



Los adyuvantes en la inducción del tipo de respuesta inmune

Oliver Pérez ¹ .
Miriam Laestre
José Lapinet
Gustavo Bracho
Judith del Campo
Tamara Rodríguez
Gustavo Sierra

¹Dr. Cs. Investigador Titular Jefe del Departamento de Inmunología Básica y Clínica Instituto Finlay. La Habana Cuba. oliverp@finlay.edu.cu

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El presente artículo no pretende agotar el extenso tema de los adyuvantes, ya que existen excelentes revisiones recientes, a las cuales se remiten a quienes quieran profundizar en el mismo (1,2,3,4,5). Más bien pretende dar una panorámica sintetizada, profundizar en algunos aspectos de la inducción de la respuesta inmune aplicado a los adyuvantes, realizar algunos comentarios sobre los mecanismos de acción y resumir, a nuestro entender, las principales estrategias para el desarrollo de esta temática.

INTRODUCCIÓN

Los adyuvantes son componentes de las vacunas, antiguos e inseparables (Cuadro 1) y han sido clasificados de diversas formas, aunque creemos que una clasificación acertada y simple es la de Cox y Coulter (1). Sin embargo, para acercarnos más a nuestros fines los agruparemos en: Nanoparticulados, Microparticulados y Formulaciones, pues aun cuando estos últimos pueden aplicarse solos, la tendencia es a su empleo en Formulaciones complejas (Cuadro 2).

Gastón Ramón (el padre de los adyuvantes, por sistematizar los trabajos iniciales de Le Moignac and Pinay (referidos por que aumentan la respuesta de anticuerpos al unir *Salmonella typhimurium* en aceite mineral) en 1925 demuestra el incremento de la respuesta humoral antitoxina diftérica y tetánica, al unir las vacunas a compuestos no relacionados (agar, tapioca, licitina, aceite de almidón, saponina, costra del pan y derivados bacterianos) (37,38). Por otra parte, la inoculación de bacilos tuberculosos induce Hipersensibilidad retardada (HR) y poca respuesta de anticuerpos y la aplicación de la proteína purificada, estimulan altos títulos de anticuerpos y no DTH. Estos hallazgos concluyen con los de Dienes en 1936, quien encuentra que la aplicación de una proteína de un foco tuberculoso induce HR contra la proteína (referido por 6). En 1942 Freund, teniendo en cuenta estos resultados, crea el adyuvante completo e incompleto, con los cuales produce anticuerpos/HR y anticuerpos/no HR, respectivamente (39). Anteriormente, en 1926 Glenny y cols. introduce la Alúmina de potasio para incrementar la respuesta anti-toxina diftérica (40), cual desencadenó el estudio de otras alúminas y que hayan sido las más expandidas y las únicas autorizadas en humanos por la tiempo.

La era actual de los adyuvantes está matizada por la búsqueda de los principios activos, el empleo de sustancias biodegradables sobre todo la utilización de Formulaciones complejas.

Cuadro 1. Histor

Clasificación	Referencias
• Particulados y no particulados	1
• Por su origen (no bacterianos, bacterianos, mediadores del huésped, anticuerpos anti-idiotípicos, vectores vivos y conjugados)	41
• Hidrófobos y productores de citocinas, Vehículos, Facilitadores independientes de adyuvantes y Formulaciones	7
• Sales de aluminio, agentes surfactivos, polianiones, derivados bacterianos, citocinas y vehículos y materiales de liberación lenta	6
• Nanoparticulados, Microparticulados y Formulaciones	Presente

Cuadro 2. Clasificación

El presente artículo no pretende agotar el extenso tema de los adyuvantes, ya que existen excelentes revisiones recientes, a las cuales se remiten a quienes quieran profundizar en el mismo (1, 2, 3, 4, 5). Más bien pretende dar una panorámica sintetizada, profundizar en algunos aspectos de la inducción de la respuesta inmune aplicado a los adyuvantes, realizar algunos comentarios sobre los mecanismos de acción y resumir, a nuestro entender, las principales estrategias para el desarrollo de esta temática.

