

El papel de los Toll Like Receptors (TLRs) en la respuesta inmune innata contra el cáncer cérvico-uterino

Mayor M.C. y M. en C. Francisco Raúl **Aragón-Franco,*** Dr. en C. Constantino Roberto **López-Macías,**** Dra. en C. Iris Citlali **Estrada-García,***** Dr. en C. Horacio **Astudillo-de la Vega******

Escuela Médico Militar, México, D.F.

RESUMEN

La infección producida por el virus del papiloma humano (VPH) representa un problema de salud importante en la población femenina mexicana. Los papilomavirus humanos oncogénicos (VPHs) representan el agente causal primario del cáncer cérvico-uterino y están íntimamente asociados con un subgrupo de cánceres vulvares, anales y penianos. Aunque se han identificado más de 200 de genotipos diferentes, se han identificado como oncogénicos el VPH tipo-16 (VPH 16) y está presente en más de 90% de los cánceres cervicales, se sabe que está íntimamente asociada con el desarrollo de lesiones precancerígenas denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC), así como con el cáncer cérvico uterino (CaCu). La respuesta inmune innata contra el VPH es la primera línea de defensa contra el virus, ésta incluye el reconocimiento a través de “receptores del reconocimiento del patrón” (PRR), específicamente los “Toll-like receptos” (TLRs) que inician vías de señalización para inducir la expresión de genes que codifican para moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria y en el cambio de clase de las inmunoglobulinas.

The role of Toll Like Receptors (TLRs) in innate immune response against cervical cancer

SUMMARY

Infection of human papilloma virus (HPV) represents a major health problem in Mexican female population. Oncogenic human papillomaviruses (HPVs) represent the primary causative agent of cervical cancer and are closely associated with a subset of vulvar cancers, anal and penile. Although, we have identified more than 200 different genotypes have been identified as oncogenic HPV type-16 (HPV 16) and is present in more than 90% of cervical cancers, is known to be intimately associated with the development of lesions called precancerous cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer with (CC). The innate immune response against HPV is the first line of defense against the virus, this includes recognition through “pattern recognition receptors (PRR), specifically the Toll-like receptors (TLRs) that initiate the process of signaling to induce the expression of genes that encode molecules involved in the inflammatory response and class switch of immunoglobulins.

Palabras clave: Virus del papiloma humano, cáncer cérvico-uterino, neoplasia intraepileal cervical.

Key words: Human papillomavirus, cervical cancer, cervical intraepithelial neoplasia.

Introducción

Antecedentes

El cáncer es un problema de salud importante en México y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad tanto en niños como en adultos. El virus del papiloma humano (VPH) es una fuente significativa de morbi-mortalidad en los Estados Unidos Americanos (EUA) y en el mundo. Los

VPH oncogénicos (incluyen VPH 16 y VPH 18) están asociados con 99.7% de todos los cánceres cérvico-uterinos, así como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE-AG) y resultados de Papanicolaus (Pap) anormales. Aproximadamente 6.2 millones de nuevas infecciones ocurren cada año en los EUA y aproximadamente 20 millones de individuos están infectados.¹

* Subsección de Inmunología, Escuela Médico Militar. México, D.F. ** Unidad de Investigación en Inmunoquímica. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional SXXI, IMSS. *** Laboratorio de Inmunología Molecular II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. **** Laboratorio de Investigación Traslacional y Terapia Celular. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas. Hospital de Cardiología. Centro Médico Nacional SXXI, IMSS, México, D.F.

Correspondencia:

Dr. Francisco Raúl Aragón-Franco

Subsección de Inmunología, Escuela Médico Militar. México D.F. Tel.: 5540-77-28, Ext.: 175.

Correo electrónico: raulemm@yahoo.com.mx

Recibido: Mayo 20, 2010.

Aceptado: Julio 16, 2010.

El VPH es transmitido a través de contacto sexual piel a piel y es prevalente en toda la población sexualmente activa. El Centro para el Control de Enfermedades (CDC) estima que la mitad de todos los individuos sexualmente activos adquirirán VPH en alguna época de sus vidas, mientras que aproximadamente 80% de las mujeres adquirirán la infección por VPH a los 50 años de edad. En los EUA se estima que 10% de la población tiene infección activa por VPH, 4% tenía una infección que causó anomalías citológicas y 1% adicional quienes tienen infección que causa verrugas genitales. Se calcula que 1% de los habitantes de los EUA tienen verrugas genitales clínicamente visibles.²

El virus del papiloma humano (VPH)

Los papilomavirus son virus pequeños no encapsulados con un diámetro de 55 nm y cápside icosaédrica que contiene un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena de aproximadamente 8,000 pares de bases (pb). La cubierta proteica que rodea al ADN viral posee una proteína llamada L1. Los genes se agrupan en tempranos E1 a E7, incluyendo las propiedades oncogénicas. Los genes tardíos L1 y L2 determinan las proteínas de la cubierta proteica viral. Están ampliamente distribuidos a través del reino animal, infectando al epitelio escamoso. Los virus de manera individual son denominados de alto riesgo o de bajo riesgo de acuerdo a la propensión para la progresión de la malignidad de las lesiones que causan. La mayoría de los VPHs son de bajo riesgo y producen verrugas benignas localizadas, que no progresan hacia la malignidad.³

Expresión génica del VPH en cáncer cervicouterino

Uno de los eventos claves de la carcinogénesis es la integración del genoma del VPH en los cromosomas del huésped. La integración del genoma de VPH frecuentemente ocurre cerca de sitios frágiles del genoma humano,⁴ pero no aparecen en “puntos calientes” para su integración y no se evidencia para la mutagénesis insercional.⁵ La expresión de los genes virales E6 y E7 está consistentemente mantenida, mientras otras porciones del ADN viral son deletados o su expresión esta detenida.⁶ La pérdida de la expresión del represor transcripcional VPH E2 es significativa y puede resultar en una desregulación de la expresión de E6 y E7.⁷

La expresión de los genes de alto riesgo E6 y E7 en queratinocitos primarios humanos facilita su immortalización. La proteína E7 de alto riesgo interactúa con pRB (retinoblastoma) más eficientemente que E7 codificada por VPH de bajo riesgo. E7 de alto riesgo tiene la única capacidad de desestabilizar el “bolsillo” de las proteínas a través del mecanismo dependiente de los proteasomas que es crítico para la transformación celular¹ (Figura 1).

La respuesta inmune al cáncer

El sistema inmune ha sido tradicionalmente dividido en un componente innato y adaptativo, cada uno con diferentes funciones. El componente adaptativo esta organizado en dos

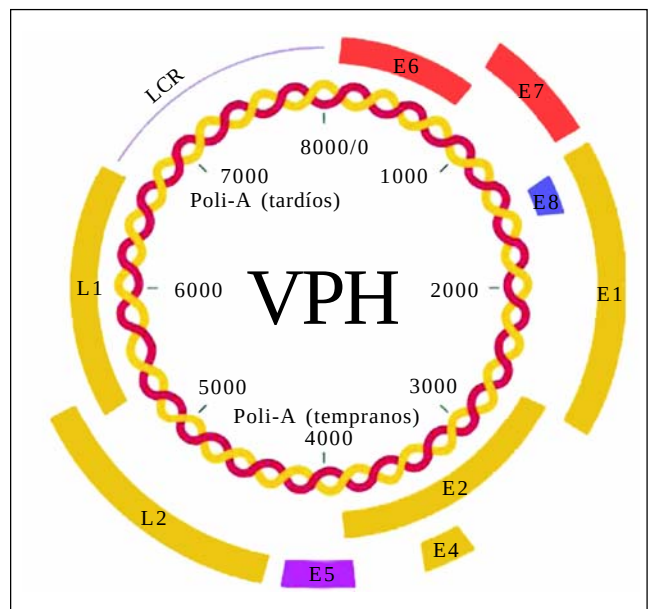


Figura 1. Genoma del VHP16.

clases de células especializadas, linfocitos B y linfocitos T. En general, la respuesta inmune en las mucosas a la infección comienza con las células de la epidermis, específicamente los queratinocitos, que secretan señales de alarma, las cuales actúan sobre células del sistema inmune y también sobre las células infectadas. Estas señales de alarma son las quimiocinas, citocinas, moléculas de adhesión y proteasas, las primeras, dirigen la migración de monocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, natural killers (NK), células dendríticas (CDs) y células endoteliales, mientras que los interferones (IFNs) inhiben la replicación viral dentro de las células infectadas.⁸

