



Respuesta inmune en cáncer cervicouterino. Estrategias para el desarrollo de vacunas terapéuticas

María de Lourdes Mora-García,^a Alberto Monroy-García^b

Immune response in cervical cancer. Strategies for the development of therapeutic vaccines

High-risk human papillomaviruses (HR-HPV), as HPV-16, evade immune recognition through the inactivation of cells of the innate immune response. HPV-16 E6 and E7 genes down-regulate type I interferon response. They do not produce viremia or cell death; therefore, they do not cause inflammation or damage signal that alerts the immune system. Virus-like particles (VLPs), consisting of structural proteins (L1 and L2) of the main HR-HPV types that infect the genitourinary tract, are the most effective prophylactic vaccines against HR-HPV infection. While for the high grade neoplastic lesions, therapeutic vaccines based on viral vectors, peptides, DNA or complete HR-HPV E6 and E7 proteins as antigens, have had limited effectiveness. Chimeric virus-like particles (cVLPs) that carry immunogenic peptides derived from E6 and E7 viral proteins, capable to induce activation of specific cytotoxic T lymphocytes, emerge as an important alternative to provide prophylactic and therapeutic activity against HR-HPV infection and cervical cancer.

Keywords Palabras clave

Cervical cancer	Cáncer cérvico-uterino
Human papillomavirus	Virus de papiloma humano
Immune response antigens	Antígenos de respuesta inmune
Vaccines	Vacunas

La infección por virus de papiloma humano (VPH) en genitales es una de las enfermedades de transmisión sexual que más comúnmente se presenta en la población mundial. En 2008, se estimó que 610 000 (4.8 %) de los 12.7 millones de casos de cáncer reportados en el mundo fueron atribuibles a la infección por VPH, de los cuales 530 000 casos correspondieron a cáncer cervicouterino (CaCU) y la cantidad restante a cáncer de pene, vulva, vagina y orofaringe.¹ El CaCU ocupa el tercer lugar en incidencia y el cuarto lugar en mortalidad por cáncer en mujeres en el mundo (más de 270 000 muertes al año). Es el cáncer más frecuente en países en vías de desarrollo, donde ocurre el 85 % de los casos (en México el CaCU ocupa el segundo lugar de incidencia y de mortalidad por cáncer), lo que representa un problema de salud pública en estos países debido a la enorme carga económica relacionada con los costos en el cuidado de la salud.¹ La presencia de VPH en prácticamente todos (99.7 %) los carcinomas del cérvix uterino ha sugerido que ese virus es un factor necesario para el desarrollo de esta neoplasia.² En las últimas dos décadas, el estudio de la respuesta inmune hacia las proteínas estructurales y no estructurales de estos virus ha dado la pauta para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas para prevenir y evitar el desarrollo de cáncer asociado a la infección por VPH.

VPH y cáncer cervicouterino

Los VPH son una familia de más de 100 diferentes genotipos virales constituidos por una doble cadena de ADN. Alrededor de 40 tipos de VPH pueden infectar el tracto genitourinario y, con base en el espectro de lesiones que producen, se dividen en VPH de bajo riesgo (VPH-BR) y VPH de alto riesgo (VPH-AR).³ El VPH-6 y el VPH-11, que pertenecen a los VPH-BR, producen más del 90 % de verrugas genitales y papilomas respiratorios; además, se encuentran en un amplio número de lesiones de bajo grado: lesiones intraepiteliales cervicales, de

^aLaboratorio de Inmunobiología, Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México
^bLaboratorio de Inmunología y Cáncer, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social

Distrito Federal, México

Comunicación con: María de Lourdes Mora-García
 Correo electrónico: mogl@servidor.unam.mx

