

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccinationVERMOUT S.¹, DENIS M.², LOSSON B.¹, MIGNON B.¹

¹ Service de Parasitologie et de Pathologie des Maladies Parasitaires, Département des Maladies Infectieuses et Parasitaires
Faculté de Médecine Vétérinaire – Université de Liège – Boulevard de Colonster, 20 (B43), B-4000 Sart Tilman

² GlaxoSmithKline Biologicals (Département de Recherche et Développement)
Rue de l'Institut, 89 – 1330 Rixensart, Belgique

Vermout Sandy est mandataire d'une bourse du Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (F.R.I.A.)

Correspondance : Bernard Mignon, bmignon@ulg.ac.be

RESUME: Le développement de nouveaux vaccins, contenant des antigènes protecteurs de mieux en mieux caractérisés, se heurte au manque d'adjuvants permettant d'amplifier la réponse immune générée tout en la contrôlant d'un point de vue qualitatif. De nombreuses tumeurs et maladies infectieuses pourraient être combattues grâce à des préparations adjuvantes capables d'intensifier et de moduler adéquatement la réponse immune; en particulier, la possibilité d'induire spécifiquement une réponse de type Th1 semble être déterminante pour la prévention ou la guérison de ces affections. Par ailleurs, les nouveaux adjuvants doivent être autant que possible dépourvus d'effets secondaires, non seulement pour pouvoir envisager des applications commerciales, mais aussi dans le souci du bien-être des animaux d'expérience. Cette synthèse a pour but de présenter les différents adjuvants utilisés actuellement en vaccinologie, en les classifiant selon leur nature chimique et en exposant pour chaque catégorie les connaissances relatives à leur activité et leur toxicité.

INTRODUCTION

Le terme « adjuvant » dérive du latin *adjuvare* qui signifie aider, assister. Il désigne toute substance capable d'augmenter l'intensité de la réponse immune dirigée contre un antigène administré simultanément. Il existe une multitude d'adjuvants, de nature et d'origine extrêmement diverses, et dont il serait impossible de dresser une liste exhaustive.

On distingue parmi les adjuvants les agents immunostimulants et les « véhicules ». Les premiers activent directement les cellules de l'immunité en se liant à différents récepteurs. Les seconds contiennent l'antigène et déterminent la façon dont il sera présenté au système immunitaire. Cependant, les véhicules ont souvent eux-mêmes des propriétés immunostimulantes, simplement parce qu'ils constituent des corps étrangers.

Bien qu'ils soient également testés dans le cadre de certaines immuno-

thérapies, les adjuvants sont surtout utilisés en tant que constituants de vaccins. La plupart du temps, ils sont indispensables à l'installation d'une réponse immune protectrice. En effet, le pouvoir immunogène d'un vaccin non adjuvanté, surtout s'il est inactivé, est souvent trop faible car la vaccination ne peut imiter parfaitement une infection naturelle. Les vaccins sous-unitaires en cours de développement, qui se réduisent parfois à de simples peptides, sont particulièrement concernés par ce problème. Même s'ils contiennent les épitopes protecteurs adéquats, ils manquent d'un agent capable d'amplifier et d'orienter la réponse immune spécifique sans en être la cible; c'est à ce titre qu'interviennent les adjuvants.

Les adjuvants se retrouvent tant dans les vaccins humains que vétérinaires. L'alum par exemple, seul adjuvant actuellement enregistré pour la médecine humaine, est utilisé dans de nom-

breux vaccins vétérinaires. Au niveau expérimental, les deux types de vaccins bénéficient du développement de nouveaux adjuvants tels que les saponines ou les oligonucléotides CpG. Toutefois, même si les exigences en matière d'innocuité et d'efficacité sont semblables dans les deux cas, la mise au point de vaccins vétérinaires doit absolument tenir compte de contraintes telles que les coûts de production et les limites de résidus.

CLASSIFICATION DES ADJUVANTS

Les adjuvants peuvent être classés selon différents critères. Bien qu'il soit possible de les répartir en fonction de leur mode d'action et de leurs effets sur la réponse immune (Cox et Coulter, 1997; Schijns, 2001), cette classification s'avère arbitraire et compliquée; en effet, bon nombre

d'adjuvants possèdent plusieurs propriétés et les propriétés de chaque adjuvant sont loin d'être toutes connues. Il est donc plus simple et plus clair de classer les adjuvants sur base de leur espèce chimique et de leur origine (Audibert et Lise, 1993; Horzinek *et al.*, 1997).

Les constituants bactériens

À l'origine, ces adjuvants étaient simplement constitués de bactéries entières inactivées, par exemple différentes espèces de *Salmonella*. L'Adjuvant Complet de Freund (ACF), bien connu et encore utilisé en expérimentation malgré des effets secondaires considérables, associe une mycobactérie inactivée par la chaleur, *Mycobacterium tuberculosis*, à l'émulsion huileuse que constitue l'AIF (Adjuvant Incomplet de Freund, *cf. infra*). Des préparations de paroi bactérienne sont également disponibles; elles sont extraites notamment du Bacille de Calmette-Guérin (BCG), une souche atténuée de *Mycobacterium bovis* utilisée comme vaccin antituberculeux chez l'homme. Le muramyl dipeptide (*N*-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, MDP) est le plus petit composant de la paroi des mycobactéries comportant des propriétés adjuvantes. Le MDP ainsi que ses nombreux dérivés synthétiques, encore appelés peptides adjuvants, permettent de réduire les effets toxiques et allergiques liés à l'utilisation d'extraits bruts. Le tréhalose dimycolate (TDM) est un autre composant de paroi de mycobactéries efficace en tant qu'adjuvant et relativement peu toxique. L'endotoxine des bactéries gram négatives, encore appelée lipopolysaccharide (LPS), est active en tant qu'adjuvant mais possède en revanche des effets toxiques marqués. C'est pourquoi son usage est actuellement limité à l'étude de mécanismes immunitaires *in vitro*. Par contre, le monophosphoryl lipide A (MPL), obtenu par traitement du LPS à l'acide chlorhydrique, est un composant beaucoup moins toxique qui conserve son efficacité en tant qu'adjuvant.

