

Antigenicidad de las proteínas recombinantes

Antigenicity of recombinant proteins

M. López-Hoyos*, G. Fernández-Fresnedo**, H. López-Escribano*, A.L.M. de Francisco**

*Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio Cántabro de Salud. Santander

**Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio Cántabro de Salud. Santander

La aplicación de la biotecnología en Medicina ha experimentado un desarrollo espectacular en los últimos años. Ejemplos de máxima actualidad son la terapia génica y el empleo de células madre totipotenciales en terapias celulares y tisulares, potenciados todos ellos por el desarrollo del Proyecto del Genoma Humano (1,2). Otros casos más conocidos y de aplicación práctica más extendida son las proteínas, especialmente los enzimas, los factores de crecimiento y los anticuerpos (Acs) monoclonales. El mayor empleo de las proteínas se debe en parte al progreso en el conocimiento de sus funciones y a la capacidad de producir proteínas recombinantes (3). Estas proteínas no sólo se pueden fabricar a gran escala, sino que es posible diseñar proteínas con propiedades mejoradas de forma específica para alcanzar el efecto perseguido como, por ejemplo, los Ac quiméricos o humanizados (4). El uso extendido de las proteínas recombinantes es paralelo al desarrollo simultáneo de dianas diagnósticas y terapéuticas motivado por el mejor conocimiento de las funciones de las proteínas, gracias a la genómica y la proteómica (5). Sin embargo, esta tecnología y el conocimiento derivado de ella se adelantan muchas veces a la redacción de las leyes, por lo que su aplicación ocasiona múltiples problemas éticos (6). Por otro lado, la producción de forma individual de las proteínas recombinantes origina muchos problemas de consistencia del producto y cambios en la manufactura. Todo ello puede dar lugar a problemas de inmunogenicidad, a los cuales no se les presta atención en principio, dado que el objetivo perseguido suele ser reemplazar la función de una proteína deficitaria o no funcionante (7). De hecho, son escasos los

trabajos publicados que investiguen la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes empleadas en terapéutica (8,9). A lo sumo, sólo se demuestra la producción de Acs dirigidos frente a dichas proteínas. Estos Acs pueden tener capacidad neutralizante o inhibitoria de la función proteica, aunque en otras muchas ocasiones no tienen ningún efecto. No obstante, no hay prácticamente artículos en los que se demuestre donde reside la capacidad inmunogénica de la proteína recombinante cuando induce la producción de Acs.

Con el término de inmunogenicidad se describe la capacidad que tiene una molécula de inducir una respuesta inmunitaria. Los elementos específicos del sistema inmunitario originados como consecuencia de esa respuesta reconocerán dichas moléculas inductoras, conocidas como antígenos. Como norma general, cualquier molécula puede ser antígeno, es decir, ser reconocida por los elementos del sistema inmunitario. Sin embargo, no todos los antígenos son inmunógenos, es decir, no desencadenan una respuesta inmunitaria. Además, hay antígenos que son excesivamente pequeños para inducir este tipo de respuestas por sí solos. Necesitan unirse a otra molécula de mayor tamaño, denominada "carrier" o transportador. Ese antígeno, que es inmunógeno únicamente cuando se une a un transportador, se denomina hapteno (10). En el caso de las proteínas recombinantes, algunas de ellas serán inmunógenas mientras que otras serán únicamente antígenos sin capacidad de generar una respuesta inmunitaria (Figura 1).

Atendiendo a la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes, las podemos dividir en vacunas y proteínas sustitutivas (enzimas y factores de crecimiento). En el primer caso, la inmunogenicidad es el objetivo buscado (11). Por el contrario, con las proteínas sustitutivas la inmunogenicidad es un efecto adverso que puede alterar el efecto sustitutivo perseguido con ellas (12).

La presente revisión pretende analizar cuando una sustancia recombinante es



Fig. 1: Una proteína recombinante puede comportarse como antígeno y/o inmunógeno. Cualquier molécula puede ser reconocida por el sistema inmunitario (antígeno), pero no todos los antígenos tienen capacidad de inducir una respuesta inmune (inmunógeno).

inmunógena y qué factores distintos a la molécula por sí misma contribuyen en la inducción de una respuesta inmunitaria. Gran parte de los datos se referirán a los antígenos convencionales debido a la escasez de trabajos referidos a las proteínas recombinantes.

