



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**``Agonistas de TLRs en la prevención y el  
tratamiento de la infección por el Virus de Papiloma  
Humano``**

Autora: Ana Cordero Guijarro

Tutor: Víctor Jiménez Cid

Convocatoria: 23 de junio 2016

## ÍNDICE

---

1. Resumen.....	pág. 3
2. Introducción y antecedentes.....	pág. 3
2.1 Receptores Tipo Toll.....	pág. 3
2.2 Virus del Papiloma Humano y patología asociadas.....	pág. 6
3. Objetivos .....	pág. 8
4. Metodología.....	pág. 9
5. Resultados y discusión.....	pág. 9
5.1. AS04: adyuvante en la vacuna Cervarix ®.....	pág. 9
5.2. Imiquimod: tratamiento tópico.....	pág. 14
6. Conclusiones.....	pág. 18
7. Bibliografía.....	pág. 19

## 1. RESUMEN

Los receptores tipo Toll son elementos clave en la inmunidad innata, cuya activación desencadena una cascada de señalización intracelular que culmina con la translocación al núcleo de factores de transcripción, entre ellos NF- $\kappa$ B, y la posterior síntesis de compuestos proinflamatorios. Recientemente se han descubierto distintos agonistas de receptores tipo Toll con actividad farmacológica útiles en la prevención y el tratamiento de la infección por VPH. Entre ellos se encuentran el AS04, agonista de TLR4, un adyuvante que forma parte de la vacuna Cervarix®; y el imiquimod, agonista de TLR7, un fármaco que se aplica de forma tópica. Ambos mecanismos de acción se basan en estimular la respuesta inmunitaria para facilitar la eliminación de células infectadas por VPH, generar una memoria inmunitaria, y prevenir de esta forma complicaciones graves, entre las que destaca el cáncer de cérvix. En cuanto a la comparación clínica de Cervarix® con Gardasil®, e imiquimod con las otras opciones quimioterápicas y quirúrgicas, se puede concluir que son las más eficaces (en base a los estudios consultados).

*Palabras clave:* TLR, VPH, AS04 e imiquimod.

## 2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 2.1 Receptores tipo Toll

La respuesta inmunitaria en los vertebrados está compuesta principalmente por la inmunidad innata y la adaptativa. La inmunidad innata está muy conservada, y es la primera línea de defensa frente a patógenos. Dentro de ella se encuentran los Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRR), encargados de detectar a los llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*: PAMPs), que son estructuras invariables comunes en varios grupos de patógenos<sup>1</sup>. Por el contrario, la inmunidad adaptativa es específica, ya que está constituida por células (linfocitos T y B principalmente) que expresan receptores cuyos ligandos son antígenos determinados<sup>4,5</sup>.

Los Receptores Tipo Toll o *Toll like receptors* en inglés (TLRs) son una familia de PRRs de membrana que estimulan la respuesta inmunitaria innata frente a patógenos<sup>2</sup>. Su objetivo es reconocer PAMPs e iniciar señales de transducción que activen al sistema inmunitario para destruir patógenos<sup>3</sup>. Los TLRs se expresan en varias y diferentes líneas

celulares, tales como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliales de las mucosas y células endoteliales<sup>2</sup>.

Existen 10 tipos distintos de TLRs en humanos (TLR 1-10)<sup>6</sup>. Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se encuentran anclados en la membrana plasmática, y tienen como principales ligandos PAMPs bacterianos, como el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram-negativas que será reconocido por el TLR4<sup>7</sup>. Por otro lado están los TLRs 3, 7, 8 y 9, que se localizan en la membrana de los endosomas, es decir, a nivel intracelular, y cuyos ligandos naturales son los ácidos nucleicos de virus y bacterias que actúan como PAMPs<sup>3,4</sup>. Actualmente también se ha demostrado que aparte de los PAMPs, los Patrones Moleculares Asociados al Daño (*Damage-Associated Molecular Patterns*: DAMPs), que son señales endógenas enviadas por células en situación de estrés, pueden actuar como ligandos de los TLRs<sup>20</sup>.

Químicamente los TLRs son glucoproteínas integrales de membrana de tipo I. Todos los TLRs comparten la misma estructura, que se puede dividir en tres partes: el dominio N-terminal (extracelular) que posee repeticiones ricas en leucina, y será el encargado del reconocimiento de patógenos; el dominio transmembrana; y el dominio C-terminal (intracelular) que se conoce como receptor Toll/IL-1 (TIR)<sup>2,3,6</sup>.

### **Cascada de señalización intracelular**

Tras la activación de los TLRs, se desencadena una cascada intracelular que culmina con la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12; así como IFN de tipo I y quimioquinas<sup>4</sup>. La señalización intracelular se origina en el dominio TIR, el cual puede poseer cuatro adaptadores: el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP/Mal), la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR e induce IFN- $\beta$  (TRIF), y la proteína adaptadora relacionada con TRIF (TRAM). Éstos adaptadores interactúan entre sí y con los TLRs mediante su dominio TIR, siendo diferentes los adaptadores que se activan según el tipo de TLR. El funcionamiento de éstas rutas se clasifica según sea dependiente o independiente de la proteína adaptadora MyD88<sup>4,7</sup>.

Cuando la activación de la vía es dependiente de MyD88 (excepto en el caso de TLR2 y TLR4, que requieren la intervención del adaptador adicional TIRAP/Mal<sup>4</sup>), MyD88 se recluta y asocia con los TLRs a través de los dominios TIR de ambas moléculas. Este evento permite que MyD88 se una a IRAK4 (Quinasa 4 Asociada al Receptor de IL-1) a través de su

''dominio intermedio'' (DI) y a IRAK1 mediante su ''dominio de muerte'' (*death domain*: DD); la proximidad entre ambas quinasas provoca que IRAK4 fosforile a IRAK1. IRAK1 fosforilada se une a la proteína TRAF6 (Factor 6 Asociado al Receptor de TNF), ambas se disocian del complejo del receptor y se activa, mediante ubiquitinación, a TAK1 (Quinasa 1 Activada por TGF- $\beta$ , es un tipo de MAP3K), que formará un complejo con TAB1, 2 y 3 (proteínas de unión a TAK1). Una vez formado éste complejo proteico, surgen dos vías independientes de señalización: una que lleva a la activación de las MAPK y otra que conduce a la activación del sistema NF- $\kappa$ B<sup>2,6,7</sup>. En la primera ruta, la activación de TAK1 induce la fosforilación de las MAPK (ERK, JNK y p38) promoviendo la translocación nuclear del factor AP1 y la subsiguiente formación de citoquinas proinflamatorias. En la segunda ruta, TAK1 fosforila el complejo de quinasas de I $\kappa$ B (IKKs) compuesto por IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKKY/Nemo, las cuales a su vez fosforilan a I $\kappa$ B, marcándolo para su ubiquitinación y posterior destrucción por el proteasoma. El factor de transcripción heterodimérico NF- $\kappa$ B (p50, p65) deja de estar secuestrado en el citoplasma por su inhibidor (I $\kappa$ B), y se transloca al núcleo, puesto que la secuencia de localización nuclear queda expuesta. Ya en el núcleo, NF- $\kappa$ B se une a sus elementos de respuesta en los promotores de sus genes blanco.<sup>4,6,7</sup> En el caso de TLR7 y TLR9 además se induce la producción de IFN tipo I mediante la intervención de TRAF3 e IRF7 (Factor Regulador de IFN). IRF7, presente en el citoplasma, es fosforilado por IRAK1, IRAK4 o IKK $\alpha$ , y posteriormente se trasloca al núcleo donde induce a los promotores de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ <sup>6</sup>. La vía MyD88-IRF7 solo está presente en las células dendríticas plasmocitoides (CDp), en las que IRF7 se expresa en gran medida y de forma constitutiva por activación de los TLR 7, 8 y 9<sup>6</sup>.

