

Compuestos inorgánicos como adyuvantes de vacunas

Armando A Paneque-Quevedo

Dirección de Producción, Centro de Química Biomolecular, CQB
Calle 200 y Ave. 21, Atabey, Playa, La Habana, Cuba
armando.paneque@cqb.cu, armandopaneque@infomed.sld.cu,
panecu@yahoo.com

RESUMEN

La propiedad adyuvante de los minerales fue descubierta en 1926, al observarse que una suspensión de toxoide diftérico precipitado con sulfato doble de aluminio y potasio proveía de una inmunogenicidad notablemente superior al toxoide sin adyuvante. Desde entonces se han evaluado numerosas sales inorgánicas como adyuvantes de vacunas y las únicas aprobadas para su uso en seres humanos son la alúmina, el fosfato e hidróxido de aluminio y el sulfato de hidroxifosfato de aluminio. El fosfato de calcio se ha utilizado en algunas vacunas europeas. Las propiedades adyuvantes de las sales inorgánicas son muy dependientes del proceso de obtención e inciden sobre los efectos depósito y presentador atribuidos a estas. La no observancia de ello ha conducido al rechazo de muchas sales con mejores propiedades adyuvantes que las tradicionales sales de aluminio. La aplicación de los últimos avances de la nanotecnología y la alternativa de combinar adyuvantes han motivado la síntesis y evaluación de nuevos adyuvantes. En esta revisión se describen los adyuvantes inorgánicos citados con mayor frecuencia y sus potencialidades para el desarrollo de vacunas más eficaces que las que poseen sales de aluminio como adyuvantes.

Palabras clave: adyuvantes inorgánicos, sales de aluminio, alúmina, vacuna

Biotecnología Aplicada 2013;30:243-249

ABSTRACT

Inorganic compounds as vaccine adjuvants. The adjuvant capacity of minerals was first discovered in 1926, when a suspension of diphtheria toxoid precipitated with potassium aluminum sulfate was found to be significantly more immunogenic than the same suspension in the absence of this compound. Although a large number of inorganic salts has since been evaluated for this purpose, only alum, phosphate and aluminum hydroxide, and aluminum sulfate hydroxyphosphate have been approved in humans, and calcium phosphate is included in some vaccines manufactured in Europe. In the past, lack of awareness of the fact that the adjuvant properties of inorganic salts are highly dependent on nuances of their production processes that directly affect the depot and presenting effects attributed to adjuvants has led to the rejection of many compounds with potentially better adjuvant properties than traditional aluminum salts. However, the application of recent advances in nanotechnology and the combination of different adjuvants have led to the emergence and evaluation of a large number of new alternatives. The present review describes the most frequently cited inorganic adjuvants, examining their potential for the development of more potent vaccines than the current crop of products using aluminum-based compounds.

Keywords: inorganic adjuvants, aluminum salts, alum, vaccine

Introducción

Los minerales son los constituyentes básicos de la corteza terrestre y los componentes principales de los fertilizantes, los productos químicos, la industria del papel, la pintura y la cosmética. En medicina se emplean como ingredientes farmacéuticos activos o aditivos en formulaciones antiácidas y en suplementos nutricionales; en formulaciones novedosas se emplean como excipientes, transportadores y encapsuladores; y en la formulación de vacunas se emplean como adyuvantes [1-3].

En la actualidad, la vacunación es una de las intervenciones médicas preventivas más efectivas y seguras. Desde su descubrimiento, son el mejor medio para prevenir enfermedades, y se consideran el mayor logro de la salud pública de todos los tiempos [4]. Estas inducen una respuesta inmune más potente y prolongada cuando en su composición química incluyen un adyuvante [5-8].

Los adyuvantes son sustancias que en combinación con los antígenos favorecen la estimulación del sistema inmunitario y aumentan la efectividad de las vacunas. La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa 'ayudar, asistir' [7, 8]. La propiedad adyuvante de los minerales fue descubierta por Gleny

et al. en 1926 cuando observaron que una suspensión de toxoide diftérico precipitado con sulfato doble de aluminio y potasio, tenía una inmunogenicidad notablemente superior a la del toxoide sin adyuvante [9].

Los trabajos de revisión más recientes sobre adyuvantes, se enfocan más en aquellos inmunoestimuladores (saponinas-QS21, oligonucleótidos CpG, lipopolisacáridos, monofosforil lipido A, citoquinas), en los de naturaleza lipídica (liposomas, virosomas, *cochleates*), en los llamados particulados (partículas de polaxámero, semejantes a los virus), y solo dedican algunas líneas para comentar las tradicionales sales de aluminio [4, 5].

Muy pocos estudios profundizan en los otros compuestos inorgánicos, dando la falsa idea de que los adyuvantes inorgánicos sólidos son un campo agotado, y que la comunidad científica debe concentrarse más en los adyuvantes provenientes de productos que actúen como fuentes de señales de peligro para el sistema inmunitario. Sin embargo, el adyuvante óptimo para todos los antígenos no se ha encontrado y muchos candidatos muy potentes se han rechazado por problemas de estabilidad, toxicidad y el elevado costo

1. Chang L. Industrial mineralogy: materials, processes, and uses. New Jersey: Prentice-Hall; 2001.

2. Carretero MI, Pozo M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries. Part II. Active ingredients. *Appl Clay Sci.* 2010;47:171-81.

3. Reinke CM, Breitzkreutz J, Leuenberger H. Aluminium in over-the-counter drugs risks outweigh benefits? *Drug Safety.* 2003; 26(14):1011-25.

4. Harandi AM, Gwyn D, Olesen OF. Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(3):293-8.

5. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol.* 2008;38: 2068-71.

6. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res.* 2002;19(6):715-28.

7. Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine.* 2002;20:24-33.

de los procesos para su obtención [10-12].

Un análisis detallado de las fuentes y el procedimiento para la obtención de los minerales utilizados como adyuvantes sugiere que controlando las condiciones de obtención de algunos de estos y modificando sus propiedades químico-físicas, es posible obtener adyuvantes que solos o unidos a otros adquieren propiedades de adyuvación muy superiores a las de las tradicionales sales de aluminio.

Esta revisión resume información sobre los compuestos inorgánicos sólidos utilizados como adyuvantes en formulaciones vacunales para su uso en seres humanos, en la medicina veterinaria y para la obtención de anticuerpos. Se enfoca en los detalles estructurales de algunos de estos compuestos que, por su importancia, se ha publicado abundantemente información. El resto de los materiales que no se han aplicado en la clínica en formulaciones vacunales, no se discuten de manera pormenorizada; solo se describen los tipos de estudio en que se utilizaron.

Mecanismo de acción

Los adyuvantes vacunales forman un depósito en el sitio de la inyección, donde se libera lentamente el antígeno y se mantiene durante más tiempo. Este fenómeno provoca una respuesta inmunitaria de mayor intensidad. Por mucho tiempo se consideró que era su único o principal mecanismo de acción [13-16].

Se conoce que las acciones de los adyuvantes son más complejas, y que además de la persistencia física, promueven fenómenos inflamatorios con liberación de citoquinas y una intervención más eficaz de las células presentadoras de antígeno. Ello se debe a su naturaleza particulada y su tamaño inferior a 10 µm, que favorecen su reconocimiento. De este modo, el antígeno se libera al sistema inmunitario de forma más efectiva. También se han descrito los mecanismos de estimulación de células inmunocompetentes mediante la activación del complemento, la inducción de eosinofilia en el sitio de la inyección y la activación de macrófagos [8].

En el año 2008, varios grupos de inmunólogos propusieron que la activación del complejo inflammasoma, un complejo de proteínas con varias funciones en el sistema de defensa natural [5], era otro de los mecanismos de acción. Se considera que el factor que estimula este mecanismo es la naturaleza particulada del adyuvante y no su naturaleza química [17, 18].

Limitaciones

Las limitaciones de estos adyuvantes incluyen reacciones adversas locales como inflamación, granulomas, abscesos y la inducción de respuestas inmunes caracterizadas por la producción de inmunoglobulina E (IgE), asociadas con reacciones alérgicas. Además, no son tan potentes en la inducción de anticuerpos, ni efectivos en la inducción del patrón auxiliador de células T auxiliaadoras tipo 1 (Th1) protector para microorganismos de vida intracelular, específicamente células T citotóxicas [19-26].

Por lo general, las estructuras cristalinas de estos compuestos se modifican cuando disminuye la temperatura. Se ha postulado que durante la congelación y cristalización del disolvente, las partículas coloidales se concentran en regiones llamadas 'concentrados por congelación'. Las partículas suspendidas en estas re-

giones se aproximan estrechamente unas a otras hasta vencer las fuerzas repulsivas y formar un sistema de partículas coaguladas o aglomeradas. Una vez coaguladas, la suspensión original no se puede reproducir [27]. La ruptura irreversible de la estructura del gel afecta la estabilidad física de las vacunas y, consecuentemente, ocurre una disminución notable de su potencia [28]. Por tales razones, no se logran producir vacunas liofilizadas con estos adyuvantes. Además, se recomienda no almacenarlas en torno a 0 °C.

Adsorción

El aumento de la respuesta inmune provocada por los adyuvantes inorgánicos depende de sus estructuras, propiedades y mecanismos de adsorción. Se ha postulado que los principales mecanismos de adsorción entre los antígenos y los adyuvantes son las fuerzas de atracción electrostáticas, el intercambio de ligando y las interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, en algunos sistemas se considera que las fuerzas de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno también contribuyen a la adsorción [29-31].

Las propiedades de los adyuvantes inorgánicos que mayor impacto tienen sobre la adsorción son el tamaño medio de la partícula, la morfología y la carga superficial. Esta última es el parámetro más importante para optimizar la adsorción del antígeno. Los adyuvantes con un punto de carga cero por encima del pH fisiológico, estarán cargados positivamente y adsorberán los antígenos cargados negativamente. Mientras que aquellos con puntos de carga cero inferiores al pH fisiológico, adsorberán los antígenos cargados positivamente. Las interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals predominarán cuando los valores del punto de carga cero del adyuvante y del punto isoelectrico del antígeno sean muy similares. El grado de adsorción dependerá de la naturaleza y la concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones como tampones y del pH de la mezcla resultante [32, 33].

Recientemente se planteó que durante la adsorción pueden ocurrir cambios estructurales en el antígeno adsorbido. Esta transformación estructural puede incrementar la susceptibilidad del antígeno a los procesos de proteólisis por el sistema inmunitario y favorecer la presentación del antígeno [34, 35].

Compuestos inorgánicos empleados como adyuvantes

Sales de aluminio

Las sales de aluminio son los adyuvantes más utilizados en la vacunología. El primer adyuvante que se usó fue el sulfato doble de aluminio y potasio ($KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$), para la obtención de los aluminatos de toxoide tetánico (TT) y toxoide diftérico. Sus características son muy similares a las del fosfato de aluminio [36].

El hidróxido y fosfato de aluminio y posteriormente el sulfato de hidroxifosfato de aluminio son los únicos adyuvantes de aluminio aprobados para emplear en las vacunas licenciadas actualmente para seres humanos. La cantidad de aluminio está limitada a no más de 0.85 mg/dosis, en EE.UU. En 1981, el nivel permisible se elevó hasta 1.25 mg, en Europa. A continuación se resumen algunas vacunas aprobadas

8. Gupta RK. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32: 155-72.

9. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:287-93.

10. Lahiri A, Das P, Chakravorty D. Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine*. 2008;26:6777-83.

11. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317-37.

12. Tagliabue A, Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. *Hum Vaccine*. 2008;4(5):347-9.

13. Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004;22: 3658-68.

14. Glenny AT, Buttle GAH, Stevens MF. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol*. 1931;34:267-75.

15. Holt LB. Developments in diphtheria prophylaxis. London: William Heinemann, Ltd.; 1950.

16. Ramanathan VD, Badenoch-Jones P, Turk JL. Complement activation by aluminium and zirconium compounds. *Immunology*. 1979;37:881-8.

17. Harris J, Sharp FA, Lavelle Ed. C. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 2010;40:595-653.

18. Shar AF, Ruane D, Claas B, Creagh E, Harris J, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(3):870-5.

19. Esch HH. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002;20:S34-S39.

20. Davenport FM, Hennessy AV, Askin FB. Lack of adjuvant effect of AIPO4 on purified influenza virus hemagglutinins in man. *J Immunol*. 1968;100(5):1139-40.