Les adjuvants huileux («oil-based adjuvants»)

L'appellation «adjuvants huileux» regroupe les différents types d'émulsions. Une émulsion est un système

où deux phases normalement non miscibles sont dispersées l'une dans l'autre, cet état étant stabilisé par l'intervention d'agents tensioactifs (ou agents de surface). Les adjuvants huileux classiques sont des émulsions «eau dans huile», où des gouttes de solution aqueuse d'antigène hydrophile, d'un diamètre de l'ordre du nanomètre au millimètre, sont englobées dans une phase lipophile continue. L'exemple type parmi ces formulations est l'AIF, une émulsion d'huile de paraffine contenant comme émulsifiant l'Arlacel A (*mannide monooleate*).

L'intérêt croissant pour le bien-être des animaux de laboratoire a favorisé le développement d'adjuvants équivalents à l'ACF et l'AIF, mais ayant un niveau de toxicité acceptable (Jensen *et al.*, 1998; Cedarlane Laboratories Limited, 2003). *Mycobacterium tuberculosis* a par exemple été remplacé par des composants de paroi de mycobactéries. Des huiles végétales ont également été substituées à la paraffine; cependant, elles sont également potentiellement cancérigènes. Les adjuvants de type TiterMax® (Vaxcel, Norcross, Georgia, USA) sont des émulsions «huile dans eau», composés d'un copolymère synthétique (*cf. infra*) et d'une huile non toxique métabolisable, le squalène. Cette huile est également utilisée comme véhicule dans le *RIBI Adjuvant System* (RAS, Ribi Immunochem Research, Hamilton, Montana, USA), qui contient en outre du MPL et du TDM, ainsi que du Tween 80 comme émulsifiant. D'autres composants bactériens peuvent y être ajoutés. La SAF (*Syntex Adjuvant Formulation*) est une préparation performante très intéressante du point de vue de son innocuité. Elle contient la forme saturée du squalène, le squalane, ici encore dispersé par un copolymère synthétique (le Pluronic L121) pour former une émulsion huile dans eau. Le thréonyl-MDP, qui possède parmi les peptides adjuvants un des meilleurs rapports efficacité/toxicité, est le troisième constituant de l'adjuvant.

Les adjuvants minéraux

Cette catégorie compte comme principaux représentants l'hydroxyde d'aluminium, le phosphate d'aluminium (appelés alum), le phosphate de potassium et le phosphate de calcium.

Ces adjuvants se présentent sous forme d'un précipité insoluble de type gel, sur lequel sont adsorbées les protéines antigéniques en solution aqueuse. Ces protéines interagissent avec les ions du gel par des forces électrostatiques. Des préparations standardisées d'hydroxyde d'aluminium sont disponibles commercialement, telles l'Alhydrogel® (Superfos, Danemark).

Les toxines bactériennes

La toxine cholérique de *Vibrio cholerae* (CT) est un puissant adjuvant utilisé chez les animaux. Chez l'homme, naturellement beaucoup plus sensible à cette toxine, c'est la sous-unité B purifiée (CTB) qui est utilisée; en effet, elle n'est que le ligand du récepteur de la toxine, alors que la sous-unité A est responsable de l'action toxique sur les entérocytes. La toxine pertussique de *Bordetella pertussis* (PT) sous forme inactivée est elle aussi un adjuvant, ainsi que la lymphotoxine thermolabile de *Escherichia coli* (LT, «labile toxin»). Des formes mutées inoffensives de certaines de ces toxines (CT et LT) ont été produites.

Les oligodésoxynucléotides CpG

Ce type d'adjuvant est à rapprocher des constituants bactériens. Contrairement à l'ADN des vertébrés, les génomes procaryotes sont riches en dinucléotides CpG (Cytidine-Guanosine). Avec leurs séquences flanquantes spécifiques, ces dinucléotides forment des «motifs CpG» reconnus par le système immunitaire de façon non spécifique. Les motifs CpG groupés au sein d'oligodésoxynucléotides synthétiques sont de plus en plus utilisés comme adjuvants (Kandimalla *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2003). La capacité de reconnaissance des motifs CpG semble conservée à travers les espèces animales; toutefois, l'activité de chaque motif varie considérablement selon l'espèce envisagée (Mutwiri *et al.*, 2003).

Les saponines et les «ImmunoStimulating COMplexes»

Les saponines, substances d'origine essentiellement végétale, sont des agents tensioactifs amphipathiques utilisés dans divers secteurs industriels comme détergents et émulsifs.

fiant. Bien que beaucoup de saponines soient des adjuvants potentiels, celles employées comme tels sont extraites de l'écorce de *Quillaja saponaria molina*, un arbre d'Amérique du Sud. Les extraits bruts hétérogènes et aux effets peu prévisibles ont aujourd'hui fait place à des préparations standardisées telles que le Quil-A® (Superfos, Danemark), ainsi qu'à des saponines pures (QS-7, QS-21,...). Les saponines sont capables d'interagir avec le cholestérol pour former des pores dans les membranes cellulaires. Cette propriété leur confère des effets toxiques, mais elle est aussi à la base de la mise au point des ISCOMs («*ImmunoStimulating COMplexes*»). Il s'agit de structures vésiculaires d'environ 35 nm de diamètre, ayant l'aspect d'une cage, et facilement préparées en mélangeant du Quil-A®, du cholestérol et de la phosphatidylcholine. Le Quil-A® et le cholestérol forment la structure du complexe, et la phosphatidylcholine, moins rigide, permet l'incorporation d'un antigène amphipathique par son domaine hydrophobe.