La vía independiente de MyD88 sólo la emplean TLR3 y TLR4. Ambos receptores señalizan a través de la proteína TRIF y sólo TLR4 utiliza la proteína TRAM<sup>4,6,7</sup>. TLR4 no interacciona directamente con TRIF, sino que es TRAM la que actuará como intermediaria entre ambas<sup>4</sup>. La señalización de la vía independiente de MyD88 abarca la siguiente secuencia: la proteína adaptadora TRIF mediante su zona N-terminal interacciona con TRAF6, que formará el complejo proteico TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2-TAB3 capaz de activar a las IKKs; simultáneamente TRIF, mediante su región C-terminal interacciona con RIP1 (Receptor que Interacciona con la Proteína Quinasa 1). Ambas acciones convergen en el complejo IKK y tendrán como finalidad la activación de NF- $\kappa$ B. A través de otra ruta, la molécula TRIF interactúa con TRAF3 que permitirá su interacción con el dímero TBK1/IKK-

$\epsilon$ , que fosforilará a IRF-3 (Factor 3 de Transcripción Regulador de IFN) ocasionando su translocación al núcleo, e iniciando así la síntesis de IFN tipo I (IFN $\alpha$  y  $\beta$ )<sup>4,6,7</sup>.

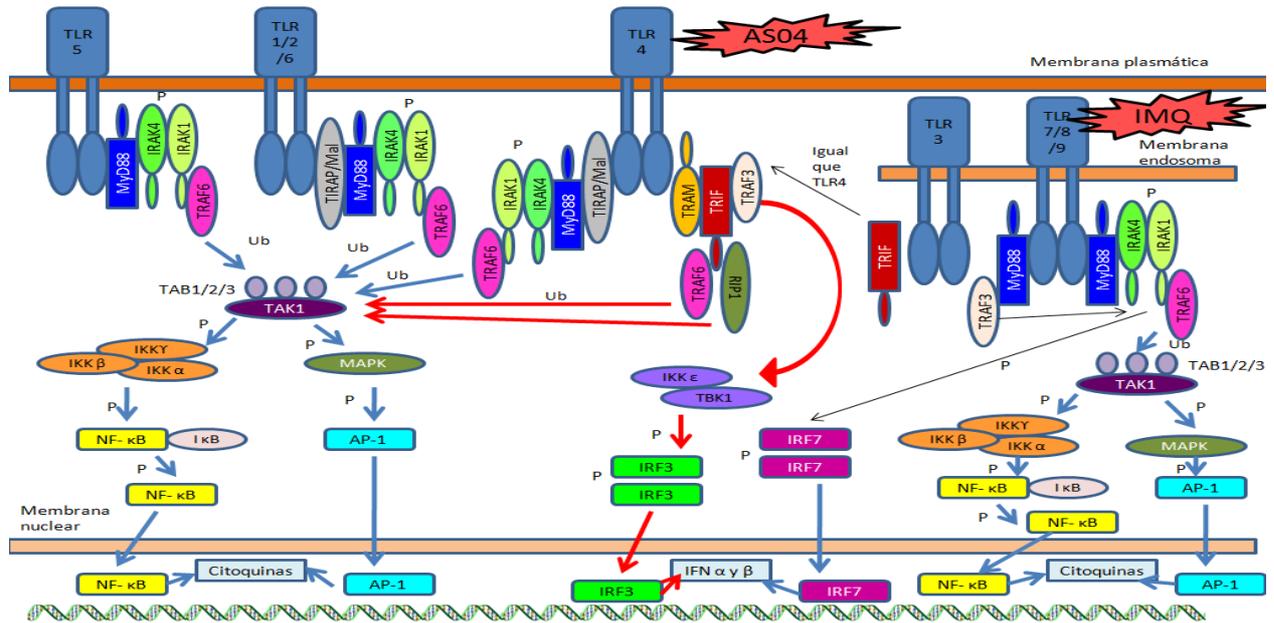


Imagen 1. Cascada de transducción de los TLR humanos<sup>4,6</sup>.

## 2.2 Virus del Papiloma Humano y patologías asociadas

El género *Alphapapillomavirus*, que incluye el Virus del Papiloma Humano (VPH), pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Los VPH son pequeños (55 nm aproximadamente), con ADN bicatenario, simetría icosaédrica y carecen de envoltura<sup>8</sup>. El ciclo viral no incluye el paso a sangre (viremia), lo que limita la exposición al sistema inmunitario<sup>5</sup>. Los genotipos virulentos del VPH son capaces de infectar cualquier tipo de epitelio escamoso, por tanto la infección más frecuente ocurre en epitelios de extremidades (verrugas), pero la infección de mucosas genitales puede ser responsable de diversas complicaciones, como son el carcinoma de cérvix y diversos carcinomas genitales<sup>9,10</sup>. Aun así, en la mayoría de los casos la infección es asintomática, transitoria y se resuelve espontáneamente<sup>5,11,12</sup>.

### Clasificación de VPH y manifestaciones clínicas

Se han identificado cerca de 150 tipos diferentes de VPH en base a la secuencia de ADN que codifica para la proteína L1 de la cápside<sup>5</sup>, y presentan un tropismo diferenciado: unos genotipos son cutaneotrópicos (75% de los VPH), causantes de lesiones cutáneas; y otros son mucosotrópicos o mucosales (25% de los VPH), con capacidad de infectar el tracto genital<sup>10,11</sup>.

Entre los VPH mucosales existen unos de alto riesgo oncogénico relacionados con las neoplasias anogenitales. Hay hasta 15 genotipos confirmados, siendo los VPH 16 y 18 responsables de aproximadamente el 70 % de todos los cánceres de cérvix, que es la patología de mayor relevancia en la infección por VPH<sup>5,10,11,13</sup>. Por otro lado están los VPH de bajo riesgo oncogénico, responsables de los condilomas acuminados (o verrugas genitales), que son la expresión clínica más frecuente de este grupo, siendo los genotipos 6 y 11 causantes de hasta el 90 % de las verrugas genitales en ambos sexos<sup>10,11,13</sup>. Además, se ha confirmado la asociación de los VPH de alto riesgo con lesiones neoplásicas extragenitales en ambos sexos a nivel de cabeza y cuello, específicamente en cavidad oral, orofaringe y laringe; y de los VPH de bajo riesgo (mayoritariamente 6 y 11) como causantes de la papilomatosis laríngea recurrente tanto en niños (transmisión vertical) como en adultos (transmisión sexual)<sup>11</sup>.