La respuesta inmune al CaCu producido por el VPH

Sólo un pequeño porcentaje de mujeres infectadas desarrolla CaCu. Se requieren de eventos adicionales para la progresión, tales como la integración viral y otras mutaciones que reflejan la inestabilidad genómica originada por la expresión de E6 y E7. El sistema inmune es capaz de limitar la enfermedad a través de la eliminación de lesiones preexistentes como se evidencia a través de la mayoría las infecciones de VPH-16 y la elevada incidencia de cánceres relacionados a VPH en individuos inmunocomprometidos. Las numerosas estrategias de señuelo empleadas por el virus para escapar de la vigilancia del sistema inmune son importantes para la persistencia viral y progresión del cáncer. Sólo la mitad de los pacientes con CaCu generan inmunoglobulina G (IgG) cápside específica.⁹

Los anticuerpos neutralizantes son mediadores críticos de la inmunidad a los retos microbianos. Éstos pueden ser rápidamente generados a través de mecanismos células Th CD4+ independientes o más despacio como la respuesta inmune adaptativa.¹⁰ El reconocimiento innato de los “patrones moleculares asociados al patógeno” (PAMPs) vía célula

presentadora de antígeno (CPA) a través de las CDs, expresando moléculas coestimuladoras y secretando citocinas. Estas señales provenientes de las CDs pueden dirigir la polarización de las células CD4⁺ vírgenes Th tipo 1 y tipo 2 hacia el fenotipo Th1 o Th2.¹¹ Las células Th1 producen interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que dirigen a las células B a producir IgG2a antígeno-específica, mientras las células Th2 expresan interleucina-4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9) e interleucina 13 (IL-13) para promover el cambio de clase de IgG1 e IgE. El factor estimulante de los linfocitos B, miembro de la superfamilia del TNF y un “ligando de la inducción de la proliferación” (APRIL), expresados por monocitos y CDs también regulan el “cambio de clase de las inmunoglobulinas” (CSR).¹² El interferón α (IFN- α) induce la expresión de moléculas coestimuladoras sobre la superficie de CDs.¹³ Sin embargo, en la ausencia de las células T CD4⁺, ciertos antígenos inducen células B antígeno-específicas, a esta respuesta se le denomina “inmunidad humoral independiente de las células Th”.^{14,15} Esta respuesta la proporciona el huésped con la especificidad del sistema inmune adaptativo y la rapidez de la inmunidad innata, estableciendo una producción rápida de anticuerpos neutralizantes.^{16,17} Varios virus, como el virus de la estomatitis vesicular¹⁸ poliomavirus¹⁹ y rotavirus²⁰ han mostrado ser independientes de las células Th en la generación de anticuerpos neutralizantes.

Rongcun Yang y cols.²¹ demostraron la importancia del ensamblaje de la cápside y el reconocimiento inmune de múltiples mutaciones en los otros residuos estructurales altamente conservados presentes dentro de VPH-16 L1, proveniente de un subgrupo de carcinoma cervical y de NIC de alto grado, identificaron varios mutantes VPH-19 L1 transportando genes que codifican proteínas que no activan la respuesta inmune innata y adaptativa dependiente de VLP, organizada a través de las CDs. Esto puede representar evasión del reconocimiento inmune innato durante la carcinogénesis cérvico-uterino.

Las células B B1 localizadas en la zona marginal se consideran protagonistas de una función importante en la respuesta humoral independientes de las células Th. Recientemente se ha sugerido que los TLRs protagonizan una función en los eventos de señalización en las células B B1 y la respuesta inmune independiente de las células T (161). La estructura génica, altamente ordenada, bien empaquetada de la proteína HPV-16 L1 VLP induce tanto altos títulos de anticuerpos protectores²²⁻²⁴ y una potente respuesta inmune mediada por células.

Se sabe que IL-12 e IFN- γ promueven la polarización Th1, mientras IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y el factor de crecimiento de granulocitos (G-CSF) están asociadas con la respuesta Th2.²⁵ Estudios recientes han demostrado que VPH-16 VLPs se une a las CDs y estimulan su maduración, incluyendo la sobreexpresión de complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), CD80, CD86, y CD40 y la producción de citocinas.²⁶⁻²⁸ Rougcn Yang y cols.²⁹ demostraron a través de un análisis de expresión

génica global que VPH-16 VLPs activan diferentes subgrupos de CDs esplénicas para producir respuestas polarizadas, además encontraron que las CDs CD4⁺CD11C⁺ sobreexpresan la transcripción de IFN- α y citocinas relacionadas a Th2 y quimiocinas, mientras el IFN- γ y las citocinas Th1 y las quimiocinas son producidas por las CDs CD8⁺CD11C⁺ en respuesta a VPH-16 VLPs. IFN- α pero no IFN- γ aumentan la señalización mediada por la producción de Ac VLP-específica y particularmente el cambio de clase de IgG2a. La producción de tal respuesta opuesta a un único Ag sugiere un linaje de CD especializada la cual predetermina la polarización. Esta respuesta a través de CDs especializadas es crucial para el control de patógenos invasores antes de la inmunidad adaptativa.³⁰

Dos genes en los VPH de alto riesgo están asociados con el potencial para transformar las células infectadas. La expresión de E6 está inversamente correlacionada con la expresión de interleucina-18 (IL-18), una citocina proinflamatoria similar a IL-1 que induce la producción de IFN- γ . E6 y E7 desregulan la expresión de IL-8, un quimioatrayente para las células T.³¹ También suprimen la expresión de la quimiocina llamada proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).³²

Así, E6 y E7 contribuyen al escape de propiedades antivirales y antiproliferativas del TNF- α e IFN- α a través de efectos estimuladores de crecimiento, e interacción con componentes de las vías de señalización del IFN.³³ Posterior a la infección, las quimiocinas secretadas por la epidermis inician la respuesta inmune adaptativa a través del reclutamiento de CDs.³⁴

La principal proteína de la cápside del virus, L1, se autoensambla para formar una partícula parecida al virus llamada “cápsides vacías” (VLPs) que son morfológica e inmunológicamente muy parecidos a los viriones nativos, pero carecen del genoma viral oncogénico.³⁷ Los VLPs presentan un alto ordenamiento y una estructura muy empaquetada³⁸ que generan altos títulos de anticuerpos protectores^{39,40} y además la respuesta inmune celular.⁴¹ La vacunación con VPH-16 L1 VLPs induce la respuesta inmune humoral vía Th1,^{42,43} que protege a la mujer de la adquisición de la infección por VPH-16 y la neoplasia intraepitelial cervical (NIC).⁴⁴ Además, la inmunogenicidad de los antígenos propios o poco extraños esta aumentada, a través de la fusión con VLPs.⁴⁵⁻⁴⁹

Las células de Langerhans (CLs) son las CDs que residen en la epidermis además de las CLs inmaduras, eficientes para la presentación de antígenos, monitorizando el microambiente epidérmico para el daño e infección. Las CLs maduran a través de la regulación diferencial de marcadores de superficie hacia áreas de células T del organismo, como los vasos linfáticos de la dermis u órganos linfoides periféricos. Aunque se ha demostrado que las CLs se mantienen en la piel por largos periodos de tiempo, los precursores de las CL se reclutan bajo condiciones de pérdida local de CLs como ocurre durante la inflamación.³⁴⁻³⁶

La respuesta inmune innata a la infección por VPH

La respuesta inmune innata es la responsable del primer contacto con partículas extrañas. Las células Th1 promueven

