

УДК 616

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА, ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Обзор

© 2019 М.С. Вонский^{1,2}, А.Л. Рунов^{1,2,3},
И.В. Гордейчук^{3,4,5}, М.Г. Исагулянец^{3,4,6,7*}

¹ Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия;
электронная почта: m.vonsky@gmail.com

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Минздрава России, 197341 Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России,
123098 Москва, Россия; электронная почта: maria.issagouliantis@rsu.lv

⁴ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН, 108819 Москва, Россия

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России,
119991 Москва, Россия; электронная почта: lab.gord@gmail.com

⁶ Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden

⁷ Department of Pathology, Riga Stradins University, LV-1007, Riga, Latvia

Поступила в редакцию 03.04.2019

После доработки 15.04.2019

Принята к публикации 21.04.2019

Вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) – основной этиологический агент развития злокачественных заболеваний шейки матки, вульвы, пениса, анального канала, гортани, шеи и головы. Профилактическая вакцинация против ВПЧ, охватывающая в основном девочек и девушек до 25 лет, не предотвращает вертикальной и горизонтальной ВПЧ инфекции младенцев и детей и не имеет терапевтического эффекта. Вследствие этого, существенная доля населения не защищена от ВПЧ-инфицирования и развития ВПЧ-ассоциированных неопластических изменений и рака, что указывает на необходимость скорейшей разработки и внедрения терапевтических ВПЧ-вакцин. В отличие от профилактических вакцин, направленных на формирование вируснейтрализующих антител, терапевтические вакцины стимулируют клеточный иммунный ответ, направленный на уничтожение инфицированных и малигнизированных клеток, экспрессирующих вирусные белки. Идеальными мишенями для вакцинной иммунотерапии являются высококонсервативные онкобелки ВПЧ ВКР Е6 и Е7, экспрессирующиеся в предраковых и опухолевых тканях. В обзоре рассмотрена их экспрессия при различных формах ВПЧ инфекции, антигенные и иммуногенные свойства, приведены Т-клеточные эпитопы, ответ на которые коррелирует с естественной рецессией вызванных ВПЧ неопластических изменений. Далее подробно описаны формы представления онкобелков Е6 и Е7 иммунной системе в составе различных кандидатных вакцин с результатами наиболее перспективных доклинических испытаний с указанием использованных для этого животных моделей. Особое внимание уделено вакцинным кандидатам, показавшим эффективность в клинических испытаниях на пациентах с ВПЧ-ассоциированными неопластическими изменениями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирусы папилломы человека (ВПЧ), плоскоклеточный рак, неоплазии, онкобелки Е6 и Е7, терапевтическая вакцинация, генетические вакцины, иммунный ответ.

DOI: 10.1134/S0320972519070108

Принятые сокращения: ВПЧ – вирусы папилломы человека; ВПЧ ВКР – ВПЧ высокого канцерогенного риска; РШМ – рак шейки матки; ПРГШ – плоскоклеточный рак головы и шеи; LSIL – плоскоклеточные интраэпителиальные изменения легкой степени; HSIL – плоскоклеточные интраэпителиальные изменения тяжелой степени; ОРС – открытая рамка считывания; ОАА – антиген, ассоциированный с опухолями; АПК – антиген-презентирующие клетки; ДК – дендритные клетки; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; НЛА – лейкоцитарные антигены человека, группа антигенов гистосовместимости; МНС – главный комплекс гистосовместимости; TCR – Т-клеточный рецептор; TLR – толл-подобные рецепторы; LLO – токсин листериолизин О; MVA – вакцинный штамм Анкара вируса осповакцины; SVF – вирус Леса Семлики; SLP – длинные, в том числе перекрывающиеся, синтетические пептиды (synthetic long peptides); ИКТ – ингибиторы иммунных контрольных точек.

* Адресат для корреспонденции.