21. Cvjetanovic B, Uemura K. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. *Bull WHO*. 1965;32:29-36.

22. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, Bittle JL, Houghton RA, Lerner RA, et al. Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*. 1987;61:1-6.

23. Bomford R. Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological adjuvants and vaccines*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1989. p. 35-41.

24. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, Brown F, Bittle JL, Houghton RA, et al. Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*. 1985;66:2347-54.

25. Lew AM, Anders RF, Edwards SJ, Langford CJ. Comparison of antibody avidity and titre elicited by peptide as a protein conjugate or as expressed in vaccinia. *Immunology*. 1988;65(2):311-4.

Tabla. Vacunas con adyuvantes inorgánicos aprobadas para su uso en seres humanos

Tipo de vacuna	Vacuna	Adyuvante	Contenido de Al ³⁺	Productor
Antimeningocócica BC	VA-Mengoc-BC®	Al(OH) ₃	2 mg	Instituto Finlay, Cuba
Antineumocócica	Prevenar®	AlPO ₄	0.125 mg	Wyeth Pharmaceuticals Inc.
	Prevenar 13®	AlPO ₄	0.125 mg	
Ántrax absorbido	BioThrax®	Al(OH) ₃	1.2 mg/mL	BioPort Corporation
DT	DT adsorbidos USP	Alúmina	≤ 0.25 mg	Sanofi Pasteur Inc.
	Decavac®		≤ 0.28 mg	
	Td (genérico)		≤ 0.28 mg	
DTaP	Boostrix®	Alúmina	≤ 0.39 mg	GlaxoSmithKline
	Infanrix®	Al(OH) ₃	≤ 0.625 mg	
	Kinrix®*	Al(OH) ₃	≤ 0.6 mg	
	Adacel®	AlPO ₄	1.5 mg	Sanofi Pasteur Inc.
	Daptacel®	AlPO ₄	0.33 mg	
	Tripedia®	Alúmina	≤ 0.17 mg	
DTaP y Hib	TriHIBit®	Alúmina	≤ 0.17 mg	Sanofi Pasteur Inc.
DTaP, hepatitis B, IPV	Pediarix®	AlPO ₄ y Al(OH) ₃	0.85 mg	GlaxoSmithKline
DTaP, IPV, Hib	Pentacel®	AlPO ₄	0.33 mg	Sanofi Pasteur Inc.
Hepatitis A inactivada	Havrix®	Al(OH) ₃	0.5 mg/mL	GlaxoSmithKline
	Vaqta®	Al(OH) ₃	0.45 mg/mL	Merck & Co., Inc.
Hepatitis B	Engerix-B®	Al(OH) ₃	≤ 0.5 mg/mL	GlaxoSmithKline
	Recombivax HB®	Al(OH) ₃	≤ 0.5 mg/mL	Merck & Co., Inc.
Hepatitis A y B	Twinrix®	AlPO ₄ y Al(OH) ₃	0.45 mg/mL	GlaxoSmithKline
Hib	PedvaxHIB®	Al ₂ (PO ₄) ₃ (OH) (SO ₄)	0.22 mg	Merck & Co., Inc.
Hib y hepatitis B	Comvax®	Al(OH) ₃ amorfo	0.225 mg	Merck & Co., Inc.
HPV	Cervarix®	Al(OH) ₃	0.5 mg	GlaxoSmithKline
	Gardasil®	Al ₂ (PO ₄) ₃ (OH) (SO ₄)	0.22 mg	Merck & Co., Inc.
HPV tetravalente	Gardasil®	Al ₂ (PO ₄) ₃ (OH) (SO ₄)	0.225 mg	Merck & Co., Inc.
HPV2 bivalente	Cervarix®	AS04 (Al(OH) ₃)	0.5 mg	GlaxoSmithKline
Hepatitis B	Fendrix®	AS04 (Al(OH) ₃)	0.5 mg	GlaxoSmithKline
TT adsorbido	IPAD-T	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1-3 mg/mL	Instituto Pasteur, Francia

DT: toxoide diftérico y toxoide tetánico; DTaP: toxoide diftérico, toxoide tetánico y pertusis acelular; Hib: *Haemophilus influenzae* tipo B; HPV: papilomavirus humano; IPV: vacuna de antipoliomielítica inactivada; TT: toxoide tetánico.

* Kinrix® incluye además la IPV.

para uso en seres humanos que emplean adyuvantes inorgánicos (Tabla) [37].

Stanley L Hem *et al.* estudiaron la naturaleza químico-física del hidróxido y el fosfato de aluminio, y demostraron que el hidróxido de aluminio como adyuvante es un sólido cristalino [38-41]. Su estructura se corresponde con la del mineral oxihidróxido de aluminio (AlO(OH)), conocido como bohemita, que tiene una morfología en forma de fibras con un tamaño promedio de partícula primario de $4.5 \times 2.2 \times 10$ nm. Ello le proporciona una gran superficie para la adsorción de los antígenos. El punto de carga cero tiene un valor de pH entre 9 y 11. Se comercializa bajo la marca Alhydrogel [38-41].

El AlPO₄ es un sólido amorfo, no estequiométrico, con una relación variable de OH-PO₄, que responde a la fórmula química de Al(OH)_m(PO₄)_n. Su morfología es en láminas y el tamaño primario de la partícula es de alrededor de 50 nm. Su punto de carga cero tiene un valor de pH entre 5 y 7. Se comercializa bajo el nombre de Adju-Phos [42].

En estos complejos, el acuo-ión Al³⁺ ocupa posiciones tetraédricas y octaédricas. La carga neta superficial de estos dos adyuvantes influye en el modo de unirse a los antígenos, y en su liberación después de la inyección y exposición al suero fisiológico, el cual es muy próximo al pH neutro [41]. En disolución, ambos adyuvantes forman agregados porosos con diámetros que varían de 1 a 10 nm.

Las velocidades de disolución de estos dos adyuvantes en el fluido intersticial *in vitro* e *in vivo* también

son diferentes. El fosfato se disuelve relativamente rápido, mientras que el hidróxido es difícil de disolver *in vitro*, y puede persistir por periodos prolongados *in vivo*. La disolución de estas sales se favorece por la presencia de los ácidos plasmático, cítrico, láctico, málico, etc. Se calcula que al mes ya se ha solubilizado y pasado a la circulación sanguínea el 17 % si es con hidróxido y el 51 % si es con fosfato de aluminio [42].

Sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo

El sulfato de hidroxifosfato de aluminio (Al₂(PO₄)₃(OH) (SO₄)) es un compuesto producido por la compañía química farmacéutica Merck. Su estructura se parece más a la del fosfato de aluminio, pero sus propiedades difieren entre sí. Posee una estructura amorfa en malla y su punto de carga cero es de 7. Se utiliza como adyuvante en una vacuna contra el virus del papiloma humano. Tiene mayor afinidad para unirse y estabilizar las partículas similares a virus (VLP) que las otras sales de aluminio [43].

Cloruro de aluminio

El cloruro de aluminio es un compuesto anfótero que se disuelve en agua y forma hidróxido de aluminio. Se utilizó como adyuvante para aumentar los volúmenes de antiseros contra el veneno de la cobra [44, 45].

Hidroxicarbonato de aluminio

El hidroxicarbonato de aluminio (Alum HC) se forma cuando el anión carbonato se une al aluminio en la estructura del gel de hidróxido de aluminio. Frecuen-

26. Geerligts HJ, Weijer WJ, Welling GW, Welling-Wester S. The influence of different adjuvants on the immune response to a synthetic peptide comprising amino acid residues 9-21 of herpes simplex virus Type 1. *J Immunol Methods*. 1989;124(1):95-102.

27. Tripathy T, Ranjan D. Flocculation: A New Way to Treat the Waste Water. *J Phys Sci*. 2006;10:93-127.

28. World Health Organization. Temperature sensitivity of vaccines. WHO/IVB/06.10. Geneva: World Health Organization; 2006.

29. Rinella JV, White JL, Hem SL. Effect of pH on the Elution of Model Antigens from Aluminum-Containing Adjuvants. *J Colloid Interface Sci*. 1995;205(1):161-5.

30. Al-Shakhshir R, Regnier F, White JL, Hem SL. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 1994;12(5):472-4.

31. Al-Shakhshir R, Lee AL, White JL, Hem SL. Interactions in Model Vaccines Composed of Mixtures of Aluminum-Containing Adjuvants. *J Colloid Interface Sci*. 1995;169:197-203.

32. Seeber SJ, White JL, Hem SL. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 1991;9(3):201-3.

33. Clapp T, Siebert P, Chen D, Braun LJ. Vaccines with Aluminum-Containing Adjuvants: Optimizing Vaccine Efficacy and Thermal Stability. *J Pharm Sci*. 2011;100(2):388-401.

temente se utiliza como antiácido. Su efecto adyuvante se comparó con el de otros 24 adyuvantes, para la inducción de la respuesta inmune humoral contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2) en ratones. Se demostró que, al igual que los otros adyuvantes de aluminio, induce anticuerpos contra la proteína gp120 de la envoltura externa [46].

Silicato de aluminio

Los silicatos de aluminio (Al_2SiO_5) aparecen en la naturaleza como formas hidratadas. Se han usado ampliamente en la industria farmacéutica y dental. La bentonita al 1 % es la forma estudiada como adyuvante en vacunas. Se ensayó para aumentar la respuesta de IgE en animales de experimentación con resultados positivos en la producción del anticuerpo IgG1. Su comportamiento fue similar al compararlo con la alúmina [47]. También se empleó al 2 % en un estudio para evaluar la eficacia de cuatro adyuvantes en el aumento de los volúmenes de anticuerpos contra la rabia en caballos [48].

En un estudio más reciente en ovejas se demostró que la vacuna de enterotoxemia adsorbida en bentonita es mejor, desde el punto de vista económico, que la adsorbida en sulfato doble de aluminio y potasio [49].

Métodos de obtención de las sales de aluminio

Los óxidos e hidróxidos de aluminio se preparan generalmente adicionando disoluciones de NaOH o NH_3 a una disolución de alguna sal de aluminio (AlCl_3 , $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$). Los otros compuestos se obtienen de igual manera, pero adicionando, al mismo tiempo, una sal de fosfato (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), bicarbonato o sulfato, etc. Las propiedades del gel resultante, que incluyen el área y la carga superficial, la composición química y la estructura dependen notablemente del proceso de producción. Diversos factores como el pH, la temperatura, la concentración y los parámetros técnicos (la geometría del reactor y la velocidad de mezclado), entre otros, influyen en la calidad del gel resultante, que se mide por el contenido de aluminio y de algunos iones (nitratos, sodio, cloruros, sulfatos), la esterilidad, la viscosidad, las propiedades de sedimentación, la capacidad adsorbida, el punto de carga cero, entre otros [50].

Durante el proceso de obtención de estos geles se forman varias estructuras hidratadas amorfas con diferentes especies de aluminio en equilibrios múltiples. Por ejemplo, en una disolución acuosa a valores de pH menores de 3, el aluminio existe como el acuó ion complejo $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, usualmente abreviado como Al^{3+} . Al aumentar ligeramente el pH, el $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ experimenta un proceso de desprotonación sucesiva, formando el ión $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ y una serie de hidrocomplejos [51, 52]. A un pH cercano a 7 comienza la precipitación del $\text{Al}(\text{OH})_3$. Finalmente, a pH básico, el $\text{Al}(\text{OH})_3$ se redisuelve y se forma el ión aluminato $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$.

Sales de calcio

Fosfato de calcio

El fosfato de calcio fue originalmente desarrollado por el Profesor Edgar H Relyveld, del Instituto Pasteur, como alternativa a los adyuvantes de aluminio. Desde entonces se empleó como adyuvante en las vacunas

contra la difteria, el tétano, la tosferina, la poliomielitis, el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), la fiebre amarilla, el sarampión, la hepatitis B y varios alérgenos [53-55].