Les adjuvants vésiculaires

La structure de base de ces adjuvants est une bicouche lipidique de composition variable, délimitant une microsphère aqueuse, et dont les propriétés physicochimiques peuvent être modifiées par l'ajout d'agents tensioactifs. Ils comprennent surtout les liposomes et les enveloppes virales reconstituées ou virosomes. Selon son caractère plus ou moins hydrophobe ou hydrophile, l'agent immunogène peut être adsorbé à leur surface, inséré dans leur membrane, ou contenu dans leur phase aqueuse.

Les copolymères synthétiques («*Non-ionic Block Polymers*»)

Ces polymères amphipathiques sont le plus souvent composés de chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène (POE), et de chaînes hydrophobes de polyoxypropylène (POP). Ils sont surtout utilisés en tant qu'agents de surface au sein d'émulsions huile dans eau, où ils permettent la présentation de l'immunogène à la surface des gouttelettes huileuses, à la fois par l'établissement de ponts hydrogènes avec le POE et par des interactions hydrophobes avec le POP. En faisant varier la longueur relative et l'agence-

ment des «blocs» de POP et de POE, il est possible de générer toute une série de composés et de retenir ceux qui ont les meilleures propriétés tensioactives (Hunter, 2002).

Les amines lipophiles

Ces composés portent d'une part un ou plusieurs groupements aminés, chargés positivement, et de l'autre de longues chaînes hydrocarbonées de 10 atomes de carbone ou plus. Cette structure permet la formation de micelles en solution aqueuse. Deux molécules de ce type sont actuellement utilisées en tant qu'adjuvants. Il s'agit principalement du DDA (*dime-thyldioctadecylammonium bromide* ou *chloride*, une amine quaternaire), qui apparaît comme le plus actif, et d'un composé analogue, l'avridine.

Les cytokines

Ces protéines de faible poids moléculaire agissent directement en leur qualité de médiateurs de la réponse immune, et à ce titre pourraient permettre d'orienter cette réponse de façon très précise. C'est par leur intermédiaire qu'agissent tous les autres immunostimulants.

Les imidazoquinolones

L'imiquimod, ainsi que d'autres membres de cette famille, sont de petites molécules capables d'agir sur certains récepteurs membranaires des macrophages et d'autres cellules immunitaires (notamment des récepteurs de type Toll), modulant ainsi la synthèse de cytokines par ces cellules.

Les polysaccharides

Les dextrans, mannanes, glucanes,... ont été utilisés en tant qu'adjuvants. Les chitosans, polymères obtenus par déacétylation de la chitine, semblent constituer des véhicules efficaces au niveau des muqueuses, en raison notamment de leur capacité de perméabiliser les muqueuses aux antigènes (Van der Lubben *et al.*, 2001).

MODE D'ACTION, EFFICACITÉ ET TOXICITÉ DES PRINCIPAUX ADJUVANTS

Cette section décrit les mécanismes biologiques qui président à l'action des adjuvants, ainsi que les effets de chaque adjuvant sur la réponse immune. Les effets toxiques de ces préparations et les modalités d'utilisation particulières y sont également présentés. Les connaissances concernant les effets des adjuvants sont cependant loin d'être complètes et certains aspects de leur activité peuvent ne pas avoir été étudiés. L'origine et les propriétés des principaux adjuvants décrits sont résumés dans le tableau I.

Un adjuvant efficace ne doit pas seulement renforcer la réponse immune, mais aussi orienter cette réponse en fonction de la pathogenèse propre à chaque infection. Chaque adjuvant est d'abord caractérisé par sa capacité d'activer sélectivement les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) de type Th2 ou Th1, qui correspondent aux deux grandes voies que peut emprunter la réponse immune, à savoir humorale et cellulaire. Cette dichotomie a été mise à jour chez la souris en comparant les effets des sels d'aluminium et de l'ACF, les premiers induisant une réponse de type Th2 et les seconds une réponse de type Th1 (Grun et Maurer, 1989). Un adjuvant peut aussi favoriser des aspects plus particuliers de la réponse immune, comme par exemple la réponse d'hypersensibilité de type retardé (DTH, *Delayed Type Hypersensitivity*) ou la réponse à lymphocytes T cytotoxiques (CTL, *Cytotoxic T Lymphocytes*), qui correspondent à deux paramètres de l'immunité à médiation cellulaire (IMC), ou encore la production d'IgA sécrétoires dans un contexte Th2. Il peut aussi influencer l'isotype des immunoglobulines produites.

La dichotomie Th1/Th2, qui repose sur les observations faites chez la souris, n'est pas toujours aussi nette chez les autres espèces. Néanmoins, étant donné que les nouveaux adjuvants sont d'abord testés chez la souris, cette distinction reste largement utilisée.

Les émulsions eau dans huile

Cette formulation permet la libération progressive de l'antigène au niveau du site d'injection et sa présentation sur une surface étendue; elle le pro-

Tableau I : Origine et propriétés des principaux adjuvants

ADJUVANT	ORIGINE OU COMPOSITION CHIMIQUE	EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNE
alum	minérale	stimulation de la réponse en anticorps (Th2)
adjuvant incomplet de Freund et adjuvants huileux	émulsions eau dans huile (huiles minérales ou végétales + agents de surface)	importante production d'anticorps ; fortement inflammatoires
adjuvant complet de Freund	émulsion eau dans huile + mycobactéries entières inactivées	réponse mixte humorale et cellulaire
<i>Syntex Adjuvant Formulation</i> et formulations apparentées	émulsions huile dans eau à base de squalène et de copolymères synthétiques	stimulation de la réponse en anticorps
monophosphoryl lipide A	composant bactérien dérivé du lipopolysaccharide	stimulation préférentielle de la réponse de type Th1
muramyl dipeptide et dérivés	composants de paroi des mycobactéries	stimulation préférentielle de la réponse en anticorps
oligonucléotides CpG	motifs moléculaires propres aux génomes procaryotes	induction de réponses de type Th1
cytokines	protéines généralement utilisées sous forme recombinante	action directe et spécifique, mais dépendant de la dose et de l'espèce cible
saponines et <i>Immuno Stimulating COMplexes</i>	agents amphipathiques d'origine végétale, permettant la formation de structures vésiculaires	production d'anticorps et stimulation des lymphocytes T cytotoxiques
imidazoquinolones	composés synthétiques de faible masse moléculaire	induction de réponses de type Th1 ; stimulation des lymphocytes T cytotoxiques
amines lipophiles	agents de surface amphipatiques	induction de réponses de type hypersensibilité retardée
toxines bactériennes	sous formes entière, inactivée, sous-unitaire ou mutée	favorisation des réponses de type Th2 ; production d'IgA sécrétoires
polysaccharides	diverses	stimulation de l'immunité au niveau des muqueuses