En cuanto a las lesiones en la piel, se observan como neoformaciones verrugosas, las cuales pueden ser de tres tipos: verrugas plantares (solitarias), verrugas vulgares (en manos, dedos y uñas y pie) y planas (en cara y manos). Las verrugas vulgares pueden transformarse en neoplasia (enfermedad de Bowen)<sup>8</sup>.

### **VPH y cáncer**

La relación principal entre la infección por VPH y la aparición de cáncer se debe a que el VPH requiere la integración de su ADN en el genoma de la célula infectada<sup>11,14</sup>, interfiriendo así con la expresión de las proteínas reguladoras del crecimiento celular normal. Ésto unido a una infección prolongada en el tiempo culminará con el desarrollo de múltiples mutaciones que condicionarán la transformación celular. Éste proceso habitualmente requiere entre 10 y 20 años, aunque se han constatado evoluciones rápidas de tan solo 2 años desde la infección<sup>11</sup>.

### **Vías de transmisión**

Las principales vías de transmisión son por contacto directo de piel y mucosas (sexual) con sujetos previamente infectados con VPH, y rara vez de forma vertical de la madre al hijo durante el parto<sup>8,11</sup>. Tanto la mujer como el hombre pueden ser portadores asintomáticos y vehículos de la infección por VPH<sup>9,11</sup>. De todas las ITS, la infección por el VPH es en la actualidad la más prevalente y responsable de un mayor estrés psicosocial<sup>9</sup>.

## **Tratamiento**

No existe una terapia eficaz para erradicar la infección, por lo que el tratamiento tiene como objetivo eliminar las lesiones sintomáticas producidas por el virus<sup>9</sup>. Además las recidivas son muy frecuentes, puesto que el VPH puede permanecer en estado de latencia<sup>9,14</sup>.

Principalmente hay dos tipos de tratamiento para una infección por VPH: químico y quirúrgico. En cuanto al tratamiento químico, para las lesiones cutáneas se pueden utilizar fármacos queratolíticos como el ácido salicílico o la podofilina. En el caso de las lesiones genitales se puede aplicar ácido tricloroacético, 5-fluorouracilo o el imiquimod<sup>8,12</sup>. No se recomienda la quimioprofilaxis<sup>9</sup>.

En lo referente a los tratamientos quirúrgicos, el objetivo es eliminar todas las células epiteliales infectadas por el VPH<sup>14</sup>. Existen varias opciones, como el curetaje, escisiones, electrofulguración, crioterapia o cirugía con láser<sup>8,12,14</sup>. Son de elección en lesiones graves, sin embargo son muy agresivas y no se suele conseguir una completa eliminación de las células infectadas por el VPH<sup>14</sup>, por lo que las recurrencias son frecuentes<sup>15</sup>.

## **Estrategias preventivas frente a la infección por el VPH**

La utilización del preservativo reduce el riesgo de contagio por el VPH, aunque solo lo evita en un 60-70% de los casos, debido al contacto de zonas genitales no cubiertas por el mismo o a su uso inadecuado<sup>11,13</sup>.

La citología mediante la técnica de Papanicolau ha sido y es fundamental como técnica de cribado, contribuyendo de forma determinante a la reducción de la morbimortalidad por cáncer de cérvix en más de un 75 % en las poblaciones en que se utiliza de forma sistemática y continuada, ya que permite la detección precoz de lesiones preneoplásicas<sup>11</sup>.

Como estrategias de prevención primaria, actualmente existen tres vacunas frente a la infección por papilomavirus, que evitan la infección persistente por los VPH y el desarrollo de las lesiones preneoplásicas<sup>11,13</sup>.

## **3. OBJETIVOS**

El objetivo de éste trabajo es realizar un estudio bibliográfico de los agonistas de TLR, AS04 e imiquimod, en lo referente a su estado actual, su mecanismo de acción y la comparación con otras opciones terapéuticas.

## 4. METODOLOGÍA

Se trata de una revisión bibliográfica basada principalmente en artículos científicos publicados en la web internacional PubMed (motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica) y BUCea (biblioteca digital de la UCM), así como el buscador Google. Además se han consultado libros de la biblioteca de Farmacia de la UCM.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. AS04: adyuvante en la vacuna Cervarix ®

#### VPV y vacunas

El cáncer de cervix es el segundo cáncer más frecuente a nivel mundial en mujeres entre 15-44 años, después del cáncer de mama<sup>5,11,16</sup>, y es la expresión clínica de mayor relevancia de la infección por VPV<sup>11,16</sup>.

Actualmente existen tres vacunas profilácticas seguras, eficaces y efectivas, que son: Cervarix®, Gardasil® y Gardasil 9®. En España están autorizadas las tres, pero comercializadas solo las dos primeras<sup>11</sup>. Todas ellas son vacunas inactivadas obtenidas por recombinación genética, que tienen como antígeno viral L1, una proteína estructural de la cápside. La selección de L1 se basó en los resultados obtenidos en estudios animales en los que se demostró la formación de anticuerpos contra L1 capaces de neutralizar auténticos virus<sup>5</sup>. Las L1 se autoensamblan cuando se expresan en cultivos de células eucariotas, y forman partículas similares al virus (*Virus-Like Particles: VLPs*), que tienen la misma estructura que los viriones. Las VLPs aumentan la antigenicidad y permiten inducir una respuesta inmunitaria de anticuerpos neutralizantes que ayudan a prevenir la infección por VPV<sup>5,11,16</sup>. Éstas VLPs al no contener genoma viral no pueden causar infección ni tienen potencia para desarrollar lesiones neoplásicas<sup>11,16</sup>.

Gardasil® es una vacuna tetravalente que contiene L1 de VPV 6, 11, 16 y 18, y está coadyuvada con hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo. En cambio Cervarix® es bivalente, con L1 de VPV 16 y 18, pero además se ha demostrado una protección cruzada sobre VPV 31, 33 y 45, que no están incluidos en la vacuna; y contiene AS04 como adyuvante<sup>5,11,16,17</sup>. Ambas deben conservarse entre +2 y +8 °C dado que al contener sales de aluminio, la congelación inactivaría a la vacuna<sup>11</sup>. Generalmente para las dos vacunas se

requieren dos dosis, sin necesidad de dosis de recuerdo, y la vía de administración es intramuscular<sup>11,18,19</sup>. Gardasil 9® es una nueva vacuna que posee L1 de 9 tipos de VPH (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58)<sup>11</sup>. No hay estudios que hayan analizado el binomio coste-efectividad y la eficacia de ésta vacuna en comparación con las otras dos<sup>16</sup>.