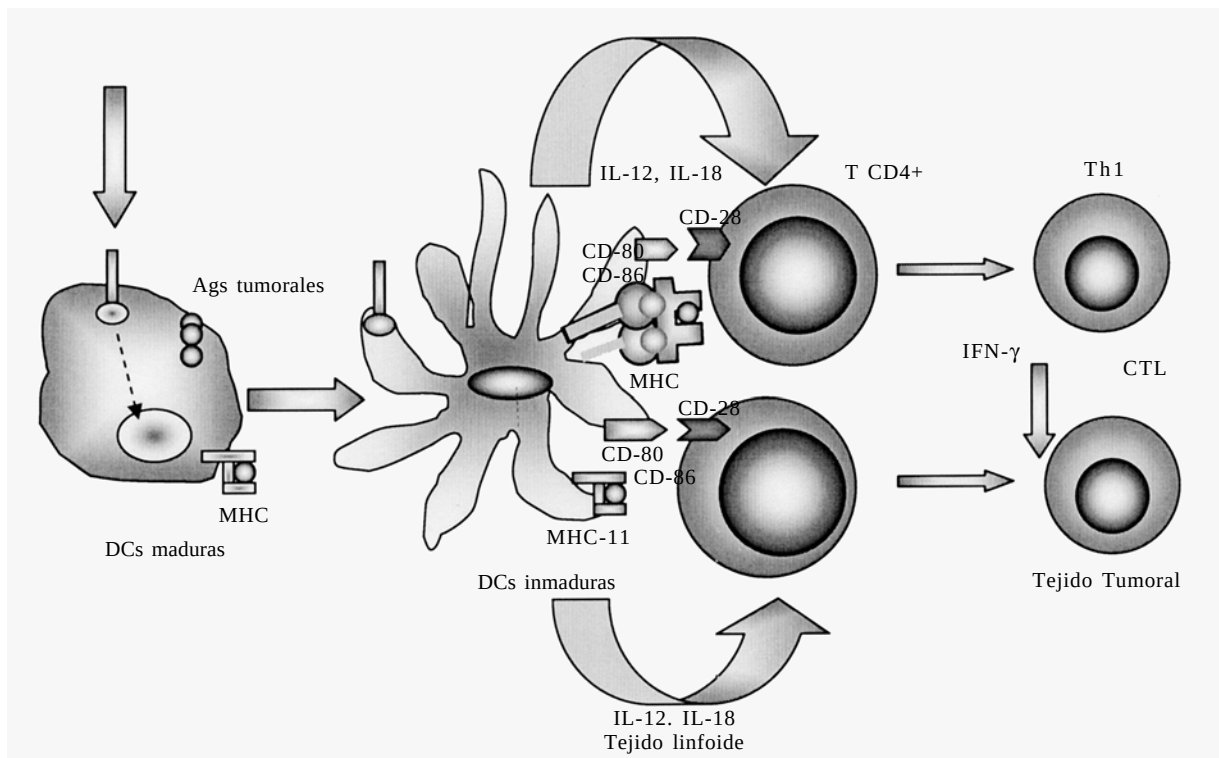


Figura 2. Ligandos de TLRs con capacidad anticáncer: r BCG-CWS, CpG-DNA, OK-432.

ven respuestas proinflamatorias que activan a los macrófagos y proporcionan apoyo a las células T citotóxicas CD8⁺. En contraste, las células Th2 proporcionan ayuda para la producción de anticuerpos por las células B y secretan ciertas citocinas, tales como la interleucina 10 (IL-10), que antagonizan la respuesta Th1 (*Figura 2*).

Los receptores del sistema inmune innato que son codificados en línea germinal. Están expresados en varias células efectoras del sistema inmune innato, de manera más importante sobre macrófagos, células dendríticas y células B. La expresión de los “receptores de reconocimiento de patrón” (PRR) no es clonal para los receptores presentes en un solo tipo de células (p.e. macrófagos). Desde que se identificaron los PRR, las células efectoras son estimuladas para llevar a cabo sus funciones efectoras inmediatamente después que han proliferado.⁸ Estructuralmente los PRR, pertenecen a varias familias de proteínas, dominios de repetición ricos en leucina y dominios de proteínas de receptor “scavenger”, están involucrados en el reconocimiento.^{50,51}

Desde el punto de vista funcional, los PRR pueden ser divididos en tres clases:

1. Secretorios.
2. Endocíticos.
3. De señalización.

Los PRR secretorios funcionan como opsoninas a través de la unión de la pared celular microbiana y marcándolos

para el reconocimiento del sistema del complemento y la fagocitosis.^{52,53}

Los PRR endocíticos son receptores que median la presentación y liberación de los patógenos hacia los lisosomas, donde son destruidos. Las proteínas derivadas de los patógenos pueden ser entonces procesadas y el péptido resultante puede ser presentado por las moléculas del MHC en la superficie de los macrófagos.⁵³

Los PRR de señalización inducen la expresión de una variedad de genes de la respuesta inmune, incluyendo las citocinas inflamatorias. Las CPAs y especialmente las DCs emplean PRRs en la detección de agentes infecciosos, incluyendo la familia Toll.⁵⁶ Los receptores recientemente identificados de la familia Toll, tienen la función principal de la inducción de la respuesta inmune e inflamatoria.

Los Toll Like Receptors

Toll-like receptors o Receptores Tipo Toll (TLRs), son proteínas transmembrana tipo I que han evolucionado de manera conservada entre insectos y humanos (*Figura 3*). La proteína Toll fue primero identificada como una molécula esencial para el desarrollo embrionario en la mosca *Drosophilla* y posteriormente mostró ser la clave de la inmunidad antifúngica. Una familia homóloga de los receptores Toll existe en mamíferos, así que también los llamaron TLRs. Basados en la similitud de las porciones citoplasmáticas (llamados Toll-IL-1R o dominio TIR), los TLRs están relacionados a los receptores de IL-1 (IL-1Rs). Las porciones

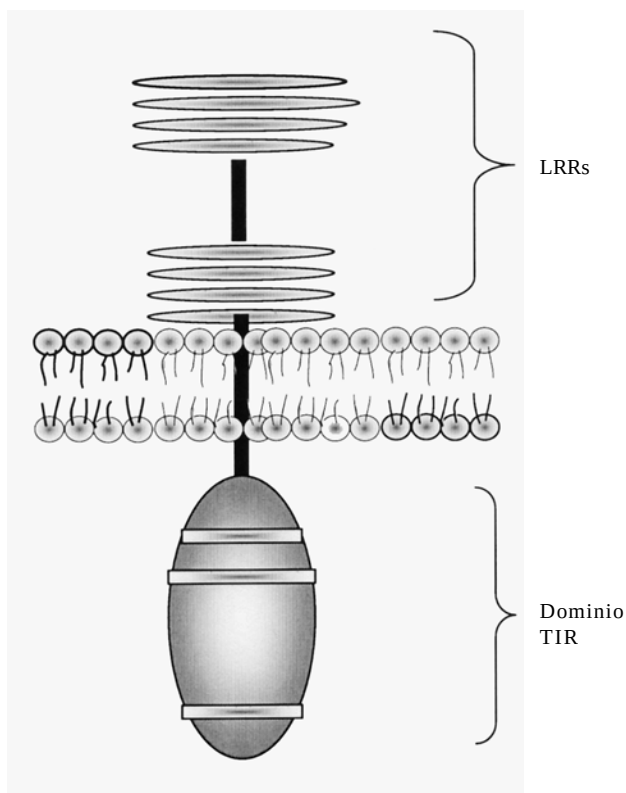


Figura 3. Estructura del TLR.

extracelulares de TLRs e IL-1Rs son completamente diferentes; la porción extracelular de los TLRs contienen repeticiones ricas en leucina, mientras IL-1Rs contienen tres dominios parecidos a inmunoglobulina.^{54,55} Trece TLRs han sido identificados; TLR 1 al 9 son comunes para el hombre y el ratón, mientras TLR 10 es sólo funcional en humanos y TLR11, 12 y 13 han sido encontrados sólo en ratones.⁵⁶⁻⁵⁹

TLR1, TLR2 y TLR 6 median el estímulo celular después de la interacción con peptidoglicano y otros productos microbianos, TLR3 con RNA de doble cadena (dsRNA), TLR4 con lipopolisacárido (LPS), TLR5 con flagelina, TLR7 y TLR8 con imidiazquinolinas y TLR9 con DNA CpG desmetilados (*Cuadro 1*). Los TLRs están diferencialmente expresados en los diferentes tipos de CDs y en monocitos.⁶⁰ Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 son muy parecidos en cuanto a la especialización en el reconocimiento principal de productos que son únicos en las bacterias y no los producidos en el huésped.

TLR3, 7, 8 y 9, en contraste se especializan en la detección viral y el reconocimiento de ácidos nucleicos. Éstos (TLR3,7,8,9) están localizados en compartimentos intracelulares llamados endosomas. Debido a que los ácidos nucleicos del huésped no son, normalmente accesibles en estos compartimentos, ellos no son blancos de los TLRs. Además en ciertas condiciones, tal como en una deficiente eliminación de células apoptóticas, los ácidos nucleicos derivados del huésped (complejos con ADN o proteínas de unión de ARN) se lleva a cabo el reconocimiento, para la activación de los TLR, los

cuales pueden romper la tolerancia e iniciar autoinmunidad.⁶¹

Toll Like Receptors en la inmunoterapia del cáncer

TLR9 se encuentra en CD plasmocitoides (CDp) y en linfocitos B en el humano, reconoce un patrón específico de nucleótidos del ADN, conocidos como CpG ADN que se encuentran en genomas virales y bacterianos, son poco comunes en el ADN humano. Una serie de motivos CpG, capaces de unirse y activar TLR9 han sido desarrollados de manera comercial (ProMune®, Coley Pharmaceuticals) como adyuvantes de inmunoterapia para su uso en humanos. Han sido aplicados de manera temprana solos o combinados con quimioterapia con poca toxicidad en melanoma, linfoma, cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) y con vacunas virales. Una combinación de Promune con Carboplatino/Taxol incrementa la respuesta en la primera línea de quimioterapia de NSCLC avanzado.