Профилактическая вакцинация против вирусов папилломы человека (ВПЧ) предотвращает до 90% ВПЧ инфекций и является мощным инструментом защиты от ВПЧ-ассоциированных неопластических изменений [1, 2]. ВПЧ-вакцинация была рекомендована ВОЗ для внедрения в обязательную программу вакцинаций 10 лет назад (в 2009 г.) и к настоящему времени включена в обязательную программу в 60 странах мира [3]. Ее применение уже снизило частоту выявления аногенитальных кондилом и предраковых изменений шейки матки в популяциях Австралии, Германии, Швеции и США, раньше других включившихся в обязательную программу вакцинации [1, 2].

Включение вакцинации против ВПЧ в программу субсидируемых государством вакцинаций требует значительных бюджетных средств. Одна доза вакцинного препарата стоит ~100 долларов США, вакцинация требует трех доз и дополнительных расходов на организацию процесса. В силу этого сложно ожидать существенного увеличения охвата ВПЧ-вакцинацией населения, в особенности в развивающихся странах. Кроме того, в большинстве стран, принявших обязательную программу ВПЧ-вакцинации, она распространяется только на девочек и девушек до 25 лет, мальчики и юноши охвачены вакцинацией только в 6 странах [2]. Предполагается, что они будут достаточно защищены за счет «коллективного иммунитета», однако это не общее мнение, многие придерживаются нейтрального подхода к вакцинации, предполагающей равное включение в программу мальчиков и юношей. Помимо передачи ВПЧ половым путем имеет место вертикальное и горизонтальное заражение младенцев и детей до достижения ими возраста вакцинации [4]. В силу этого, глобальное искоренение ВПЧ инфекции путем вакцинации, как в ближайшем, так и в достаточно отдаленном будущем, представляется мало реалистичным. Это означает, что существенная доля населения не защищена и в ближайшее время не сможет быть защищена от ВПЧ-инфицирования и развития ВПЧ-ассоциированных неопластических изменений и рака.

Наряду с этим, профилактические ВПЧ вакцины не имеют терапевтического эффекта, т.е. не предотвращают развития неоплазий у тех, кто был инфицирован ВПЧ до начала вакцинации [1]. Развитие рака может быть предотвращено при раннем выявлении, лечении и элиминации неопластически измененных тканей [5, 6]. Однако статистика по Российской Федерации показывает, что в 18,8% случаев раки выявляют только на III, а в 20,2% – на IV стадии, что приводит к высокому уровню летальности уже в

первый год с момента выявления заболевания [7]. Одним из потенциально эффективных методов лечения ВПЧ-ассоциированных онкологических заболеваний могла бы стать терапевтическая вакцинация [5, 8]. Первые успехи терапевтических противораковых вакцин были достигнуты именно при терапии предраковых состояний, вызванных инфекцией ВПЧ 16 и 18 типов [9, 10]. В отличие от профилактических вакцин, направленных на формирование нейтрализующих антител против вирусных частиц, терапевтические вакцины стимулируют клеточный иммунный ответ, направленный на уничтожение инфицированных и малигнизированных клеток, экспрессирующих вирусные белки. Клинические исследования Trimble et al. [9] показали, что иммунотерапия может быть полноценной частью комплексной профилактики и лечения рака, дополняя хирургическое вмешательство, лучевую терапию и химиотерапию [10]. Приведенные выше данные свидетельствуют о необходимости скорейшей разработки и внедрения терапевтических вакцин против ВПЧ и ВПЧ-ассоциированных неоплазий.

БЕЛКИ-МИШЕНИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВПЧ ВАКЦИН

Действие профилактических вакцин направлено на индукцию гуморального иммунного ответа, призванного нейтрализовать вирус до его проникновения в клетку. Все существующие на настоящий момент профилактические ВПЧ вакцины используют в качестве мишени мажорный белок капсида L1, вызывающий образование специфических вируснейтрализующих антител [11]. В отличие от профилактической, терапевтическая вакцина должна индуцировать клеточную цитотоксичность, способную найти и убить инфицированные вирусом клетки. Отсутствие L1 и L2 в большей части малигнизированных клеток (вследствие делеции открытых рамок считывания (ОРС), кодирующих ранние E1, E2, E4 и E5 и поздние L1 и L2 белки) делает эти антигены непригодными для использования в качестве мишеней терапевтической вакцины против ВПЧ-ассоциированных раков. Для таких вакцин нужны другие мишени.