Factores determinantes de la inmunogenicidad de una proteína recombinante

Existen tres tipos de factores que pueden contribuir a la inducción de una respuesta inmunitaria por parte de una molécula recombinante (8):

- Factores propios del antígeno: filogenia, diferentes patrones de glicosilación, contaminantes, etc.
- Factores intrínsecos del huésped: genéticos, infecciones concomitantes, etc.
- Factores relativos a la administración del antígeno: dosis, ruta de administración, duración del tratamiento, intervalo entre dosis, etc.

Además, es probable que en el caso de las proteínas recombinantes participen otros factores desconocidos hasta el momento y que sean propios de este tipo de moléculas.

Correspondencia:
Dr. Marcos López Hoyos
Servicio Inmunología
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
39008, Santander
Tfno./Fax: 942203453
Correo electrónico: inm1hm@humv.es
Recibido: 28-02-03
Aceptado: 16-04-03

Factores propios del antígeno

Es lógico pensar que la diferencia filogénica existente entre la fuente de donde se obtiene la proteína administrada y el ser humano sea uno de los determinantes más importantes de la inmunogenicidad de una proteína recombinante. Así, toda molécula extraña al ser humano originará una respuesta inmunitaria, tanto más potente cuanto mayor sea la diferencia en la escala filogénica respecto a la especie humana. Las primeras evidencias al respecto provienen del empleo de sustancias de origen animal como la calcitonina de salmón (13) o la adenosina deaminasa bovina (14). Sin embargo, existen casos de proteínas de origen humano que, a pesar de la igualdad de secuencia, al ser administradas han producido fuertes respuestas de Acs, como el interferón- β (15) o la hormona de crecimiento (16). Es más, proteínas recombinantes producidas con secuencias prácticamente idénticas a las humanas han mostrado capacidad inmunogénicas. El ejemplo más reciente es el de producción de Acs anti-eritropoyetina (tanto endógena como exógena) tras la administración de la proteína recombinante (17). Sin embargo, no existe una regla fija respecto a la importancia de la igualdad de secuencia aminoacídica puesto que existen casos de proteínas recombinantes producidas con cambios sustanciales de secuencia que no incrementa su capacidad inmunogénica, como el IFN- α 2A (18).

Además de la similitud de la secuencia de la proteína recombinante con la molécula humana, existen otros factores propios de la estructura del antígeno recombinante que pueden afectar a su inmunogenicidad, que se explican a continuación.

Tamaño

Las moléculas de un tamaño mayor de 10 Kd son más inmunogénicas que aquellas con un tamaño más pequeño. El ejemplo más claro de molécula que no induce una respuesta inmunitaria por su tamaño pequeño es el de los haptenos (10).

Naturaleza química

En principio, todas las proteínas son antigénicas y la gran mayoría inmunogénicas. La capacidad de inducir respuestas inmunes aumenta cuanto más compleja es la estructura de la proteína como, por ejemplo, cuando se compone de aminoácidos aromáticos (19,20).

Los polisacáridos inducen respuestas inmunes en unas especies (humano, ratón) y no en otras (conejo, cobaya). Por otro lado, el grado de glicosilación de las proteínas recombinantes induce cambios conformacionales que modifican las propiedades de solubilidad de la molécula o que induce la exposición de epítopos crípticos o escondidos (20). Así, el IFN- β producido en *E. Coli* posee mayor capacidad inmunogénica que el producido en células de cobaya porque la bacteria es incapaz de glicosilar la proteína recombinante y, de este modo, se reduce su solubilidad (21). Sin embargo, no se ha demostrado hasta la fecha que la hiperglicosilación sea capaz de aumentar la inmunogenicidad de una proteína.

Los lípidos y ácidos nucleicos por sí mismos no son capaces de desencadenar respuestas inmunitarias, pero sí funcionan como haptenos. Los ejemplos más conocidos están relacionados con la producción de autoanticuerpos frente a un lípido como la cardiolipina, que se mezcla con la beta-2 glicoproteína I para inducir una respuesta inmune frente a ella (22), o frente a un ácido nucleico como el ADN nativo o de doble cadena, en el que la respuesta humoral frente a él se desencadena al formar complejos con proteínas como las histonas (23).

Configuración

Las moléculas complejas pueden inducir respuestas inmunitarias con más facilidad que las simples. De este modo, las proteínas globulares o policatenarias presentan muchos más epítopos inmunogénicos que las proteínas lineales, más simples (19,20).

