la RI innata y adaptativa, pues se encargan del reconocimiento de los diferentes patógenos y desencadenan respuestas dirigidas a eliminarlos y a desarrollar memoria inmunológica²⁴. Forman parte de los receptores para el reconocimiento de patrones (*pathogen recognition receptors* [PRR]), presentes tanto en células involucradas en la RI como en células no inmunes²⁵. Sus ligandos son los patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns* [PAMP]), moléculas muy conservadas estructuralmente y que son vitales para la supervivencia del patógeno. Constituyen un elemento clave en la conexión entre la RI innata y adaptativa, pues promueven la presentación antigénica y la inducción de un patrón específico de secreción de citocinas, dependiendo de que se trate de un Ag intracelular (patrón Th1) o extracelular (patrón Th2)^{24,26}.

La captura del Ag y la unión del MPL activan la CPA y hace que migre hacia el ganglio linfático, donde se inician los pasos claves de la activación de los linfocitos, la producción de Acs y la generación de la memoria inmunológica²⁷. De esta manera el adyuvante AS04 incrementa la eficacia de todas las etapas posteriores de la RI^{21,28}.

Este innovador mecanismo de acción se traduce, clínicamente, en la inducción de una respuesta de anticuerpos más potente y mantenida en el tiempo que la inducida por las sales de aluminio, y en la generación de un mayor número de linfocitos B de memoria, comparado con la misma vacuna formulada con hidróxido de aluminio¹⁹.

Una diferencia importante respecto a las sales de aluminio es que el MPL, además de inducir una respuesta Th2 necesaria para la producción de Acs, también induce una potente respuesta Th1^{22,28} activando a su vez la inmuni-