Las vacunas son únicamente profilácticas, ofreciendo la posibilidad de prevenir la infección inicial por VPH frente a los genotipos incluidos en ellas, pero sin efecto terapéutico alguno sobre infecciones ya establecidas previamente ni sobre las potenciales lesiones secundarias a las mismas<sup>11,13,18</sup>. Por tanto, a pesar de estar vacunado será indispensable continuar con el cribado de cáncer cervical<sup>5,10,13,18</sup>. El momento óptimo para iniciar la vacunación es antes del debut sexual de la mujer, ya que no habrá estado expuesta al VPH, por ello la población diana son las mujeres preadolescentes y adolescentes antes de los 14 años<sup>5,10,11,18</sup>. La única vacuna para la que ha sido evaluada la eficacia clínica en hombres mediante ensayos es la tetravalente (Gardasil®), y por tanto la que actualmente está aprobada en varones<sup>10,11</sup>.

Existen otras vacunas en investigación que contienen antígenos del VPH, como la vacuna Kanda VPH, con actividad neutralizante para seis variantes de VPH de alto riesgo, que se encuentra en ensayos preclínicos. Otro ejemplo es la vacuna bivalente EG-VPH, en fase I, con protección frente a VPH 16 y 18, y coadyuvada con CIA06 (derivado del LPS de *E.coli*) que presenta un mecanismo de acción muy similar al AS04<sup>16</sup>.

#### **AS04**

El desarrollo de nuevas vacunas ha incentivado la necesidad de crear nuevas estrategias que mejoren y adapten la respuesta inmunitaria para obtener una adecuada efectividad y protección a largo plazo. Ésto es especialmente importante en aquellas vacunas que contienen antígenos solubles recombinantes (como las VLPs de L1), que generalmente requieren adyuvantes para compensar la pérdida de la respuesta inmunitaria microbiana natural debida al proceso de inactivación o purificación<sup>5,19</sup>. El sistema adyuvante 04 (AS04), consistente en el monofosfolípido A (MPL) adsorbido en hidróxido de aluminio [Al (OH)<sub>3</sub>], pertenece a esta nueva generación de adyuvantes<sup>5,6,11,19</sup>. Actualmente AS04 forma parte de dos vacunas humanas autorizadas: una para el VPH (Cervarix®) y otra para el VHB (Fendrix®)<sup>5,19</sup>. Hay una tercera vacuna del virus del herpes simple 2 que está en fase III de ensayos clínicos<sup>19</sup>.

## Mecanismo de acción de AS04

El MPL es el principal componente y responsable de la actividad de AS04. Se trata de un derivado destoxificado del LPS aislado de la bacteria gram negativa *Salmonella enterica ser. Minnesota*, y que por tanto actuará como agonista de TLR4<sup>5,16,19,20</sup>. La estimulación de TLR4 contribuye a la activación de la respuesta inmunitaria innata de la siguiente forma: el LPS se une en primer lugar a la proteína soluble fijadora del LPS (LBP) en la sangre y el líquido extracelular. Éste complejo sirve para facilitar la unión del LPS a CD14 (proteína de membrana). Una vez que el LPS se une a CD14, se disocia la LBP y el complejo LPS-CD14 se asocia físicamente al TLR4, que posteriormente se homodimeriza. Una proteína accesoria extracelular denominada MD2 también se une al complejo<sup>2</sup>. La activación del TLR4 atrae a una serie de proteínas adaptadoras, entre las que se encuentran MyD88 y TRIF, que iniciarán una cascada intracelular<sup>3</sup> que concluirá con la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (ver imagen 1) y la posterior expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 por monocitos y células dendríticas (CD) tanto locales como reclutadas. TNF- $\alpha$  e IL-6 van a enlazar con la respuesta inmunitaria adaptativa, puesto que estimulan la maduración de células presentadoras de antígenos (CPA) e inhiben la actividad de los linfocitos T (LT) reguladores. En las CD además se aumenta la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 indispensables para la activación de los LT. Por tanto el MPL será el responsable de la activación de un gran número de CD y monocitos, y su posterior migración a los ganglios linfáticos de drenaje, donde actuarán como CPA, exponiendo las L1 del VPH, lo que se traducirá en la activación de LT específicos<sup>6,11,19</sup>. El MPL no estimula directamente a los LT CD4+, pero sí promueve la producción IFN- $\gamma$  de los activados, decantando así una respuesta inmunitaria de tipo Th1, necesaria para ofrecer protección frente a patógenos intracelulares<sup>16,19</sup>. Además los niveles de IFN- $\alpha$  (no es inducido por ninguna sustancia de la vacuna) como de quimioquinas (CCL2 y CCL3) están aumentados en el lugar de inyección<sup>19</sup>.

El hidróxido de aluminio ha sido utilizado durante mucho tiempo como adyuvante debido a su capacidad para estimular la formación de anticuerpos, es decir, de promover una respuesta inmunitaria de tipo Th2, efectiva para los patógenos extracelulares pero no para los intracelulares<sup>5,19</sup>. Aun así, el Al(OH)<sub>3</sub> apenas contribuye a la respuesta inmunitaria inducida por AS04<sup>5,19</sup>, pero tampoco interfiere ni inhibe al MPL de forma significativa en la cantidad ni en el tipo de citoquinas proinflamatorias generadas (*in vivo* o *in vitro*) por monocitos, o la infiltración de CPA. Sin embargo, a nivel molecular, las sales de aluminio y el MPL parecen

tener una acción sinérgica en la secreción de citoquinas dependientes de caspasa. Las sales de aluminio estimulan Nlrp3, que es un componente del inflamasoma. El inflamasoma es una plataforma multiproteica intracelular necesaria para el reclutamiento y la activación de la caspasa-1 y el subsiguiente proceso de formación de citoquinas como IL-1 $\beta$  o IL-8. *In vitro* éste proceso necesita el pretratamiento de las CPA con ligandos de TLR, como el MPL, puesto que las sales de aluminio no son capaces por sí solas de inducir la transducción de los genes de IL-1 $\beta$  o IL-8. Esta teoría no está confirmada<sup>19</sup>. Sin embargo, sí que se ha comprobado que el Al(OH)<sub>3</sub> prolonga la respuesta de citoquinas generada por MPL (verdadero inductor de citoquinas) en el lugar de inyección, obteniéndose niveles de citoquinas más altos con AS04 que con MPL solo, especialmente de CCL2 (valores cinco veces mayores)<sup>5,19</sup>. Debido a su particular naturaleza, las sales de aluminio se utilizan principalmente para concentrar y estabilizar físicamente a los antígenos, y así favorecer su interacción con las CPA<sup>19</sup>.

La principal ventaja que presenta el uso de AS04 en comparación con el hidróxido de aluminio solo, a igual cantidad de antígenos, es que AS04 induce una mayor y más prolongada respuesta inmunitaria<sup>5,19</sup>. AS04 es capaz de inducir niveles más altos de anticuerpos específicos, así como linfocitos B (LB) de memoria en comparación con el hidróxido de aluminio solo<sup>5,19</sup>. Los LB humanos carecen de receptores TLR4, por lo que no responden a la estimulación por MPL, y consecuentemente tampoco por AS04<sup>5,19</sup>. Algo similar les ocurre a los LT. Por tanto lo más probable es que las CPA, cuya maduración y activación ha estado mediada por las citoquinas inducidas por el MPL, interaccionen con los LT, los activen y éstos posteriormente a los LB. Ésto está respaldado por la rápida aparición de CPA expresando antígenos en los ganglios linfáticos de drenaje<sup>20</sup>. Las citoquinas inducidas en el lugar de inyección son determinantes en los procesos celulares que tienen lugar en los ganglios linfáticos de drenaje: las quimioquinas CCL2 y CCL3 promueven el reclutamiento de monocitos y CD inmaduras, siendo la maduración de estos dos tipos de células es clave en la inducción de LT y LB. La combinación de MPL e hidróxido de aluminio permite el reclutamiento y la activación óptima de CPA en los ganglios linfáticos de drenaje, que puede deberse en parte a la prolongación de la respuesta de citoquinas generada por el hidróxido de aluminio. La activación directa de CD mediante sus TLR es importante en la respuesta sostenida de anticuerpos, que es mayor que la obtenida con la activación por citoquinas solamente<sup>19</sup>.