tège de la dégradation hépatique ou de l'action des protéases sériques. En outre, elle exerce un effet « corps étranger » par lequel elle attire les cellules de l'immunité non spécifique et active le complément par la voie alterne, provoquant ainsi une réaction inflammatoire. C'est par ces différents mécanismes, regroupés sous le nom d'« effet dépôt », qu'agissent ces préparations.

L'AIF, version de l'ACF dépourvue

de corps bactériens, constitue sans doute l'émulsion eau dans huile la plus connue et la plus utilisée. Il peut induire une meilleure réponse en anticorps que l'alum (*cf. infra*), mais est incapable de stimuler les types de réponses cellulaires efficaces contre les tumeurs et contre beaucoup d'infection virales (Jensen *et al.*, 1998). Même s'il n'a pas les effets toxiques systémiques de l'ACF, l'AIF peut provoquer des lésions comparables au

site d'injection, et s'avère potentiellement cancérigène.

Certains vaccins vétérinaires contiennent un adjuvant huileux. C'est le cas par exemple du Corifelin®, vaccin à base de calicivirus félin inactivé et de sous-unités d'herpèsvirus félin. Le Geskygrip®, destiné au porc et composé de virus influenza inactivé et de sous-unités du virus de la maladie d'Aujeszky, est adjuvanté par l'huile de paraffine.

Les adjuvants minéraux

Les sels de calcium et surtout d'aluminium stimulent la production d'anticorps via l'induction d'une réponse de type Th2 (Nicklas, 1992). Chez la souris, les anticorps produits sont essentiellement de type IgG1 ; les cytokines associées à cette production sont principalement l'IL-4 et l'IL-5. D'importants taux d'IgE sont également observés, en raison surtout de la production d'IL-5. Le phosphate de calcium induit cependant des taux d'IgE moins importants que les sels d'aluminium (Relyveld, 1986). Ce type d'adjuvant permet de concentrer l'antigène localement et de le présenter sous forme d'agrégats multimoléculaires, ce qui favorise le captage par les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) (*cf. infra*). Les adjuvants minéraux peuvent stimuler directement des cellules non spécifiques comme les macrophages, et sont capables d'activer le complément ; leur effet dépôt par libération lente de l'immunogène semble par contre modéré voire négligeable (Nicklas, 1992 ; Hogenesch, 2002). Il faut noter que toutes les protéines ne sont pas adsorbées efficacement par les sels d'aluminium (Seeber *et al.*, 1991).

Le Rabisin®, vaccin antirabique inactivé destiné à la fois aux animaux de rente et de compagnie, fait partie des vaccins vétérinaires adjuvants par l'hydroxyde d'alumine. C'est également le cas du Miloxan®, vaccin constitué d'anatoxines clostridiennes et destiné aux ruminants. Mis à part le MF59 (une émulsion squalène/eau présente dans un vaccin anti-influenza), les sels d'aluminium sont aussi les seuls adjuvants actuellement enregistrés pour la médecine humaine. Ils restent en effet les seuls à avoir démontré une efficacité et une innocuité suffisantes pour être exploités dans des vaccins prophylactiques commerciaux. Même s'ils sont efficaces contre diverses maladies, la production d'anticorps induite par ces adjuvants reste modérée. Pour de nouveaux vaccins qui nécessiteront des titres élevés, il est vraisemblable que d'autres adjuvants devront être employés. L'intérêt de l'alum réside donc essentiellement dans sa sécurité ; il n'induit que quelques réactions locales minimales. Contrairement à l'aluminium, le phosphate de calcium ne constitue pas un corps étranger pour l'organisme ; il est donc

encore mieux toléré et résorbé (Cedarlane Laboratories Limited, 2003). Il n'est cependant pas encore établi que des vaccins formulés avec le phosphate de calcium présenteront les mêmes caractéristiques d'immunogénicité et d'efficacité.

Les constituants bactériens

Ces adjuvants portent des motifs moléculaires propres aux bactéries, parfois appelés PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), et capables à ce titre d'activer les mécanismes de défense non spécifiques (O'Hagan, 2001). Administrer ces composants revient donc à mimer les signaux pro-inflammatoires reçus par le système immunitaire lors d'une infection bactérienne, signaux qui déterminent le type de réponse spécifique mis en place. Le MDP et ses dérivés sont de puissants inducteurs de la production d'IL-1. Administrés seuls en solution aqueuse, ils favorisent plutôt la réponse de type Th2 (Cedarlane Laboratories Limited, 2003). Par contre, les corps bactériens entiers et le MPL stimulent préférentiellement la réponse de type Th1 (Cox et Coulter, 1997 ; Moingeon *et al.*, 2001). Leur mode d'action se base sur une interaction du LPS et de ses dérivés avec des récepteurs Toll-Like (TLR, *Toll-Like Receptors*), dont notamment le TLR-4 (Persing *et al.*, 2002).

L'ACF combine donc l'effet dépôt d'une émulsion eau dans huile et la capacité d'activation de l'immunité non spécifique des bactéries inactivées, sans compter la stimulation de cellules T auxiliaires spécifiques d'épitopes de *M. tuberculosis*. Ces propriétés en font un puissant activateur à la fois de la réponse humorale et de la réponse cellulaire (Comoy *et al.*, 1997). La composante humorale de la réponse induite est liée à l'émulsion huile dans eau, tandis que sa composante cellulaire est attribuable aux extraits mycobactériens (Billiau et Matthys, 2001).