PANORÁMICA GENERAL

Adyuvantes

Para simplificar la terminología consideraremos adyuvantes (del latín *adjuvare* = ayudar) a toda sustancia, proceso o combinación de sustancias que aumentan, no específicamente la respuesta específica a un inmunógeno cuando son administrados conjuntamente y en el mismo lugar. Esta definición precisa que la influencia sobre la respuesta deseada (específica) se realiza de forma inespecífica. Por otro lado, como los adyuvantes, objetos de nuestro interés, son los relacionados con las vacunas, se enfatiza que sean aplicados, no sólo al mismo tiempo, sino también en el mismo lugar. Esto conllevaría al empleo de menores dosis, a un efecto local y por ello a la disminución de las posibles reacciones adversas, las cuales en los adyuvantes, aunque sean raras, son inaceptables. Esta definición engloba a: los vehículos y las Formulaciones complejas (6), el facilitamiento independiente de los adyuvantes (7); el efecto adyuvante (8), los inmunoestimulantes y los portadores. Las propiedades de los adyuvantes y sus implicaciones aparecen resumidas en el Cuadro 3. Las virtudes y sus problemas se sintetizan en el Cuadro 4, y un resumen de las características fundamentales se refleja en el Cuadro 5.

Características, según Edelman (42)	Implicaciones
Seguridad esencial	Ausencia de: reacciones locales y sistémicas; autoinmunidad; hipersensibilidad; carcinogenicidad; teratogenicidad, etc.
Químicamente definido	Producción consistente
Eficaz con antígenos débiles (ej. conjugados)	Antígenos escasos y disminuir dosis
Efectivo en niños y lactantes	Protección contra enfermedades de la infancia
Respuesta intensa y duradera	Buena respuesta celular y anticuerpos de alta afinidad e isotipo deseado
Estables en adyuvanticidad y toxicidad	Larga vida útil
Biodegradables	Ética, liberación lenta, disminución de dosis
No inmunogénicos por sí mismos	Aplicaciones repetidas
Aplicable por diferentes vías	Inducción de respuesta en mucosa
Cuadro 3. Propiedades de los Adyuvantes	

Ventajas	Desventajas
Necesidad de menores dosis	Toxicidad, aún muy rara, no es aceptable (8). Excepto en grupos de alto riesgo (cáncer y SIDA) y vacunas terapéuticas
Aumento de inmunogenicidad	Ausencia de metodología publicada, aunque debe existir
Dirección de la respuesta inmune	Adyuvanticidad limitada frente a determinados antígenos(43,44,45) y no patrones antigénicos o algunos sin relevancia biológica
Inducir respuesta: más temprana, más potente y más duradera	Subóptima dosis de alúmina: diferentes compuestos, variable adsorción (características físico-químicas, tipo de alúmina, pH, iones fosfato) (46) e inmunogenicidad depende de: eficiente adsorción (47) y cantidad de alúmina (48)
	Modelos animales ausentes para muchas enfermedades, diferencias biológicas entre animales y humanos, estudios en varias cepas murinas (8), en Cúriel (49) o Conejo en Formulaciones (50)
	Problemas con Ensayos por diferentes unidades, no empleo de adecuados controles, no abordaje celular, no correlación con pruebas funcionales y reto (8)
Cuadro 4. Virtudes y problemas de los adyuvantes	

Nanopartículas (10-1000 nm)	nm	Antígenos	Th1	Th2	Tc
Alúmina	100-1000	Interacción electrostáticas		F1	
ISCOM	40	Incorporados	F	F	F
Liposomas	20-1000	Lipofílicos, anfipáticos e hidrofílicos			M2
Emulsiones de aceite en agua	~200	Lipofílicos	D3	D	F4
Emulsiones de agua en aceite	-	Hidrofílicos	D	D	-

Microparticulados (1-100 μ m)	nm	Th1	Th2
Liposomas	1-3		
Sales de Calcio			
γ -inulina	1-2		
Algamulin		M	M
Virosomas			
stearyl tyrosina			
Polímeros de bloques no iónicos	2,5-12,5		