Toda esta respuesta inmunitaria innata generada por AS04 queda limitada al músculo (lugar de inyección). Ésta afirmación se respaldada por el confinamiento espacial de la actividad de NF-kB, y por tanto de la respuesta inmunitaria a MPL, en el lugar de inyección y en los ganglios linfáticos de drenaje. Además los niveles séricos de citoquinas son mucho menores que los presentes en el músculo<sup>5,19</sup>. La transitoriedad y la naturaleza localizada de ésta respuesta aporta suficiente evidencia para establecer un perfil favorable de seguridad en las vacunas que usan AS04 como adyuvante<sup>5,19</sup>. Además los factores implicados en las inflamaciones crónicas y en las enfermedades autoinmunes, como son la inducción de IFN- $\alpha$ , la activación directa de LT, y los niveles altos y sostenidos de citoquinas, no se observan<sup>5,19</sup>. No se ha demostrado relación causal entre las enfermedades autoinmunes y la administración de AS04<sup>5</sup>.

Es imprescindible la colocación tanto temporal (menos de 24 horas) como espacial (mismo sitio de inyección) de AS04 con los antígenos para obtener una respuesta inmunitaria óptima, por ello se coadministran. Ésto se debe a que la acción de AS04 se restringe a las primeras 24 horas, y a que AS04 no tiene capacidad de estimular la formación de anticuerpos si se inyecta en un lugar distinto al de los antígenos. Además las L1 de VPH 16 y 18 por sí solas no parecen inducir la producción de citoquinas ni la activación de CPA *in vivo* ni *in vitro*<sup>5,19</sup>.

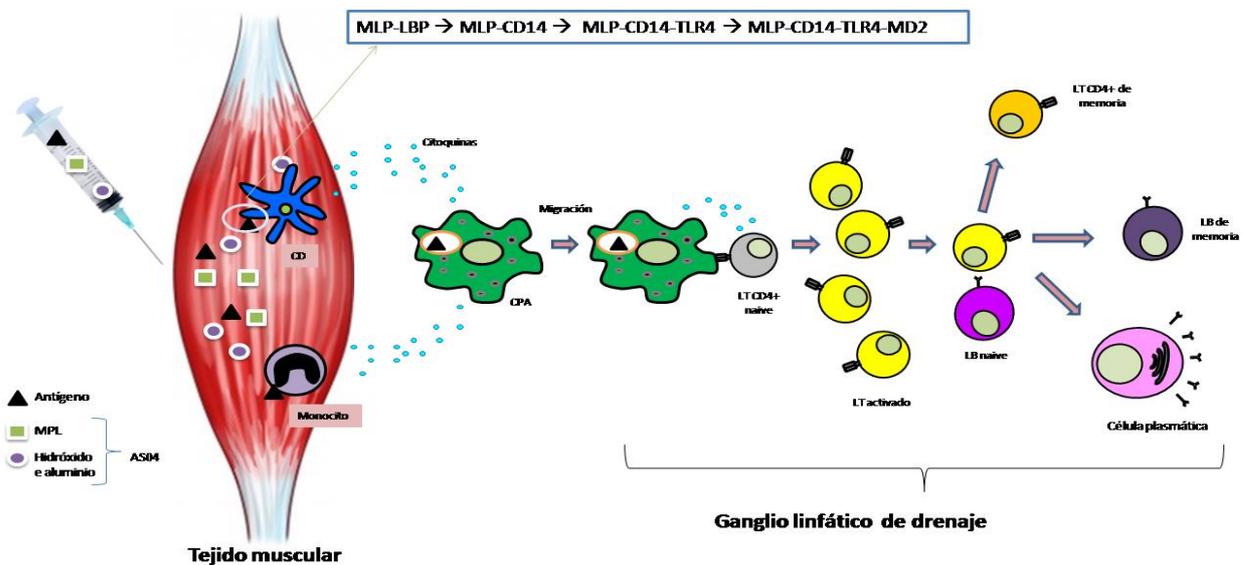


Imagen 2. Mecanismo de acción del AS04<sup>5</sup>.

## Cervarix® vs Gardasil®

Mark Einstein *et al* (2014) recoge un estudio de fase III aleatorio en el que compara la inmunogenicidad y la seguridad de las vacunas Cervarix® y Gardasil® durante 5 años (60 meses) de seguimiento. La población inicial del estudio fueron 1106 mujeres sanas de entre 18-45 años, vacunadas con al menos una dosis de Cervarix® (N=553) o de Gardasil® (N=553), pero solo concluyeron el ensayo 213 y 208 mujeres respectivamente. Las principales conclusiones a las que se llegaron fueron que Cervarix® induce una respuesta sérica de anticuerpos neutralizantes mayor que Gardasil®: para VPH-16, en el rango de edad 18-26 se obtuvieron valores 7.8 más altos para Cervarix® que para Gardasil®, igual ocurre con los grupos 27-35 y 36-45 para los que los resultados fueron 6.6 y 2.3 mayores respectivamente. Sin embargo, para el VPH-18 la diferencia es mucho más acusada: 12.1, 13 y 7.8 para los mismos grupos de edad antes mencionados respectivamente. Además la vacuna Cervarix® induce anticuerpos anti-VPH-18 claramente superiores a los niveles obtenidos por la infección natural, en cambio los obtenidos con la vacuna Gardasil® son similares o inferiores. La segunda gran conclusión es que en cuanto al porcentaje de seroconversión, los datos obtenidos también son más favorables para Cervarix®: tras los cinco años de seguimiento, para VPH-16 la tasa de seroconversión tras la administración de Cervarix® es de 100%, y del 95.7-97.5% para Gardasil®. En el caso del VPH-18 es del 98.1-100% y del 61.1-76.9% para Cervarix® y Gardasil® respectivamente. Además distintos modelos estadísticos predicen que los anticuerpos formados por Cervarix® puede tener una durabilidad mayor<sup>21</sup>.

## 5.2. Imiquimod: tratamiento tópico

El imiquimod (IMQ) es una amina imidazoquinolina (ver imagen 3) sintética con actividad farmacológica antiviral y antitumoral indirecta. Es capaz de incrementar la respuesta inmunológica tanto innata como adquirida. Se administra por vía tópica en forma de crema al 5% (Aldara®) o 3,75% (Zyclara®) sobre las zonas afectadas, ambas aprobadas por la AEMPS y la FDA<sup>22,23</sup>, y sujetas a prescripción médica<sup>24</sup>. La duración del tratamiento y las aplicaciones semanales dependerán de la indicación terapéutica<sup>22,23</sup>.