Идеальной мишенью являются онкобелки E6 и E7 [12]. Их повышенная экспрессия является необходимым и достаточным условием импортизации и злокачественной трансформации клеток [13–17]. Интеграция ВПЧ, в ходе которой теряется ОРС E2, снимает ограничения на их экспрессию и способствует малигнизации [18]. В экспериментальных моделях мыши,

трансгенные по Е6 и/или Е7, демонстрируют гистопатологические признаки инфекции ВПЧ 16, включая образование доброкачественных и злокачественных папиллом, эпителиом и развитие эпидермоидных карцином I, II и III степени спонтанно и под действием канцерогенов [19, 20]. Помимо прямого карциногенного эффекта, экспрессия Е6 и Е7 индуцирует синтез и высвобождение специфических провоспалительных цитокинов и хемокинов, создавая провоспалительное микроокружение, способствующее росту опухоли и одновременно подавляющее противоопухолевый иммунный ответ [21]. Важно, что оба белка, и Е6, и Е7, высоко консервативны. Отсутствие сколько-нибудь значительной варибельности в структуре Е7, по сравнению с варибельностью у ВПЧ-инфицированных лиц без предраковых изменений, было продемонстрировано при анализе геномных последовательностей вирусов, выделенных как из предраковых тканей, так и при раке шейки матки (РШМ) [22].

Уникальные карциногенные свойства Е6 и Е7, их конститутивная экспрессия в части предраковых и опухолевых тканей и высокая консервативность делают эти белки идеальными мишенями для вакцинной иммунотерапии ВПЧ-ассоциированных предраковых состояний и рака. Консервативность открывает возможность сделать такую вакцину универсальной, по крайней мере в применении к вирусам, относящимся к одному типу ВПЧ ВКР.

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА Е6 И Е7

В отличие от других антигенов, ассоциированных с опухолями (ОАА), рассматриваемых в качестве вакцинных кандидатов противораковых вакцин, ни Е6, ни Е7 не являются аутоантигенами и не вызывают толерантности, т.е. могут вызвать иммунный ответ, не осложненный аутоиммунными реакциями. Прежде чем создавать иммунотерапевтическую ВПЧ вакцину, необходимо охарактеризовать «естественную» иммуногенность Е6 и Е7, т.е. наличие специфического иммунного ответа к этим онкобелкам у здоровых ВПЧ-неинфицированных и инфицированных лиц, пациентов с различными степенями ВПЧ-ассоциированных неоплазий, картировать участки белков, распознаваемые иммунной системой (эпитопы), и определить влияние иммунного ответа на эти эпитопы на течение хронической ВПЧ инфекции. При этом акцент должен быть сделан на индукцию Т-клеточного иммунного ответа против онкобелков ВПЧ высокого канцерогенного риска.

Антигены Е6 и Е7, прежде чем презентироваться молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и II на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК) и стимулировать ответ цитотоксических $CD8^+$ или хелперных $CD4^+$ Т-клеток соответственно, должны пройти процессинг, т.е. гидролизиться до пептидных фрагментов протеасомой ($CD8^+$) или лизосомой ($CD4^+$). Из этих фрагментов только часть сможет с высокой аффинностью связаться с молекулами МНС и провзаимодействовать с пептид-распознающими рецепторами специфических Т-клеток (TCR).