Accesibilidad

Para que se genere una respuesta inmunitaria frente a un antígeno se precisa que dicho antígeno se presente a los elementos del sistema inmunitario. Por ello, se entiende que los antígenos superficiales en la estructura de una proteína tengan mayor poder inmunogénico que los antígenos escondidos (24).

Carga

Los antígenos que contengan un mayor número de residuos ácidos o básicos inducirán respuestas inmunitarias con más facilidad que los que tengan mayor propor-

ción de residuos neutros o los que su carga total sea neutra (19,20).

Factores propios del huésped

El desencadenamiento de una respuesta inmune frente a cualquier antígeno va a estar determinado por las características del huésped que se enfrenta a dicho antígeno. La mejor manera de entender la importancia del huésped la encontramos al considerar las enfermedades autoinmunes (25). Estas enfermedades se producen por una respuesta del sistema inmune frente a los antígenos propios o autoantígenos que, lógicamente, son todas las moléculas de nuestro organismo. Sin embargo, sólo un porcentaje relativamente bajo de sujetos va a responder frente a esos autoantígenos y desarrollar una enfermedad autoinmune. Esta situación está motivada en gran medida por las características intrínsecas del individuo, además de factores ambientales y extrínsecos (25). Entre las características del huésped que condicionan que un sujeto sufra una enfermedad autoinmune por una respuesta inmune inapropiada y otro no destaca la carga genética, con una clara influencia del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) (26).

El ejemplo de la reacción frente a un antígeno propio se puede trasladar a los antígenos recombinantes. Las moléculas HLA expresadas en las células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos) son las encargadas de presentar el antígeno a los linfocitos T CD4+ que son el eje central de toda la respuesta inmunitaria mediante la secreción de citocinas y la interacción con otras células del sistema inmunitario. Como resultado final se producirá una respuesta humoral, mediada por Acs, o una respuesta celular (27).

Por otra parte, un defecto genético para una molécula puede ser la causa del desencadenamiento de una respuesta inmunitaria frente a la proteína recombinante que se administra para suplir su ausencia. Así, se ha demostrado la producción de Acs anti-eritropoyetina (EPO) en pacientes con una mutación para el gen de la EPO (28). De este modo, los linfocitos B, que reconocerían la EPO endógena en condiciones normales, no desarrollarían los fenómenos de tolerancia central ni periférica, de manera que las células B EPO-específicas sobrevivirían y madurarían en la periferia (29). Estas células, al administrarse la EPO recombinante para suplir su ausencia, reaccionan y producen Acs frente a la EPO.

Además de los factores genéticos, existen múltiples factores propios del huésped de otra índole (Figura 2):

- Edad: las respuestas inmunitarias son menos eficaces en los recién nacidos, por inmadurez del sistema inmunitario, y en los ancianos, por deterioro (30).
- Estado nutricional: el déficit en nutrientes y oligoelementos condiciona una función del sistema inmunitario inapropiada (31).
- Estrés físico y psíquico: las condiciones de estrés condicionan un cierto grado de inmunodepresión (31).
- Inmunodeficiencias e inmunosupresión: toda situación en la que la función inmunitaria esté deprimida facilitará la tolerancia frente a sustancias extrañas, como las proteínas recombinantes (32).
- Fármacos o agentes químicos: estas sustancias pueden tener un doble efecto según que depriman la función de las células del sistema inmunitario o funcionen como adyuvantes que potencian las respuestas inmunitarias (33). Además pueden funcionar como transportadores de proteínas recombinantes que sean haptenos e inducir una respuesta inmune.
- Infecciones: los agentes microbianos pueden facilitar la respuesta del sistema inmune frente a una proteína recombinante mediante diversos mecanismos (34). Así, el adyuvante completo de Freund o el lipopolisacárido de las paredes bacterianas pueden inducir activación policlonal de linfocitos B y facilitar

las respuestas de Acs. También es posible inducir respuestas policlonales por el efecto activador de superantígenos bacterianos y virales (35). Diversas moléculas derivadas de microorganismos pueden actuar de transportadores de proteínas recombinantes (haptenos) que por sí solos no inducen respuestas inmunitarias, pero sí al unirse a esos transportadores. Los microorganismos también pueden inducir una respuesta inmunitaria frente a la proteína exógena por un mecanismo de mimetismo molecular (36).