Recibido: 10/03/2015

Aceptado: 15/05/2015

Los virus de papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), como el VPH-16, evaden el reconocimiento inmune a través de la inactivación de células de la respuesta inmune innata. Los genes E6 y E7 del VPH-16 desregulan la respuesta al interferón tipo I. Además, no producen viremia ni muerte celular; por lo tanto, no producen inflamación o señal de daño que alerte al sistema inmunológico. Las partículas tipo virales (VLP, del inglés virus-like particles), constituidas por proteínas estructurales (L1 y L2) de los principales tipos de VPH-AR que infectan el tracto genitourinario, son las

vacunas profilácticas más eficaces contra la infección por VPH-AR. Mientras que para lesiones neoplásicas de alto grado, las vacunas terapéuticas basadas en vectores virales, péptidos, ADN o proteínas totales E6 y E7 de VPH-AR, han tenido una efectividad limitada. Las partículas quiméricas tipo virales (cVLP), que acarrean péptidos de las proteínas virales E6 y E7, y que inducen la activación de linfocitos T citotóxicos específicos, surgen como una alternativa importante para proveer actividad profiláctica y terapéutica contra la infección por VPH-AR y el cáncer cervicouterino.

Resumen

ano (AIN), pene (PIN), vagina (VAIN) y vulva (VIN); mientras que el grupo de VPH-AR, que incluye los tipos VPH-16, -18, -31, -33, -45, -52 y -58, entre otros, se asocia con el desarrollo de cánceres anogenitales e incluye cáncer cervicouterino, vaginal, de cabeza y cuello, de pene y anal. En el caso particular del CaCU, más del 99 % de los tumores presentan infección por VPH-AR y el VPH-16 se encuentra en cerca del 50 % de los casos.²

El genoma de los VPH contiene marcos de lectura abierta que pueden dar lugar a ocho diferentes proteínas: seis proteínas de transcripción temprana (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos proteínas de transcripción tardía (L1 y L2). Las proteínas E1 y E2 de transcripción temprana regulan la replicación del ADN y el ARN viral; mientras que las proteínas E4, E5, E6 y E7 intervienen en el control del ciclo celular, así como en la transformación celular.⁴ Las proteínas L1 y L2 se asocian en una proporción de 30:1 para constituir la estructura de la cubierta viral (cápside) que envuelve al ADN circular de doble cadena, constituyendo así las partículas virales infecciosas (viriones).⁵ La estructura completa del virión es icosaédrica, con un diámetro de 50-60 nm y contiene un total de 72 subunidades de la proteína L1 (60 hexaméricas y 12 pentaméricas); mientras que la proteína L2 es una proteína interna que ayuda a la estabilidad de la partícula. Los VPH tienen como blanco de infección las células de los epitelios y las mucosas, en donde llevan a cabo su replicación. Las partículas infecciosas entran a las células basales o germinales del epitelio estratificado a través de una lesión o microtrauma. Se ha propuesto a la integrina alfa-6/beta-4 como receptor de membrana para unir al virus y a los proteoglicanos de sulfato de heparina presentes en la membrana plasmática, para permitir la entrada del virus a las células germinales.⁶ Dentro de las células, el genoma viral se mantiene en estado episomal (ADN completo) en bajo número de copias (de 10 a 200 copias); inicialmente se expresan las proteínas E1 y E2 para facilitar la segregación correcta de los genomas durante la división celular. La infección

inicial es seguida por una fase proliferativa que conduce al incremento del número de células basales que contienen el genoma viral (figura 1), lo que puede requerir la expresión de las proteínas E6 y E7, las cuales estimulan el progreso de la fase de ciclo celular G1 a S. Para que se produzcan viriones infecciosos, los virus de papiloma deben amplificar su genoma y empaquetarlo en la partícula proteica.⁶ Esto ocurre en las capas superiores del epitelio, en el estrato espinoso, donde aumenta la actividad transcripcional de proteínas involucradas en la replicación del ADN viral, como E1, E2, E4 y E5, y las constituyentes de la cápside, L1 y L2. El ensamble de las partículas virales ocurre en el estrato granuloso del epitelio y eventualmente las células infectadas se descaiman de la capa superior de este. El proceso infeccioso y la amplificación del ADN viral pueden ocurrir entre seis y doce semanas, mientras que el desarrollo de lesiones malignas en dos o más años (figura 1).⁶