Опубликованная к настоящему времени информация по эпитопному картированию всех антигенов ВПЧ различных типов представлена на протеомном ресурсе <http://cvc.dfci.harvard.edu/hpv>. Сайт поддерживает базу данных по Т-клеточным эпитопам и является удобным источником информации о известных к настоящему моменту эпитопах и их рестрикции по лигандам лейкоцитарных антигенов гистосовместимости (HLA), а также платформой для предсказания новых иммунных мишеней [23]. Анализ данных показывает, что при персистирующей ВПЧ инфекции иммунный ответ сосредоточен на эпитопах белков Е6 и Е7. Действительно, исследование Т-клеточного ответа на пептиды из состава белков L1, Е6 и Е7 методом IFN- γ ELISPOT у женщин с инфекцией ВПЧ 52 на различных стадиях, включая 30 случаев инвазивного РШМ, показало наличие ответа против L1 у субъектов с транзитной ВПЧ инфекцией и ответа против Е6 и Е7 – преимущественно у лиц с неоплазиями шейки матки [24].

В тестах *in vitro* в составе белков Е6 и Е7 идентифицирован ряд пептидов, распознаваемых $CD8^+$ цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) здоровых ВПЧ-инфицированных и неинфицированных лиц и пациентов с ВПЧ-ассоциированными неоплазиями (ЦТЛ-эпитопов). Отмечается их широкий репертуар и универсальность («promiscuity»), т.е. низкая степень рестрикции распознавания по типам HLA [25–27]. Несмотря на это, данные эпитопы слабо распознаются иммунной системой пациентов с ВПЧ-ассоциированными неоплазиями и раком. Доля лиц, иммунная система которых распознавала описанные выше ЦТЛ-эпитопы среди лиц со всеми типами неопластических изменений, включая РШМ, была крайне низкой по сравнению с долей таковых при транзитной ВПЧ инфекции [24]. У лиц с хронической ВПЧ инфекцией и ВПЧ-ассоциированными неопластическими изменениями отмечался низкий уровень как цитолитического, так и Т-хелперного клеточного иммунитета, специфичного к

онкобелкам ВПЧ. Так, в частности, исследование иммунореактивности Т-клеток из общей популяции инфильтрирующих в опухоль лимфоцитов и дренирующих опухоль лимфатических узлов показало, что, хотя от 1 до 66% из них распознает эпитопы из состава онкобелков Е6 и Е7, только единичные клетки способны продуцировать IFN- γ при стимуляции Е6 и Е7 пептидами, что говорит об их нефункциональности [26]. Более того, клоны ЦТЛ, специфичные к эпитопам Е6, оказались не способны распознать Е6, экспрессируемый Е6(+) клетками карциномы шейки матки, даже когда уровень Е6 искусственно повышали путем транзитной трансфекции [28]. Такую неспособность связали с дефектами в представлении эпитопов клетками карциномы, обусловленными низким уровнем экспрессии поверхностных молекул HLA, субъединиц протеасомы LMP2 и LMP7 и транспортных белков TAP1 и TAP2 [28]. Этот феномен проявлялся вне зависимости от уровня экспрессии онкогенов и степени неопластических изменений [24]. Таким образом, трансформированные ВПЧ клетки уже на ранних этапах своей «жизни» не представляют иммунной системе вирусные антигены и не индуцируют/не поддерживают естественного противовирусного иммунного ответа. В то же время у пациентов со спонтанной рецессией ВПЧ-ассоциированных неоплазий было показано наличие ВПЧ-специфического ЦТЛ и Т-хелперного иммунного ответа [25, 27, 29]. В целом, полученные данные свидетельствуют об иммуногенности Е6 и Е7 и компрометации иммунного ответа на них у пациентов с персистирующей ВПЧ инфекцией, что еще раз подчеркивает целесообразность проведения терапевтической ВПЧ-вакцинации, направленной на индукцию и/или восстановление иммунного ответа против онкогенов ВПЧ ВКР.