Factores relativos a la manufactura del producto

Los procedimientos de clonaje y producción de una proteína recombinante en su fase de experimentación básica son relativamente fáciles de controlar dado que se tratan de experimentos a pequeña escala, donde cada una de las variables del proceso es fácil de supervisar. Evidentemente, las empresas farmacéuticas, una vez que se deciden a sacar un producto recombinante al mercado, se encargan de establecer rigurosos controles de calidad durante todo el proceso de producción. Como se ha comentado al principio de esta revisión, el efecto inmunogénico no es el que se busca con una proteína recombinante y es posible que pequeñas modificaciones en la producción a gran

escala (impurezas y contaminantes de las células huésped productoras, modificaciones proteicas, formación de agregados, etc.) repercutan en la capacidad inmunogénica de la molécula (37).

Por otro lado, el mantenimiento de la cadena del frío suele ser crucial para un correcto mantenimiento de la proteína recombinante. Dado que se trata de productos que en muchas ocasiones se administran por el propio paciente, es frecuente que los viales se conserven a temperatura ambiente, lo que puede facilitar la formación de agregados y la oxidación del producto, especialmente en aquellos productos liofilizados (38). Otras veces, para evitar el problema con los productos liofilizados, la proteína recombinante se suministra en suspensión líquida acompañada de moléculas estabilizadoras. Hasta hace unos años la más utilizada era la albúmina sérica humana. Sin embargo, el empleo de este estabilizador se ha prohibido en la Unión Europea, pero no en EEUU, debido al riesgo de transmisión de encefalopatía. La albúmina se ha sustituido normalmente por otros estabilizadores como el Tween-80 y aceites de glicerol (39). En este sentido, es posible especular que combinaciones como la anterior aumenten la inmunogenicidad de la proteína recombinante administrada en la suspensión por un efecto adyuvante (40).

Factores relativos a la administración del antígeno

Además de todos los factores descritos hasta el momento, existen otros propios de la forma de administración de la proteína recombinante que pueden ser los determinantes de la producción de una respuesta inmunitaria y que tienen una explicación lógica desde el punto de vista de la Inmunología.

El primero de estos factores es la vía de administración del antígeno. Así, las rutas subcutánea (s.c.) e intramuscular (i.m.) serían las más inmunogénicas. En segundo término estaría la vía intravenosa (i.v.) y, en último lugar, sería la vía oral (v.o.) la que tendría menor capacidad inmunogénica (20). Este orden es lógico si se piensa en las rutas que se emplean para la administración de vacunas, que son la s.c. o la i.m. En cambio, nunca se emplea la inyección i.v. para vacunar y conseguir una respuesta de Acs protectora. Además, la v.o. no sólo no se emplea para conseguir una correcta vacunación frente a un antígeno, sino que se ha utilizado como ruta de tolerización frente auto-