En ratones, motivos CpG han mostrado que aumentan la eficacia anti-tumoral de vacunas peptídicas y de ADN.⁶² La inducción de las células T específicas-VPH fue más eficiente en la terapia inducida por vacunación, cuando el antígeno E7 del VPH 16 administrados con ODN-CpG resultó en la erradicación del tumor, establecido y expresado por HPV-16.⁶³ Esto sugiere que la co-administración de ligandos de TLR con vacunas contra el cáncer proporcionan protección antígeno-específica, que es una respuesta inmune mediada por células T. La estimulación de CDp en humanos en algunas circunstancias puede producir una respuesta de Th1, requeridas en la inmunidad contra el cáncer.⁶⁴

La molécula sintética llamada Poly I:C (polyribinosinico:polyribocitilic acid), es un ARN de doble cadena sintético (dsRNA), es un ejemplo de ligando para TLR3,⁶⁵ el cual activa y madura CDs humanas *in vitro*.⁶⁶ Esto produce una CD fenotípicamente madura, estable con altos niveles de expresión de CD86, sobreexpresión de CD83 y altos niveles de IL-12 y bajos niveles en la producción de IL-10.⁶⁶

Las células T CD4+ también expresan TLRs, sugiriendo que los PAMPs pueden directamente activar células T CD 4+ para mediar la respuesta inmune. En ratones, se han en-

Cuadro 1. TLRs y sus lingandos.

TLRs	Ligandos
TLR 1	Triacil lipopéptidos
TLR 2	Peptidoglucanos.
TLR 3	RNA de doble cadena
TLR 4	LPS
TLR 5	Flagelina.
TLR 6	Ácido lipoteicoico.
TLR 7	RNA de cadena única.
TLR 8	RNA de cadena única
TLR 9	Motivos CpG
TLR 10	N.D.
TLR 11	N.D.
TLR 12	N.D.
TLR 13	N.D.

contrado agonistas de TLRs,³² poly I:C y CpG que dirigen la sobrevivencia prolongada de los linfocitos CD4⁺ vía interacciones con TLR3 y TLR9 sin presencia de células presentadoras de antígeno (CPA).⁶⁷ La administración de agonistas de los TLRs tienen el potencial en pacientes con cáncer para promover la co-estimulación para la activación de la respuesta de las células T de memoria antígeno-específicas e inducen un medio ambiente linfocítico apropiado para el desarrollo de la intensa respuesta de células T citotóxicas y Th1 antígeno-específicas.

Adyuvantes basados-dsRNA estimulan directamente a TLR3, presente sobre DC mieloides y células T en humanos.^{67,68} Poly I:C fue el primer análogo de dsRNA utilizado en la clínica para la estimulación de IFN-I previo al efecto sobre CDs y células T de memoria.⁶⁹ Esto ha sido investigado para su potencial uso terapéutico en leucemia e infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), con el inconveniente que induce efectos tóxicos colaterales que incluyen shock, insuficiencia renal, coagulopatías y reacciones de hipersensibilidad. Modificaciones en la estructura de Poly I:C a través de la introducción de bases no pareadas que resulta en un único dsRNA, llamado Poly I:C₁₂U.⁷⁰

In vitro, poly I:C₁₂U madura DC derivadas de monocitos hacia un fenotipo maduro con producción de altos niveles de IL-12.⁷¹ Las DCs inducen respuesta de células T antígeno-específicas con la producción significativamente menor de IL-10 que aquellas tratadas con el compuesto parenteral, Poly I:C.⁷¹ Un polímero relacionado, ácido poliadenílico-poliuridílico (poly A:U) ha sido evaluado como una terapia adyuvante con radioterapia loco-regional versus quimioterapia adyuvante CMF en cáncer de mama.⁷² Con un promedio de seguimiento de más de 14 años, poly A:U y radioterapia local proporciona sobrevivencia libre de enfermedad y reduce la incidencia de metástasis.⁷³

Algunos componentes microbianos como *Mycobacterium bovis* lisados por calor suspendidos en aceite mineral (p.e., adyuvante completo de Freund) han sido utilizados durante años para aumentar la respuesta inmune celular y humoral anti-cáncer.^{74,75} Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual los componentes microbianos inducen la respuesta inmune no ha sido totalmente elucidado. Es claro que estos componentes microbianos activan al sistema inmune innato y adaptativo a través del reconocimiento de PAMPs mediante los TLRs.^{75,76} El esqueleto de la pared del *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), aumenta la toxicidad de las células T y macrófagos contra las células cancerígenas, e induce *in vivo* efecto anti-tumor vía TLR2 y TLR4.⁷⁷ OK-432 una preparación liofilizada y lisada mediante penicilina de *Streptococcus pyogenes* del Grupo A, exhibe efectos anti-cáncer en un número de malignidades.^{78,79}

Una molécula relacionada a ácido lipoteicoico denominada OK-PSA, aislada de OK-432, es responsable de la mayoría de los efectos anticancerígenos. El efecto anti-cáncer de OK-PSA esta mediado a través de TLR4.⁷⁶ De la misma manera, una proteína denominada AILb-A, aislada de *Aeginetia indica* L., una planta parásita de las raíces de plantas acuáticas

japonesas o caña de azúcar, también muestra efecto anti-cáncer vía señalización a través de TLR4.^{76,80}

El ADN bacteriano, contiene dinucleótidos CpG desmetilados⁸¹ y han demostrado que aumentan la inmunidad humoral y celular contra cáncer vía TLR9.⁸²⁻⁸⁴ Compuestos sintéticos que están estructuralmente relacionados a ácidos nucleicos, tales como imidazoquinolinas, loxoribina y broprimina son ligandos de TLR7 (85,86). Estos ligandos de TLR7 son inmunomoduladores que poseen efectos anti-cáncer.^{87,88} Por lo tanto, PAMPs y ligandos sintéticos tienen el potencial como adyuvantes para el tratamiento del cáncer.

Con los reportes recientes de ligandos endógenos de TLRs, es concebible que moléculas intracelulares como las “proteínas de choque térmico” (HSPs), el domino extra A de fibronectina y heparán sulfato son liberados durante la progresión tumoral. Estas moléculas pueden entonces inducir inflamación persistente de bajo grado a través de la señalización de los TLR conllevando al reclutamiento de células supresoras mieloides y la desregulación subsecuente de la cadena ζ .⁸⁹

La señalización de TLR7 y TLR8 puede también tener potencial significativo como el blanco para la terapia del cáncer. Debido en parte, a que dos pequeños componentes antivirales sintéticos imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848), lo cual también es bien conocido como aumentadores de la respuesta inmune. Imiquimod y resiquimod dirigen su señal sobre la unión endosomal (intracelular) de TLR7 y TLR8. Utilizando ratones deficientes de MyD88, se demostró que la señalización ocurre a través de la vía TLR-MyD88. Esta actividad, ha sido atribuida a la capacidad de estos compuestos para inducir la producción de IFNs. El incremento de IFN- α y γ es observado en las células sanguíneas humanas tratadas con imiquimod *in vitro*.⁹⁰ La sobreexpresión de IFNs subsecuentemente induce la producción de otras citocinas tales como IL-1, IL-6 e IL-8 en varios tipos celulares.⁹¹

Las imidazoquinolinas han mostrado ser efectivos contra las infecciones virales tales como el VPH, herpes simple y también han sido exitosas para el tratamiento de condiloma intra-anal, verrugas genitales y molusco contagioso.⁹² La aplicación tópica de imiquimod sobre las lesiones cancerosas del carcinoma de células escamosas produce inflamación intensa y se utiliza como inmunoterapia en humanos.⁹³ Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* indican que el imiquimod induce apoptosis en células de melanoma en una manera tumoral selectiva.⁹⁴ El imiquimod tópico ha sido evaluado en docenas de otros cánceres incluyendo cáncer superficial de células basales, enfermedad de Bowen's y melanoma.⁹⁵

Muchos de estos están en fase II/III de investigación y 50% para completar la respuesta clínica han sido reportados. Otro compuesto, loxoribina (7-alil-7, 8-dihidro-8-oxoguanosina), un agonista de TLR7 dependiente de MyD88 está bajo ensayo clínico (Fase I) para la evaluación de esta actividad antitumoral en pacientes con cáncer avanzado.⁹⁶ Loxoribina muestra limitada toxicidad para células de mamífero y proporcionan seguridad para el uso humano. De los resultados

de observaciones clínicas, hay optimismo para el desarrollo de nuevos agonistas de TLR7, 8 y 9 que podrían ser benéficos para el tratamiento de cánceres humanos.⁹⁷