Aunque tiene propiedades similares a los compuestos de aluminio, esta sal posee varias ventajas potenciales. Es un constituyente normal del cuerpo humano y, como tal, es bien tolerada; adsorbe eficientemente los antígenos y se libera lentamente; y genera niveles elevados de anticuerpos IgG. No incrementa la producción de IgE, por lo que es más segura contra reacciones adversas a largo plazo, que solo se pueden reconocer después de muchos años en la etapa de poscomercialización de las vacunas. Tras la administración de vacunas contra *Bordetella pertussis* adsorbidas con este adyuvante se han observado reacciones neurológicas esporádicas. La Organización Mundial de la Salud y la farmacopea Europea recomiendan una concentración límite de 1.3 mg de calcio/dosis [56].

El fosfato de calcio adyuvante tiene una composición química cercana a la fórmula $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Mediante las técnicas de difracción de rayos X, la espectroscopía infrarroja, el análisis térmico, entre otras, se demostró que el fosfato de calcio comercial es una hidroxiapatita no estequiométrica: $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$. La x varía de cero a dos. La carga superficial es dependiente del pH y su punto de carga cero es igual a 5.5. Como consecuencia, presenta una carga superficial negativa al pH fisiológico y adsorbe electrostáticamente antígenos con carga positiva. La presencia de los grupos hidroxilos permite al adyuvante adsorber antígenos fosforilados por intercambio de ligando con los hidroxilos superficiales [57].

Las propiedades del adyuvante son notablemente dependientes de las condiciones de precipitación al igual que las sales de aluminio. El precipitado de fosfato de calcio obtenido mediante la mezcla rápida de los reaccionantes, adsorbe el 100 % de toxoide diftérico, mientras que el producido con la adición lenta solo adsorbe el 58 % de la misma dosis de toxoide diftérico. Esto se debe a que la relación molar Ca/P en el complejo varía de 1.35 a 1.83 en función de la velocidad de mezclado [58].

Recientemente se han sintetizado nanopartículas de fosfato de calcio con mejores propiedades adyuvantes y químico-físicas, muy diferentes al fosfato de calcio utilizado tradicionalmente como adyuvante [59]. Esta nueva forma provoca poca inflamación en el sitio de aplicación de la vacuna, induce mayores respuestas IgG2a y menores respuestas IgE cuando se compara con los adyuvantes de aluminio. Se plantea que su uso puede ser una buena alternativa para antígenos virales. Además, estas nanopartículas se evaluaron como adyuvantes en vacunas de administración intranasal, para generar respuestas inmunomucosales en modelos animales [59-62]. Este fosfato de calcio nanoestructurado es un buen ejemplo de cómo modificando el tamaño y la morfología de una sustancia conocida se puede lograr otra con propiedades adyuvantes superiores.

Alginato de calcio

El alginato de calcio se forma a partir del alginato de sodio. Este último polimeriza en presencia de calcio y forma depósitos con el antígeno adsorbido. Su efecto adyuvante se estudió en ratones para la generación de

34. Peek JL, Russell Middaugh C, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:915-28.

35. Jones LS, Peek LJ, Power J, Markham A, Yazzie B, Middaugh R. Effects of Adsorption to Aluminium Salt Adjuvants on the Structure and Stability of Model Protein Antigens. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13406-14.

36. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:497-505.

37. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminium salts in vaccines-US perspective. *Vaccine.* 2002;20:S18-S23.

38. Clausi A, Cumiskey J, Merkley S, Carpenter J, Braun LJ, Randolph TW. Influence of particle size and antigen binding on effectiveness of aluminum salt adjuvants in a model lysozyme vaccine. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5252-62.

39. Shirodkar S, Hutchinson RL, Perry DL, White JL, Hem SL. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Pharm Res.* 1990;7(12):1282-8.

40. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminum phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure. *Vaccine.* 2001;19:275-81.

41. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminum phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part II: physicochemical properties. *Vaccine.* 2001;19:282-7.

42. Hem SL. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine.* 2002;20:S40-S43.

43. Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Henryck Mach, et al. Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice. *Hum Vaccines* 2007;3(4):139-46.

44. Kawamura Y, Sawai Y. Study on Indian Cobra Venom toxoid. *Snake.* 1989;21:6-8.

45. Kawamura Y, Sawai Y. Study on the immunogenicity of purified toxoid of Siamese Cobra (Naja Naja kaouthia) Venom. *Snake.* 1989;21:81-4.

46. Stieneker F, Kersten G, van Bloois L, Crommelin DJ, Hem SL, Löwer J, et al. Comparison of 24 different adjuvants for inactivated HIV-2 split whole virus as antigen in mice. Induction of titres of binding antibodies and toxicity of the formulations. *Vaccine.* 1995;13(1):45-53.

47. Fujimaki H, Ozawa M, Imai T, Kubota K, Watanabe N. Adjuvant effects of aluminum silicate on IgE and IgG1 antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1984;75(4):351-6.

48. Arora S, Sharma S, Goel SK, Singh US. Effect of different adjuvants in equines for the production of equine rabies immunoglobulin. *Natl Med J India.* 2005;18(6):289-92.

49. Basavalingappa BS, Krishnamurthy GV, Suryanarayana VVS, Byregowda SM, Isloor S, Mayanna A, et al. Immune response of sheep to bentonite clay and alum adjuvanted enterotoxaemia vaccines. *Indian J Animal Sci.* 2008;78(4):339-41.

anticuerpos contra el veneno de *Bothrops asper*. Su eficacia también se ha evaluado en vacunas antibacterianas, antivirales y antitoxoides en ratones, y se ha demostrado que es más efectivo en la producción de anticuerpos que con las otras vacunas antitifoideas [63]. Su propiedad adyuvante es inferior a la del adyuvante de Freund y no ejerce acción adyuvante cuando se une al toxoide diftérico [64, 65].

Cloruro de calcio

El cloruro de calcio mezclado con liposomas (que forma coqueatos de estructura cilíndrica) se ha evaluado como adyuvante en vacunas administradas por vía intranasal para generar respuesta inmune mucosal en ratones de animales [66]. Más recientemente se ha demostrado su eficacia en la formulación AMVAD (*archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery*) basada en lípidos de arqueobacterias, administrada por vía intranasal para promover una respuesta inmune sistémica duradera en ratones [67].

Compuestos de magnesio

El hidróxido de magnesio cristalino se ha empleado en una mezcla de igual proporción con hidroxicarbonato de aluminio amorfo. Se conoce comercialmente con el nombre de Imject Alum®. Su efectividad se demostró en ratones, pero no se ha empleado en vacunas para seres humanos [68, 69].

Otra sal de magnesio estudiada fue el hidroxicarbonato de magnesio pentahidratado. En ratones se demostró que es más potente para inducir anticuerpos específicos a TT que el hidróxido de aluminio utilizado como adyuvante [70].

Sales de hierro

Fosfato de hierro

El fosfato de hierro es un compuesto amorfo con un tamaño de partícula promedio entre 0.01 µm y 300 µm. Estudios en ratones indicaron que su grado de tolerancia es similar al hidróxido de aluminio. Posee la propiedad de incrementar los niveles de IgG1; pero no es superior cuando se compara con el hidróxido de aluminio; aunque sí mayor al hidróxido de hierro. Su cantidad está limitada entre 0.2 y 1.4 mg de hierro por dosis [71].

Hierro coloidal

El hierro coloidal está constituido por una mezcla de hidróxido y de óxido de hierro (III), que puede tener diferentes grados de hidratación y estequiometría. Tiene un tamaño de partícula entre 1 y 500 nm, y su capacidad adyuvante es similar a la del hidróxido de aluminio. Sin embargo, tiene la ventaja de potenciar la generación de linfocitos T citotóxicos. En animales de experimentación (ratones) se demostró que aumenta la inmunogenicidad del TT y del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) inactivado. Este tipo de coloide posee propiedades de adsorción superiores a la del hidróxido de hierro en forma de gel, por lo que adsorbe un mayor número de proteínas [72, 73].

Hierro carbonílico

El hierro carbonílico se caracteriza por formar partículas esféricas con un potente efecto adyuvante en

la inducción de encefalomiелitis alérgica en ratas. La actividad adyuvante también se encontró en suspensiones de Kaolin, pero no en otras formas del hierro metálico, como el óxido de hierro y el hierro dextrano. El hierro carbonílico podría convertirse en un material útil para la investigación de los mecanismos de adyuvación y de inmunología celular por sus propiedades magnéticas y fácil detección [74].

Con respecto a otros, los adyuvantes de hierro descritos tienen la desventaja de que sus áreas superficiales son pequeñas, lo que significa que consiguen una menor adsorción de antígenos. Además, estos compuestos son absorbidos en menor magnitud y velocidad por el organismo.

Compuestos de cinc

Óxido de cinc

El efecto adyuvante del óxido de cinc se ha evaluado en ratones y se demostró que actúa sobre el sistema inmune estimulando la respuesta Th2. Otros estudios sugieren que el óxido de cinc es un adyuvante más seguro que el hidróxido de aluminio porque estimula la respuesta inmune con mayor potencia, posee baja toxicidad e induce una débil respuesta alérgica [75, 76].

Sulfato de cinc

El sulfato de cinc se empleó como adyuvante en formulaciones para tratamiento tópico [77]. Además se estudió su efecto sobre la respuesta inmunológica de una vacuna recombinante de hepatitis B en ancianos. La investigación reveló que el sulfato de cinc no ejerce ningún efecto sobre los niveles de inmunidad en los ancianos [78].

Hidróxido de cinc

Se ha descrito que el hidróxido de cinc tiene propiedades adsorbentes ante proteínas y antígenos. En ratones y cerdos se demostró que estimula tanto la respuesta inmune celular como la humoral. La adición de lecitina aumenta el efecto adyuvante e incrementa la tolerancia local de las vacunas con hidróxido de cinc [78].

El hidróxido de cinc, combinado con hidróxido de calcio, lecitina y poli-alfa-olefina hidrogenado tienen una propiedad adyuvante superior al de estas sales por separado.

En otros estudios en ratones y cerdos también se evaluaron el cloruro y el acetato de cinc y se demostró que no tienen efecto adyuvante medible y que poseen una baja tolerancia local [78].

Cloruro de manganeso

El efecto adyuvante del cloruro de manganeso se experimentó en ratones. Tiene la propiedad de aumentar la actividad de las células citotóxicas naturales (NK). Actúa de forma similar a aquellas moléculas más complejas que inducen la producción de interferón [79-81].

Sales de circonio

Se han evaluado varias sales de circonio: lactato de sodio y circonio, lactato de circonio y aluminio, oxiclорuro de circonio, glicinato de aluminio y circonio e hidróxido de circonio. Se ha encontrado que estos

50. Matheis W, Zott A, Schwanig M. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine*. 2002;20:67-73.

51. De Oliveira EC, Moita JM, Fujiwara FY. Aluminum Polyphosphate Thermoreversible Gels: A Study by ³¹P and ²⁷Al NMR Spectroscopy. *J Colloid Interface Sci*. 1995;176(2):388-96.

52. Teagarden DL, Kozlowski JF, White JL, Hem SL. Aluminum chlorohydrate I: Structure studies. *J Pharm Sci*. 1981;70(7):758-61.

53. Coursaget P, Yvonne B, Relyveld EH, Barres JL, Diop-Mar I, Chiron PJ. Simultaneous administration of diphtheria-tetanus-pertussis-polio and hepatitis B vaccines in a simplified immunisation programme: immune response to diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis and hepatitis B surface antigens. *Infect Immun*. 1986;51(3):784-7.

54. Relyveld EH. A history of toxoids. In: Plotkin SA, Fantini B, editors. *Vaccinia, vaccination, vaccinology*. New York: Elsevier; 1996. p. 95.

55. Relyveld EH, Hi-Nocq E, Raynaud M. Etude de la vaccination antidiphtherique de sujets allergiques, avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bull World Health Org*. 1964;30:321-5.

56. Gupta RK, Siber GR. Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals*. 1994;22(1):53-63.

57. Jiang D, Premachandra GS, Johnston C, Hem SL. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine*. 2004;23:693-8.

58. Relyveld EH. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand*. 1986;65:131-6.

59. He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):899-903.

60. Abd el-Razek NEE, Shoman SA, Mohamed AF. Nanocapsulated Rift Valley Fever vaccine candidates and relative immunological and histopathological reactivity in out bred Swiss mice. *J Vaccines Vaccin*. 2011;2:115.