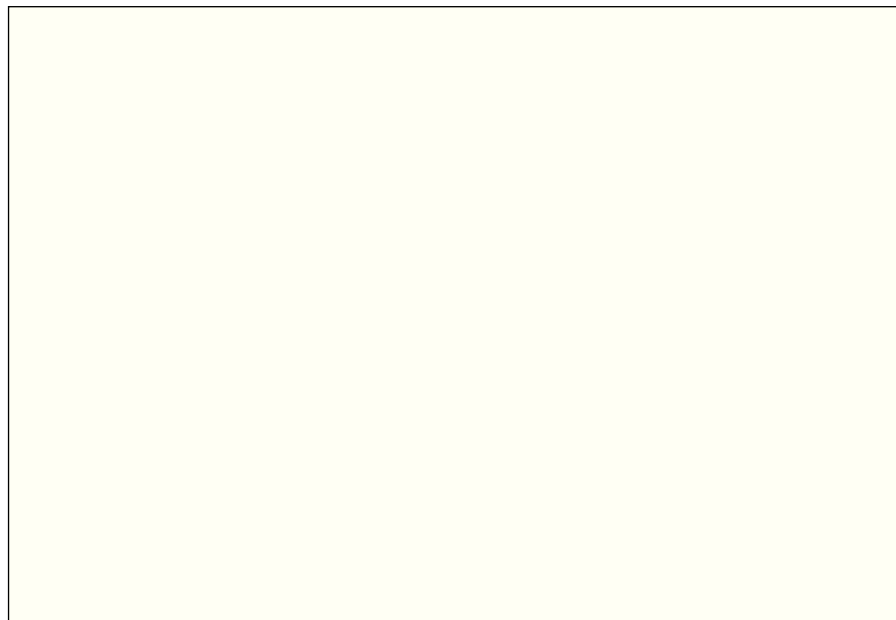


Fig. 2: Factores relativos al huésped no genéticos que influyen en las respuestas inmunes. Además de la contribución genética, sobre todo del sistema HLA, existen múltiples características y situaciones temporales, propias del huésped donde se induce la respuesta inmune, que pueden modificar el funcionamiento normal del sistema inmunitario y del desarrollo de las respuestas inmunes.

antígenos en modelos experimentales de enfermedades autoinmunes (41).

La explicación inmunológica para la diferente capacidad inmunogénica de las rutas de administración de un antígeno radica en el tipo de células presentadoras del antígeno (APC) que se encuentran en un tipo u otro de localización. Así, cualquier antígeno o proteína recombinante que entre en nuestro organismo por vía s.c. o i.m. será captada inmediatamente por células dendríticas y macrófagos presentes en la epidermis o en tejidos circundantes (42). Estos dos tipos de APC rápidamente migrarán hacia los ganglios linfáticos periféricos donde interaccionarán con las células T colaboradoras específicas para el antígeno que origina esta reacción. Posteriormente, estas células T activadas antígeno-específicas podrán interaccionar con células B antígeno-específicas promoviendo la producción de Acs dirigidos frente al antígeno primitivo (Figura 3). En cambio, cuando la entrada del antígeno es i.v., será captado por otro tipo de APC como las células B que, además de producir Acs también puede procesar el antígeno y presentarlo a las células T colaboradoras. La razón de la distinta inmunogenicidad entre las rutas radica en que las células dendríticas y los macrófagos son unas APC más eficaces que las células B y, por lo tanto, tienen mayor capacidad de inducir una respuesta inmunitaria (10). En la figura 4 se esquematizan las principales características de las APC que ayudan a

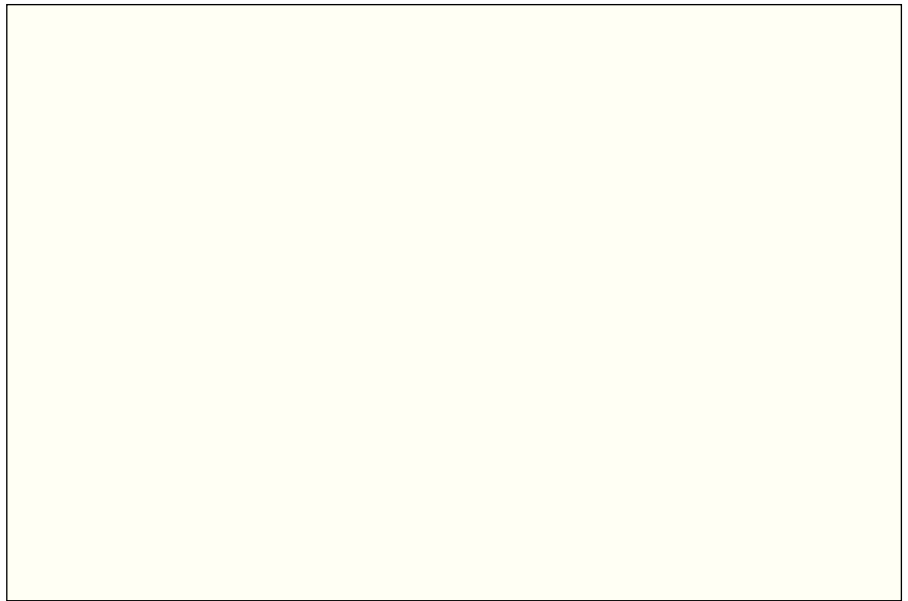


Fig. 4: Características diferenciales de los tres tipos principales de células presentadoras del antígeno. Las diferencias, especialmente las resaltadas en negrita, en la figura ayudan a entender la mayor capacidad para inducir respuestas inmunes que posee la presentación a través de las células dendríticas, seguido de la producida por los macrófagos y, en último lugar, la realizada por las células B.

comprender la diferente capacidad presentadora de antígeno.