El descubrimiento de la actividad inmunoestimuladora de las bacterias, reside en el prospecto que ofrece el ADN en la inmunoterapia tumoral.⁹⁸ Así, oligodesoxinucleótidos (ODG) contienen motivos CpG,⁹⁹ que se han sintetizado y se han evaluado, son potentes estimuladores tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. Activan a CDp y células B, que adquieren un incremento en la capacidad para presentar antígenos a las células T y secretar diferentes citocinas y quimiocinas que horas después de la administración de ODN CpG, estimulan un amplio rango de efectos secundarios, como la activación de las células NK y monocitos, las cuales tienen actividad antitumor.¹⁰⁰

Esta respuesta inmune innata temprana es seguida durante varios días a través de la inducción de la respuesta inmune adaptativa caracterizada por altos niveles de linfocitos T citotóxicos (LCT)^{101,102} antígeno-específicos y células B productoras de anticuerpos.¹⁰³⁻¹⁰⁵ El incremento en evidencias de modelos animales experimentales muestran que los ODN CpG ejercen actividad antitumoral contra diferentes tipos de tumores en los grupos control y terapéuticos. El efecto se ha observado principalmente cuando el tratamiento fue iniciado cuando los tumores fueron pequeños y el efecto fue manifestado usualmente como una disminución en el desarrollo tumoral y la prolongación en la sobrevivencia del huésped.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ El tratamiento con ODN CpG ha reportado que mejora los resultados de la cirugía, quimioterapia y radioterapia.^{110,111} Kathryn A. Mason y cols. reportaron que el ODN CpG 1826, fue muy potente en el favorecimiento de la respuesta inmune en sarcoma murino (fibrosarcoma) a dosis únicas de radiación tumoral local.¹¹²

El ODN CpG 1826 favoreció la disminución en el desarrollo tumoral mediante un factor de >2.5 y de la radiocurabilidad a través de un factor de aproximadamente 2.0. Los tumores que fueron tratados tanto como ODN y con radiación fueron intensamente filtrados a través de las células inflamatorias del huésped (linfocitos y granulocitos) y mostraron cambios histológicos característicos de la destrucción celular masiva, incluyendo incremento en la necrosis y reducción en la densidad celular tumoral. El aumento de la radiorespuesta tumoral inducido por el ODN CpG disminuyó en ratones inmunocomprometidos a través de radiaciones subletales de todo el cuerpo demostró que la eficacia antitumor del oligonucleótido CpG requirió la presencia de un sistema inmune intacto.¹¹³

La mayoría de neoplasias linfoides son derivados de linfocitos B en diferentes estados de diferenciación, las neoplasias originadas de precursores de células B son raras. Las neoplasias derivadas de células B vírgenes maduras incluyen leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), linfoma linfocítico de células B pequeñas (SLL) y linfoma de células del manto (MCL). Una estrategia para estimular el compartimiento de las células B está basado en la expresión de TLR9 en la superficie de las células B. El ODN CpG 2006

(ODN 7909) fue originalmente desarrollado, basado sobre su capacidad para activar células B humanas normales.¹¹⁴

Este ODN (7909) ha sido estudiado en investigaciones clínicas como un adyuvante de vacunas y para la inmunoterapia de cáncer incluyendo linfoma no Hodgking.¹¹⁵ En modelos murinos de linfomas, los ODN de CpG demostraron ser efectivos como adyuvantes para las vacunas anti-idiotipos¹¹⁶ para aumentar o facilitar la terapia con anticuerpos monoclonales y como monoterapia.¹¹⁷ Varios estudios han establecido que las células de B-CLL responden a la estimulación con ODN CpG.¹¹⁸ Bernd Jahrsdorfer y cols.¹¹⁹ demostraron que las neoplasias de células B difieren en su respuesta al ODN CpG 2006, además mostraron que las células B-CLL expresan TLR9, sugiriendo que las células B-CLL directamente responden a los ODN CpG; en contraste, la no respuesta de las células de plasmocitoma estuvieron asociados con la carencia de TLR9.

CpG ODN inicia una compleja cascada inmunomoduladora que incluye la producción de células Th1 y citocinas proinflamatorias.¹²⁰ CpG ODNs estimulan directamente la activación de las DC a través de TLR9,^{121,122} iniciando el aumento de la respuesta de las células T específicas para los antígenos coadministrados en ratones.¹²³⁻¹²⁷ Daniel E. Speiser y cols. reportaron que la adición de CpG ODN al péptido antigénico de melanoma A₂₆₋₃₅ (péptido Melan-A₂₆₋₃₅) y el uso del péptido antigénico en vacunas en prueba en paciente HLA-A2 mezclado con adyuvante incompleto de Freund (IFA) incrementa la respuesta específica de células T en ratones transgénicos HLA-A2.¹²⁸

Estudios clínicos han mostrado que CpG 7909 es un potente inductor de la respuesta inmune innata y muestra un intenso efecto adyuvante cuando se coadministra con vacunas estimulando una respuesta contra el virus de la hepatitis B.^{129,130} Proporcionando información de la respuesta de las células T CD8+ antígeno específicas observadas en pacientes con melanoma vacunados con péptido Melan-A₂₆₋₃₅ e IFA, los resultados de sus experimentos mostraron una rápida y consistente respuesta de células T *in vivo*, aumentado el potencial de CpG 7909 para el favorecimiento de la respuesta inmune celular en humanos.¹³¹

El adyuvante completo de Freund (FCA) consiste de un conjugado de micobacteria muerta con aceite mineral que aumenta la respuesta de la vacuna, p.e. producción de anticuerpos, la inducción de LTC y activación de células NK.^{74,75} Sin el adyuvante, una pobre respuesta inmune es observada después de la vacunación. Esto ha dilucidado que las células dendríticas mieloides (CDm) y las CDp, formalmente llamadas células productoras de interferón tipo I, son el blanco de la mayoría de los adyuvantes.⁵⁶ Janeway y Medzhitov¹³² sugieren que las CDs expresan dos grupos de receptores, receptores para la presentación de antígeno a través de las moléculas del MHC y receptores para PAMPs. Tanto los antígenos como los PAMPs adyuvantes son derivadas de microbios y actúan diferencialmente sobre mDCs para inducir eficientemente linfocitos efectores secundarios a la activación (*Figura 4*).