61. He Q, Mitchell A, Morcol T, Bell SJ. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(5):1021-4.

62. Contorni M, Singh M, Derek O'Hagan D, inventors; Novartis, assignee. Compositions with antigens adsorbed to calcium phosphate. United States patent US 20090035326. 2009 Feb 5.

63. Sterne M, Trim G. Enhancement of the potency of typhoid vaccines with calcium alginate. *J Med Microbiol*. 1970;3(4):649-54.

64. Shapiro A, Modai Y, Kohn A. Efficacies of vaccines containing alginate adjuvant. *J Appl Microbiol*. 1967;30(2):304-11.

65. Kohn A, Helering I, Ben-Efraim S. Adjuvant properties of alginate in bacterial, viral and protein vaccines. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1969;36(1-2):156-62.

compuestos estimulan la respuesta inmune a partir de una mayor producción de anticuerpos IgM en ratones. Aunque no se explica detalladamente, se plantea que induce una producción de anticuerpos prolongada.

Con la excepción del hidróxido de circonio ($\text{Zr}(\text{OH})_4$), se ha encontrado que existe una relación entre la propiedad de estos compuestos de inducir una inflamación crónica y de activar la cascada del complemento en cerdos [16, 82].

Nitrato de cerio

El nitrato de cerio ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_4$) existe en varias formas. La más utilizada en medicina es la sal hidratada ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$). En la actualidad el nitrato de cerio se emplea como adyuvante en cremas de sulfadiazina de plata. También se evaluó *in vitro* la propiedad del óxido de cerio de adsorber proteínas y su captación por las células de adenocarcinoma del pulmón [83].

Sales de berilio

En un estudio en ratones susceptibles a *Leishmania* spp., se demostró que el sulfato de berilio actúa como un adyuvante que promueve significativamente la producción de interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$). La propiedad del berilio de sinergizar con la interleuquina 12 (IL-12) para promover la producción de citoquinas de patrón Th1, es un elemento importante que se pudiera evaluar para su desarrollo como adyuvante de vacunas [84]. El óxido de berilio ($\text{Be}(\text{OH})_2$) se ha explorado como adyuvante en animales de experimentación [85].

Óxidos

Aerosil

El aerosil 200 (11 % w/v) es el dióxido de silicio muy disperso que se emplea como sustancia auxiliar en formulaciones farmacéuticas y cosméticas. Esta forma del dióxido de silicio se distingue por sus propiedades hidrófilas. El aerosil R972 (1 %, p/v) es un dióxido de silicio hidrófobo muy disperso. Se utiliza en la obtención de comprimidos a partir de polvos o gránulos higroscópicos [46]. Ambos óxidos se evaluaron en ratones con antígenos del VIH-2 inactivado, y se demostró que inducen anticuerpos contra la glicoproteína de la membrana externa del virus gp120.

Otros óxidos

Las propiedades adyuvantes de la sílica (SiO_2), el talco ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$), y los compuestos Al_2O_3 , óxidos de estaño (SnO_2), óxidos de circonio (ZrO_2), la hematita (Fe_2O_3) y la magnetita (Fe_3O_4) se evaluaron en ratas utilizando como antígeno la proteína ovoalbúmina [86]. En ese estudio se concluyó que la respuesta de anticuerpos aumentó moderadamente al administrar el óxido de aluminio, la hematita y la magnetita. Los óxidos de estaño y circonio provocaron un efecto muy pequeño. En ese estudio no se pudo correlacionar la hidrofobicidad e hidrofiliadad de los óxidos con la magnitud de sus efectos adyuvantes.

Mezclas de adyuvantes

Algamulina

Cooper *et al.* [87] combinaron el hidróxido de aluminio con la gamma inulina, polisacárido procedente

de algas, aprovechando que la inulina es un potente activador natural de la vía alternativa del complemento. Esta combinación conocida como algamulina ha potenciado la respuesta contra diversos antígenos comerciales, como toxoide diftérico y TT, el virus sincitial respiratorio y la proteína E7 del virus del papiloma humano [87].

AS04

El AS04 (sistema adyuvante 04) es uno de los pocos adyuvantes modernos e innovadores autorizado para su uso en la formulación de vacunas profilácticas para seres humanos. Su principal novedad es la asociación de dos adyuvantes de actividad complementaria: el clásico hidróxido de aluminio y el monofosforil lipido A (MPL). El MPL es un lipopolisacárido obtenido de *Salmonella minnesota* que es purificado y detoxificado, pero que mantiene intacta su propiedad de unirse al receptor similar a Toll 4 (TLR-4). El adyuvante AS04 se ha utilizado en una vacuna contra el virus de la hepatitis B (comercializada como Fendrix®), indicado preferentemente en enfermos en hemodiálisis y situaciones de inmunosupresión. También se ha utilizado en una vacuna contra el virus del papiloma humano (comercializada como Cervarix®) [88].

Imject Alum®

El hidróxido de aluminio-hidróxido de magnesio se conoce comercialmente como Imject Alum® (Pierce Biotechnology, USA). Es una mezcla en igual proporción de hidroxycarbonato de aluminio amorfo con el hidróxido de magnesio cristalino. Su composición es similar al antiácido Maalox®. Se ha usado solo en ensayos con animales, y se plantea que es un adyuvante muy efectivo. Su acción transcurre por la activación del inflammasoma NLRP3 [89].

Vale destacar que la mezcla de adyuvantes podría convertirse en una buena alternativa ante la ausencia de un adyuvante que induzca una intensa y prolongada respuesta Th2 mediada por anticuerpos y una potente respuesta Th1, la cual es fundamental para combatir virus y bacterias intracelulares. Además, en la composición de la mezcla pudiera incluirse un transportador que garantizaría que la respuesta inmune inducida por la vacuna no solo sería más eficaz sino también dirigida.

Consideraciones

La mayor parte de los adyuvantes inorgánicos se utilizan en forma de gel, a pesar de reportes previos de sales solubles en agua de metales divalentes y trivalentes que han demostrado ser eficaces adyuvantes, como el gluconato de calcio, el gluconato de manganeso, el glicerofosfato de manganeso, el acetato de aluminio y el salicilato de aluminio [90]. La calidad de estos geles varía según el fabricante y no siempre poseen el efecto adyuvante deseado. Por ello, cada productor de vacuna trata de desarrollar su propio adyuvante [91].

En la mayoría de los estudios que evalúan para tales fines a esta familia de compuestos, se han utilizado las sales disponibles comercialmente sin tener en cuenta sus propiedades químico-físicas, como el polimorfismo, la constante de solubilidad, la energía de la red, la naturaleza del enlace (covalente o iónico), el pH del

66. Mannino RJ, Canki M, Feketeova E, Scolpino AJ, Wang Z, Zhang F, *et al.* Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;32(3):273-87.

67. Patel GB, Zhou H, Ponce A, Chen W. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaean lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine.* 2007;25(51):8622-36.

68. Lambrecht BN, Kool M, Willart M, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2009;21:23-9.

69. Munks MW, McKee AS, Macleod MK, Powell RL, Degen JL, Reisdorph NA, *et al.* Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps *in vivo*. *Blood.* 2010;116(24):5191-9.

70. Kristensen N, Uldal J, Aasmul-Olsen S, Lund L, inventors; ALK-Abello A/S, assignee. Parenteral vaccine formulations and uses thereof. United States patent US 7785611 B2. 2010 Aug 31.

71. Sauzeat E, inventor; Sanofi Pasteur S.A., assignee. Vaccine composition comprising iron phosphate as vaccine adjuvant. United States patent US 06927235. 2005 Aug 9.

72. Eibl J, Leibl H, Mannhalter J, inventors; Tempo G, assignee. Adjuvant based on colloidal iron compounds. United States patent US 5895653. 1999 Apr 20.

73. Leibl H, Tomasits R, Brühl P, Kerschbaum A, Eibl MM, Mannhalter JW. Humoral and cellular immunity induced by antigens adjuvanted with colloidal iron hydroxide. *Vaccine.* 1999;17(9-10):1017-23.

74. Levine S, Sowinski R. Carbonyl iron: a new adjuvant for experimental autoimmune diseases. *J Immunol.* 1970;105(6):1530-5.

75. Matsumura M, Nagata M, Nakamura K, Kawai M, Baba T, Yamaki K, *et al.* Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010; 32(1):56-62.

76. Li T. Zinc hydroxide as a new vaccine adjuvant enhance the humoral immune response of HAV antigen [Master Dissertation]. Beijing: Peking Union Medical College; 2008.

77. Torvi J, Dambal SS, Indumati V. Effect of adjuvant oral zinc sulphate therapy in psoriasis patients. *Int J Med Res.* 2010;1(2):106-10.

78. Dieter B, inventor; Behringwerke Aktiengesellschaft, assignee. Solutions containing antigen and zinc hydroxide or iron hydroxide as an adjuvant and processes for preparing such solutions. United States patent US 5252327. 1993 Oct 12.

79. Rogers RR, Garner RJ, Riddle MM, Luebke RW, Smialowicz RJ. Augmentation of murine natural killer cell activity by manganese chloride. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983;70(1):7-17.

80. Smialowicz RJ, Luebke RW, Rogers RR, Riddle MM, Rowe DG. Manganese chloride enhances natural cell-mediated immune effector cell function: Effects on macrophages. *Immunopharmacology.* 1985;9(1):1-11.

medio, el estado de oxidación, el tamaño de la partícula y la afinidad por adsorber sustancias inmunogénicas. Todas estas propiedades están directamente relacionadas con los efectos *depósito* y *presentador* atribuidos a los adyuvantes. Como consecuencia, los investigadores han rechazado sales de compuestos con potencialidades para ser mejores adyuvantes que las tradicionales sales de aluminio [92].

Las investigaciones en este campo avanzan no solo hacia la obtención de nuevos adyuvantes, sino también hacia la obtención de adyuvantes basados en los ya existentes. Con el empleo de la nanotecnología se pueden obtener sales inorgánicas a escala nanométrica que favorece la captación y adsorción por las células presentadoras de antígenos, particularmente de las células dendríticas, y que muestran nuevas propiedades, entre ellas una mayor área superficial específica que incrementa su propiedad de adsorción. El tamaño nanométrico permite mimetizar mejor la naturaleza particulada de los virus y las bacterias. Las nanopartículas de fosfato de calcio y de óxido de aluminio son un ejemplo de ello.

El estudio, la obtención y evaluación de nuevos polimorfos a partir de los compuestos conocidos y seguros de aluminio y calcio, permitirán caracterizar detalles estructurales, morfológicos y químicos que

serán la base para la reevaluación de adyuvantes ya existentes, como las sales de cinc y hierro.

Las mezclas de adyuvantes se evalúan con mayor frecuencia, de forma que se complementen sus acciones sobre el sistema inmune. La más avanzada es el adyuvante AS04. Sin embargo, las mezclas de adyuvantes inorgánicos o la síntesis de minerales artificiales con la composición química deseada para aumentar la potencia de las vacunas o reducir los efectos adversos, no se han explotado lo suficiente.

La preparación de un compuesto a partir de la combinación del hidróxido de cinc ($\text{Zn}(\text{OH})_2$, promotor de patrón Th1) con las tradicionales sales de calcio y aluminio (promotor de patrón Th2) sería un buen punto de partida con el fin de obtener el adyuvante inorgánico ideal.

Por estas razones, el uso de los compuestos inorgánicos como adyuvantes continúa siendo un campo de investigación atractivo y en expansión. La aplicación de los últimos avances de la nanotecnología, junto a la combinación de adyuvantes o la preparación de compuestos nanoestructurados, integrados por sales o iones que estimulen las respuestas humoral y celular del sistema inmune por diferentes rutas de inmunización, posibilitarán la obtención de vacunas más eficaces que las actuales.

81. Smialowicz RJ, Rogers RR, Riddle MM, Luebke RW, Rowe DG, Garner RJ. Manganese chloride enhances murine cell-mediated cytotoxicity: effects on natural killer cells. *J Immunopharmacol.* 1984;6(1-2):1-23.