Le caractère pro-inflammatoire marqué de l'ACF est malheureusement à la base de ses nombreux effets délétères. Outre le fait qu'il soit extrêmement visqueux et donc difficile à injecter, l'ACF entraîne l'apparition d'abcès, de granulomes, et de nécrose cutanée. Il est pyrogène et peut provoquer des polyarthrites et diverses lésions liées à des réactions auto-

immunes ; de plus, il a été démontré que les huiles minérales étaient cancérigènes (Murray *et al.*, 1972). D'autre part, l'ACF rend positif le test de tuberculination. L'ACF ne peut être administré qu'une seule fois au même individu ; en effet, des injections répétées peuvent provoquer une réaction anaphylactique fatale. C'est pourquoi il est recommandé de n'injecter que de l'AIF lors des injections de rappel (Griswold, 2002).

L'ACF représente aussi un danger potentiel pour l'utilisateur. Il peut provoquer des lésions douloureuses et difficiles à traiter lorsqu'il est inoculé par piqûre accidentelle ou projeté sur la cornée. En ce qui concerne les animaux de laboratoire, l'ACF est encore largement utilisé, bien qu'il soit en passe d'être interdit dans de nombreux pays. Pour limiter au mieux la douleur infligée à ces animaux, le composant bactérien de l'ACF ne devrait jamais dépasser une concentration de 0,5 mg/ml (Conseil canadien de protection des animaux, 2002).

Dans certains laboratoires de recherche, des immunogènes sont isolés à partir de gels de polyacrylamide ou de membranes de nitrocellulose. Ces préparations induisent elles-mêmes de très fortes réactions inflammatoires. Il est donc recommandé de minimiser la quantité de ces supports contenue dans le vaccin par une élution adéquate, et de ne jamais coupler ces antigènes avec de l'ACF.

Les émulsions huile dans eau

Ce type d'émulsion est essentiellement représenté par des préparations de copolymères de POE et POP incorporés au squalène. La structure particulière formée par ces préparations constitue la base de leur efficacité, et semble être la clé du mode d'action de nombreux adjuvants. En effet, ce type de structure favorise le captage par les CPA. Ce phénomène de « ciblage » (« *targeting* ») des cellules dendritiques et des macrophages s'explique par différents mécanismes : l'antigène incorporé par les CPA est concentré et protégé contre la dégradation, la phagocytose est stimulée par différentes interactions ligands-récepteurs (Audibert et Lise, 1993 ; Cox et Coulter, 1997 ; Hogenesch, 2002), et les structures formées peuvent fixer le composant C3b du complément (Allison et Byars, 1992).

Lors de l'administration d'une émulsion huile dans eau, la phase aqueuse continue se disperse rapidement. Les sphérules d'huile libérées transportent l'antigène directement vers les ganglions via les vaisseaux lymphatiques. L'effet de ciblage et l'effet dépôt de ce genre d'adjuvant s'exercent donc non seulement au site d'injection mais aussi au sein même du tissu lymphoïde (Allison et Byars, 1992).

Les émulsions décrites ici n'induisent qu'une réaction locale minime. Les copolymères synthétiques utilisés sont très peu inflammatoires; quant au squalène, il s'agit d'un constituant corporel abondant, qui est un précurseur du cholestérol. Contrairement aux émulsions eau dans huile, la dispersion rapide d'une émulsion huile dans eau permet d'éviter la formation de granulomes et d'abcès autour d'une masse huileuse persistante. Ces émulsions ont la consistance du lait et sont donc faciles à injecter. L'incorporation délicate de l'antigène dans une émulsion préformée permet également d'éviter une dénaturation partielle donnant lieu à la production d'anticorps dirigés contre des peptides internes. C'est en effet ce qui se produit lors de la préparation d'une émulsion eau dans huile, qui nécessite une homogénéisation vigoureuse.

La SAF est la première préparation mettant à profit le concept d'émulsion huile dans eau à base de squalène (Allison et Byars, 1992). Par la suite, d'autres adjuvants comme ceux de type TiterMax® ou comme le RAS ont été élaborés selon le même principe.

Dans la SAF, le squalène est simplement remplacé par le squalane, son équivalent saturé, lui aussi présent normalement dans l'organisme. Contrairement au squalène, le squalane n'est pas sensible à l'auto-oxydation et reste donc beaucoup plus stable au sein des préparations pharmaceutiques. La SAF contient en outre un peptide adjuvant, le thréonyl-MDP, qui est ciblé vers les CPA tout comme l'antigène. Chez la souris, la SAF favorise la production d'IFN γ par les lymphocytes T cytotoxiques et Th1, ce qui entraîne une importante production d'anticorps de type IgG2a. Cette sous-classe d'Ig, équivalente aux IgG1 et IgG3 chez l'homme, semble jouer un rôle primordial dans l'opsonisation des bactéries.

Les adjuvants de type TiterMax®

(Cedarlane Laboratories Limited, 2003) contiennent d'autres copolymères. La réponse induite est surtout de type Th2. La version Gold induit des taux d'anticorps particulièrement élevés et persistants. Ces effets semblent cependant associés à une réactogénicité non négligeable. Weeratna et collaborateurs (2000) rapportent en effet que le TiterMax® cause d'importants dégâts tissulaires au niveau de son site d'injection.

Les saponines et les «ImmunoStimulating COMplexes»

Les préparations de saponines les plus utilisées sont le QS-21 et le Quil-A®. Elles induisent une réponse de type CTL et une importante production d'IgG2a. Les autres sous-classes d'anticorps sont toutefois elles aussi significativement augmentées. L'association Quil-A®-alum se retrouve dans plusieurs vaccins vétérinaires, par exemple les vaccins marqués inactivés contre l'IBR (*Infectious Bovine Rhinotracheitis*).