Respuesta inmune al VPH

La defensa del hospedero ante una infección viral resulta de la colaboración entre la inmunidad innata (fagocitos, proteínas solubles y barreras epiteliales) y la inmunidad adaptativa (anticuerpos, células cooperadoras y citotóxicas). El sistema inmune innato a través de macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas detecta las partículas virales y actúa como primera línea de defensa, eliminando la mayoría de las intrusiones; no tiene memoria específica, pero es responsable de activar la inmunidad adaptativa, la cual por medio de mecanismos efectores humorales y celulares exquisitamente específicos hacia los antígenos foráneos puede generar células de memoria de larga vida. En el caso particular de la infección por VPH, este patógeno ha desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped (figura 1). El ciclo infeccioso del virus ocurre por sí mismo (es un meca-

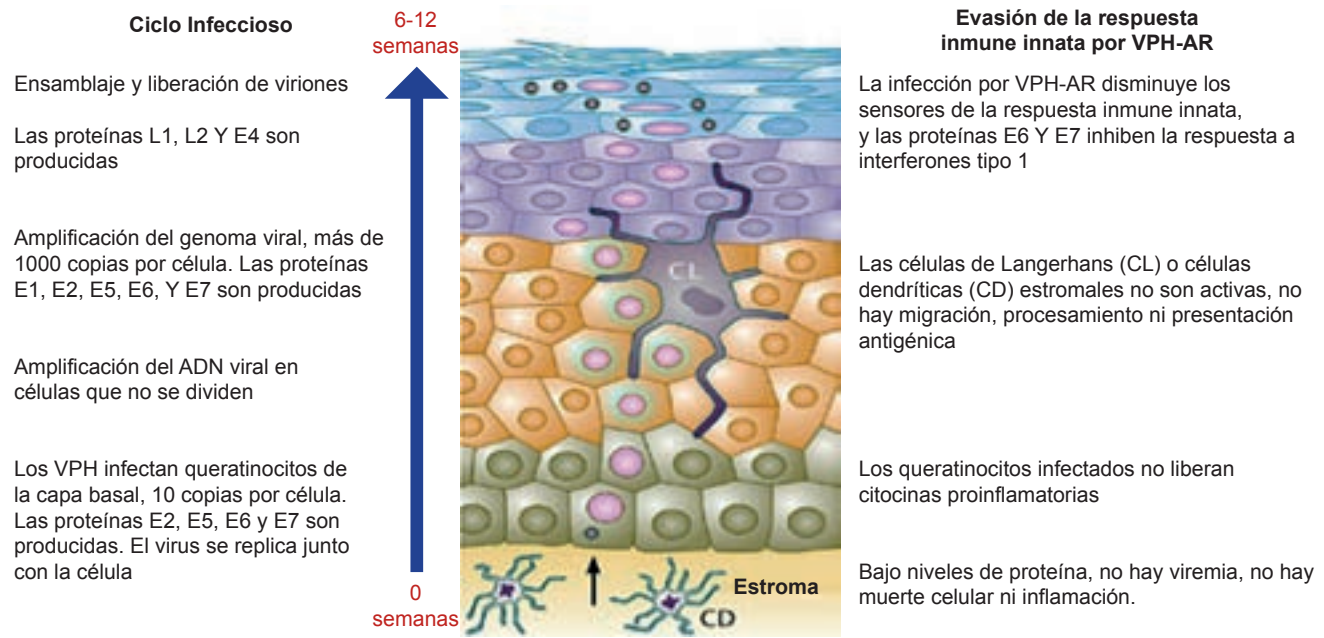


Figura 1 Ciclo infeccioso y mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata durante la infección por VPH-AR⁷

nismo de evasión del sistema inmune), debido a que el VPH es un patógeno exclusivamente intraepitelial; no se presenta una fase de transmisión sanguínea o viremia en el ciclo de vida, y solo cantidades mínimas de virus están expuestas a las defensas inmunes.⁷ Además, no hay citólisis o muerte citopática como consecuencia de la replicación del virus; por lo tanto, no hay inflamación y durante la mayor parte del ciclo de infección por VPH, parece haber poca o ninguna liberación de citocinas proinflamatorias importantes para la activación y la migración de las células presentadoras de antígeno (CPA) en el microambiente local.⁷ Por ejemplo, se sabe que los interferones de tipo I, principalmente IFN-alfa e IFN-beta, tienen actividad antiviral, antiproliferativa y antiangiogénica, además de participar en la activación de la respuesta adaptativa mediante la inmunidad innata.⁸ Los VPH-AR tienen mecanismos que inhiben la síntesis de interferón y las vías de señalización intracelular; por ejemplo, las proteínas E6 y E7 del VPH-16 pueden interactuar directamente con los componentes de las vías de señalización del interferón, lo cual favorece la evasión de la respuesta inmune (figura 1).⁹