82. Shima S, Morita K, Tachikawa S, Ito T, Kurita H, Yoshida T, et al. IgM Antibody Production in Mice Intraperitoneally Injected with Zirconium Oxide. *Br J Ind Med.* 1987;44(9):633-7.

83. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials.* 2007;28(31):4600-7.

84. Lee JY, Atochina O, King B, Taylor L, Elloso M, Scott P, et al. Beryllium, an adjuvant that promotes gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68(7):4032-9.

85. Hall JG. Studies on the adjuvant action of beryllium. IV. The preparation of beryllium containing macromolecules that induce immunoblast responses in vivo. *Immunology.* 1988;64:345-51.

86. Naim JO, van Oss CJ, Wu W, Giese RF, Nickerson PA. Mechanisms of adjuvancy: I-Metal oxides as adjuvants. *Vaccine.* 1997;15(11):1183-93.

87. Cooper PD. Vaccine adjuvants based on gamma inulin. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:559-80.

88. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6186-97.

89. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting Edge: Inflammasome activation by Alum and Alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* 2008;181(1):17-21.

90. Aucouturier J, Ganne V, Trouve G, inventors; Societe d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques, assignee. Vaccine composition of surfactants as adjuvant of immunity. United States patent US 7422748. 2008 Sep. 9.

91. Paneque A. El uso de las sales de aluminio como adyuvantes. IV International Symposium on Chemistry, 2010 Jun 1-4, Santa Clara, Cuba.

92. Paneque A. Compuestos inorgánicos como adyuvantes. 8th International Congress on Chemistry, Chemical Engineering and Biochemistry, 2012 Oct 9-12, La Habana, Cuba.

Recibido en junio de 2012.

Aprobado en abril de 2013.

Inorganic compounds as vaccine adjuvants

Armando A Paneque-Quevedo

Dirección de Producción, Centro de Química Biomolecular, CQB
Calle 200 y Ave. 21, Atabey, Playa, La Habana, Cuba
armando.paneque@cqb.cu, armandopaneque@infomed.sld.cu,
panecu@yahoo.com

REVIEW

ABSTRACT

The adjuvant capacity of minerals was first discovered in 1926, when a suspension of diphtheria toxoid precipitated with potassium aluminum sulfate was found to be significantly more immunogenic than the same suspension in the absence of this compound. Although a large number of inorganic salts have since been evaluated for this purpose, only alum, phosphate and aluminum hydroxide, and aluminum sulfate hydroxyphosphate have been approved in humans, and calcium phosphate is included in some vaccines manufactured in Europe. In the past, lack of awareness of the fact that the adjuvant properties of inorganic salts are highly dependent on nuances of their production processes that directly affect the depot and presenting effects attributed to adjuvants has led to the rejection of many compounds with potentially better adjuvant properties than traditional aluminum salts. However, the application of recent advances in nanotechnology and the combination of different adjuvants have led to the emergence and evaluation of a large number of new alternatives. The present review describes the most frequently cited inorganic adjuvants, examining their potential for the development of more potent vaccines than the current crop of products using aluminum-based compounds.

Keywords: inorganic adjuvants, aluminum salts, alum, vaccine

Biotecnología Aplicada 2013;30:250-256

RESUMEN

Compuestos inorgánicos como adyuvantes de vacunas. La propiedad adyuvante de los minerales fue descubierta en 1926, al observarse que una suspensión de toxoide diftérico precipitado con sulfato doble de aluminio y potasio proveía de una inmunogenicidad notablemente superior al toxoide sin adyuvante. Desde entonces se han evaluado numerosas sales inorgánicas como adyuvantes de vacunas y las únicas aprobadas para su uso en seres humanos son el sulfato doble de aluminio y potasio, el fosfato e hidróxido de aluminio y el sulfato de hidroxifosfato de aluminio. El fosfato de calcio se ha utilizado en algunas vacunas europeas. Las propiedades adyuvantes de las sales inorgánicas son muy dependientes del proceso de obtención e inciden sobre los efectos depósito y presentador atribuidos a estas. La no observancia de ello ha conducido al rechazo de muchas sales con mejores propiedades adyuvantes que las tradicionales sales de aluminio. La aplicación de los últimos avances de la nanotecnología y la alternativa de combinar adyuvantes han motivado la síntesis y evaluación de nuevos adyuvantes. En esta revisión se describen los adyuvantes inorgánicos citados con mayor frecuencia y sus potencialidades para el desarrollo de vacunas más eficaces que las que poseen sales de aluminio como adyuvantes.

Palabras clave: adyuvantes inorgánicos, sales de aluminio, alúmina, vacuna

Introduction

Minerals are not only the basic constituents of the earth's crust, but are important components of fertilizers, chemicals and paints, receiving intensive use in industries such as the manufacture of paper and cosmetics. They also have numerous applications in medicine, employed directly as active pharmaceutical ingredients, additives in antacid formulations and nutritional supplements; or excipients, carriers and encapsulating agents in novel formulations. Minerals are also used as adjuvants in the formulation of vaccines [1-3].

Vaccination still represents one of the most effective and safe medical interventions. From the moment of its initial discovery, it became the golden standard for disease prevention, and is regarded as the most important public health achievement in the history of humankind [4]. Vaccines are known to induce a longer and more potent immune response when an adjuvant is included in their chemical makeup [5-8].

Adjuvants are substances that, when combined with an antigen, potentiate the immune response against the latter. Not surprisingly, therefore, the inclusion of

adjuvants is one of the best strategies for increasing vaccine efficacy. The word 'adjuvant' comes from the Latin *adjuvare*, that is, 'to help, to assist' [7, 8]. The adjuvant character of minerals was first discovered by Gleny *et al.* in 1926, who noticed that a suspension of diphtheria toxoid precipitated with aluminum and potassium sulphate (alum) was notably more immunogenic than the same suspension in the absence of this mineral [9].

In general, modern reviews of the state of the art in adjuvant technology tend to focus on either immunostimulating molecules (saponins-QS21, CpG oligonucleotides, lipopolysaccharides, monophosphoryl lipid A, cytokines), lipid-based structures (liposomes, virosomes, *cochleates*) or particulates (virus-like poloxamer particles), touching on the subject of traditional aluminum salts-based adjuvants only succinctly [4, 5].

In addition, the number of publications in this field focusing on other inorganic compounds has dwindled, giving the false impression that the potential applications of solid inorganic adjuvants have already been thoroughly explored, and that the time and resources of

1. Chang L. Industrial mineralogy: materials, processes, and uses. New Jersey: Prentice-Hall; 2001.

2. Carretero MI, Pozo M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries. Part II. Active ingredients. *Appl Clay Sci.* 2010;47:171-81.

3. Reinke CM, Breitzkreutz J, Leuenberger H. Aluminium in over-the-counter drugs risks outweigh benefits? *Drug Safety.* 2003; 26(14):1011-25.

4. Harandi AM, Gwyn D, Olesen OF. Vaccine adjuvants: scientific challenges and strategic initiatives. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(3):293-8.

5. De Gregorio E, Tritto E, Rappuoli R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. *Eur J Immunol.* 2008;38: 2068-71.

6. Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res.* 2002;19(6):715-28.

7. Clements CJ, Griffiths E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine.* 2002;20:24-33.

the scientific community would be better spent based on mechanistically different adjuvants, such as those acting as danger signals for the immune system. However, experience has shown that a one-size-fits-all adjuvant producing an optimal response to every antigen simply does not exist, otherwise very potent and promising alternatives have eventually been discarded due to issues with their stability, toxicity or production costs [10-12].

A detailed analysis of the starting materials and procedures used to obtain the constituent minerals of inorganic adjuvants suggests that it is possible, simply by accurately controlling manufacturing conditions and carefully modifying their physico-chemical properties, to obtain mineral adjuvants far superior to traditional aluminum salts-based variants, either alone or in combination with other compounds.

In this review, a comprehensive compendium is presented on the available information concerning solid inorganic compounds used as adjuvants in vaccines currently used in humans, in veterinary medicine or in biomedical research, where they are widely applied for the preparation of specific polyclonal antisera. Closer attention was paid to the structural characteristics of the most important inorganic adjuvants, as the amount of available information in the literature about the latter tends to be much larger. Other compounds of this type, which have failed to reach the stage of clinical application, are not discussed in detail, summarizing instead the results from existing studies.

Mechanism of action

Many vaccine adjuvants form depots at the injection site from which the antigen is released slowly, thereby sustaining antigen exposure to the immune system for a longer time and, in consequence, eliciting a stronger response.

For a long time, the prevailing view was that this was the sole or principal mechanism of action of immunological adjuvants [13-16]. Today, however, it is known that vaccine adjuvants act through many different and not mutually exclusive mechanisms including, in addition to physical persistence, the stimulation of inflammatory processes and cytokine release, more efficient antigen delivery to antigen-presenting cells (thanks to their particulate structure and a size smaller than 10 μm), the stimulation of immunocompetent cells through complement activation, the induction of eosinophilia at the injection site, and macrophage activation [8].

In 2008 several research teams working in the field of vaccine adjuvants proposed that the activation of the inflammasome, a protein complex performing different roles in innate immune responses [5], was another mechanism of action for adjuvants. Inflammasome activation is thought to be triggered by the particulate nature of antigen-adjuvant complexes, rather than their exact chemical composition [17, 18].

Limitations

The limitations of inorganic adjuvants include local adverse reactions such as inflammation, granulomas, abscesses and the induction of immune responses biased towards the production of immunoglobulin E (IgE), which is associated with allergic processes.

They are also not the most potent inducers of antibody responses, and are not effective for the induction of the T-helper cell type 1 (Th1)-biased immune responses mediated by cytotoxic T-cell lymphocytes, which are deemed essential to provide protection against intracellular parasites [19-26].

In general, the crystalline structure of inorganic adjuvants changes when temperature decreases. It has been postulated that during solvent freezing and crystallization, colloidal adjuvant particles congregate into regions denominated 'freezing concentrates' where they are brought into close contact and repulsive interparticle forces are overcome, originating a system of coagulated or flocculated particles from which reversion to the original suspension is impossible [27]. This irreversible deterioration of the structure of adjuvant gels negatively impacts the physical stability of vaccines and, consequently, their potency [28], accounting for the fact that it is impossible to produce lyophilized vaccines when employing inorganic adjuvants. In addition, this phenomenon explains why these vaccines cannot be stored at temperatures close to 0 °C.

Adsorption

The larger and better immune responses made possible by the use of inorganic adjuvants depend on the structure, properties and mechanisms of adsorption of the latter. Among the main mechanisms postulated to explain the adsorption of antigens to inorganic adjuvants are electrostatic interactions, ligand exchange and hydrophobic interactions. In some systems, van der Waals forces as well as hydrogen bonding are also thought to play an important role in this process [29-31].

Mean particle size, morphology and surface charge have the largest impact on the adsorption of antigens to inorganic adjuvants. Adjuvants with an isoelectric point above physiological pH become positively charged at that pH, and will readily adsorb negatively charged antigens. Conversely, those with isoelectric points below physiological pH will adsorb positively charged antigens at that pH, so van der Waals forces and hydrophobic interactions will predominate whenever the isoelectric points of the antigen and adjuvant are similar. Quantitatively, adsorption will depend on the chemical makeup and concentration of the antigen, the presence of salts or ions such as those provided by commonly used buffers, and the pH of the resulting solution [32, 33].

Moreover, recent results have suggested that the process of adsorption may induce structural changes in the antigen that might increase its susceptibility to many host proteases involved in the generation of immune responses, favoring its presentation by professional antigen-presenting cells [34, 35].

Inorganic compounds used as adjuvants

Aluminum salts

Aluminum salts represent the most popular and ubiquitous class of vaccine adjuvant. Indeed, potassium aluminum sulphate ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$), whose characteristics are very similar to those of aluminum phosphate, was employed to obtain tetanus and

8. Gupta RK. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32: 155-72.

9. Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:287-93.

10. Lahiri A, Das P, Chakravorty D. Engagement of TLR signaling as adjuvant: Towards smarter vaccine and beyond. *Vaccine*. 2008;26:6777-83.

11. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317-37.

12. Tagliabue A, Rappuoli R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. *Hum Vaccine*. 2008;4(5):347-9.

13. Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine*. 2004;22: 3658-68.