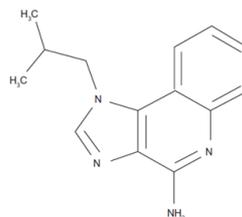


Imagen 3. Estructura química del imiquimod

## Indicaciones y grupos de población especiales

En un primer momento el IMQ en crema al 5% se aprobó para el tratamiento tópico de verrugas genitales y perianales externas (condiloma acuminado) y queratosis actínicas de la cara y cuero cabelludo en pacientes adultos. Posteriormente se incorporó la indicación para pequeños carcinomas basocelulares superficiales en adultos<sup>6,20,22,23,24</sup>. El IMQ en crema al 3,75% solo está aprobado para el tratamiento de queratosis actínicas de todo el rostro o del cuero cabelludo alopecico en adultos inmunocompetentes<sup>25</sup>.

Aparte de éstas indicaciones aprobadas, existen otras muchas patologías para las que se está investigando el tratamiento con IMQ (estudios off-label), como el lentigo maligno (fase IV), enfermedad de Bowen o el cáncer cervical intraepitelial (fase III-IV), para los que hay bastantes estudios que presentan elevadas tasas de aclaramiento y baja recurrencia<sup>20,23</sup>.

En cuanto a grupos de población especiales, no está recomendado para uso en niños ni en embarazadas (categoría C) por falta de estudios. Se desconoce si se elimina por leche materna<sup>23,24</sup>.

## Mecanismo de acción

El IMQ tiene una estructura química análoga a la de un nucleósido, pero carece del cuarto nitrógeno que sí se encuentra en las purinas. Posee un grupo imidazoquinolina como un tercer anillo y un grupo isobutilo en la posición 1, que en el caso de de un nucleósido estaría ocupado por una ribosa o dexosirribosa (ver imagen 3)<sup>1</sup>. Ésto unido a su pequeño tamaño y elevada liposolubilidad<sup>26</sup>, le permitirá atravesar la epidermis, pasar la membrana plasmática celular y acceder a los receptores TLR7 intracelulares, cuyo ligando natural son las cadenas simples de RNA (ssRNA). El IMQ actuará sobre ellos como un agonista<sup>1,6,15,26</sup>. También se ha visto que tiene cierta actividad agonista sobre los TLR8, pero es mucho más débil<sup>26</sup>. Como consecuencia de la activación de TLR7 y TLR8, factores de transcripción como NF-κB se traslocarán al núcleo e inducirán la transcripción de multitud de genes de componentes proinflamatorios. El resultado final es la síntesis de citoquinas como IFNα, TNFα, IL-2, -6, -8, -12, G-CSF y GM-CSF; quimioquinas como CCL3, CCL4 y CCL2; moléculas de adhesión y proteínas relacionadas con la apoptosis<sup>1,15,20,23,26</sup>. Tanto las citoquinas como las interleucinas serán producidas principalmente por monocitos, macrófagos y CDp que expresen TLR7<sup>23</sup>. Los niveles elevados de mediadores inflamatorios aumentan la potencia de las NK para atacar a las células infectadas por VPH, así como las cancerígenas.

Además las NK son productoras de IFN- $\gamma$  como consecuencia de su estimulación por IMQ<sup>15,23</sup>. Ésta respuesta inmunitaria puede llevar a la aparición de efectos adversos como enrojecimiento, edema y picor<sup>15</sup>.

El IMQ también tiene un efecto sobre la inmunidad adaptativa, ya que favorece la maduración de las células de Langerhans y su migración a los nódulos linfáticos<sup>15,26</sup>, donde presentarán antígenos que inducirán una respuesta inmunitaria de tipo Th1<sup>6,15</sup>, siendo los LT citotóxicos activados capaces de destruir células infectadas por algunos virus o células tumorales<sup>22,23</sup>. El IMQ estimula la producción de IFN- $\gamma$  por los LTh1, pero no su división o producción directa de citoquinas. El IFN- $\alpha$  puede unirse a una fracción del receptor de IL-12 en los LTh1, lo que permitirá la respuesta a IL-12, así como la producción de IFN- $\gamma$ . Las células Th1 son la principal fuente de IFN- $\gamma$ <sup>23</sup>. Simultáneamente, los LB empezarán a fabricar anticuerpos, lo que aumentarán la presentación de antígenos<sup>15</sup>. Además en condiciones experimentales se ha visto que el IMQ favorece este proceso porque mimetiza las señales de CD40 que normalmente son enviadas por los LT. A su vez las imidazoquinolinas pueden estimular la proliferación de LB incluso en ausencia de otros inmunocitos<sup>26</sup>.

A pesar de que la principal acción es por agonismo de los receptores TLR7 y 8, también se ha observado cierta actividad como agonistas de receptores de adenosina y proapoptóticos. Experimentalmente el IMQ presenta afinidad por los receptores de adenosina A2A y A1 en los que actúa como antagonista. Teniendo en cuenta que en condiciones normales la unión de un agonista a estos receptores inhibe la transcripción de citoquinas proinflamatorias, se puede deducir que el IMQ interfiere en el mecanismo de retroalimentación negativo que se lleva a cabo en las reacciones inflamatorias, ejerciendo así un efecto proinflamatorio<sup>20,26</sup>. Por otro lado, su efecto proapoptótico en varios tipos de células se debe a dos mecanismos, uno directo y otro indirecto. El indirecto está basado en la modulación de la vía STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*). El IMQ aumenta la expresión del receptor de muerte CD95 y disminuye la de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en células carcinogénicas basales. Ésta actividad proapoptótica puede que esté mediada por la activación de los TLR. Por otro lado, el mecanismo directo se basa en la inhibición de la activación de las caspasas. Sin embargo parece que *in vivo*, factores adicionales como la infiltración de células inmunitarias puedan contribuir a la apoptosis de tumores tratados con IMQ, por tanto la inducción de la apoptosis por IMQ no está del todo clara<sup>26</sup>.