A pesar de los mejores esfuerzos del virus para evadir las defensas del huésped, por lo menos entre 80 y 90 % de las infecciones genitales por VPH se resuelven con el devenir del tiempo.¹⁰ Las verrugas anogenitales y las neoplasias intraepiteliales de bajo grado (NIC-1) se revierten gracias a la respuesta inmune mediada por células, que está dirigida contra proteínas virales de transcripción temprana, especialmente contra las proteínas E2 y

E6.^{11,12} Este proceso está acompañado por una infiltración masiva de las células mononucleares (CD4+, CD8+, CD56 y macrófagos) en la lesión y la expresión de las citocinas Th1.¹³ En un estudio histológico prospectivo de 12 meses en lesiones de NIC-1, la regresión observada durante ese periodo de estudio se correlacionó fuertemente con la presencia de células citotóxicas (granzima B+ CD8+ y granzima B+ CD56+) y linfocitos T CD8+, que expresan la integrina alfa-4/beta-7 en las lesiones cervicales colitocíticas y en las lesiones NIC-1, pero están ausentes o presentes en números reducidos en lesiones NIC de alto grado (NIC-2/3).¹³ Sin embargo, a pesar de esta intensa respuesta local, las respuestas sistémicas de células T antígeno-específicas son débiles y a menudo transitorias. La respuesta inmune celular contra el VPH es seguida de cerca por la seroconversión y la producción de anticuerpos, específicamente hacia la proteína L1 de la cápside viral.¹⁴ Los títulos de anticuerpos que siguen a la infección natural por VPH son bajos, y se ha encontrado que para los virus de papiloma mejor estudiados (VPH-6, -11, -16 y -18) los tiempos promedio de seroconversión exceden los seis meses; parece que entre un 30 y un 50 % de individuos con evidencia de infección genital persistente por VPH nunca adquieren anticuerpos, lo cual puede asociarse a un estado de progresión de la enfermedad.¹⁵ En el CaCU, la seropositividad para los VPH-AR está generalmente reportada entre 30 y 50 % de las pacientes.¹⁶ Por otra parte, respuestas inmunes humorales en contra de las proteínas E6 y E7 son consideradas como un marcador de progresión tumo-

ral.¹⁷ Esto se debe a que la integración de los oncogenes E6 y E7 del VPH-AR en la célula huésped causa inestabilidad genómica, lo que puede conducir a la progresión maligna.¹⁷ En el epitelio infectado y en el endotelio microvascular subyacente, la expresión de las principales citocinas, moléculas de adhesión, quimiocinas y receptores de quimiocinas se encuentra desregulada. Por lo tanto, incluso si se han generado linfocitos T citotóxicos específicos contra el VPH, su penetración en el epitelio es pobre y las células T reguladoras dominan cada vez más las lesiones y suprimen la respuesta efectora asesina.¹⁸

Vacunas contra la infección por VPH

En 1991 el grupo de investigación de Zhou y Frazer¹⁹ logró expresar por primera vez la proteína L1

(proteína principal de la cápside de VPH) en células eucariotes y con ello los investigadores demostraron que estas proteínas podían autoensamblarse en partículas similares a virus (VLP, del inglés virus-like particles), lo que marcó la base para el desarrollo de vacunas efectivas de primera generación para prevenir la infección por VPH. De hecho, las vacunas profilácticas comerciales que incluyen VLP de los tipos VPH-16 y -18 (Glaxo SK) y VPH-6, -11, -16 y -18 (Gardasil, Merck Co) generan altos títulos de anticuerpos neutralizantes con especificidad hacia la proteína L1 (entre 100 y 1000 veces más que los encontrados en infecciones naturales) y una memoria robusta inmune.²⁰