14. Glenny AT, Buttle GAH, Stevens MF. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J Pathol*. 1931;34:267-75.

15. Holt LB. Developments in diphtheria prophylaxis. London: William Heinemann, Ltd.; 1950.

16. Ramanathan VD, Badenoch-Jones P, Turk JL. Complement activation by aluminium and zirconium compounds. *Immunology*. 1979;37:881-8.

17. Harris J, Sharp FA, Lavelle Ed. C. The role of inflammasomes in the immunostimulatory effects of particulate vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 2010;40:595-653.

18. Shar AF, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(3):870-5.

19. Esch HH. Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*. 2002;20:S34-S39.

20. Davenport FM, Hennessy AV, Askin FB. Lack of adjuvant effect of AlPO₄ on purified influenza virus hemagglutinins in man. *J Immunol*. 1968;100(5):1139-40.

21. Cvjetanovic B, Uemura K. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines. *Bull WHO*. 1965;32:29-36.

22. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, Bittle JL, Houghton RA, Lerner RA, et al. Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*. 1987;61:1-6.

23. Bomford R. Aluminium salts: perspectives in their use as adjuvants. In: Gregoriadis G, Allison AC, Poste G, editors. *Immunological adjuvants and vaccines*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1989. p. 35-41.

24. Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, Brown F, Bittle JL, Houghton RA, et al. Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*. 1985;66:2347-54.

25. Lew AM, Anders RF, Edwards SJ, Langford CJ. Comparison of antibody avidity and titre elicited by peptide as a protein conjugate or as expressed in vaccinia. *Immunology*. 1988;65(2):311-4.

diphtheria toxoid aluminates, thereby becoming the very first adjuvant to be used in human vaccines [36].

Aluminum hydroxide and phosphate, and later aluminum hydroxyphosphate sulfate, are the only aluminum-based adjuvants currently approved for manufacturing vaccines licensed for clinical use. The amount of aluminum per dose is restricted to no more than 0.85 mg in the USA, although European regulatory agencies have increased this limit to 1.25 mg since 1981. The table summarizes available vaccines currently licensed for use in humans that employ inorganic adjuvants [37].

Stanley Hem *et al.* studied the physico-chemical characteristics of aluminum hydroxide and phosphate, demonstrating that aluminum hydroxide, under the conditions employed for its application as adjuvant, is a crystalline solid [38-41]. Its structure corresponds to that of aluminum oxide hydroxide (AlO(OH)), a mineral known as boehmite that organizes into fibers with an average primary particle size of $4.5 \times 2.2 \times 10$ nm. Thanks to this structural organization, aluminum hydroxide exhibits a large surface-mass ratio and a high capacity for adsorbing antigens. It has an isoelectric point that ranges from 9 to 11, and is marketed under the *Alhydrogel* trade name [38-41].

AlPO₄ is an amorphous, non-stoichiometric solid of variable OH-PO₄ ratio whose chemical formula is Al(OH)_m(PO₄)_n. It organizes into plates or sheets, and its average primary particle size is approximately 50 nm. Its isoelectric point ranges from 5 to 7, and is marketed under the *Adju-Phos* trade name [42].

In these complexes, the aquo ion Al³⁺ occupies tetrahedral and octahedral positions. The net surface charge of these two adjuvants impacts the way antigen adsorption takes place and the rate of antigen release after injection and exposure to the physiological medium, whose pH is close to neutral [41]. In solution, both adjuvants form porous aggregates with diameters ranging from 1 to 10 nm.

Aluminum hydroxide and aluminum phosphate exhibit different rates of solubilization, both *in vitro* and *in vivo*, into the interstitial fluid. While dissolution of the phosphate salt is relatively fast, the *in vitro* solubility of the hydroxide is poor, a finding that explains the prolonged persistence of this compound *in vivo*. The solubilization of these salts is favored in the presence of plasmatic, citric, lactic or malic acids, among others. According to the available data, 51 % of the injected aluminum phosphate is solubilized during the first month post-administration; a figure that drops to only 17 % in the case of aluminum hydroxide [42].

Amorphous hydroxyphosphate sulfate

Aluminum hydroxyphosphate sulfate (Al₂(PO₄)₃(OH)(SO₄)) is a compound manufactured by Merck with a structure similar to that of aluminum phosphate, but clearly dissimilar properties. It is an amorphous lattice with an isoelectric point close to 7, which has been employed in a vaccine against Human Papillomavirus. The binding capacity of aluminum hydroxyphosphate sulfate for virus-like particles (VLP), and

26. Geerligs HJ, Weijer WJ, Welling GW, Welling-Wester S. The influence of different adjuvants on the immune response to a synthetic peptide comprising amino acid residues 9-21 of herpes simplex virus Type 1. *J Immunol Methods*. 1989;124(1):95-102.

27. Tripathy T, Ranjan D. Flocculation: A New Way to Treat the Waste Water. *J Phys Sci*. 2006;10:93-127.

28. World Health Organization. Temperature sensitivity of vaccines. WHO/IVB/06.10. Geneva: World Health Organization; 2006.

29. Rinella JV, White JL, Hem SL. Effect of pH on the Elution of Model Antigens from Aluminum-Containing Adjuvants. *J Colloid Interface Sci*. 1995;205(1):161-5.

30. Al-Shakhshir R, Regnier F, White JL, Hem SL. Effect of protein adsorption on the surface charge characteristics of aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 1994;12(5):472-4.

31. Al-Shakhshir R, Lee AL, White JL, Hem SL. Interactions in Model Vaccines Composed of Mixtures of Aluminum-Containing Adjuvants. *J Colloid Interface Sci*. 1995;169:197-203.

32. Seeber SJ, White JL, Hem SL. Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*. 1991;9(3):201-3.

33. Clapp T, Siebert P, Chen D, Braun LJ. Vaccines with Aluminum-Containing Adjuvants: Optimizing Vaccine Efficacy and Thermal Stability. *J Pharm Sci*. 2011;100(2):388-401.

Table. Vaccines based on inorganic adjuvants that are licensed for clinical use

Vaccine	Brand name	Adjuvant	Al ³⁺ contents	Manufacturer
Antimeningococcal BC	VA-Mengoc-BC®	Al(OH) ₃	2 mg	Finlay Institute, Cuba
Antipneumococcal	Prevenar®	AlPO ₄	0.125 mg	Wyeth Pharmaceuticals Inc.
	Prevenar 13®	AlPO ₄	0.125 mg	
Adsorbed anthrax	BioThrax®	Al(OH) ₃	1.2 mg/mL	BioPort Corporation
DT	DT adsorbidos USP	Alum	≤ 0.25 mg	Sanofi Pasteur Inc.
	Decavac®		≤ 0.28 mg	
	Td (genérico)		≤ 0.28 mg	
DTaP	Boostrix®	Alum	≤ 0.39 mg	GlaxoSmithKline
	Infanrix®	Al(OH) ₃	≤ 0.625 mg	
	Kinrix®*	Al(OH) ₃	≤ 0.6 mg	
	Adacel®	AlPO ₄	1.5 mg	Sanofi Pasteur Inc.
	Daptacel®	AlPO ₄	0.33 mg	
	Tripedia®	Alum	≤ 0.17 mg	
DTaP and Hib	TriHIBit®	Alum	≤ 0.17 mg	Sanofi Pasteur Inc.
DTaP, hepatitis B, IPV	Pediarix®	AlPO ₄ and Al(OH) ₃	0.85 mg	GlaxoSmithKline
DTaP, IPV, Hib	Pentacel®	AlPO ₄	0.33 mg	Sanofi Pasteur Inc.
Inactivated Hepatitis A	Havrix®	Al(OH) ₃	0.5 mg/mL	GlaxoSmithKline
	Vaqta®	Al(OH) ₃	0.45 mg/mL	Merck & Co., Inc.
Hepatitis B	Engerix-B®	Al(OH) ₃	≤ 0.5 mg/mL	GlaxoSmithKline
	Recombivax HB®	Al(OH) ₃	≤ 0.5 mg/mL	Merck & Co., Inc.
Hepatitis A and B	Twinrix®	AlPO ₄ and Al(OH) ₃	0.45 mg/mL	GlaxoSmithKline
Hib	PedvaxHIB®	Al ₂ (PO ₄) ₃ (OH)(SO ₄)	0.22 mg	Merck & Co., Inc.
Hib and hepatitis B	Comvax®	Amorphous Al(OH) ₃	0.225 mg	Merck & Co., Inc.
HPV	Cervarix®	Al(OH) ₃	0.5 mg	GlaxoSmithKline
	Gardasil®	Al ₂ (PO ₄) ₃ (OH)(SO ₄)	0.22 mg	Merck & Co., Inc.
HPV, tetravalent	Gardasil®	Al ₂ (PO ₄) ₃ (OH)(SO ₄)	0.225 mg	Merck & Co., Inc.
HPV2, bivalent	Cervarix®	AS04 (Al(OH) ₃)	0.5 mg	GlaxoSmithKline
Hepatitis B	Fendrix®	AS04 (Al(OH) ₃)	0.5 mg	GlaxoSmithKline
Adsorbed	IPAD-T	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1-3 mg/mL	Pasteur Institute, France

DT: diphtheria and tetanus toxoids; DTaP: diphtheria toxoid, tetanus toxoid and acellular pertussis; Hib: *Haemophilus influenzae*, type B; HPV: human papilloma virus; IPV: inactivated polio vaccine; TT: tetanus toxoid

* Kinrix® also includes IPV.

their subsequent stabilization, is larger than that of other aluminum salts [43].

Aluminum chloride

Aluminum chloride is an amphoteric compound that readily dissolves into water, forming aluminum hydroxide. It was used as an adjuvant for the production of antisera for cobra venom [44, 45].

Aluminum hydroxycarbonate

Aluminum hydroxycarbonate (Alum HC) forms through the pairing of a carbonate anion to an aluminum cation in an aluminum hydroxide gel. This compound has been used extensively as an antacid. A comparison of the adjuvant effect of aluminum hydroxycarbonate against that of 24 different adjuvants for eliciting a humoral immune response against Human Immunodeficiency Virus type 2 (HIV-2) in mice demonstrated that this compound, as all other aluminum-based adjuvants, is able to potentiate the induction of an antibody response against the gp120 antigen [46].

Aluminum silicate

In nature, aluminum silicates (Al_2SiO_5) are found only as hydrates. They have found extensive application in the pharmaceutical industry and in dentistry. A 1 % gel of bentonite, a form of aluminum silicate, has been the preferred formulation in vaccine adjuvant studies describing this compound. A study examining its potency for the induction of IgE responses in experimental animals and the production of IgG1 antibody found that it exhibited a behavior similar to that of alum [47]. Bentonite has also been used at 2 % in a study comparing the potency of four adjuvants for raising anti-rabies antibodies in horses [48].

A more recent study in sheep demonstrated that a vaccine against enterotoxaemia adsorbed in bentonite was a more economical alternative to the vaccine adsorbed into alum, with no loss of vaccine efficacy [49].

Manufacturing methods for aluminum salts

Aluminum oxides and hydroxides are generally prepared through the addition of NaOH or NH_3 solutions to a solution containing an aluminum salt (AlCl_3 , $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$). Other aluminum-based adjuvant salts are prepared similarly, the only difference being the simultaneous addition of a phosphate (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), bicarbonate or sulfate salt. The properties of the resulting gel (i.e., surface area and charge, chemical composition, structure) are significantly influenced by the details of the manufacturing process, including factors, such as pH, temperature, concentration and chemical engineering variables (reactor geometry and rate of mixing). Quality specifications for aluminum-based gels used as adjuvants usually list parameters such as the contents of aluminum and some other ions (nitrates, sodium, chlorides, and sulfates), sterility, viscosity, sedimentation rate, adsorption capacity and isoelectric point, among others [50].

A number of amorphous hydrated structures, all in multiple equilibria with different aluminum species, are formed during the production of these gels. For instance, in aqueous solutions below pH 3, aluminum exists as a complex aquo ion $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, usually written simply as Al^{3+} . At slightly higher pH the

$[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ ion undergoes successive deprotonations, forming the $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})]^{2+}$ ion and a number of hydrocomplexes [51, 52]. At pH close to 7, $\text{Al}(\text{OH})_3$ begins to precipitate, and finally, at basic pH, $\text{Al}(\text{OH})_3$ is solubilized again, forming the aluminate ion $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$.