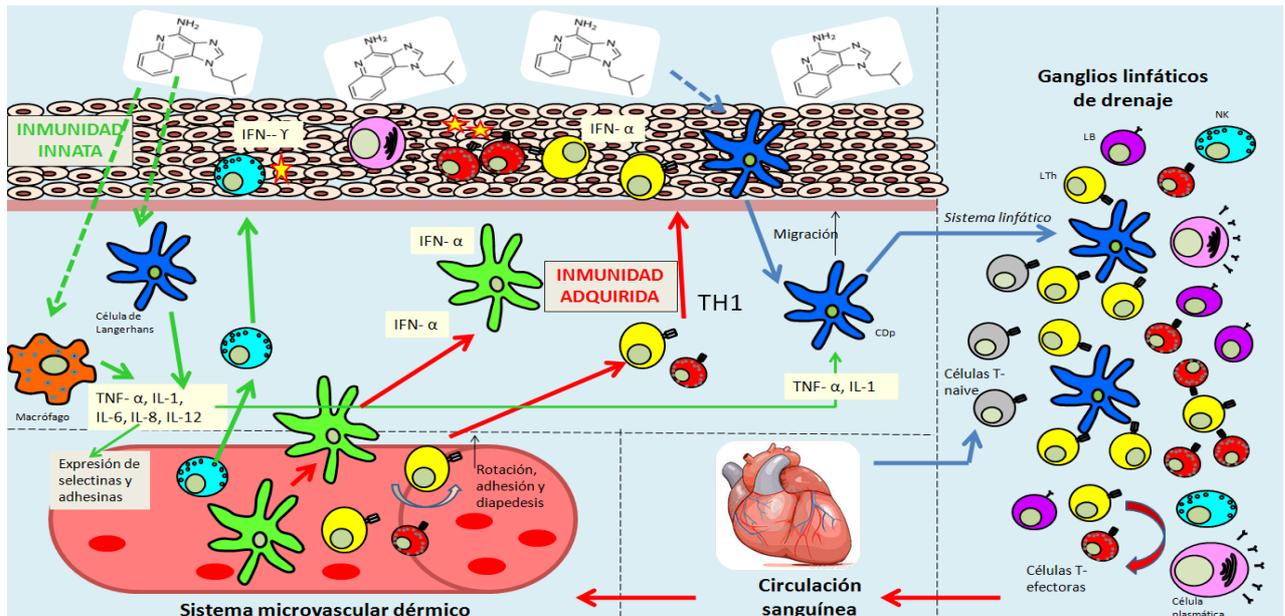


Imagen 4. Mecanismo de acción del imiquimod<sup>36</sup>.

### Comparación con otros tratamientos

En esta sección, para cada indicación aprobada se hará una recopilación de ensayos clínicos realizados por varios autores.

La queratosis actínica consiste en pápulas eritematosas causadas principalmente por la exposición al sol, y son consideradas premalignas. Hanke *et al* (2010)<sup>23,27</sup> y Del Rosso *et al* (2009)<sup>23, 28</sup>, en dos estudios distintos, compararon la tasa de aclaramiento total del IMQ 3,75% y 5% con respecto al placebo: 34% y 36,4% respectivamente. Estos resultados evidencian la eficacia terapéutica del IMQ. Krawtchenco *et al* (2007) comparó el IMQ con otras técnicas como la criocirugía, o el tratamiento tópico con 5-fluorouracilo (5-FU). Las tasas de aclaramiento inicial obtenidas fueron: 85%, 68% y 96% respectivamente, mientras que las tasa de aclaramiento después de un año fueron: 73%, 28% y 54% respectivamente. Por tanto, aunque inicialmente el tratamiento con 5-FU sea el más eficaz, a largo plazo es liderado por el IMQ<sup>23,29</sup>. Y por último, Jorizzo *et al* (2010) concluyó que la combinación de IMQ 3,75% en crema después de una criocirugía aumenta la eficacia del tratamiento en comparación con la criocirugía sola, puesto que la tasa de aclaramiento completa casi se duplica (29,8% frente al 59,5% de la combinación)<sup>23,30</sup>.

Las verrugas genitales son pápulas de transmisión sexual altamente contagiosas causadas principalmente por VPH 6 y 11. El tratamiento efectivo es importante para evitar el desarrollo de cáncer, así como el trauma psicológico asociado con las manifestaciones

clínicas. En el artículo de Garland *et al* (2010) se recoge un ensayo multicentro en el que se evaluó la eficacia del IMQ para el tratamiento de verrugas genitales, y en el que se obtuvo una tasa de aclaramiento del 47,8% tras 16 semanas de tratamiento, y una tasa de recurrencia del 23% a los seis meses<sup>23,31</sup>. Por otro lado, Carrasco *et al* (2002) realizó un estudio retrospectivo con un tamaño de muestra no muy grande (N=60) en el que se estudiaron tres grupos de pacientes con una tasa de aclaramiento del 100%: unos tratados en monoterapia con cirugía, otros con IMQ 5% y otros combinando ambas técnicas. El objeto de éste estudio fue comparar la tasa de recurrencia entre las tres opciones, la más baja se obtuvo en los pacientes tratados con IMQ en monoterapia (15%)<sup>23,32</sup>. Por último Ferreriset *et al* (2010) recoge un estudio sobre la eficacia del IMQ al 3,75% y 2,5% en crema para esta misma indicación (no aprobada en ningún país): los resultados de aclaramiento (IMQ 2,5% = 22,1%; IMQ 3,75%= 28,3%) y recurrencia (IMQ 2,5% = 40,5%; IMQ 3,75%= 30,4%) no son tan buenos como los del 5%, pero sí marcan una diferencia con el placebo<sup>23,33</sup>.

El carcinoma de células basales es el cáncer de piel más frecuente, y generalmente se desarrolla en las áreas expuestas al sol. Puede ser localmente destructivo y desfigurativo, pero no suele producirse metástasis. Schulze *et al* (2005)<sup>23,34</sup> y Quirk *et al* (2010)<sup>23,35</sup> recogieron estudios de fase III de IMQ al 5% para el tratamiento de ésta patología y con la misma duración de tratamiento. Las tasas de aclaramiento fueron del 80% y 94%, respectivamente, siendo unos resultados muy aceptables. Aunque las tasas de aclaramiento para el tratamiento del carcinoma de células basales con escisión quirúrgica son mayores, la relación coste-efectividad del IMQ y otras técnicas no invasivas parecen mejores. A pesar de todo, el tratamiento de elección es el quirúrgico.

## 6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de ésta revisión bibliográfica se recogen en los siguientes puntos:

- Es imprescindible la prevención y el tratamiento de la infección por el VPH, principalmente para evitar las complicaciones graves de tipo canceroso.
- Es preferible la vacunación con Cervarix® que con Gardasil® porque los niveles de anticuerpos generados son mayores, a pesar de que proteja frente a un menor número de genotipos del VPH.
- Imiquimod se usa como tratamiento tópico, por lo que sólo será útil para las infecciones leves o más superficiales, pero no para las graves, en las que la cirugía será el

tratamiento de elección. Lo ideal por tanto, es realizar primero una cirugía y continuar con tratamiento tópico, para evitar recidivas.