Los ensayos clínicos actuales han demostrado que estas vacunas proporcionan protección sostenida contra neoplasias intraepiteliales de grado I en el cuello uterino (NIC-I), en vulva (VIN) y vagina (VAIN), así

Cuadro I Resumen de estudios clínicos con vacunas terapéuticas en pacientes con neoplasias positivas a VPH-16²³

Tipo de vacuna	Composición	Fase	Pacientes	Respuesta inmune	Respuesta clínica de pacientes
Péptidos*	VPH-16 E7 (86-93)	I	12 CaCU, CaVa	CD8+ para E7	22 % RP 6 % RC
	VPH-16 E7 (12-20), E7 (86-93)	I-II	19 CaCU	NO CD8+ para E7	
	VPH-16 E7 (12-20), E7 (86-93)	I	18 CaVu	CD8+ para E7 10 pac.	
Proteínas	VPH-16 E7+HSP-65/BCG*	II	22 HSIL	ND	20 % RP 11.6 % RC
	VPH-16 L2+E6+E7 TA-CIN †	I	40 Voluntarias	CD8+ para E6 y E7	
	VPH-16 L2+E6+E7 TA-CIN+TA-VPH †	II	29	-	
	VPH-16 E6+E7 + ISCOMATRIX †	I	8 NIC-I 10NIC-II 13 NIC-III	CD8+ 18 pac.	
	VPH-16 E7 +PD-E7 INFL †	I/II	5 NIC-III, 2 NIC-II	CD4+/CD8+ para E7	
Células dendríticas*	CD+ VPH-16/-18 E7 Proteína	I	15 CaCU IV	CD8+ 4 pac., Ac. 8 pac.	NO
	CD+ VPH-16/-18 E7 Proteína+ IL-2	I	4 CaCU (VPH-16/18+)	CD4+ 2 pac., CD8+ 4 pac.	
DNA	ZYC101a+ DNA-Pep VPH-16 E7	I	12 displasia anal	CD8+ 10 pac.	2 % RP 27 % RC
	ZYC101*, †	I	15 NIC-II/III	CD8+ 11pac.	
	ZYC101a+DNA Pep VPH-16/18 E6 Y E7 HLA-A2 †	II	127 NIC-II/III	CD8+ 80 pac.	
Vectores virales	TA-VPH VPH-16/18 E6/E7 ‡	I	8 CaCU I-IIIB	Ac. 3 pac., CD8+ 8 pac.	20 % RP 30 % RC
	TA-VPH ‡	I	29 CaCU I-IIIB	Ac. 8 pac., CD8+ 4 pac.	
	TA-VPH ‡	II	12 VIN	Ac. 10 pac., CD4+ 6 pac.	
	TA-VPH ‡	II	18 VIN	CD8+ 8, Ac. 1 pac.	
	MVA-E2	I-II	36 NIC-II/III	Ac., CD4+, CD8+	
	MVA-E2 §	II	34 NIC-I, II, III	Ac., CD4+, CD8+	
VLP L1-E7	L1 VLP-E7	I-II	39 NIC-II/III	Ac. IgG 39 pac.	39 % RP NICII/III > NICI 56 % I-VPH > Normal

VPH = virus de papiloma humano; IL-2 = interleucina-2; HSIL = lesión intraepitelial de alto grado; NIC = neoplasia intraepitelial cervical; VIN = neoplasia intraepitelial vulvar/vaginal; Pac. = pacientes; CaCU = cáncer cervicouterino; CaVu = cáncer de vulva = CaVa = cáncer de vagina; Ac. = anticuerpos; Pep. = péptidos; RP = remisión parcial; RC = remisión completa