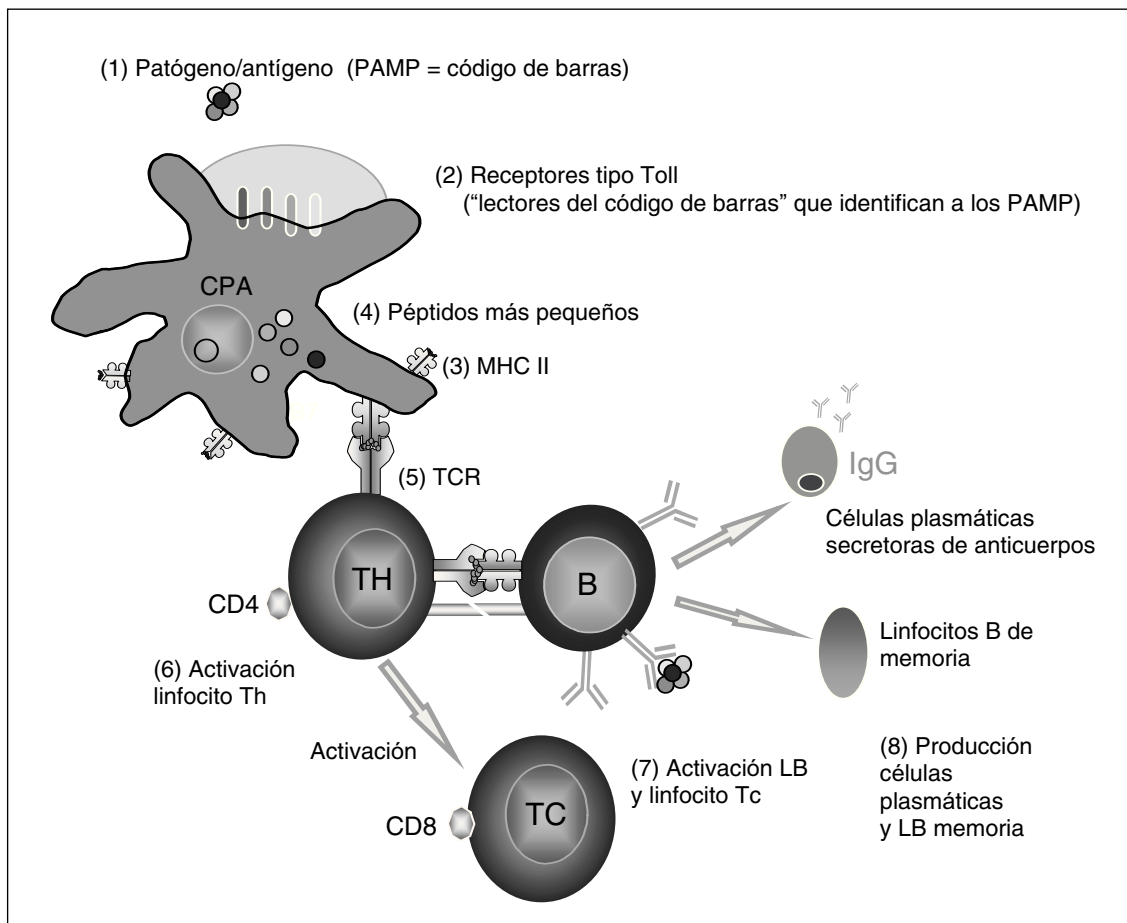


Figura 1. Activación del SI innato y adaptativo. (1) Las células presentadoras de antígeno (CPA) tienen capacidad para detectar y reconocer a los diferentes patógenos y antígenos a través de sus PRR (receptor de reconocimiento de patrones). Podría decirse que los PRR se comportan como "lectores de los códigos de barra" del patógeno, identificando los PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos).

(2) Los receptores tipo Toll son proteínas que actúan como PRR en los mamíferos, reconociendo los distintos componentes de los microorganismos.

(3) Las CPA expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) en su superficie y son capaces de presentar péptidos a los linfocitos Th (cooperadores). Las CPA más importantes son los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B.

(4) La respuesta inmunitaria a los antígenos T dependientes (proteínas) se inicia con la captación, procesamiento y presentación del antígeno por una CPA. Los antígenos capturados pasan al interior de las vesículas del citoplasma y son degradados en péptidos pequeños. Estos péptidos más pequeños, una vez unidos de forma no covalente a las moléculas MHC II, son reconocidos en la superficie de las CPA por los linfocitos Th.

(5) La respuesta inmune adaptativa comienza con el reconocimiento del antígeno por los receptores específicos de membrana de los linfocitos T (TCR: receptor de la célula T).

(6) El LTh se activa una vez que se produce el reconocimiento a través de su TCR del antígeno procesado y asociado a las moléculas MHC II en la superficie de la CPA.

(7) Una vez activados, los LTh son fundamentales, ya que inducen a su vez la activación de los linfocitos T citotóxicos (LTC) y de los linfocitos B, orquestando toda la respuesta inmune adaptativa.

(8) Los linfocitos B se diferencian de células plasmáticas productoras de anticuerpos y de células de memoria que constituyen la base de la memoria inmunológica.

dad celular necesaria para la protección frente a numerosos virus y bacterias intracelulares²¹.

En la RI desencadenada tras la infección por el VPH se puede detectar la activación tanto de una respuesta Th2 como Th1¹⁵. Por ello, la presentación del Ag y su reconocimiento por la CPA tiene que producirse en las condiciones más idóneas. Ya hemos comentado la importancia de la CPA como nexo de unión entre el SI innato y adaptativo, mediado entre otros receptores por los TLR, desempeñando un papel importante en la determinación, no solo de la

magnitud, si no también de la calidad de la respuesta adaptativa²⁴.

Si tenemos en cuenta los mecanismos del VPH para evadir el SI, y lo comparamos con la inmunomodulación inducida por el MPL tras su unión a TLR-4, existen ciertas ventajas respecto a la respuesta inducida tras una infección natural. Estas diferencias se resumen en la tabla 3.

En resumen, el VPH es capaz de evadir la RI innata, lo que retrasa la activación de la RI adaptativa¹⁵, encontrando que la RI natural frente al VPH tras una infección es más

Tabla 3. Características de la respuesta inmune tras la infección natural por el virus del papiloma humano comparada con la inmunomodulación inducida por AS04

Respuesta inmune tras infección natural ¹⁵	Inmunomodulación inducida por AS04
Inducción de títulos bajos de Acs	Inducción de elevados títulos de Acs ¹⁹
Baja activación de las células CPA en el epitelio cervical por la cápside vírica	Potenciación de la activación de las CPA ^{22,23}
Débil estimulación del sistema inmune adaptativo	Potenciación de la respuesta inmune adaptativa ^{26,28}
Escasa inducción de inflamación	Inducción de la producción de citocinas pro-inflamatorias ¹⁹
Inducción de escasa memoria inmunológica	Potente inducción de memoria inmunológica ¹⁹

Acs: anticuerpos; CPA: célula presentadora de antígeno.

débil cuando se compara con la inducida por la mayoría de otros virus²⁹. Para vencer esta dificultad, lo ideal sería disponer de una vacuna que, además de inducir unos niveles séricos de Acs elevados, fuera capaz de activar de forma eficaz el SI innato, consiguiendo una potenciación de la RI adaptativa. En este aspecto, y por todo lo que se ha comentado, el AS04 consigue este objetivo de una forma más eficaz que los adyuvantes clásicos¹⁹.