Por último, es importante considerar también la dosis y duración del tratamiento. En principio, tanto las dosis muy bajas como las muy altas se consideran tolerogénicas o poco inmunogénicas. Más importante parece ser la administración de forma crónica de un agente. De este

modo, administraciones puntuales no se consideran que tengan capacidad inmunogénica, pero sí aquellas administraciones que se producen a intervalos regulares y de forma crónica (20). De esta manera, el antígeno se mantiene de forma continuada en la zona de entrada al organismo (piel o tejido subcutáneo) y las células dendríticas pueden captarlo y procesarlo continuamente. Este es el mecanismo por el que pueden actuar también los aceites y otros adyuvantes que pueden acompañar a la proteína recombinante. Estos compuestos forman pequeños microdepósitos (por ejemplo, micelas) en el sitio de administración que producen una liberación retardada del antígeno, de modo que la estimulación antigénica continúa más allá del momento de la inyección.

Conclusiones

La utilización terapéutica de proteínas recombinantes se ha implantado a gran escala en la práctica médica. Estas moléculas se caracterizan por asemejarse extraordinariamente a la molécula original a la que intentan suplir. A pesar de ello, en ocasiones pueden originar reacciones del sistema inmunitario las cuales se caracterizan fundamentalmente por la producción de Acs dirigidos frente a la proteína recombinante y frente a la molécula humana endógena. Estos Acs pueden ser inocuos o producir una pérdida de efecto de la molécula recombinante. El desenca-

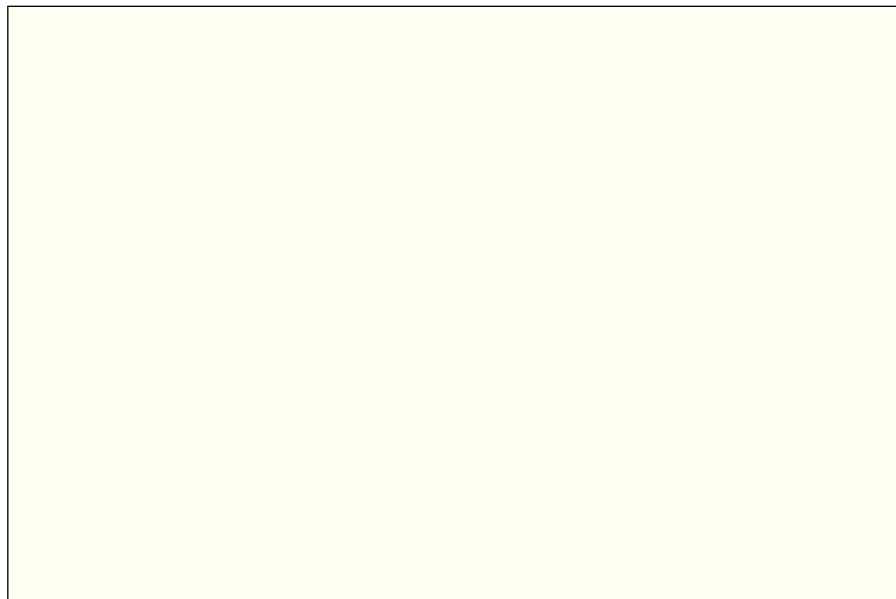


Fig. 3: Las células presentadoras del antígeno (en la figura las células dendríticas interdigitantes) captan el antígeno en la zona de entrada (la piel). Desde este sitio, estas células migrarán a los ganglios linfáticos donde presentarán el antígeno a las células T. La interacción entre la célula T y la célula presentadora del antígeno en esta localización inducirá la activación de las células T y el inicio de una respuesta inmune adquirida. Estas células T activadas contribuirán también a la activación de las células B específicas del antígeno y a la producción de Acs.

denamiento de una respuesta inmunitaria frente a estos productos o biofármacos normalmente no se debe sólo a sus características intrínsecas, sino a la suma de otros factores añadidos, como los genéticos, ambientales, de manufactura o derivados del modo de administración del producto. Es importante considerar cada uno de estos factores en el caso de producirse una reacción inmunitaria frente a una proteína recombinante y valorar el posible riesgo inmunológico que puede suponer un cambio en cualquiera de los pasos conducentes a la administración final del producto descritos en esta revisión.