Les ISCOMs sont utilisés en médecine vétérinaire dans un vaccin commercial contre la grippe et la rhinopneumonie équine, l'Equilis Resequin®, où ils sont combinés avec l'hydroxyde d'aluminium. Ils induisent également une réponse mixte Th1/Th2, par ciblage des CPA, et sont capables en particulier de stimuler la présentation des antigènes en association avec le CMH I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I) aux lymphocytes T cytotoxiques. Ce phénomène s'explique probablement par la capacité qu'ont les saponines d'interagir avec le cholestérol pour créer des pores membranaires; de cette façon, l'antigène pourrait être introduit directement dans la voie endogène de présentation. Cette interaction des saponines avec les membranes peut provoquer de l'hémolyse. Outre les voies parentérales classiques, les ISCOMs peuvent s'administrer par voie orale ou nasale. Ils induisent alors, en plus des réponses systémiques habituelles, une importante production d'IgA sécrétoires (Sjolander et Cox, 1998).

Les adjuvants vésiculaires

L'activité immunostimulante des liposomes repose sur leur capacité de présenter l'antigène adéquatement

pour la voie exogène de présentation par les CPA, et à la fois d'être internalisés par les CPA afin de stimuler le mode endogène de présentation. Les virosomes quant à eux peuvent cibler les CPA de façon tout à fait spécifique par l'intermédiaire de leur récepteurs d'origine virale, et tendent à reproduire le mode de présentation naturel des antigènes viraux. Il s'agit par exemple des IRIVs (*Immuno-potentiating Reconstituted Influenza Virosomes*). En outre, les adjuvants vésiculaires exercent un certain effet dépôt. Le résultat est une réponse mixte caractérisée à la fois par de hauts taux d'anticorps et par une activité CTL. Ces systèmes sont toutefois difficiles à formuler.

Les cytokines

De très nombreuses cytokines ont été expérimentées en tant qu'adjuvants, ainsi que certains de leurs inhibiteurs (comme l'inhibiteur de l'IL-13, une cytokine immunosuppressive). Une grande partie des cytokines connues sont disponibles commercialement sous forme recombinante.

De nombreuses recherches concernant les cytokines se focalisent actuellement sur la cible importante que constituent les cellules dendritiques. Ces cellules d'origine médullaire sont des CPA professionnelles agissant sous l'effet des premiers signaux inflammatoires; ce sont elles qui *in fine* font le lien entre l'immunité innée et la réponse spécifique. Les interférons de type I, parmi lesquels l'IFN α , activent les cellules dendritiques et leur permettent d'activer à leur tour les cellules T. Ils induisent à la fois une réponse de type CTL et une réponse humorale, et constituent des adjuvants potentiellement efficaces contre les infections virales (Rizza *et al.*, 2002). L'IFN α fait actuellement l'objet d'études cliniques chez l'homme. Le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) stimule les réponses DTH et CTL dirigées contre des peptides isolés de mélanomes (Jäger *et al.*, 1996).

L'IL-2 est sécrétée par les cellules dendritiques et intervient en grande partie dans l'activation et la division des cellules T; elle aussi constitue un candidat adjuvant pour de nouveaux vaccins. L'IL-12, elle aussi sécrétée par les CPA, est une cytokine pivot pour l'orientation de la réponse

immune vers l'alternative Th1 ; c'est pourquoi ses propriétés adjuvantes sont actuellement testées.

L'efficacité d'un vaccin adjuvanté dépend essentiellement du profil cytokinique généré, puisque ce dernier détermine l'orientation prise par la réponse immune. Dès lors, la possibilité d'utiliser directement les cytokines comme adjuvants est une perspective très attirante. Certains obstacles restent toutefois à surmonter. En effet, certaines cytokines immunostimulantes ont des effets immunosuppresseurs selon la dose utilisée et l'antigène employé. La spécificité d'espèce des cytokines, même si elle n'est pas absolue, peut également engendrer une perte d'efficacité. De plus, l'administration de cytokines n'est pas dénuée de risques ; par exemple, l'IL-2 et l'IL-12 peuvent avoir des effets secondaires dangereux sur la fonction circulatoire (Carson *et al.*, 1999).

Les résultats les plus prometteurs en cette matière sont obtenus avec des mélanges de cytokines, telle l'association GM-CSF/IL-12/TNF α utilisée dans le cadre d'essais de vaccination anti-HIV et anti-tumorale (Rizza *et al.*, 2002).

Les imidazoquinolones

L'imiquimod et le resiquimod augmentent de façon considérable la sécrétion d'IFN α , de TNF α et d'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques ; cela a pour effet d'orienter la réponse immune dans la direction Th1, et de générer des cellules cytotoxiques (Dockrell et Kinghorn, 2001 ; Stanley, 2002). Malgré quelques effets secondaires locaux, ces deux agents ont prouvé leur efficacité dans le traitement topique de plusieurs infections virales de la peau et des muqueuses. L'imiquimod est commercialisé sous forme de crème et indiqué pour le traitement des papillomes anogénitaux. Les capacités immunomodulatrices du resiquimod semblent être encore plus marquées ; celui-ci favoriserait notamment l'activité tueuse des macrophages dans un modèle de leishmaniose cutanée (Buates et Matlashewski, 1999). Les propriétés de ces agents pourraient s'avérer précieuses dans le traitement de diverses infections virales et de néoplasmes, mais aussi dans la formulation de nouveaux vaccins.

Les amines lipophiles

Les micelles formées par le DDA en solution aqueuse lient avec une forte affinité les immunogènes portant des charges négatives. Au sein du complexe ainsi formé, ces charges sont neutralisées et l'immunogène devient plus hydrophobe. Ce complexe permet de cibler les CPA. Le DDA s'avère être un puissant activateur de l'immunité à médiation cellulaire (Hilgers et Snippe, 1992) ; il a été démontré chez différentes espèces animales que cet adjuvant induit très efficacement des réponses de type DTH. Le DDA est par contre peu efficace pour stimuler la production d'anticorps. Les effets secondaires réduits du DDA en font un candidat valable pour des vaccins vétérinaires. Bien qu'il ait été utilisé dans le cadre de plusieurs essais cliniques chez l'homme, il sera nécessaire de développer des analogues encore moins irritants en vue d'applications commerciales.