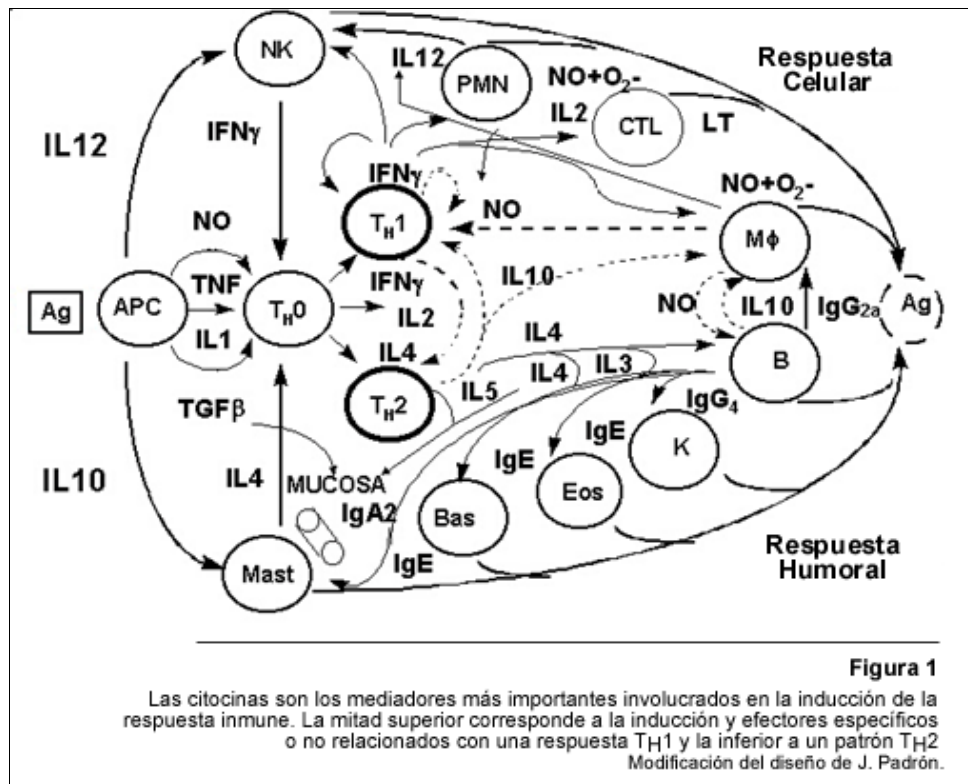
Formulación	Antígenos	Th1	Th2	Mucosa
MDP en emulsiones de A5/Aceite, Liposomas	hidrofílicos		F	
MDP en emulsiones de Aceite/A, Liposomas	lipofílicos	F		
Saponinas en Liposomas o MPL		F	F	
Lip A (MPL) en emulsiones de Aceite/A, Liposomas		F		
Citocinas en Liposomas				
IL-12		F		
IFN- γ		F		
IL-4			F	
GM-CSF				
IL-1				
Toxinas bacterianas				P ⁶
Vitamina E				P

Cuadro 5. Características fundamentales de algunos adyuvantes

¹F, Fuerte. ²M, Moderada. ³D, Débil. ⁴Sólo frente a antígenos externos. ⁵A, agua y ⁶P, Presente

La Tradición vs. la Actualidad

Los adyuvantes deben ser analizados en el ámbito de la compleja dinámica de la respuesta inmune y particularmente en su rama inductora y en los efectores específicos y no específicos que se estimulan (Figura 1). Tradicionalmente, el efecto de los adyuvantes era evaluado a través de la producción de anticuerpos, inducción de Hipersensibilidad retardada (HR), inducción de células T citotóxicas y por reto con microorganismos vivos cuando existía modelo animal. Esto se correspondía con la división didáctica y práctica de la inmunología en humoral y celular. Se sabía, además, que una fuerte respuesta celular conllevaba a una menor respuesta humoral y viceversa.



Hoy, la evaluación de los adyuvantes se ha revolucionado con el paradigma $Th1/Th2$, el cual ha sido demostrado en varias especies (9,10), no sólo en las subpoblaciones de células $TCD4^+$, sino también a nivel de las $TCD8^+$ (11). Este enfoque conlleva a que los efectores de la respuesta $Th1$ (celular), no es sólo mediada por linfocitos T citotóxicos, sino también, se estimula tanto la producción de isotipos particulares de anticuerpos como a células no linfoides para amplificar la respuesta celular. Este desarrollo de la Inmunología y en particular de la Vaccinología ha hecho que este efecto de la evaluación de los adyuvantes se desplace actualmente hacia el nivel molecular, principalmente, a través de la evaluación de la producción de citocinas, por ser éstas las que determinan en el microambiente inductivo. Por otro lado, también se ha evaluado la simulación del efecto adyuvante por la administración de las citocinas y por el pleiotropismo de las mismas que han producido los fragmentos que intervienen en la inducción de la respuesta inmune (7).