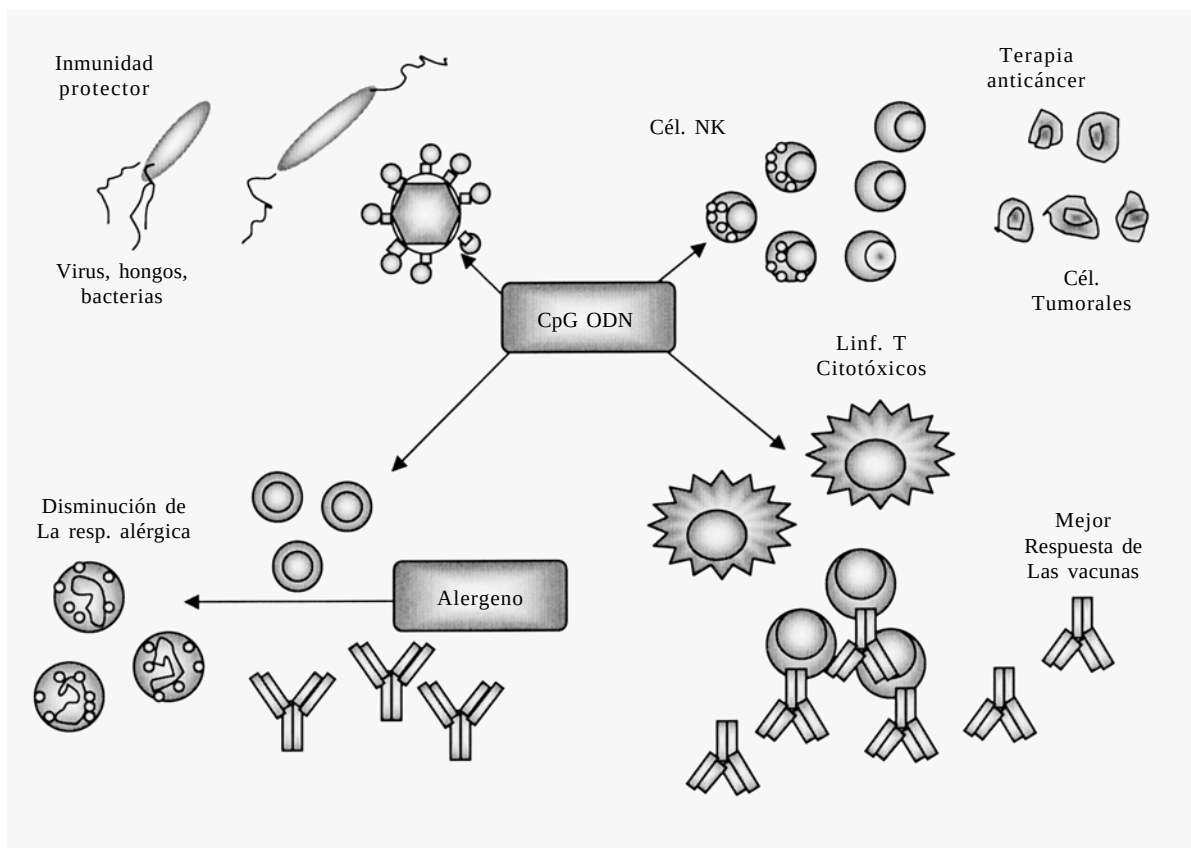


Figura 4. Usos de CpG ligando de TLR9 como inmunoterapia.

Función de los TLRs en las CD

Las células dendríticas mieloides (CDm) son centrales para la activación de las células B y T.¹³³ Aumentan la producción de anticuerpos a través de la inducción de la diferenciación de linfocitos B. Los linfocitos T son diferenciados a través de CDm maduras hacia linfocitos Th1, Th2 y CTL. Las CDm atrapan antígenos, migran y drenan hacia los linfonodos. El antígeno y adyuvante favorecen la madurez de las CDm, la presentación peptídica antigénica sobre las moléculas del MHC aumenta. La sobreexpresión de moléculas del MHC y coestimuladoras, la expresión de receptores para quimiocinas, presentación de antígenos, secreción de citocinas y quimiocinas son aceleradas por los adyuvantes en las CDm.^{134,135} Los TLRs sobre las CDm están involucradas en estos eventos pivotes conllevando a la activación de linfocitos. La función de las células T reguladoras (Treg) es suprimida por IL-6, la cual es producida por las células mDC en respuesta a la activación de los TLRs. Las células NK y las células NKT son activadas en respuesta a la maduración de las células mDC mediada por los TLRs.¹³⁶

Recientemente se ha desarrollado interés en la modificación de la respuesta que estimula el sistema inmune a través de la inmunidad mediada celular en pacientes con cáncer.¹³⁷ Los ODN sintéticos, que asemejan el ADN bacteriano en su capacidad para inducir una respuesta inmune tienen una efectividad semejante.¹³⁸

Los motivos CpG son reconocidos a través de TLR9 presente sobre las CDp y células B.^{139,140} De manera adicional, los CpG ODN estimuladores apoyan la sobrevivencia y maduración de las CDp y la sobreexpresión de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD40 y moléculas del MHC II.¹⁴¹ El potencial inmunoestimulador de CpG ODN ha sido evaluado en varios modelos murinos tumorales. Ratones inmunizados con un péptido análogo MART-1/Melan-A₂₆₋₃₅ en la presencia de ODN CpG generan una intensa respuesta sistémica LTC contra las células del melanoma.¹⁴² Se han inyectado de manera intratumoral ODN CpG para generar respuesta protectora antitumor resultando en una remisión completa de los tumores sólidos establecidos.¹⁴³ La capacidad de ODN CpG para generar respuesta antitumor protectora en estudios similares terminados ratones se han llevado a cabo en humanos. Un pequeño grupo en la Fase Clínica I de pacientes inyectados intralesionalmente en pacientes con carcinoma baso-celular o melanoma mostró regresiones locales severas, sugiriendo un efecto potencial terapéutico de CpG ODN en el tratamiento de cánceres humanos.¹³⁸

Los ODN sintéticos se dividen en tipo A (CpG-A), B (CpG-B) y C (CpG-C), basado sobre la actividad biológica de sus motivos CpG. CpG-A se une predominantemente a las CDs e induce altos niveles de IFN- α ; CpG-B es superior en la activación de células B e induce únicamente bajos niveles de

IFN- α de CDp, mientras CpG-C combina los efectos inmunes de CpG ODN clase A y B, incluyendo niveles significativos de IFN- α de CDp y también la estimulación de células B.¹⁴⁴

María Wysocka y cols.¹⁴⁵ evaluaron el potencial estimulador de ODN CpG, particularmente CpG-A e IL-15 para aumentar la respuesta inmune en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con CTCL. Demostrando la capacidad de CpG-A para activar células NK y células T CD8⁺ de pacientes. Y demostraron un aumento en la activación de células NK resultando de la acción combinada tanto de CpG-A como IL-15. Sugiriendo que para obtener la estimulación de la respuesta inmune en pacientes con cáncer, los compartimientos inmunes deberían ser estimulados simultáneamente, requiriendo tratamientos que involucren una combinación de diferentes respuestas biológicas modificadas. Los adyuvantes son utilizados frecuentemente para la inmunización con antígenos puros para la inducción potencial de la producción de anticuerpos y la activación de células NK y LCT.¹⁴⁶

Variaciones en producción de la respuesta parecen depender de las propiedades de cada adyuvante y el blanco de las células inmunocompetentes.⁷⁶ El aumento de la inmunidad del huésped *in vivo* y/o el incremento de la antigenicidad tumoral han sido el objetivo en el diseño de inmunoterapia.¹⁴⁷ La manipulación selectiva de las células inmunes, particularmente las CDs, ha sido utilizada como inmunoterapia con vectores y reactivos.¹⁴⁸

La función del adyuvante en la potenciación inmune efectiva no ha sido todavía identificada a nivel molecular a pesar de que los TLRs fueron descubiertos en mamíferos.¹⁴⁹ Takashi Akasawa y cols.^{150,151} demostraron que BCG-CWS ejerció actividad de regresión tumoral a una dosis que no demostró toxicidad. La aplicación cuidadosa de BCG-CWS a más de 600 pacientes con cáncer con un largo posoperatorio demostró mejoría clínica notable (> 60%).^{152,153} En un análisis *ex vivo* de las PMBC de estos pacientes produjeron IFN- γ en respuesta a la adición de BCG-CWS exógeno en la mayoría de los pacientes con un buen pronóstico.¹⁵⁴ Los mecanismos de la activación del sistema inmune mediados por BCG-CWS son atribuidos en parte a la maduración de DCs, la cual es inducida a través de TLR2 y TLR4 y posiblemente sobre receptores de BCG-CWS.¹⁵³

Las moléculas coestimuladoras CD80/CD83/CD86 y las citocinas TNF- α e IL-12 p40 están sobre-reguladas en DCs humanas a través de estimulación experimental con BCG-CWS.¹⁵¹ Ninguna de las células de la población linfocítica (células NK, NKT, B y T) están directamente activadas en respuesta a BCG-CWS. BCG-CWS actúa como un potente inductor de la maduración de DCs *ex vivo* vía activación de estos TLRs. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales BCG-CWS induce la activación efectora *in vivo*, incluidas la producción de IFN- γ y las respuestas de LCT a los antígenos asociados al tumor y la supresión resultante del crecimiento tumoral no han sido identificadas.

El dominio citoplasmático de cada TLR recluta distintos grupos de moléculas adaptadoras que activan hacia moléculas

las señalizadoras específicas.⁵⁵ Cuatro moléculas adaptadoras han sido identificadas y la selección de estas moléculas parecen determinar el inicio de la vía de señalización particular de cada TLR para la activación de factores de transcripción específicos de TLR, tales como factor nuclear- κ B (NF- κ B), c-Jun (AP-1), o factor regulador del interferon-3 (IRF-3).⁷⁵

MyD88 es una molécula adaptador que activa NF- κ B, iniciando la inducción de la expresión citocinas tales como: TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-12.¹⁵⁵ La sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y la inducción de IFN- β son independientes de MyD-88. Se ha reportado que los LPS activan TLR4 tanto por la vía dependiente de como de la vía independiente de MyD-88.¹⁵⁶

A pesar de que BCG-CWS actúa como un agonista de TLR4, induce pobremente la respuesta independiente. Los mecanismos moleculares en donde BCG-CWS sirve como un agonista con propiedades distintas de los LPS y además tiene el potencial para ejercer inmunidad antitumor permanecen sin resolver. Takashi Akasawa y cols.¹⁵⁷ mostraron evidencias, utilizando ratones deficientes de MyD-88, que es un adaptador crítico para la inducción de toxicidad tumoral específica y subsecuentemente la inmunidad activa para la supresión tumoral a través de BCG-CWS.