Calcium salts

Calcium phosphate

Calcium phosphate was originally examined as an alternative to aluminum-based adjuvants by Prof. Edgar H Relyveld, working at the Pasteur Institute. It has since been used as an adjuvant in vaccines against diphtheria, tetanus, whooping cough, poliomyelitis, tuberculosis, yellow fever, measles and hepatitis B, also forming part of immunotherapeutic preparations against a number of allergens [53-55].

Although the properties of calcium salts are similar to those of aluminum, the former exhibit a number of potential advantages. To begin with, calcium is a normal constituent of the human body and is, therefore, well tolerated; its capacity for adsorbing antigens is excellent, and antigen release proceeds only slowly; lastly, it stimulates the induction of IgG but not IgE antibodies, decreasing the possibility of long-term side effects that are usually detectable only in expensive large scale post-marketing trials. However, there have been sporadic cases of neurological reactions after the administration of *Bordetella pertussis* vaccines adsorbed with this adjuvant, and the World Health Organization, together with the European Pharmacopoeia, has therefore recommended an upper safety limit of 1.3 mg of calcium/dose [56].

The empirical formula of calcium phosphate as employed in adjuvants is approximated by $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_x$. X-ray diffraction, infrared spectroscopy and thermal analysis, among other techniques, have shown that commercially available calcium phosphate is a non-stoichiometric hydroxyapatite: $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ (where x ranges from 0 to 2). Surface charge depends on pH, and its isoelectric point is 5.5. Calcium phosphate, therefore, is negatively charged at physiological pH, and adsorbs positively charged antigens through electrostatic interactions. This adjuvant can also adsorb phosphorylated antigens through ligand exchange via surface hydroxyls [57].

The adjuvant properties of calcium phosphate are strongly dependent on precipitation conditions, in a manner very similar to that described above for aluminum salts. Precipitates produced through the rapid mixing of two reactants adsorb 100 % of diphtheria toxoid, but those produced by slow addition only adsorb 58 % of the same dose; a phenomenon caused by molar Ca/P ratios that can vary from 1.35 to 1.83 depending on mixing rate [58].

Recently, calcium phosphate nanoparticles have been synthesized that show better physicochemical characteristics and performance than traditional preparations [59]. These nanoparticles, which produce less inflammatory reactions at the injection site, higher IgG2a titers and lower IgE titers than aluminum-based adjuvants, are regarded as a good alternative for immunization schemes involving viral antigens, and have already been applied in studies employing the

34. Peek JL, Russell Middaugh C, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60:915-28.

35. Jones LS, Peek LJ, Power J, Markham A, Yazzie B, Middaugh R. Effects of Adsorption to Aluminum Salt Adjuvants on the Structure and Stability of Model Protein Antigens. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13406-14.

36. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol.* 2004;82:497-505.

37. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine.* 2002;20:S18-S23.

38. Clausi A, Cumiskey J, Merkley S, Carpenter J, Braun LJ, Randolph TW. Influence of particle size and antigen binding on effectiveness of aluminum salt adjuvants in a model lysozyme vaccine. *J Pharm Sci.* 2008;97(12):5252-62.

39. Shirodkar S, Hutchinson RL, Perry DL, White JL, Hem SL. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. *Pharm Res.* 1990;7(12):1282-8.

40. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminum phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure. *Vaccine.* 2001;19:275-81.

41. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminum phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part II: physicochemical properties. *Vaccine.* 2001;19:282-7.

42. Hem SL. Elimination of aluminum adjuvants. *Vaccine.* 2002;20:S40-S43.

43. Caulfield MJ, Shi L, Wang S, Wang B, Tobery TW, Henryck Mach, et al. Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice. *Hum Vaccines* 2007;3(4):139-46.

44. Kawamura Y, Sawai Y. Study on Indian Cobra Venom toxoid. *Snake.* 1989;21:6-8.

45. Kawamura Y, Sawai Y. Study on the immunogenicity of purified toxoid of Siamese Cobra (Naja Naja kaouthia) Venom. *Snake.* 1989;21:81-4.

46. Stieneker F, Kersten G, van Bloois L, Crommelin DJ, Hem SL, Löwer J, et al. Comparison of 24 different adjuvants for inactivated HIV-2 split whole virus as antigen in mice. Induction of titres of binding antibodies and toxicity of the formulations. *Vaccine.* 1995;13(1):45-53.

47. Fujimaki H, Ozawa M, Imai T, Kubota K, Watanabe N. Adjuvant effects of aluminum silicate on IgE and IgG1 antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1984;75(4):351-6.

48. Arora S, Sharma S, Goel SK, Singh US. Effect of different adjuvants in equines for the production of equine rabies immunoglobulin. *Natl Med J India.* 2005;18(6):289-92.

49. Basavalingappa BS, Krishnamurthy GV, Suryanarayana VVS, Byregowda SM, Isloor S, Mayanna A, et al. Immune response of sheep to bentonite clay and alum adjuvanted enterotoxaemia vaccines. *Indian J Animal Sci.* 2008;78(4):339-41.

50. Matheis W, Zott A, Schwanig M. The role of the adsorption process for production and control combined adsorbed vaccines. *Vaccine.* 2002;20:67-73.

intranasal route to elicit mucosal immune responses in animal models [59-62]. Nano-structured calcium phosphate is, therefore, a good example of how it is possible to develop far superior adjuvants by simply modifying the size and morphology of existing compounds.

Calcium alginate

Calcium alginate is prepared from sodium alginate, which polymerizes in the presence of the former and forms depots where the antigen is adsorbed. The adjuvant effect of this preparation has been studied in mice, where it has been used in the production of antisera for *Bothrops asper* venom and in a number of assays involving antibacterial and antiviral vaccines. When used for experimental typhoid vaccines, it has been proven better at eliciting a humoral response than conventional adjuvants [63]. It should be noted, however, that calcium alginate is less potent as a vaccine adjuvant than Freund's, and has been shown to be unable to increase the immune response against diphtheria toxoid [64, 65].

Calcium chloride

Calcium chloride mixed with liposomes (forming cylindrically shaped cochleates) has been evaluated in intranasal vaccines used to stimulate mucosal immune response in animal models [66]. Also, it has recently been shown to have a good adjuvant effect when included in the AMVAD (*archaeal lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery*) formulation, an intranasal formulation based on archaeobacterial lipids that can promote a long-lasting systemic immune response in mice [67].

Magnesium compounds

Crystalline magnesium hydroxide has been employed in a mixture at equal proportions with amorphous aluminum hydroxycarbonate, sold under the registered trade mark of Imject Alum®. It has been shown to be an effective adjuvant in mice, but has not been examined yet in clinical trials [68, 69].

Another magnesium salt whose adjuvant effect has been studied is the penta-hydrate of magnesium hydroxycarbonate. In mice, the latter performed better than aluminum hydroxide for the induction of specific anti-TT antibodies [70].

Iron salts

Iron phosphate

Iron phosphate is an amorphous compound with an average particle size ranging from 0.01 to 300 µm. Studies in mice have shown that it is tolerated as well as aluminum hydroxide. Iron phosphate is an effective adjuvant for the induction of IgG1 antibodies, but is not better for this purpose than aluminum hydroxide (it is better, however, than iron hydroxide). The amount of iron per dose is limited by regulatory agencies to 0.2-1.4 mg per dose [71].

Colloidal iron

Colloidal iron is actually a mixture of iron (III) hydroxide and oxide, with varying stoichiometry and hydration levels. Its particle size ranges from 1 to 500 nm, and its adjuvant capacity is similar to that

of aluminum hydroxide, but advantageously effective at stimulating the induction of cytotoxic T-lymphocytes. In experimental animals (mice), colloidal iron has been shown to increase the immunogenicity of TT and inactivated Tick-Borne Encephalitis Virus. Adsorption-wise, this type of colloid performs better than pure iron hydroxide gels, binding a wider range of proteins [72, 73].

Carbonyl iron

This compound forms spherical particles that have exhibited a potent adjuvant effect for the induction of allergic encephalomyelitis in rats. A similar adjuvant effect is exhibited by kaolin, but not other metallic iron suspensions such as iron oxide or iron-dextran. Carbonyl iron might become a useful tool for research into adjuvant mechanisms and cellular immunology due to its magnetic properties and ease of detection [74].

Compared to other alternatives, the iron-based adjuvants described above are handicapped by their smaller surface area/mass ratios, and therefore smaller adsorption capacities. In addition, these compounds exhibit slower absorption rates *in vivo*.

Zinc compounds

Zinc oxide

The adjuvant effect of zinc oxide has been studied in mice, where it stimulates Th2-type responses. According to the available data, zinc oxide is a safer alternative to aluminum hydroxide, as it is more potent, less toxic, and induces IgE in lower proportions [75, 76].

Zinc sulfate

Zinc sulfate has been used as adjuvant in formulations intended for topical use [77]. It was also studied in a clinical trial describing its effect on the immune response to a recombinant hepatitis B vaccine in the elderly, although this research has failed to detect a significant effect of this compound on antibody generation for this target population [78].

Zinc hydroxide

It is well known that zinc hydroxide is an effective protein and antigen sorbent. Not surprisingly, then, this compound has been shown to stimulate both cellular and humoral immune responses in mice and pigs. Adding lecithin increases the adjuvant effect and improves local tolerance for zinc hydroxide-based vaccines [78].

The adjuvanticity of zinc hydroxide in combination with calcium hydroxide, lecithin and hydrogenated poly- α -olefin is better than that of the individual components of this mixture.

Other studies have shown the effect of zinc chloride and acetate, with negative results. Not only their adjuvanticity is not detectable, but also local tolerance to their administration is low [78].

Manganese chloride

Manganese chloride has been tried in mice as an adjuvant, and found to stimulate the activity of natural killer cells (NK). It acts similarly to more complex compounds that induce the synthesis of interferons [79-81].

51. De Oliveira EC, Moita JM, Fujiwara FY. Aluminum Polyphosphate Thermoreversible Gels: A Study by ³¹P and ²⁷Al NMR Spectroscopy. *J Colloid Interface Sci.* 1995;176(2):388-96.

52. Teagarden DL, Kozlowski JF, White JL, Hem SL. Aluminum chlorohydrate I: Structure studies. *J Pharm Sci.* 1981;70(7):758-61.

53. Coursaget P, Yvonné B, Relyveld EH, Barres JL, Diop-Mar I, Chiron PJ. Simultaneous administration of diphtheria-tetanus-pertussis-polio and hepatitis B vaccines in a simplified immunisation programme: immune response to diphtheria toxoid, tetanus toxoid, pertussis and hepatitis B surface antigens. *Infect Immun.* 1986;51(3):784-7.

54. Relyveld EH. A history of toxoids. In: Plotkin SA, Fantini B, editors. *Vaccinia, vaccination, vaccinology*. New York: Elsevier; 1996. p. 95.

55. Relyveld EH, Hi-Nocq E, Raynaud M. Etude de la vaccination antidiphtherique de sujets allergiques, avec une anatoxine pure adsorbée sur phosphate de calcium. *Bull World Health Org.* 1964;30:321-5.

56. Gupta RK, Siber GR. Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals.* 1994;22(1):53-63.

57. Jiang D, Premachandra GS, Johnston C, Hem SL. Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine.* 2004;23:693-8.

58. Relyveld EH. Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Dev Biol Stand.* 1986;65:131-6.

59. He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(6):899-903.

60. Abd el-Razek NEE, Shoman SA, Mohamed AF. Nanocapsulated Rift Valley Fever vaccine candidates and relative immunological and histopathological reactivity in out bred Swiss mice. *J Vaccines Vaccin.* 2011;2:115.

61. He Q, Mitchell A, Morcol T, Bell SJ. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):1021-4.

62. Contorni M, Singh M, Derek O'Hagan D, inventors; Novartis, assignee. Compositions with antigens adsorbed to calcium phosphate. United States patent US 20090035326. 2009 Feb 5.

63. Sterne M, Trim G. Enhancement of the potency of typhoid vaccines with calcium alginate. *J Med Microbiol.* 1970;3(4):649-54.