Por otra parte, para comprender mejor a los adyuvantes es necesario que se incorporen otros criterios cuantitativos, cualitativos y sobre todo funcionales. Esto está relacionado con la posibilidad de que se induzca altos títulos de anticuerpos, y ellos no sean efectivos, por tener una baja afinidad, por el antígeno natural. Para lograr una prueba funcional *in vitro* (neutralización, bactericida, opsonofagocitosis, etc.), además de los múltiples problemas técnicos a resolver, es imprescindible que los anticuerpos sean de alta afinidad o del isotipo efectivo.

Además de lo anterior, es necesario tener muy en cuenta la distribución de las clases y subclases de inmunoglobulinas que son inducidas. Para citar un ejemplo, la protección por anticuerpos específicos de los recién nacidos se logra sólo por el traspaso placentario de algunas subclases de IgG y por la IgA de la leche materna. A otras propiedades biológicas de las inmunoglobulinas muchas veces no se les presta la atención necesaria. Entre ellas se pueden destacar: la capacidad de fijar complemento y la posibilidad de unirse a receptores de alta afinidad de determinadas células. Si estos elementos los unimos a que $Th1$ induce preferencialmente IgG2a e IgG1 en ratones y humanos, respectivamente, se confunde más el problema de humoral y celular. Por ello, una

contradicción a primera vista es que la respuesta humoral (Th2) induce anticuerpos, pero estos son fundamentalmente IgG1 e IgE en ratones (9) y principalmente IgE en los humanos (10).

Por último, es importante destacar que estas subclases se encuentran asociadas a pruebas funcionales por lo cual es posible explorarlas. Los anticuerpos producidos por la estimulación Th1 son fijadores de complemento y se unen a los receptores FcγRI de alta afinidad (12). Junto a ello está el hecho de que estos dos procesos sinergizan la fagocitosis por existir también constitutivamente en los fagocitos, además de los receptores Fcγ los receptores de complemento (13).

En resumen, en la actualidad la afinidad, el isotipo y las propiedades biológicas de los anticuerpos son tres elementos importantes a tener en cuenta en la respuesta inducida. Además, es necesario la evaluación celular y no sólo incluir las técnicas clásicas de HR, Linfoproliferación y Linfocitos T citotóxicos, sino también la determinación de pruebas funcionales celulares (opsonofagocitosis, bactericida, etc.) y especialmente los patrones de citocinas.

CARACTERÍSTICAS DE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La inducción de la respuesta inmune deseada en un organismo "virgen" (no debe confundirse con la primera dosis de la vacuna, la cual puede ser aplicada en sujetos que ya tengan respuesta a la vacuna por haberse puesto en contacto previamente con el agente natural o por reacción cruzada) necesita garantizar tres aspectos esenciales. En primer lugar, que se produzca la captura, procesamiento y presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos (CPA) asociados a moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC, en el humano). En segundo lugar, que ocurra la interacción T-B para la producción final de anticuerpos funcionales. En tercer lugar, es necesario lograr células T y B de memoria que mantengan la respuesta frente a futuras agresiones o re-exposiciones antigénicas.

La presentación antigénica a las células T se garantiza a través de la existencia del MHC, los que constituyen la expresión molecular de los genes de inmunorespuesta. El MHC es una región de genes de gran polimorfismo, cuyos productos están expresados en la superficie de una significativa variedad de células. Estos sitios fueron descubiertos en 1940 en situaciones artificiales de trasplante de tejidos de un individuo a otro (14). Las moléculas MHC proveen a las células de un sistema que les permite mostrar péptidos antigénicos a las células T, con el muestreo, por parte de estas últimas, de todo el organismo y el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas extrañas. Clásicamente, existen dos tipos diferentes de productos de los genes MHC, relacionados con la respuesta inmune, llamados moléculas de clase I y de clase II, siendo en general las células T, capaces de reconocer antígenos foráneos unidos a moléculas de clase I ó II (15), característica que da la restricción del reconocimiento.

Presentación por MHC de clase I

La mayoría de los péptidos que son presentados a los TCD8⁺ por moléculas de clase I son originados fundamentalmente en el citosol. El transporte hacia el retículo endoplásmico (RE), el sitio de asociación con moléculas de clase I, involucra dos productos génicos de la región MHC, designados TAP-1 y TAP-2 (16,17,18,19). Los transportadores TAP son requeridos para la eficiente presentación de muchos, aunque no de todos los antígenos (20,21). Los péptidos son generados probablemente por la proteólisis de las proteínas intracelulares o glicoproteínas (22,23,24). Los

mecanismos involucrados en la dirección de antígenos proteicos para la proteólisis y la presentación de péptidos por moléculas de clase I son en gran medida desconocidos, involucrándose al proteasoma en la generación peptídica, específicamente los proteasomas que contienen productos de los genes LMP-2 y LMP-7 (25,26). No obstante, existe la posibilidad de presentación de péptidos pequeños que puedan acoplarse directamente a las moléculas MHC ya expresadas en la superficie.