Conclusiones

El presente trabajo de revisión engloba la importancia de las proteínas denominadas TLRs en la inmunidad inducida para el control del desarrollo tumorigénico producido por el HPV 16, así como las diferentes estrategias para la inducción de la respuesta inmune a través de la activación de los TLRs en la infección producida por el HPV 16, las proteínas involucradas en las vías de señalización para la inducción de la transcripción de genes que codifican para citocinas proinflamatorias.

Referencias

- Centers for Disease Control and Prevention. Genital HPV Infection-CDC Fact Sheet. Centers for Disease Control and Prevention; 2004.
- Koutsky LA. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102 (5 Suppl. 1): 3-8.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78(21): 11451-60.
- Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. 2003. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 22: 1225-37.
- Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Eienkel J, Hoeckel M, Von Knebel Doeberitz M. 2003. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene* 22: 3977-84.
- Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61: 962-71.
- Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1654-8

8. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity. Review The New England Journal of Medicine 2000; 338:44.
9. Yang R, Martínez MF, Delannoy MJ, Blosser RL, Yutzy WH IV, Uematsu S, Takeda K, et al. B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR-4-MyD88. *J Immunol* 2005; 174: 7912-19.
10. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001; 14: 617-29.
11. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 984-93.
12. MacLennan I, Vinuesa C. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 2002; 17: 235-8.
13. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002; 3: 822-29.
14. Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur J Immunol* 1995; 25: 3445-51.
15. Fehr T, Bachmann MF, Bluethmann H, Kikutani H, Hengartner H, Zinkernagel RM. T-independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal. *Cell Immunol* 1996; 168: 184-92.
16. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 2000; 176: 154-70.
17. Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996; 183: 403-11.
18. Freer G, Burkhardt C, Ciernik I, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Vesicular stomatitis virus Indiana glycoprotein as a T-cell-dependent and -independent antigen. *J Virol* 1994; 68: 3650-5.
19. Szomolanyi-Tsuda E, Brien JD, Dorgan JE, Garcea RL, Woodland RT, Welsh RM. Antiviral T-cell-independent type 2 antibody responses induced in vivo in the absence of T and NK cells. *Virology* 2001; 280: 160-8.
20. Franco MA, Greenberg HB. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 1997; 238: 169-79.
21. Yang R, Wheeler CM, Chen X, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Pastrana DV, Viscidi RP, Roden RBS. Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J Virol* 2005.
22. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1993; 262: 1448-51.
23. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trinh-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. Immunization with virus like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995; 69: 3959-63.
24. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, Schlegel R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11553-7.
25. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567.
26. Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 5346.
27. Rudolf MP, Fausch SC, Da Silva DM, Kast WM. Human dendritic cells are activated by chimeric human papillomavirus type-16 virus-like particles and induce epitope-specific human T cell responses in vitro. *J Immunol* 2001; 166: 5917.
28. Lenz P, Thompson CD, Day PM, Bacot SM, Lowy DR, Schiller JT. Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol* 2003; 106: 231.
29. Yang R, Martínez Murillo F, Lin KY, William H, IV Y, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi RP, Roden RBS. Human papillomavirus type-16 virus-like particles active complementary defense response in key dendritic cell subpopulations. *J Immunol* 2004; 173: 2624-31.
30. Krug A, Rothenfusser S, Selinger S, et al. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol* 2003; 170: 3468-77.
31. Huang PS, Patrick DR, Edwards G, Goodhart PJ, Huber HE, Miles J, Garsky VM, Oliff A, Heimbrook DC. Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol. Cell Biol* 1993; 13: 953-60.
32. Huang SM, McCance DJ. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. 2002. *J Virol* 76: 8710-21.
33. Scott M, Nakagawa M, Moscicki A. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. 2001. *Clin Diagn Lab Immunol* 220; 8: 209-20.
34. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.
35. Pieri L, Domenici L, Romagnoli P. Langerhans cells differentiation: a three-act play. *J Anat Embryol* 2000; 106: 47-69.
36. Guess JC, McCance DJ. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3a production. *J Virol* 2005; 79(23): 14852-62.
37. Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993; 67: 6929.
38. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig YM, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 1993; 262: 1448-51.
39. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trinh-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. Immunization with virus like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 1995; 69: 3959.
40. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, Schlegel R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11553.
41. De Bruijn ML, Greenstone HL, Vermeulen H, Melief CJ, Lowy DR, Schiller JT, Kast WM. L1-specific protection from tumor challenge elicited by HPV16 virus-like particles. *Virology* 1998; 250: 371.
42. Harro CD, Pang YY, Roden RB, Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, et al. Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 viruslike particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst* 2001; 93: 284.
43. Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, O'Brien D, Campbell M, White WI, Balsley J, Reichman RC. A Phase 1 study of a recombinant virus like particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 2001; 183: 1485.
44. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002; 347: 1645.
45. Greenstone HL, Nieland JD, de Visser KE, De Bruijn ML, Kirnbauer R, Roden RB, Lowy DR, Kast WM, Schiller JT. Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1800.

46. Jochmus I, Schafer K, Faath S, Muller M, Gissmann L. Chimeric virus-like particles of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) as a prophylactic and therapeutic vaccine. *Arch Med Res* 1999; 30: 269.
47. Nieland JD, Da Silva DM, Velders MP, de Visser KE, Schiller JT, Muller M, Kast WM. Chimeric papillomavirus virus-like particles induce a murine self-antigen-specific protective and therapeutic antitumor immune response. *J Cell Biochem* 1999; 73: 145.
48. Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J Clin Invest* 2001; 108: 415.
49. Chackerian B, Lenz P, Lowy DR, Schiller JT. Determinants of autoantibody induction by conjugated papillomavirus virus-like particles. *J Immunol* 2002; 169: 6120.
50. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4-9.
51. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272: 50-3.
52. Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RA. The collection in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 29-35.
53. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998; 10: 363-72.
54. Snack J, Haga IR, Schröder M, Bartlett NW, Maloney G, Reading PC, Fitzgerald KA, Smith GL, Bowie AG. Vaccinia virus protein A46R targets multiple toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Experim Med* 2005; 201(6): 1007-18.
55. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2001; 2(8): 675-80.
56. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.
57. Dunne A, O'Neil. The interleukin-1/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE*. 2003; re
58. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt, Bussey C, Clavel RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-6.
59. Tabada KP, Georgel P, Janssen E, Du K, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004.
60. Sivori S, Faico M, Chiesa MD, Carlomagno M, Vitale M, Moretta L, Moretta A. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *PNAS* 2004; 101(27): 10116-21.
61. Akiko I, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5(0): 987-95.
62. Schneeberger A, Wagner C, Zemann A, et al. CpG motifs are efficient adjuvants for DNA cancer vaccines. *J Invest Dermatol* 2004; 123(2): 371-9.
63. Zwaveling S, Ferreira Mota S, Nouta J, et al. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 2002; 169(1): 350-8.
64. Poeck H, Wagner M, Battiany J, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004; 103(8): 3058-64.
65. Alexopoulou L, Holt A, Medzhitov R, Flavell R. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857): 732-8.
66. Verdijk R, Mutis T, Esendamb B, et al. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 1999; 163(1): 57-61.
67. Gelman A, Zhang J, Choi Y, Turka L. Toll-like receptor ligand directly promotes activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 2004; 172(10): 6065-73.
68. Ulevitch R. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7): 512-20.
69. Robinson R, DeVita V, Levy H, Baron S, Hubbard S, Levine A. A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosinic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57(3): 599-602.
70. Strayer D, Carter W, Brodsky I, et al. A controlled clinical trial with a specifically configured RNA drug, poly(I).poly(C12U), in chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 1994; 18(Suppl. 1): 88-95.
71. Navabi H, Reece A, Clayton A, et al. Ampligen (poly I:poly C12U): a GMP-grade agent which is a powerful inducer of dendritic cell maturation. In: *Proceedings of the Immunology, 12th International Immunology Meeting*; 2004, p. 297-301.
72. Laplanche A, Alzieu L, Delozier T, et al. Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC). *Breast Cancer Res Treat* 2000; 64(2): 189-91.
73. Adams M, Navabi H, Croston D, Coleman S, Tabi Z, Clayton A, Jasani B, Mason MD. The rationale for combined chemo/immunotherapy using a Toll-like receptor 3 (TLR 3) agonist and tumor-derived exosomes in advanced ovarian cancer. *Vaccine* 2005; 23: 2374-8.
74. Freund J. The mode of action of immunopharmacological adjuvants. *Adv Tuberc Res* 1956; 1: 130-48.
75. Seya T, Akazawa T, Uehori J, Natsumoto M, Asuma I, Toyoshima K. Role of Toll-like receptors and their ligands in adjuvant immunotherapy for cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 4369-76.
76. Okamoto M, Sato M. Toll-like Receptor signaling in anticancer immunity. *J. Med Invest* 2003; 50: 9-24.
77. Yamamura Y, Sakatani M, Ogura T, Azuma I. Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG cell-wall skeleton (BCG-CWS). *Cancer* 1979; 39: 3262-7.
78. Watanabe Y, Iwa T. Clinical value of immunotherapy with the streptococcal preparation OK-432 in non-small cell lung cancer. *J Biol Response Modif* 1987; 6: 169-80.
79. Kikkawa F, Kawai M, Oguchi H, Kojima M, Ishikawa H, Iwata M, et al. Randomized study of immunotherapy with OK-432 in uterine cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 1993; 29: 1524-46.
80. Ohe G, Okamoto M, Oshikawa T, Furuichi S, Nishikawa H, Tano T, et al. Th1-cytokine induction and anti-tumor effect of 55 kDa protein isolated from *Aegineta indica* L., a parasitic plant. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 251-9.
81. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-60.
82. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirchning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 408: 740-5.
83. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-60.
84. Agawal S, Kandimalla ER. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trend Mol Med* 2002; 8: 114-21.
85. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Saio S, Sanjo S, Hoshino K, et al. Small antiviral compounds activate immune cells via TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3: 196-200.
86. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-97.
87. Goodman MG. A new approach to vaccine adjuvants. Immunopotentiality by intracellular T-helper-like signals transmitted by loxoribine. *Pharm Biotechnol* 1995; 6: 581-609.
88. Akaza H, Kotake T, Machida T. Bropiramine, an orally active anticancer agent for superficial bladder cancer. *Eur Urol* 1998; 34: 107-10.
89. Tsan MF. Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. Review 2006; 16: 32-7.