Естественно, возникает вопрос о возможности создания терапевтической ВПЧ вакцины, которая обеспечила бы формирование «перекрестного» иммунного ответа, распознающего одновременно несколько типов ВПЧ ВКР. Исследование, проведенное на периферических CD4(+) Т-лимфоцитах здоровых лиц, вакцинированных и невакцинированных против ВПЧ 16, показало, что иммунная система ~50% респондентов распознает гомологичные пептиды из состава Е6 двух и более типов ВПЧ [30]. Возможно, это говорит о перекрестной иммунной реакции, но нельзя исключить и предысторию abortивных и транзитных инфекций различными типами ВПЧ. Более глубокое изучение ответа с помощью обогащенных и клональных культур Т-клеток (с белковым антигеном вместо

пептидов) выявило, что CD4⁺ Т-клетки, способные эффективно распознавать Е6 различных типов ВПЧ, встречаются редко, при этом «перекрестно» распознаются только высококонсервативные участки белка Е6 [30]. Аналогичные данные получены и другими исследователями [31]. Таким образом, Т-клеточный иммунный ответ, индуцированный терапевтической вакциной на основе ВПЧ 16, вряд ли сможет обеспечить эффективную перекрестную защиту против других ВПЧ ВКР, даже относящихся к той же филогенетической кладе. Для обеспечения терапевтического эффекта вакцинация должна проводиться иммуногенами, представляющими тип ВПЧ, вызвавший неопластические изменения.

МОДЕЛИ ДЛЯ ИСПЫТАНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВПЧ ВАКЦИН

Исследования иммунного ответа, как врожденного, так и специфического, в контексте создания вакцины, требуют применения суррогатных доклинических моделей с использованием лабораторных животных. Существует несколько моделей папилломавирусных инфекций на животных, доступных сообществу ВПЧ исследователей. Старые, хорошо охарактеризованные модели, включают вирусы папилломы собак, быков и кроликов, разработаны также новые модели на грызунах. Эти доклинические модели имеют свои сильные и слабые стороны, различаясь в способности адекватно (в переложении на ожидаемые результаты при применении в клинике) предсказать развитие злокачественных новообразований и возможности терапевтического, в том числе иммунотерапевтического, контроля папилломной инфекции [32]. Разработка иммунотерапевтической ВПЧ вакцины на основе иммуногенов из состава вирусов папилломы животных (коров, собак, кроликов, мышей), даже в виде их рекомбинантов с ВПЧ человека, с испытанием в соответствующих животных моделях может показать принципиальную возможность подхода, но не может обеспечить доклинического тестирования вакцинного кандидата перед его клиническими испытаниями. Для этого годятся только модели, позволяющие испытывать эффективность иммуногенов напрямую. Наиболее близко воспроизводят ВПЧ инфекцию человека модели трансгенных мышей и опухолевые модели, основанные на трансплантации мышам опухолей, экспрессирующих антигены ВПЧ ВКР. Последние были успешно использованы для тестирования различных иммунотерапевтических подходов лечения ВПЧ-ассоциированных, в том числе раковых, заболеваний [33]; разработки

стратегий улучшенной презентации антигенов [34]; определения роли $CD8^+$ Т-клеток в контроле роста опухолей [34, 35]; оценки эффективности иммунотерапии с использованием ингибиторов иммунного контроля клеточного цикла, препятствующих истощению Т-клеток [36, 37] и собственно разработки терапевтических вакцинных препаратов [38, 39].

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К КОНСТРУИРОВАНИЮ ВПЧ ВАКЦИН

К настоящему времени разработано много вариантов прототипов терапевтических противораковых вакцин на основе онкобелков ВПЧ ВКР, из которых наиболее успешные прошли клинические испытания. Это вакцины, использующие живые векторы, белки, синтетические пептиды, нуклеиновые кислоты и клеточные вакцины. Большинство из них в той или иной форме представляет онкобелки Е6 и Е7 и обеспечивает их доставку АПК для стимуляции презентации антигенов в составе МНС класса I и класса II с выработкой $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеточного иммунного ответа. Основная масса кандидатных вакцин оказалась направленной на формирование иммунного ответа против онкобелка Е7, лучше охарактеризованного в доклинических исследованиях, хотя ранее отмечалось, что со спонтанной элиминацией инфекции ВПЧ ВКР коррелирует иммунный ответ на Е6, а не на Е7 [40]. Основные характеристики подходов, используемых в настоящее время при создании терапевтических вакцин, и основные механизмы, задействованные для индукции специфического Т-клеточного иммунного ответа, представлены в таблице, которая описывает различные формы иммуногенов, представляющих онкобелки Е6 и/или Е7 ВПЧ ВКР (в основном ВПЧ 16): живые векторные вакцины, пептиды, белки, плазмидную ДНК, а также терапевтические вакцины, базирующиеся на аутологических клетках, их плюсы и минусы и примеры их клинического применения (таблица).