Presentación por MHC de clase II

Las moléculas MHC de clase II presentan péptidos, provenientes de antígenos adquiridos por fagocitosis o pinocitosis, que son degradados por la vía endosomal/lisosomal, a las células T CD4⁺. Estas moléculas son ensambladas en el RE, asociándose a la cadena invariable (Ii) (27). Esta asociación es requerida para la liberación eficiente desde el RE. Tras su llegada a los endosomas, la Ii es degradada, probablemente, exponiendo la gruta de unión de las moléculas MHC de clase II permitiendo la unión antigénica en la misma (28). Por otro lado, la disociación de los fragmentos de la Ii de las moléculas de MHC de clase II es esencial para su liberación de la vía endocítica y su transporte a la superficie celular (29). Es de destacar que no existen mecanismos de presentación absolutos por vía del MHC de clase I ó II. Por el contrario, ya sea por mecanismos de escape de antígenos desde la vía endocítica hacia el citosol, por el paso hacia estas estructuras de sustancias de naturaleza lipídica administradas exógenamente o por la presentación de antígenos endógenos por vía del MHC de clase II, ambas vías de presentación pueden presentar antígenos que normalmente no se unen a ellos.

Presentación por CD1

La familia de moléculas del CD1, las cuales no son codificadas por los genes del MHC, han emergido recientemente como un sistema de presentación celular que es completamente distinto de los sistemas de presentación conocidos, tanto del MHC de clase I, de clase II o de moléculas relacionadas. Existen en el humano 5 genes no polimórficos del CD1, a saber: CD1A, -B, -C, -D y -E. El CD1B ha sido mostrado como un elemento de restricción en la presentación a las células T de varios antígenos lipídicos (ácido micólico) y algunos glicolípidos (lipoarabinomannan) provenientes de micobacterias. A diferencia de la presentación antigénica por vía de las moléculas de clase I, la presentación de estos antígenos es independiente de los sistemas proteicos de transportación TAP-1 y TAP-2, siendo además, sensibles a la cloroquina, sugiriendo el requerimiento de acidificación endosomal. Estos hallazgos revelan la existencia de un sistema que es capaz de presentar antígenos no proteicos a las células T. Las moléculas del CD1 parecen ser un tercer linaje de moléculas que también se encuentran en las células presentadoras de antígenos.

ALGUNOS COMENTARIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ADYUVANTES

Es de destacar que no se conocen, con profundidad, todos los mecanismos de acción de los adyuvantes (Cuadro 6), lo que ha hecho más lento y limitado su desarrollo. Por otra parte, la terminología existente resulta a veces ambigua o poco convincente y no queda absolutamente claro dónde y cómo actúa el adyuvante, sin suplantar al antígeno y su curso en la inducción de la respuesta inmune, máxime cuando muchas veces se emplean Formulaciones complejas. La mayoría de los autores coinciden con los efectos de: depósito, inmunomodulación y direccionamiento a células inmunocompetentes (1,8,40). Cox y Coulter añaden la presentación e

inducción de Tc (1) y Bomfort (40) incluye el atrapamiento de los linfocitos, la activación de estos y el incremento de las funciones inmunes celulares.

Mecanismo	Referencia
Inmunomodulación	1, 8, 51
Direccionamiento a células inmunocompetentes	1, 8, 51
Depósito	1, 8, 51
Presentación	1
Inducción de Tc	1
Atrapamiento de Linfocitos	51
Activación del Complemento	51
Incremento de funciones inmunes celulares	51
Cuadro 6. Mecanismos de acción	

Desde nuestro punto de vista, la presentación y la inducción de Tc son mecanismos normales de la inducción inmune, por lo que no los consideraremos apartes. No obstante, existen otras posibilidades de mecanismos como son: la inducción de quimiotaxis celular específica (en la cual pudieran estar implicados, entre otros, las quemoquinas; la acción mitogénica sobre diferentes células, etc.); eliminar las células indeseables de los sitios inflamatorios; etc. Además, consideramos que el mecanismo fundamental involucrado sea la inmunomodulación, es decir la capacidad de dirigir la respuesta no sólo hacia Th1/Th2 sino también hacia la formación de Tc; por lo tanto, consideramos la inducción de este último mecanismo como un fenómeno también de la inmunomodulación.