CONCLUSIONES

En la última década hemos asistido a un importante aumento en la búsqueda y desarrollo de nuevos adyuvantes vacunales, lo que ha permitido apreciar el valor que pueden proporcionar en el diseño de nuevas vacunas.

El gran avance en este campo ha ido parejo al mayor conocimiento que cada día se tiene sobre los mecanismos que regulan la RI. Así, el descubrimiento de los TLR como receptores clave para la activación del SI innato, y la posterior puesta en marcha de una RI adaptativa, ha hecho que se conviertan en dianas interesantes para el desarrollo de adyuvantes con un mecanismo de acción innovador respecto a los adyuvantes clásicos.

Parece que la combinación de varios adyuvantes con mecanismos de acción diferentes podría ser la estrategia más útil en el diseño de futuras vacunas, tratando de conseguir adyuvantes que induzcan una respuesta celular, además de potenciar la producción de anticuerpos. Esta RI celular será fundamental para el éxito de vacunas terapéuticas, pero también para vacunas frente a infecciones por virus y bacterias intracelulares. Las ventajas de estas formulaciones de adyuvantes ya han podido ser comprobadas en vacunas utilizadas para la inmunización en seres humanos. En el caso concreto de la infección por el VPH, y debido a la capacidad de este virus para evadir el SI, es fundamental utilizar un adyuvante capaz de activar el SI innato de una manera más efectiva y rápida a la conseguida en la infección natural, para iniciar una RI adaptativa más potente y mantenida en el tiempo.

Sin embargo, todavía queda mucho camino por recorrer, y en los próximos años habrá que seguir explorando nuevos adyuvantes que permitan optimizar al máximo la eficacia de las vacunas, para conseguir los mejores resultados tanto en situaciones tradicionales, como en patologías más complejas y en poblaciones especiales, lo que supondrá un desafío para la moderna vacunología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kenney RT, Edelman R. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:167-88.
2. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trend. *Immunol Cell Biol*. 2004;82:488-96.
3. Lindblad EB. Aluminium adjuvants- in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004;22:3658-68.
4. Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*. 2005;11 Suppl 4:S63-8.
5. 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.
6. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J Path Bacteriol*. 1926;29:38-45.
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. World Health Organ*. 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. Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccines adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25:3752-62.
11. Thoelen S, De Clercq N, Tornieporth N. A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system. *Vaccine*. 2001;19:2400-3.
12. Hogen Esch H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002;20 Suppl 3:S34-9.
13. Gupta RK, Siber GR. Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds. En: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine Design: the subunit and adjuvant approach*. New York: Plenum Press; 1995. p. 229-48.
14. Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Mach H, et al. Effect of alternative aluminium adjuvants on the adsorption and immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in mice. *Hum Vaccin*. 2007;3: 139-46.
15. Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 1:S16-22.
16. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7:79-89.
17. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev*. 2007;5:505-17.
18. Tong NK, Beran J, Kee SA, Miguel JL, Sánchez C, Bayas JM, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2005; 68:2298-303.
19. Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24:5937-49.
20. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schiind A, et al. Sustained efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet*. 2006;367:1247-55.

21. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccin.* 2003;2:219-29.
22. De Becker G, Moulin V, Pajak B, Bruck C, Francotte M, Thiriart C, et al. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. *Int Immunol.* 2000;12:807-15.
23. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvants. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1589:1-13.
24. Jiang Z, Koganty RR. Synthetic vaccines: the role of adjuvants in immune targeting. *Curr Med Chem.* 1993;10:1423-39.
25. Janssen S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16:637-46.
26. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;8:675-80.
27. Janeway CH, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* 6th ed. New York: Garland Science Publishing; 2005. p. 319-458.
28. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4:1129-38.
29. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Immunol.* 2004;4:46-54.