Генетические вакцины, как основанные на «голой» ДНК и РНК, так и на живых векторах, несущих эту ДНК или РНК, доставляют вакцинные антигены клеткам хозяина, включая антиген-презентирующие клетки, что обеспечивает им повышенную иммуногенность. При этом в отличие от «голых» ДНКовых и РНКовых вакцин, ряд живых вакцин на основе как бактериальных, так и части вирусных векторов, способен реплицироваться в клетках реципиента, возобновляя свой генетический материал и, соответственно, длительно поддерживая высокий

уровень синтеза вакцинных антигенов (иммуногенов). Эти формы привлекательны тем, что способны индуцировать иммунный ответ, сходный с ответом, вызываемым естественной инфекцией, сопровождающейся элиминацией патогена. В этом ключе особо интересны результаты II-й фазы клинических испытаний на пациентах с тяжелыми интраэпителиальными неоплазиями влагалища или матки вакцинного препарата на основе модифицированных вирусом осповакцины, экспрессирующих Е6 ВПЧ 16, или Е7 ВПЧ 16, или Е6 ВПЧ 18, или Е7 ВПЧ 18 [41], и ДНК-вакцины на основе Е6 и Е7 ВПЧ 16 и 18 (VGX-3100) [9, 10, 42]. Обе вызвали устойчивую регрессию поражений более чем у 40% респондентов, что служит подтверждением терапевтического потенциала генетических вакцин.

КАНДИДАТНЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БАКТЕРИЙ

К числу разнообразных «живых» векторных вакцин относят кандидатные вакцины, созданные на основе рекомбинантных бактерий, в частности, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* и *Listeria monocytogenes*. Безопасность и эффективность пероральной вакцинации живой бактериальной векторной терапевтической вакциной GLBL101c на основе рекомбинантного штамма *Lactobacillus casei*, экспрессирующего модифицированный белок Е7 ВПЧ 16, прошла проверку в клинических испытаниях на 17 пациентах с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями, ассоциированными с ВПЧ 16 [43]. У пациентов, получавших 4–6 доз вакцины в день, было выявлено значительное повышение Е7-специфического клеточного иммунного ответа в области шейки матки и влагалища. Через 9 недель у большинства пациентов этой группы (69%) было зафиксировано уменьшение выраженности патологии, у 56% пациенток в течение года регрессия достигла уровня изменений легкой степени (LSIL) [43]. У пациенток, получавших 1–2 дозы, эффект отсутствовал. Иммунизация показала, что индукция Е7-специфических $IFN\gamma$ -продуцирующих клеток зависит от дозы иммуногена с насыщением на уровне 0,3 мкг Е7 на 10^8 клеток. Для оптимизации вакцины необходимо было повысить уровень экспрессии Е7 в клетках *L. casei*. Этого удалось достигнуть в новой живой бактериальной векторной терапевтической вакцине IGMKK16E7. Иммунизация IGMKK16E7 приводила к 4× повышению индукции Е7-специфических $IFN\gamma$ -продуцирующих клеток слизистой оболочки по сравнению с GLBL101c [44], что в

Основные подходы, используемые при создании терапевтических вакцин, и основные механизмы, задействованные для индукции антиген-специфического Т-клеточного иммунного ответа