Quimiocinas

Las quemoquinas constituyen una familia compleja de proteínas recientemente identificadas como citoquinas con actividad quimiotáctica y activadora de diferentes tipos celulares del sistema inmune, que se diferencian de los quimioatrayentes clásicos, en su especificidad, por subtipos particulares de leucocitos (30).

1. Estructuralmente estas moléculas son de bajo peso molecular (5-15 kDa) y contienen 4 residuos de cisteínas conservadas que forman 2 puentes disulfuro. Con relación a la posición de las dos primeras cisteínas, son clasificadas en tres grupos: las a quemoquinas (C-X-C), las b quemoquinas (C-C) y el grupo de las g quemoquinas (C)(31) Los tres grupos se diferencian no solo en su estructura, sino también en los estímulos y los tipos celulares que las producen, los receptores membrenarios que las reconocen, en el sistema de transducción de señales y en la especificidad por tipos celulares determinados (32-33). De forma general, las a quemoquinas son quimioatrayentes y activadoras de neutrófilos, linfocitos T y basófilos (34). Sin embargo, el grupo b es específico para monocitos, células T de memoria, eosinófilos, células NK y células dendríticas (35). Las g quemoquinas se encuentran menos estudiadas; pero se conoce su actividad quimioatrayente de linfocitos.

La actividad biológica de las quemoquinas tiene implicaciones importantes en varios procesos normales y patológicos, entre los que se incluyen: hematopoyesis, angiogénesis, tumorigénesis, inflamación, autoinmunidad y enfermedades infecciosas (36). En el caso de la vaccinología y los adyuvantes pudieran tener un amplio espectro de aplicaciones; pues estas moléculas constituyen un arma muy potente para manipular la proporción de células en los sitios de inoculación y direccionar el contacto del antígeno con tipos celulares específicamente en orden de generar una

buena respuesta en la ruta mas favorable (Th1 o Th2) en dependencia del antígeno utilizado y a la respuesta protectora deseada.

ESTRATEGIA DE DESARROLLO

En la actualidad se está dedicando gran cantidad de financiamiento de la industria farmacéutica internacional a la actividad de los adyuvantes, aunque en muchas ocasiones no es perceptible por permanecer como "know how". La causa está relacionada con que "no es el antígeno, sino el adyuvante el que en fin de cuentas determina el tipo de respuesta inducida".

Un aspecto esencial para el desarrollo de esta temática es verla como una esfera independiente y no unida a la necesidad imperiosa de la Vaccinología, de usarlos unido a un inmunógeno. Esta tendencia contrarresta con el hecho de que en fin de cuentas también es necesario la evaluación preclínica del inmunógeno en cuestión. La tendencia actual es a buscar los principios activos de los adyuvantes, se basa en la necesidad de disminuir las reacciones adversas y es resumida en el Cuadro 7. Otra tendencia está relacionada con la combinación de los adyuvantes. En el Cuadro 8 se resumen algunas de las formulaciones complejas existentes.

Procedencia	Principio Activo	Derivados
Peptidoglicanos de <i>Micobacteria Tuberculoso</i>	MDP	Threonil MDP, Murabutide, N-acetylglucosaminil-M Murabutide, nor_MDP, MTP-PE
Copolímeros de bloques no iónicos	Polyoxy-propileno (POP) y polyoxiethylene (POE)	CRL 1005
<i>Quiallaia saponaria</i>	Saponinas	Quil A, Spikoside, QS21 (Stimulon), ISCOPEPTM
LPS de bacterias Gram Negativas	Lip A	MPL
Polímeros	Carbohidratos Manosa β 1-3 glucosa	Mannan Glucano, Acemannan, Lentinan
Derivatizaciones	Polisacáridos	Dextran sulfate, Dietyl-amynoethyl dextran
Toxinas bacterianas <i>V. cholerae</i> <i>E. coli</i>	CT, CTB LT, LTB	