*Por vía subcutánea; † vía intramuscular; ‡por escarificación dermal; § vía intrauterina

como contra lesiones de condilomas atribuibles a varios tipos de VPH (-6, -11, -16 y -18) en más de 90 % de los casos, y una importante reducción en la incidencia de estas enfermedades. Por otro lado, aunque la capacidad inmunogénica de las VLP de primera generación es generalmente de tipo específica, actualmente se están generando vacunas profilácticas de segunda generación que incluyen en su composición secuencias de la proteína estructural L2, las cuales son conservadas entre los diferentes genotipos de VPH, lo que dará lugar a la generación con mayor efectividad de vacunas profilácticas polivalentes.²¹ Sin embargo, la eficacia de las vacunas profilácticas frente a lesiones con la presencia real de ADN de VPH-16 o de VPH-18 es pobre.²² Por lo tanto, se convierte en una prioridad el desarrollo de vacunas terapéuticas, destinadas a inducir una respuesta inmune celular, particularmente contra las oncoproteínas E6 y E7, ya que estas se expresan predominantemente en las células malignas y además son importantes para mantener su estado transformado. En consecuencia, en los últimos años se han generado vacunas terapéuticas que incluyen las proteínas E6 y E7 como antígenos de manera total o en péptidos, ya sea asociadas a vectores virales recombinantes y células dendríticas activadas, o que contienen ácidos nucleicos codificantes para estas proteínas (cuadro I).²³

Las evaluaciones de estas vacunas en personas sanas o pacientes con CaCU, NIC, VIN, VAIN o lesiones perianales, así como en personas afectadas por verrugas genitales o papilomas laríngeos, han mostrado seguridad, viabilidad, tolerabilidad e inmunogenicidad.²³ Sin embargo, a pesar de los datos preclínicos optimistas, la evidencia de beneficio terapéutico de respuestas inducidas por linfocitos T en los seres humanos ha sido limitada, probablemente debido a que los primeros ensayos clínicos se realizaron con pacientes en la fase final de la enfermedad, que estaban inmunocomprometidos, tanto por la enfermedad como por el tratamiento previo. Por otro lado, existen resultados prometedores en casos con lesiones intraepiteliales menos avanzadas (CIN, VIN, VAIN); sin embargo, ninguno de los estudios fue diseñado para mostrar una diferencia estadística importante entre los grupos vacunados y el placebo, además de una pobre correlación entre la respuesta clínica y la respuesta inmune en los pacientes cuando se analizaron los linfocitos T de sangre periférica o citocinas.²⁴

Recientemente se ha reportado una estrategia basada en la construcción de VLP quiméricas (cVLPs) que fusiona las proteínas estructurales L1 y L2 con secuencias antigénicas de las proteínas E6 y E7, con lo que se logra una partícula más completa en cuanto a equivalencia antigénica con los viriones.²⁵ En un primer estudio clínico, se aplicaron cVLP para el tratamiento de pacientes infectadas con VPH-16 que presentaban NIC2/3 de

alto grado.²⁶ El tratamiento consistió en 2 dosis parenterales de 75 o 250 µg, en pacientes voluntarias a las que se les evaluó la reducción del tamaño de sus lesiones, en el grado de NIC y la pérdida de DNA viral. La vacunación resultó en un aumento en la concentración de anticuerpos contra L1 de hasta 100 veces más que los títulos normales del grupo placebo. También se observó estimulación de respuesta inmune celular contra las dos proteínas.²⁶ Este tratamiento resultó seguro y por tanto marcó la pauta para la generación de otras estrategias en cuanto al diseño y desarrollo de cVLP.

Siguiendo esta estrategia, nuestro grupo de investigación ha generado cVLP empleando plantas como biofábricas productoras de proteínas antigénicas.²⁷ Las cVLP generadas están constituidas por la proteína estructural L1 y péptidos inmunogénicos de las proteínas E6 y E7 de VPH-16 con capacidad de estimular linfocitos T citotóxicos.²⁸ Ratones inmunizados con estas partículas produjeron anticuerpos IgG, los cuales fueron persistentes por más de un año y capaces de reconocer específicamente partículas constituidas de la proteína L1 de VPH-16 y con fuerte actividad neutralizante.²⁹ La inmunización con estas cVLP evitó el crecimiento tumoral en ratones previamente inmunizados e inhibió entre 50 y 70 % el crecimiento tumoral cuando los ratones fueron inmunizados de manera simultánea o después del reto tumoral.²⁹ Estos resultados permiten sugerir que las cVLP generadas en plantas pueden ser una opción viable para producir vacunas con potencial profiláctico y terapéutico para el tratamiento de infecciones y lesiones producidas por VPH-AR. En consecuencia, las propiedades profilácticas y terapéuticas de las cVLP abren una importante perspectiva para su amplio uso en la clínica, por lo que consideramos que este tipo de estrategias puede ser de gran utilidad para contrarrestar el desarrollo de neoplasias producidas por VPH-AR y, sobre todo, para poder tener acceso en países de bajos recursos, donde la infección por este tipo de virus de papiloma repercute fuertemente como un problema de salud pública.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento para investigación otorgado por CONACyT (proyectos 83732, 82827 y 84071) y por el FIS/IMSS (protocolos No. 60, 617 y 876).