Referencias bibliográficas

- Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA* 2001; 285: 540-4.
- Staudt LM, Brown PO. Genomic views of the immune system. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 829-59.
- Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S. Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA* 2001; 286: 2296-307.
- Huston JS, George AJ. Engineered antibodies take center stage. *Hum Antibodies* 2001; 10: 127-42.
- Koths K. Recombinant proteins for medical use: the attractions and challenges. *Curr Opin Biotech* 1995; 6: 681-7.
- Thomas SM. Genomics: the implications for ethics and education. *Br Med Bull* 1999; 55: 429-45.
- Wierda D, Smith HW, Zwickl CM. Immunogenicity of biopharmaceuticals in laboratory animals. *Toxicology* 2001; 158: 71-4.
- Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 457-62.
- Porter S. Human immune response to recombinant human proteins. *Pharma Sci* 2000; 90: 1-11.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 4ª ed. Nueva York: Garland Publishing, 1999: 33-76.
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-74.
- Richards S. Immunologic considerations for enzyme replacement therapy in the treatment of lysosomal storage disorders 2002; 2: 241-53.
- Grauer A, Frank-Raue K, Schroth J, Raue F, Ziegler R. Neutralizing antibodies against salmon calcitonin. The cause of a treatment failure in Paget's disease. *Dtsch Med Wochenschr* 1994; 119: 507-10.
- Chafee S, Mary A, Stiehm ER, Girault D, Fischer A, Hershfield MS. IgG antibody response to polyethylene glycol-modified adenosine deaminase in patients with adenosine deaminase deficiency. *J Clin Invest* 1992; 89: 1643-51.
- Dummer R, Muller W, Nestle F, Wiede J, Dues J, Lechner W, et al. Formation of neutralizing antibodies against natural interferon- β , but not against recombinant interferon- γ during adjuvant therapy for high-risk malignant melanoma. *Cancer* 1991; 67: 2300-4.
- Frasier SD. Human pituitary growth hormone (hGH) therapy in growth hormone deficiency. *Endocr Rev* 1983; 4: 155-70.
- Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Eng J Med* 2002; 7: 469-75.
- Konstsek P, Liptakova H, Kontsekova E. Immunogenicity of interferon- α 2 in therapy: structural and physiological aspects. *Acta Virol* 1999; 43: 63-70.
- Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ, Gurd FRN, Hannum C, Leach SJ, et al. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu Rev Immunol* 1984; 2: 67-101.
- Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, 1988: 53-137.
- Benz I, Schmidt A. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 2002; 45: 267-76.
- Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Eng J Med* 2002; 346: 752-63.
- Hahn BV. Antibodies to DNA. *N Eng J Med* 1998; 338: 1359-68.
- Nakra P, Manivel V, Vishwakarma RA, Rao KV. B cell responses to a peptide epitope. X. Epitope selection in a primary response is thermodynamically regulated. *J Immunol* 2000; 164: 5615-25.
- Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Eng J Med* 2001; 345: 340-50.
- Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 261-92.
- Klein J, Sato A. The HLA system: first of two parts. *N Eng J Med* 2000; 343: 702-9.
- Prabhakar SS, Muhlfelder T. Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia. *Clin Nephrol* 1997; 47: 331-5.
- Kamradt T, Mitchinson NA. Tolerance and autoimmunity. *N Eng J Med* 2001; 344: 655-64.
- Martinez-Taboada V, Bartolome MJ, Amado JA, Blanco R, Garcia-Unzueta MT, Rodriguez-Valverde V, et al. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 1477-86.
- Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today* 2000; 21: 192-9.
- Arnaiz A, Perez-Blas M, Subiza JL, Artal P. *Immunopatología*. 1ª ed. Madrid: Sintesis SA, 1997: 435-45.
- Warren HS, Vogel FR, Chedid LA. Current status of immunological adjuvants. *Annu Rev Immunol* 1986; 4: 369-88.
- Wucherpfennig KW. Mechanism for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest* 2001; 108: 1097-104.
- Torres BA, Jonson HM. Modulation of disease by superantigens. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 465-70.
- Benoist C, Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol* 2001; 2: 797-801.
- DiPaolo B, Pennetti A, Nugent L, Venkat K. Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology. *Pharm Sci Technol Today* 1999; 2: 70-82.
- Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 2000; 203: 1-60.
- Waterman KC, Adami RC, Alsante KM, Hong J, Landis MS, Lombardo F, et al. Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharm Dev Technol* 2002; 7: 1-32.
- Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001; 19: 2673-80.
- Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997; 18: 335-43.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system: first of two parts. *N Eng J Med* 2000; 343: 37-49.