Cuadro 7. Productos activos y sus deriv

Formulación	Combinación 1	Combinación 2	Combinación 3
FCA	Inmunestimulación de MTB (principalmente TDM y MDP)	Depósito de corta duración de emulsiones de agua/aceite	
Ciba-Geigy	Aceite metabolizable	nor-MDP	
ISCOM	Saponina	Fosfolípidos	Citocinas
SAF	Copolímeros L121	Threonyl MDP	Aceite
Ribi Detox™	MPL	CWS	
Chiron MF59	MTP-PE	Emulsión de aceite	
Liposomas MPL	Proteínas	MPL, MDP o QuilA	Citocinas
Titer Max™97	MPL	Qs21	
Proteoliposoma	Alúmina	LPS	Plisacárido
Cuadro 8. Combinación de Adyuvantes			

En el presente, el desarrollo de esta temática es esencial, por el impetuoso potencial vacunal existente y se encuentra encaminado fundamentalmente: al tamizaje al azar de los potenciales adyuvantes; hacia su búsqueda ingeniosa y en la purificación de los principios activos de conocidos adyuvantes para la realización de Formulaciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Cox JC, Coulter AR.** Adyuvans-a classification and review of their modes of action. Vaccine 15(3):248-256,1997
2. **Vogel FR and Powell MF.** A compendium of vaccine adyuvantes and excipients. In: Vaccine Design. The Subunit and Adjuvant Approach (Eds Powell MF and Neuman MJ). Plenum Press, New York, 1995, pp. 141-228.
3. **Stewart-Tull DES. (Ed.)** The Theory and Practical Application of Adyuvants. Jhon Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1994
4. **Cox JC, Coulter AR.** Advances in adjuvant technology and application. In: Animal Parasite Control Utilizing Biotchnology (De. Yong, W.K.). CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 49-112.
5. **Morein B, Lovgren-Bengtsson K and Cox J.** Modern Adytuvants. Functional aspects. In: Concepts in Vaccine Development (Ed. Koufmann SHE). Walter de Gruyter, Berlin. New York, 1996, pp. 243-263
5. **Morein B, Lovgren-Bengtsson K and Cox J.** Modern Adytuvants. Functional aspects. In: Concepts in Vaccine Development (Ed. Koufmann SHE). Walter de Gruyter, Berlin. New York, 1996, pp. 243-263
6. **Allison A C, and Byars EN.** Adyuvants for a new generation of vaccines. In: New Generation Vaccine (Eds Woodrow, GC and Levine MM). Marcel Dekker, Inc. New York, 1990, pp. 129-140.
7. **Classen E and Boersma WJA.** Characteristics and practical use of new generation adjuvants as an acceptable alternative to Frund's complete adjuvant. Res. Immunol. 143:475-82, 1992.
8. **Gupta RK and Siber GR.** Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. Vaccine 13:1263-76,1995
9. **Mossman TR, Coffman RL:** Two types of mouse helper T cell clones. Implications for immune

- regulation. *Immunol Today*. 8:223-224, 1987.
10. **Romagnani S.** Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immun. Today*, 1991, 12:256-257.
 11. **Fong TAT and Mossman TR.** Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the TH1 pattern of cytokines. *J Immunol* 144:1022-7,1990.
 12. **Van de Winkel JGJ and Capel PJA.** Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today* 14:215-221,1993.
 13. **Ross S, Rosenthal PJ, Berberich HM and Densen P.** Killing of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils: implications for normal and complement-deficient individuals. *J. Infect. Dis.* 155:1266-1275,1987.
 14. **Abbas A, Lichtman AH, and Pober JS.** The Major Histocompatibility Complex. In: Abbas A, Lichtman AH, and Pober JS eds. *Cellular and Molecular Immunology*. 1994: 394-408.
 15. **Bennink, J.R. et al.** 1990. Recombinant vaccinia viruses as vector for studying T lymphocytes specificity and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 163:153.
 16. **Deverson, E. et al.** 1990. MHC class II region encoding proteins related to the multi-drug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348:738.
 17. **Trowsdale, J. et al.** 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporter. *Nature* 348:741.
 18. **Spies, T. et al.** 1990. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 348:744.
 19. **Monaco, J.J. et al.** 1990. Transport protein genes in the murine MHC: possible implication for antigens processing. *Science* 250:1723.
 20. **Hammond, S.A. et al.** 1993. Transporter-independent processing of HIV-I envelope protein for recognition by CD8++ T cells. *Nature* 364:158.
 21. **Esquivel, F.J. et al.** 1992. RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175:163.
 22. **Townsend, A. et al.** 1988. Defective presentation to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in vaccinia-infected cells is overcome by enhanced degradation of antigens. *J. Exp. Med.* 168:1211.
 23. **Townsend, A. et al.** 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 7:601.
 24. **Yewdell, Y. Et al.** 1992. Cell biology of antigens processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 52:1.
 25. **Fehling, H.J. et al.** 1994. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science*. 265:1234.
 26. **Yewdell, J. et al.** 1994. MHC-encoded proteasome subunits LMP-2 and LMP-7 are not required for efficient antigen presentation. *J. Immunol.* 152:1163.
 27. **Glincher, L. et al.** 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Annual Review of Immunology*. 10:13-39.
 28. **Brown, J.H. et al.** 1993. Three-dimensional structure of the class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 364:33-39.
 29. **Parham, P.** 1990. Antigen processing. Transporters of delight. *Nature*. 348:674-675.
 30. **Taub D.D., Oppenheim J.J.,** Chemokines, Inflammation and the Immune system. *Ther Immunol.* 1994, 1:229.
 31. **Baggiolini M., Dewald B.,** Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, 1995, 55:97.
 32. **Ben-Baruch A., Michiel D. F., Oppenheim J. J.,** Signal and receptors involved in recruitment of inflammatory cells., *J. Biol Chem*, 1995, 270:11703.
 33. **Kelvin D. J., Michiel D. F., Johnston J. A., Lloyd A. R., Sprenger H., Oppenheim J. J., Wang J-M.,**