Les oligodésoxynucléotides CpG (CpG ODN)

Ces adjuvants ont la capacité d'induire des réponses qui sont très nettement de type Th1, comme en témoigne notamment l'importante production d'IL-12 et d'IFN- γ qu'ils stimulent (Halpern *et al.*, 1996 ; Carson et Raz, 1997). Cet effet passe par une interaction du CpG avec le TLR-9 (Dalpke *et al.*, 2002). De même, les oligonucléotides CpG contenus dans l'adjuvant de Freund pourraient être en grande partie responsables de son pouvoir de stimulation de la réponse de type Th1. Ils peuvent également inhiber une réponse de type Th2 déjà installée et l'orienter vers une réponse de type Th1 (Chu *et al.*, 1997). Ils pourraient donc être utiles en tant que vaccins thérapeutiques ainsi que pour soigner certaines allergies. Cependant, leurs effets chez l'homme en restent à un stade précoce d'investigation (Halperin *et al.*, 2003 ; Mutwiri *et al.*, 2003). L'association CpG-aluminium s'est révélée capable d'induire à la fois une forte réponse de type Th1 et des titres élevés en anticorps, tout en étant fort peu toxique (Weeratna *et al.*, 2000). Pour l'instant, aucune préparation standardisée de CpG ODN n'est disponible sur le marché.

Les toxines bactériennes

Ces adjuvants sont administrés par voie orale ou nasale. Ils induisent une réponse de type Th2 s'accompagnant de la production d'IgA sécrétoires répartie au niveau de l'ensemble des muqueuses (Horsinek *et al.*, 1997 ; Moingeon *et al.*, 2001). La production d'anticorps au niveau systémique est également stimulée. La sous-unité B de la toxine cholérique, qui est beaucoup moins efficace par rapport à la toxine entière, peut être associée à de très petites quantités d'holotoxine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De très nombreux adjuvants, aux modes d'actions variés, sont actuellement à l'étude tant en médecine humaine que vétérinaire. A ce jour, les adjuvants utilisables dans des vaccins commerciaux ne permettent pas d'induire une réponse à dominante Th1. Or, cette propriété pourrait être la clé d'une immunisation efficace contre bon nombre de tumeurs ou de maladies infectieuses aujourd'hui incurables. La production d'anticorps spécifiques reste toutefois indispensable pour obtenir une protection ; c'est pourquoi les nouveaux vaccins devront sans doute combiner plusieurs adjuvants de nouvelle génération. C'est le cas notamment de nouveaux vaccins expérimentaux contre le VIH (Virus de l'Immuno-déficience Humaine) (Ahlers *et al.*, 2003). De plus, la perspective thérapeutique s'ajoute aujourd'hui au concept de vaccination, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer. Les adjuvants développés devront induire une réponse suffisamment puissante pour éliminer une infection chronique ou détruire une tumeur.

L'étude des récepteurs de surface des CPA constitue un nouveau champ d'investigation en vaccinologie (Moingeon *et al.*, 2001). Il s'agit des récepteurs *Toll-like*, de différents récepteurs de chémokines, de manose/fucose, de HSP (*Heat Shock Proteins*), ou encore de molécules de costimulation comme les récepteurs CD40 (Barr *et al.*, 2003) ou CD28 (Carlring *et al.*, 2003). Les ligands de ces récepteurs, ou des anticorps dirigés contre eux, pourraient agir en tant qu'immunostimulants ; de plus, ils peuvent être associés aux immuno-

gènes au sein d'une protéine de fusion et ainsi cibler les CPA de façon extrêmement spécifique. Les cellules dendritiques elles-mêmes pourraient être utilisées comme adjuvants (Citterio *et al.*, 1999). Quoi qu'il en soit, les nouveaux vaccins devront sans doute combiner plusieurs de ces adjuvants de nouvelle génération.

Enfin, il faut garder à l'esprit que le développement des adjuvants a été jusqu'à présent largement empirique. Il est bien sûr nécessaire d'approfondir les études concernant les effets des adjuvants, mais les connaissances fondamentales en immunologie doivent évoluer parallèlement.

Choice of an adjuvant for vaccination trials

SUMMARY

The development of new vaccines, containing protective antigens that are more and more well characterized, is hindered by the lack of adjuvants able both to amplify immune response and to control it qualitatively. A number of tumors and infectious diseases could be treated with adjuvant preparations that would adequately intensify and modulate specific immune response; in particular, the possibility to

specifically induce a Th1 response seems to be of paramount importance for the prevention and for the cure of these diseases. Furthermore, these adjuvants must be as safe as possible, not only for commercial applications, but also in the respect of laboratory animals' welfare. This review describes the different adjuvants presently used in vaccinology, classifying them following their chemical nature and presenting for each category the knowledge concerning their activity and toxicity.