64. Shapiro A, Modai Y, Kohn A. Efficacies of vaccines containing alginate adjuvant. *J Appl Microbiol.* 1967;30(2):304-11.

65. Kohn A, Helerling I, Ben-Efraim S. Adjuvant properties of alginate in bacterial, viral and protein vaccines. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1969;36(1-2):156-62.

66. Mannino RJ, Canki M, Feketeova E, Scolpino AJ, Wang Z, Zhang F, et al. Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;32(3):273-87.

Zirconium salts

Adjuvanticity studies have been performed for several zirconium salts and combinations thereof: zirconium and sodium lactate, zirconium lactate and aluminum, zirconium oxychloride, zirconium and aluminum glycinate and zirconium hydroxide. These compounds have been found to stimulate the immune response, producing larger titers of IgM antibodies in mice. Although the existing literature provides no further details, it is argued that these adjuvants induce a prolonged, more sustained production of antibodies.

In pigs, there is a direct relation between the extent of chronic inflammation induced by zirconium-based adjuvants (with the exception of zirconium hydroxide, $(\text{Zr}(\text{OH})_4)$ and activation of the complement cascade [16, 82].

Cerium nitrate

There are several different forms of cerium nitrate ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_4$), although most medical applications of this salt employ its hexa-hydrate ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$). Currently, cerium nitrate is used as adjuvant in silver sulfadiazine creams. There is some data describing the in vitro evaluation of the protein adsorption capacity of cerium oxide and its uptake by lung adenocarcinoma cells [83].

Beryllium salts

A study in mice susceptible to infection by *Leishmania* spp. demonstrated that beryllium sulfate promoted significantly the production of interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$). This compound was shown to synergize with interleukin 12 (IL-12), stimulating the production of Th1 cytokines; these findings have led to the examination of the adjuvanticity of beryllium salts [84]. Beryllium oxide ($\text{Be}(\text{OH})_2$) has been used as an adjuvant in animal experimentation [85].

Oxides

Aerosil

Aerosil 200 is a formulation based on highly dispersed 11 % (w/v) silicon dioxide that has found ample use as an auxiliary substance in pharmaceutical and cosmetic applications, due to its hydrophilicity. A similar formulation by the name of aerosil R972 is a hydrophobic dispersion of 1 % (w/v) silicon dioxide employed for the manufacture of pills from hygroscopic powders or granules [46]. The adjuvanticity of both formulations was evaluated in mice using inactivated HIV-2 antigens, finding that both were able to stimulate the production of antibodies against the gp120 glycoprotein.

Other oxides

The adjuvanticity of silica, (SiO_2), talcum powder ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$), aluminum oxide (Al_2O_3), tin oxide (SnO_2), zirconium oxide (ZrO_2), hematite (Fe_2O_3) and magnetite (Fe_3O_4) was evaluated in rats using ovalbumin as model antigen [86]. That study found that aluminum oxide, hematite and magnetite showed moderate adjuvanticity, but found tin and zirconium oxides to be very poor adjuvants. No link was detected between the hydrophobicity and hydrophilicity of these oxides and the magnitude of the resulting adjuvant effect.

Adjuvant mixtures

Algamulin

Taking advantage of the fact that gamma inulin, a natural algal polysaccharide, is a potent activator of the alternative complement pathway, Cooper *et al.* [87] combined aluminum hydroxide with gamma inulin. This combination, christened as 'algamulin', has been found to provide an adjuvant effect when combined with commercially available antigens such as diphtheria and tetanus toxoids, respiratory syncytial virus and protein E7 from the human papilloma virus [87].

AS04

AS04 (for Adjuvant system 04) is one of the very few examples of a novel, groundbreaking adjuvant that has actually been licensed for inclusion into prophylactic human vaccines. This compound is a combination of two different adjuvants with mutually complementary profiles: the time-tested aluminum hydroxide and monophosphoryl lipid A (MPL). This last is a purified, detoxified lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* that retains its affinity for Toll-like receptor 4 (TLR-4). AS04 is used in a commercially available Hepatitis B vaccine (marketed as Fendrix®) that is indicated preferentially for patients under hemodialysis and in immunosuppressive situations, and in a vaccine against the human papilloma virus (marketed as Cervarix®) [88].

Imject Alum®

Aluminum hydroxide-magnesium hydroxide, marketed under the Imject Alum® (Pierce Biotechnology, USA), is a 1:1 mixture of amorphous aluminum hydroxycarbonate with crystalline magnesium hydroxide that is very similar to Maalox®, a well-known antacid. This combination has only been used in studies involving experimental animals, but is reported as very effective. Its mechanism of action is based on the activation of inflammasome NLRP3 [89].

Noteworthy, adjuvant combinations represent a cost-efficient, quick solution whenever an adjuvant that can simultaneously stimulate a prolonged and intense antibody-based Th2 response and a potent Th1 response (fundamental for the protection against viruses and intracellular bacteria) is not available. Also, in addition to guaranteeing the intensity and quality of the induced response, these mixtures offer the possibility of including a homing molecule that may direct these responses to a specific immune response compartment.

Concluding remarks

Most inorganic adjuvants are employed as gels despite the previous availability of water-soluble divalent and trivalent metal salts of proven adjuvanticity, such as calcium gluconate, manganese gluconate, manganese glycerophosphate, aluminum acetate and aluminum salicylate [90]. The quality of these gels changes according to the manufacturer, hence, their adjuvant effect is sometimes far from optimum. This situation has pushed vaccine manufacturers into a search for alternatives of their own [91].

Most studies examining the adjuvanticity of inorganic compounds have used commercially available

67. Patel GB, Zhou H, Ponce A, Chen W. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using arachaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine*. 2007;25(51):8622-36.

68. Lambrecht BN, Kool M, Willart M, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:23-9.

69. Munks MW, McKee AS, Macleod MK, Powell RL, Degen JL, Reisdorph NA, *et al.* Aluminum adjuvants elicit fibrin-dependent extracellular traps in vivo. *Blood*. 2010;116(24):5191-9.

70. Kristensen N, Uldal J, Aasmul-Olsen S, Lund L, inventors; ALK-Abello A/S, assignee. Parenteral vaccine formulations and uses thereof. United States patent US 7785611 B2. 2010 Aug 31.

71. Sauzeat E, inventor; Sanofi Pasteur S.A., assignee. Vaccine composition comprising iron phosphate as vaccine adjuvant. United States patent US 06927235. 2005 Aug 9.

72. Eibl J, Leibl H, Mannhalter J, inventors; Tempo G, assignee. Adjuvant based on colloidal iron compounds. United States patent US 5895653. 1999 Apr 20.

73. Leibl H, Tomasits R, Brühl P, Kerschbaum A, Eibl MM, Mannhalter JW. Humoral and cellular immunity induced by antigens adjuvanted with colloidal iron hydroxide. *Vaccine*. 1999;17(9-10):1017-23.

74. Levine S, Sowinski R. Carbonyl iron: a new adjuvant for experimental autoimmune diseases. *J Immunol*. 1970;105(6):1530-5.

75. Matsumura M, Nagata M, Nakamura K, Kawai M, Baba T, Yamaki K, *et al.* Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010;32(1):56-62.

76. Li T. Zinc hydroxide as a new vaccine adjuvant enhance the humoral immune response of HAV antigen [Master Dissertation]. Beijing: Peking Union Medical College; 2008.

77. Torvi J, Dambal SS, Indumati V. Effect of adjuvant oral zinc sulphate therapy in psoriasis patients. *Int J Med Res*. 2010;1(2):106-10.

78. Dieter B, inventor; Behringwerke Aktiengesellschaft, assignee. Solutions containing antigen and zinc hydroxide or iron hydroxide as an adjuvant and processes for preparing such solutions. United States patent US 5252327. 1993 Oct 12.

79. Rogers RR, Garner RJ, Riddle MM, Luebke RW, Smialowicz RJ. Augmentation of murine natural killer cell activity by manganese chloride. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983;70(1):1-17.

80. Smialowicz RJ, Luebke RW, Rogers RR, Riddle MM, Rowe DG. Manganese chloride enhances natural cell-mediated immune effector cell function: Effects on macrophages. *Immunopharmacology*. 1985;9(1):1-11.

81. Smialowicz RJ, Rogers RR, Riddle MM, Luebke RW, Rowe DG, Garner RJ. Manganese chloride enhances murine cell-mediated cytotoxicity: effects on natural killer cells. *J Immunopharmacol*. 1984;6(1-2):1-23.

salts without paying due consideration to physico-chemical properties such as polymorphisms, solubility constants, lattice energies, bonding (whether covalent or ionic), medium pH, oxidation status, particle size and antigen adsorption capacity, which impact directly the *depot* and *presentation* effects commonly attributed to adjuvants. Consequently, many research groups have rejected or ignored compounds that can potentially perform better as adjuvants than traditional aluminum salts [92].

Research in this field has focused not only on obtaining new adjuvants, but on developing new formulations from existing compounds. Nanotechnology offers the promise of inorganic salts whose properties can be shaped at a nanometric scale, potentially increasing their surface area and, thereby, favoring antigen absorption and intake by antigen-presenting cells (especially dendritic cells). The particulate nature of viruses and bacteria is mimicked much more efficiently by nanometer-sized aggregates, as exemplified by calcium phosphate and aluminum oxide nanoparticles.

Studying, obtaining and evaluating new polymorphic forms from safe and well-known aluminum and calcium compounds is an additional research avenue that will yield new structural, morphological and

chemical data for re-evaluating existing adjuvants such as zinc and iron salts.

Currently, there is a trend towards the use of adjuvant mixtures, often combining compounds whose properties are mutually complementary as illustrated by the paradigmatic example of AS04. It should be stressed, however, that we are only scratching the surface of the world of potential applications offered by mixtures of inorganic adjuvants or the synthesis of artificial minerals with the exact chemical makeup required for increasing vaccine potency while keeping side effects to a minimum. A good starting point for the quest towards the ideal inorganic adjuvant would be the preparation of a compound mixing zinc hydroxide (Zn(OH)_2 , a known Th1 promoter) with more traditional Th2-promoting calcium and aluminum salts.

In closing, it must be remarked that the application of inorganic compounds as vaccine adjuvants remains a lively and growing research field. The application of the latest advances in nanotechnology, together with the appearance of adjuvant combinations or the preparation of nanostructured compounds using salts or ions stimulating both the humoral and cellular arms of the immune system through different vaccination routes, will no doubt eventually yield compounds overcoming the limitations of current vaccine technology.

82. Shima S, Morita K, Tachikawa S, Ito T, Kurita H, Yoshida T, *et al.* IgM Antibody Production in Mice Intraperitoneally Injected with Zirconium Oxide. *Br J Ind Med.* 1987;44(9):633-7.

83. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials.* 2007; 28(31):4600-7.

84. Lee JY, Atochina O, King B, Taylor L, Elloso M, Scott P, *et al.* Beryllium, an adjuvant that promotes gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68(7):4032-9.

85. Hall JG. Studies on the adjuvant action of beryllium. IV. The preparation of beryllium containing macromolecules that induce immunoblast responses *in vivo*. *Immunology.* 1988;64:345-51.

86. Naim JO, van Oss CJ, Wu W, Giese RF, Nickerson PA. Mechanisms of adjuvancy: I-Metal oxides as adjuvants. *Vaccine.* 1997; 15(11):1183-93.

87. Cooper PD. Vaccine adjuvants based on gamma inulin. *Pharm Biotechnol.* 1995;6: 559-80.

88. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, *et al.* AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol.* 2009;183(10):6186-97.

89. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F. Cutting Edge: Inflammasome activation by Alum and Alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol.* 2008;181(1):17-21.

90. Aucouturier J, Ganne V, Trouve G, inventors; Societe d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques, assignee. Vaccine composition of surfactants as adjuvant of immunity. United States patent US 7422748. 2008 Sep. 9.

91. Paneque A. El uso de las sales de aluminio como adyuvantes. IV International Symposium on Chemistry, 2010 Jun 1-4, Santa Clara, Cuba.

92. Paneque A. Compuestos inorgánicos como adyuvantes. 8th International Congress on Chemistry, Chemical Engineering and Biochemistry, 2012 Oct 9-12, La Habana, Cuba.

Received in June, 2012.

Accepted in April, 2013.