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no ha sido reportado alguno que esté relacionado con este artículo.

Referencias

1. Forman D, de Martel C, Lacey Ch J, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni, et al. Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine*. 2012;30S:F12-F23.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189:12-9.
3. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
4. Laimins LA. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. En: McCance DJ, editor. *Human Tumor Viruses*. Washington, USA: American Society for Microbiology; 1998. p. 201-222.
5. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. 2000;5(3):557-67.
6. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30S:F55-F70.
7. Stanley MA. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):215-22.
8. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007;7:79-89.
9. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2000;275(10):6764-9.
10. Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, et al. Updating the Natural History of Human Papillomavirus and Anogenital Cancers. *Vaccine*. 2012;30S:F24-F33.
11. De Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res*. 2002;62:472-9.
12. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res*. 2003;63(3):636-41.
13. Woo Y, Sterling J, Damay I, Coleman N, Crawford R, van der Burg SH, et al. Characterising the local immune responses in cervical intraepithelial neoplasia: a cross-sectional and longitudinal analysis. *BJOG*. 2008;115:1616-22.
14. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16,18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis*. 2000;181:1911-9.
15. Carter JJ, Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Cushing-Haugen KL, Wipf GC, et al. Human papillomavirus 16 and 18 L1 serology compared across anogenital cancer sites. *Cancer Res*. 2001;61:1934-40.
16. Ochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, Kimmig R, Koldovsky U, Schneweis KE, et al. Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:1698-704.
17. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:550-60.
18. Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*. 2008;1:412-20.
19. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. 1991;185(1):251-7.
20. Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A Review of Clinical Trials of Human Papillomavirus Prophylactic Vaccines. *Vaccine*. 2012;30S:F123-F138.
21. Jagu S, Kwak K, Karanam B, Huh WK, Damotharan V, Chivukula SV, et al. Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. *PLoS One*. 2013;8(1):1-8.
22. Stanley M, Pinto LA, Trimble C. Human Papillomavirus Vaccines – Immune Responses. *Vaccine*. 2012;30S:F83-F87.
23. Cid-Arregui A. Therapeutic vaccines against human papillomavirus and cervical cancer. *Open Virol*. 2009;3:67-83.
24. Gissmann L, Nieto K. The Therapeutic Vaccine: Is it Feasible? *Arch Med Res*. 2009;40:493-8.
25. Ma B, Maraj B, Tran NP, Knoff J, Chen A, Alvarez RD, et al. Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012;17(4):469-92.
26. Kaufmann AM, Nieland JD, Jochmus I, Baur S, Friese K, Gabelsberger J, et al. Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). *Int J Cancer*. 2007;121:2794-800.
27. Gómez Lim MA. Transgenic plants in therapeutically valuable protein production. *Transgenic Plant J*. 2007;1:256-66.
28. Paz de la Rosa G, Monroy-García A, Mora-García MD, Reynaga-Peña CG, Hernandez-Montes J, Weiss-Steider B, et al. An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice. *Virol J*. 2009;6:2.
29. Monroy-García A, Gómez-Lim MA, Weiss-Steider B, Hernández-Montes J, Huerta-Yepez S, Rangel-Santiago JF, et al. Immunization with an HPV-16 L1 based chimeric virus-like particle containing HPV-16 E6 and E7 epitopes elicits long-lasting prophylactic and therapeutic efficacy in an HPV-16 tumor mice model. *Arch Virol*. 2014;59:291:305.