- Chemokines and serpentine: the molecular biology of chemokine receptors. *J Leuk Biol*, 1993, 54:604
34. **Proost P. et al.**, Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumour cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO. IP-10 and IL-8. *J Immunol*, 1993, 150:1000.
 35. **Roth S. J., Carr M. W., Springer T. A.**, C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon- γ inducible protein-10, stimulated transendothelial chemotaxis of T Lymphocytes. *Eur J. Immunol*, 1995, 25:3482.
 36. **Proost P., Wuyts A., Van Damme J.**, The role of chemokines in inflammation. *Int J. Clin Lab Res*, 1996, 26, 211-223.
 37. **Ramon G.** Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de sérum anti-diphthérique. *Bull. Soc. Centr. Med. Vet.* 101:227, 1925.
 38. **Ramon G.** Procédés pour accroître la production de antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur* 1926, 40,1.
 39. **Freund J.** *Adv. Tuberculosis Res.* 7,130-148, 1956.
 40. **Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V.** Antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 29:28,1926.
 41. **Warren HS and Chedid LA.** Future prospects for vaccine adjuvants. *CRC Critical Reviews in Immunology* 8:83-101,1988.
 42. **Edelman R.** Vaccine Adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* 2:370-83,1980
 43. **Cvjetanovic B and Umera K.** The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines with special reference to studies sponsored by the World Health Organization. *Bull. WHO* 32:290-36,1965.
 44. **Devenport FM, Hennessy AV and Askin FB.** Lack of adjuvant effect of ALPO₄ on purified influenza virus haemagglutinins in man. *J. Immunol.* 100:1139-1140,1968.
 45. **Claesson BA, Trollfors B, Lagergard T et al.** Clinical and immunologic responses to the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b alone or conjugated to tetanus toxoid in 18-to 23-month-old children. *J. Ped.* 112:695-702,1988.
 46. **Gupta RK, Rost BE, Relyveld E and Siber GR.** Adjuvants properties of aluminium and calcium components. In: *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (Eds Powell, MF and Neuman MJ). Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 229-248, 1995
 47. **World Health Organization.** Manual For the Production and Control of Vaccines-Tetanus Toxoid. 1997:BLG/UNDP/77.2 Rev.1
 48. **Bomford R.** Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. In: *Immunological Adjuvants and Vaccine* (Eds Gregoriadis G, Allison ANTICUERPO and Poste G). Plenum Press, New York, pp. 35-41, 1989
 49. **Stewart-Tull DES.** Recommendations for the assessment of adjuvants (immunopotentiators). In: *Immunological Adjuvants and Vaccines* (Eds Gregoriadis G, Allison ANTICUERPO and Poste G). Plenum Press, New York, pp. 213-226, 1989.
 50. **Goldenthal K, Cavagnaro CR, Alving CR and Vogel FR.** Safety evaluation of vaccine adjuvants. NCVDC meeting working group. *AIDS Res. Human Retrovirus* 9(suppl.1)S47-S51,1993
 51. **Bomford R.** Adjuvants for Anti-parasite Vaccines. *Parasitology Today* 5:41-46,1989.