90. Weeks CE, Gibson SJ. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J Interfer Res* 1994; 14: 81-5.
91. Imbertson LM, Beaurline JM, Couture AM, et al. Cytokine induction in hairless mouse and rat skin after topical application of the immune response modifiers imiquimod and S-28463. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 734-9.
92. Berman B. Imiquimod: a new immune response modifier for the treatment of external genital warts and other diseases in dermatology. *Int J Dermatol* 2002; 41: 7-11.
93. Hengge UR, Ruzicka T. Topical immunomodulation in dermatology: potential of toll-like receptor agonists. *Dermatol Surg* 2004; 30: 1101-12.
94. Schon MP, Wienrich BG, Drewniak C, et al. Death receptor-independent apoptosis in malignant melanoma induced by the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 1266-76.
95. Mackenzie-Wood A, Kossard S, de Launey J, Wilkinson B., Owens ML. Imiquimod 5% cream in the treatment of Bowen's disease. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 462-70.
96. Agarwala SS, Kirkwood JM, Bryant J. Phase 1, randomized, double-blind trial of 7-allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) in advanced cancer. *Cytokines Cell Mol Ther* 2000; 6: 171-6.
97. Bhattarcharjee RN, Akira S. Toll-like receptors signaling: Emerging opportunities in human diseases and medicine. 2005. *Current Immunology Reviews*. Vol.1, No.1.
98. Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 1-11.
99. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-9.
100. Uhlmann E, Vollmer J. Recent advances in the development of immunostimulatory oligonucleotides. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2003; 6: 204-17.
101. Wild J, Grusby MJ, Schirmbeck R, et al. Priming MHC-I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to exogenous hepatitis B surface antigen is CD4+ T cell dependent. *J Immunol* 1999; 163: 1880-7.
102. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, et al. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 2000; 30: 3591-7.
103. Lipford GB, Bauer M, Blank C, et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2340-4.
104. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 1997; 3: 849-54.
105. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, et al. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1623-31.
106. Baines J, Celis E. Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2693-700.
107. Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, et al. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol* 2002; 169: 3892-9.
108. Kwarada Y, Ganss R, Garbi N, et al. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2001; 167: 5247-53.
109. Lonsdorf AS, Kuehrek H, Stern BV, et al. Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 2003; 171: 3941-6.
110. Krieg AM. Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr Oncol Rep* 2004; 6: 88-95.
111. Weigel BJ, Rodeberg DA, Krieg AM, et al. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3105-14.
112. Milas L, Mason KA, Ariga H, et al. CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation. *Cancer Res* 2004; 64: 5074-7.
113. Mason KA, Ariga H, Neal R, Valdecana D, Hunter N, Krieg AM, Whisnant JK, Milas L. Targeting Toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 361-9.
114. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000; 164: 944-53.
115. Weiner GJ. The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 455-63.
116. Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10833-7.
117. Warren TL, Dahle CE, Weiner GJ. CpG oligodeoxynucleotides enhance monoclonal antibody therapy of a murine lymphoma. *Clin Lymphoma* 2000; 1: 57-61.
118. Jahrsdörfer B, Hartmann G, Racila E, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 81-8.
119. Jahrsdörfer B, Mühlenhoff L, Blackwell SE, Wagner M, Poock H, Harmann E, et al. B-Cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 1490-9.
120. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2005; 4: 249-59.
121. Hemmi H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5.
122. Takeshita F, et al. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* 2001; 167: 3555-8.
123. Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10833-7.
124. Lipford GB, et al. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2340-4.
125. Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H., and Klennerman, P. CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol* 1999; 73: 4120-6.
126. Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 1997; 158: 2372-8.
127. Davila E, Celis E. Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 2000; 165: 539-47.
128. Miconnet I, et al. CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 2002; 168: 1212-18.
129. Davis HL, et al. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18: 1920-4.
130. Halperin SA, et al. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 2003; 21: 2461-7.
131. Speiser DE, Liénard D, Rufer N, Rubi-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest* 2005; 115: 739-46.
132. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-8.

133. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
134. Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 2004; 16: 27-34.
135. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1589: 1-13.
136. Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *eCAM* 2006; 3(1): 31-8.
137. Rook AH, Yoo EK, Grossman DJ, Kao DM, Fox FE, Niu Z. Use of biological response modifiers in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 1998; 10: 170-4.
138. Krieg AM. CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med* 2003; 9: 831-5.
139. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5.
140. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2: 675-80.
141. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, et al. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c, CD123⁺ dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 5000-7.
142. Miconnet I, Koenig S, Speiser D, et al. CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol* 2002; 168: 1212-18.
143. Lonsdorf AS, Kuekrek H, Stern BV, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Intratumor CpG oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 2003; 171: 3941-6.
144. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 2004; 34: 251-62.
145. Wysocka M, Benoit BM, Newton S, Azzoni L, Montaner LJ, Rook AH. Enhancement of the host immune responses in cutaneous T-cell lymphoma by CpG oligodeoxynucleotides and IL-15. *Blood* 2004; 104(13): 4142-9.
146. Azuma I, Seya T. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int J Immunopharmacol* 2001; 1: 1249-59.
147. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74: 181-273.
148. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999; 50: 507-29.
149. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJ. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature (Lond)* 1997; 388: 394-7.
150. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000; 68: 6883-90.
151. Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, Kawata T, Azuma I, Toyoshima K, Seya T. Simultaneous blocking of human Toll-like receptor 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-peptidoglycan (PGN). *Infect Immun* 2003; 71: 4238-49.
152. Hayashi A, Doi O, Azuma I, Toyoshima K. Immuno-friendly use of BCG cell wall skeleton remarkably improves the survival rate of various cancer patient. *Proc Jpn Acad* 1998; 74: 50-5.
153. Seya T, Matsumoto M, Tsuji S, Begum NA, Azuma I, Toyoshima K. Structural-functional relationship of pathogen-associated molecular patterns: lessons from BCG cell wall skeleton and mycoplasma lipoprotein M161Ag. *Microbes Infect* 2002; 4: 955-61.
154. Matsumoto M, Seya T, Kikkawa S, Tsuji S, Shida K, Nomura M, Kurita-Taniguchi M, et al. Interferon- γ -producing ability in blood lymphocytes of patients with lung cancer through activation of the innate immune system by BCG cell wall skeleton. *Int J Immunopharmacol* 2001; 1: 1559-69.
155. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science (Wash. DC)* 1997; 278: 1612-15.
156. Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166: 5688-94.
157. Akazawa T, Masuda H, Saeki Y, Matsumoto M, Takeda K, Tsujimura K, Kuzushima K, et al. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Research* 2004; 64: 757-64.