BIBLIOGRAPHIE

- AHLERS J.D., BELYAKOV I.M., BERZOFISKY J.A. Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Curr. Mol. Med.*, 2003, **3**, 285-301.
- ALLISON A.C., BYARS N.E. Syntex Adjuvant Formulation. *Res. Immunol.*, 1992, **143**, 475-582.
- AUDIBERT F.M., LISE L.D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1993, **14**, 174-178.
- BARR T.A., McCORMICK A.L., CARLRING J., HEATH A.W. A potent adjuvant effect of CD40 antibody attached to antigen. *Immunology*, 2003, **109**, 87-92.
- BILLIAU A., MATTHYS P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 2001, **70**, 849-860.
- BUATES S., MATLASHEWSKI G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J. Infect. Dis.*, 1999, **179**, 1485-1494.
- CARLRING J., BARR T.A., BUCKLE A.M., HEATH A.W. Anti-CD28 has a potent adjuvant effect on the antibody response to soluble antigens mediated through CTLA-4 by-pass. *Eur. J. Immunol.*, 2003, **33**, 135-142.
- CARSON D.A., RAZ E. Oligonucleotide Adjuvants for T helper 1 (Th1)-specific Vaccination. *J. Exp. Med.*, 1997, **186**, 1621-1622.
- CARSON W.E., YU H., DIERKSHEIDE J., PFEFFER K., BOUCHARD P., CLARK R., DURBIN J., BALDWIN A.S., PESCHON J., JOHNSON P.R., KU G., BAUMANN H., CALIGIURI M.A. A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells. *J. Immunol.*, 1999, **162**, 4943-4951.
- CEDARLANE LABORATORIES LIMITED. The adjuvant guide. [en ligne] (2003). Adresse URL : <http://www.cedarlanelabs.com/catalogues.asp?company=AdjuvantGuide> Consulté le 27/01/03.
- CHU R.S., TARGONI O.S., KRIEG A.M., LEHMANN P.V., HARDING C.V. CpG oligonucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.*, 1997, **186**, 1623-1631.
- CITTERIO S., RESCIGNO M., FOTI M., GRANUCCI F., AGGUJARO D., GASPERI C., MATYSZAK M.K., GIROLOMONI G., RICCIARDI-CASTAGNOLI P. Dendritic cells as natural adjuvants. *Methods*, 1999, **19**, 142-147.
- COMOY E., CAPRON A., THYPHRONITIS G. *In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int. Immunol.*, 1997, **9**, 523-531.
- CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX. Lignes directrices: production d'anticorps. [en ligne] (2002). Adresse URL : <http://www.ccac.ca/french/gdlines/antibody/antibodyfr.pdf> Consulté le 27/01/03.
- COX J.C., COULTER A.R. Adjuvants: a classification and review of their mode of action. *Vaccine*, 1997, **15**, 248-256.
- DALPKE A., ZIMMERMANN S., HEEG K. Immunopharmacology of CpG DNA. *Biol. Chem.*, 2002, **383**, 1491-1500.
- DOCKRELL D.H., KINGHORN G.R. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, **48**, 751-755.
- GRISWOLD R. CHUA guidelines concerning use of polyclonal antibody generation/production. State University of New York. [en ligne] (2002). Adresse URL : http://www.upstate.edu/dlar/hsconly/Policies/guide_antibody.htm Consulté le 27/01/03.

- GRUN J.L., MAURER P.H. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell. Immunol.*, 1989, **121**, 134-145.
- HALPERIN S.A., VAN NEST G., SMITH B., ABTAHI S., WHILEY H., EIDEN J.J. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*, 2003, **21**, 2461-2467.
- HALPERN M.D., KURLANDER M.J., PISETSKY D.S. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell. Immunol.*, 1996, **67**, 72-78.
- HILGERS L.A.T., SNIPPE H. DDA as an immunological adjuvant. *Res. Immunol.*, 1992, **143**, 494-501.
- HOGENESCH H. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminium adjuvants. *Vaccine*, 2002, **20**: Suppl 3, S34-9.
- HORIZNEK M.C., SCHIJNS V.E.C.J., DENIS M., DESMETTRE P., BABIUK L.A. Adjuvants and vehicles. In: Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P., Verschueren C. (Eds.), *Veterinary Vaccinology*. Elsevier: Amsterdam, 1997, 140-148.
- HUNTER R.L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine*, 2002, **20**: Suppl 3, S7-12.
- JÄGER E., RINGHOFFER M., DIENES H.P., ARAND M., KARBACH J., JÄER D., ILSEMANN C., HAGEDORN M., OESCH F., KNUTH A. Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides *in vivo*. *Int. J. Cancer.*, 1996, **67**, 54-62.
- JENSEN F.C., SAVARY J.R., DIVELEY J.P., CHANG J.C. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **32**, 173-186.
- KANDIMALLA E.R., YU D., AGRAWAL S. Towards optimal design of second-generation immunomodulatory oligonucleotides. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2002, **4**, 122-129.
- MOINGEON P., HAENSLER J., LINDBERG A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine*, 2001, **19**, 4363-4372.
- MURRAY R., COHEN P., HARDEGREE M.C. Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies. *Ann. Allergy*, 1972, **30**, 146-151.
- MUTWIRI G., PONTAROLLO R., BABIUK S., GRIEBEL P., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S., MENA A., TSANG C. ALCON V., NICHANI A., IOANNOU X., GOMIS S., TOWNSEND H., HECKER R., POTTER A., BABIUK L.A. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003, **91**, 89-103.
- NICKLAS W. Aluminium salts. *Res. Immunol.*, 1992, **143**, 489-494.
- O'HAGAN D.T. Recent developments in vaccine delivery. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 2001, **1**, 273-286.
- PERSING D.H., COLER R.N., LACY M.J., JOHNSON D.A., BALDRIDGE J.R., HERSHBERG R.M., REED S.G. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol.*, 2002, **10 suppl**, S32-S37.
- RELYVELD E.H. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, 1986, **65**, 131-136.
- RIZZA P., FERRANTINI M., CAPONE I., BELARDELLI F. Cytokines as natural adjuvants for vaccines: where are we now? *Trends Immunol.*, 2002, **23**, 381-383.
- SCHIJNS V.E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Immunol.*, 2001, **21**, 75-85.
- SEEBER S.J., WHITE J.L., HEM S.L. Predicting the absorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*, 1991, **9**, 201-203.
- SJOLANDER A., COX J.C. Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, **34**, 321-338.
- STANLEY M.A. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2002, **27**, 571-577.
- VAN DER LUBBEN I.M., VERHOEF J.C., BORCHARD G., JUNGINGER H.E. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **52**, 139-144.
- WEERATNA R.D., McCLUSKIE M.J., XU Y., DAVIS H.L. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine*, 2000, **18**, 1755-1762.
- ZIMMERMAN S., HEEG K., DALPKE A. Immunostimulatory DNA as adjuvant: efficacy of phosphodiester CpG oligonucleotides is enhanced by 3' sequence modifications. *Vaccine*, 2003, **21**, 990-995.