- Los mecanismos de acción de AS04 e imiquimod son bien conocidos, siendo NF-kB clave en la producción de citoquinas proinflamatorias y éstas a su vez en el desarrollo de la respuesta inmunitaria.
- A pesar de la eficacia demostrada de AS04 e imiquimod, su mecanismo de acción es indirecto. Sería más interesante desarrollar fármacos con dianas directas (presentes solo en las células infectadas por VPH), con el objetivo de aumentar la selectividad y disminuir las reacciones adversas.
- Existen varias líneas de investigación abiertas de agonistas de TLRs para el tratamiento de diversas patologías, por lo que tienen un potencial terapéutico evidente.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. M.A. Stanley. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. 2002; *Clinical and Experimental Dermatology*; 27:571–577.
2. Abul K Abbas, Andrew H. Lichtman. *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición. España: Editorial Elsevier; 2007.
3. Bioscience [Internet] Toll-like Receptors and innate immunity. 2008. Disponible en: <http://www.sabioscience.com>
4. T Kawai and S Akira. TLR signaling. 2006. *Cell Death and Differentiation* (2006) 13, 816–825.
5. Nathalie Garçon, Sandra Morel, Arnaud Didierlaurent, Dominique Descamps, Martine Wettendorff and Marcelle Van Mechelen. Development of an AS04-Adjuvanted HPV Vaccine with the Adjuvant System Approach. 2011. *Blodrugs*; (4):217-226.
6. Qiang Zhou, Kejian Zhu, Hao Cheng. Toll-Like Receptors in Human Papillomavirus Infection. 2013. *Arch. Immunol. Ther.*; 61:203–215.
7. Karol Guzmán Masias. *La inmunidad innata y los receptores tipo toll (TLR'S)*. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos 2010.
8. Raúl Romero Caballero. *Microbiología y Parasitología Humana*. 3ª edición. Méjico: Editorial Médica Panamericana; 2007.
9. José María Borrel Martínez, Asunción Díaz Franco, Ángeles Herrera Puente, Lola Sánchez Bursón y Esteban Sanmartín Sánchez. *Guía de buena práctica clínica en infecciones de transmisión sexual*. Ministerio de Sanidad, política social e igualdad. Gobierno de España. 2011.
10. American Cancer Society. HPV Vaccines. Febrero 2016. Disponible en: <http://www.cancer.org>
11. Manuel Merino Moína. *Manual de vacunas en línea de la AEP, Virus del papiloma humano*. España, Mayo 2015. Disponible en: <http://www.vacunasaep.org>
12. J. Thomas Cox, M.D., Karl-Ulrich Petry, Eva Rylander and Michel Roy. Using Imiquimod for Genital Warts in Female Patients. 2004. *Journal of Women's health*; 13(3).
13. National Institute of Health. *Human Papillomavirus (HPV) Vaccines*. Feb 2015. Disponible en: <http://www.cancer.gov>
14. H. SchÖfer. Evaluation of imiquimod for the therapy of external genital and anal warts in comparison with destructive therapies. 2007. *British Journal of Dermatology*; 157 (Suppl. 2): 52–55.
15. C.J. de Witte, A.J.M. van de Sande, H.J. van Beekhuizen, M.M. Koeneman, A.J. Kruse, C.G. Geresteind. Imiquimod in cervical, vaginal and vulvar intraepithelial neoplasia: A review. 2015. *Gynecologic Oncology*; 139: 377–384.
16. Kwang Sung Kim, Shin Ae Park, Kyung-Nam Ko, Seokjae Yi, Yang Je Cho. Current status of human papillomavirus vaccines. 2014. *Clin Exp Vaccine Res*; 3:168-175.
17. Ficha técnica Cervarix. Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

18. Manuel Rodríguez Rodríguez, Fermín García Rodríguez y Jesús Ruiz Aragón. Virus del papiloma humano: situación actual, vacunas y perspectivas de su utilización. Mayo 2008. Consejería de salud, junta de Andalucía. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/salud>
19. Arnaud M. Didierlaurent, Sandra Morel, Laurence Lockman, Sandra L. Giannini, Michel Bisteau, Harald Carlsen et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. 2016. *J Immunol*; 183:6186-61
20. Erika Vacchelli, Lorenzo Galluzzi, Alexander Eggermont, Wolf Hervé Fridman, Jerome Galon, Catherine Sautès-Fridman, et al. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. 2012. *OncoImmunology*; 1(6): 894-907
21. Mark H Einstein, Peter Takacs, Archana Chatterjee, Rhoda S Sperling, Nahida Chakhtoura, Mark M Blatter, et al. Comparison of long-term immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine and HPV-6/11/16/18 vaccine in healthy women aged 18-45 years: Endof- study analysis of a Phase III randomized trial. 2014. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*; 10(12):3435-3445
22. Jesús Flórez. *Farmacología Humana*. 5º edición. España: Elsevier Masson; 2008.
23. Caroline Caperton, Martha Viera, Sadegh Amini, Whitney Valins and Brian Berman. Pharmacotherapy of Basal Cell Carcinoma, Anogenital Warts, and Actinic Keratoses: Focus on Topical Imiquimod. 2011. *Clinical Medicine Reviews in Oncology*;3: 13-27
24. Ficha técnica Aldara®. Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
25. Ficha técnica Zyclara®. Asociación Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
26. MP SchÖn and M SchÖn. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. 2008. *Oncogene*;27: 190-199
27. Hanke CW, Beer KR, Stockfleth E, Wu J, Rosen T, Levy S. Imiquimod 2.5% and 3.75% for the treatment of actinic keratoses: results of 2 placebocontrolled studies of daily application to the face and balding scalp for two 3-week cycles. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 62(4):573-81.
28. Del Rosso JQ, Sofen H, Leshin B, Meng T, Kulp J, Levy S. Safety and Efficacy of Multiple 16-week Courses of Topical Imiquimod for the Treatment of Large Areas of Skin Involved with Actinic Keratoses. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2009 Apr;2(4):20-8.
29. Krawtchenko N, Roewert-Huber J, Ulrich M, Mann I, Sterry W, Stockfleth E. A randomised study of topical 5% imiquimod vs. topical 5-fluorouracil vs. cryosurgery in immunocompetent patients with actinic keratoses: a comparison of clinical and histological outcomes including 1-year follow-up. *Br J Dermatol*. 2007 Dec;157 Suppl 2:34-40.
30. Jorizzo JL, Markowitz O, Lebowitz MG, et al. A randomized, doubleblinded, placebo-controlled, multicenter, efficacy and safety study of 3.75% imiquimod cream following cryosurgery for the treatment of actinic keratoses. *J Drugs Dermatol*. 2010 Sep;9(9):1101-8.
31. Garland SM, Sellors JW, Wikstrom A, et al; Imiquimod Study Group. Imiquimod 5% cream is a safe and effective self-applied treatment for anogenital warts-results of an open-label, multicentre Phase IIIB trial. *Int J STD AIDS*. 2001 Nov;12(11):722-9.
32. Carrasco D, vander Straten M, Tyring SK. Treatment of anogenital warts with imiquimod 5% cream followed by surgical excision of residual lesions. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(4 Suppl):S212-6.
33. Ferris D, Baker D, Tyring S, et al. Imiquimod 2.5% and 3.75% applied daily for up to 8 weeks to treat external genital warts. Poster presentation at the 26th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Montreal, Canada. July 3-8, 2010. P-544.
34. Schulze HJ, Cribier B, Requena L, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol*. 2005;152(5):939-47.
35. Quirk C, Gebauer K, De'Ambrosis B, Slade HB, Meng TC. Sustained clearance of superficial basal cell carcinomas treated with imiquimod cream 5%: results of a prospective 5-year study. *Cutis*. 2010 Jun;85(6):318-24.
36. Meinhard Schiller, Dieter Metzger, Thomas A. Luger, Stephan Grabbe<sup>2</sup> and Matthias Gunzer. Immune response modifiers – mode of action. *Experimental Dermatology* 2006; 15: 331-341.