Тип вакцины	Преимущества	Недостатки	Примеры клинического применения**
1	2	3	4
Живые бактериальные вектора	<ul style="list-style-type: none"> – высокая иммуногенность. – большой выбор доступных векторов; – могут доставить АПК как экспрессированный белок, так и генноинженерную плазмиду. 	<ul style="list-style-type: none"> – потенциальная токсичность/опасность, особенно для иммуносуппресированных пациентов; – возможный предсуществующий иммунитет на вектор; – генерация нейтрализующих антител, ограничивающая эффективность повторного введения. 	<ul style="list-style-type: none"> – GLBL101c. Другие названия: BLS-ILB-E710c, CIN therapeutic vaccine, AnGes (AnGes/Bioleaders/GenoLac/Morishita Jintan/University of Tokyo, Япония); – Lovaxin C: аттенюированные <i>Listeria monocytogenes</i>, экспрессирующие E7 ВПЧ 16 (Advaxis, NJ, USA).
Вирусные вектора	<ul style="list-style-type: none"> – высокая иммуногенность; – большой выбор доступных векторов; – разные иммунологические особенности разных векторов и возможность их комбинаций при гетерологичной иммунизации; – возможность создания конструкций, задающих экспрессию факторов, стимулирующих и направляющих иммунный ответ (цитокины, молекулярные адьюванты). 	<ul style="list-style-type: none"> – потенциальная токсичность/опасность, особенно для иммуносуппресированных пациентов; – возможный предсуществующий иммунитет на вектор; – нейтрализующие антитела, ограничивающие эффективность повторного введения; – доминирование иммунного ответа на белки вирусного вектора над иммунным ответом на закодированные в векторе онкобелки ВПЧ. 	<ul style="list-style-type: none"> – MVA E2/E7 (Transgene, Франция); – MVA E2 (Lemery, Мексика).
РНК-репликоны*	<ul style="list-style-type: none"> – способность амплифицироваться в трансфецированных клетках, усиливая экспрессию онкобелков ВПЧ; – неинфекционный характер, без риска хромосомной интеграции и/или трансформации клеток; – большой выбор доступных векторов. 	<ul style="list-style-type: none"> – низкая стабильность, сложность в хранении и использовании; – стимуляция трансфецированных клеток к уходу в апоптоз, снижающая иммуногенность; – сложность в подготовке и производстве; – сложность масштабирования производства. 	<ul style="list-style-type: none"> – Vvax001, вирус Леса Семлики, экспрессирующий E6/E7 ВПЧ 16 (Vicinivax B.V, Голландия).
Синтетические пептиды	<ul style="list-style-type: none"> – стабильность, безопасность, простота производства; – возможность включить широкий набор эпитопов; – возможность модификации для улучшения связывания с МНС. 	<ul style="list-style-type: none"> – обязательное предшествующее картирование эпитопов в составе потенциального иммуногена; – низкая иммуногенность; – HLA рестрикция. 	<ul style="list-style-type: none"> – PepCan, пептиды из E6 ВПЧ 16; NCT02481414*** (University of Arkansas, США); – ISA101/ISA101b (HPV16-SLP), 13 SLP, перекрывающих E6 и E7 ВПЧ 16, NCT02128126*** (ISA Pharmaceuticals); – E7 пептиды ВПЧ 16 (Peninsula Labs Inc, Калифорния, США); – E6/E7 пептиды (University Medical Center, Лейден, Голландия).
Рекомбинантные белки	<ul style="list-style-type: none"> – стабильность, безопасность, простота производства; – нет ограничений по МНС класса I и II. 	<ul style="list-style-type: none"> – низкая иммуногенность; – преимущественная индукция гуморального, а не клеточного иммунного ответа; – сложности в выделении и очистке; – жесткое требование соблюдения условий хранения и транспортировки по холодной цепи. 	<ul style="list-style-type: none"> – ADXS11-001: E7 ВПЧ 16, слитый с LOO белком листерий (Advaxis, Inc, США); – Химера PD-E7 ВПЧ 16 (GSK Biologicals, Бельгия); – Химера E6/E7 ВПЧ 16 (Isotec AB, Швеция); – Химера E7 ВПЧ 16 и белка теплового шока (Nventa, Калифорния, США).

1	2	3	4
ДНК-вакцины	<ul style="list-style-type: none"> – стабильность, безопасность, простота производства, хранения и транспортировки; – продолжительность экспрессии закодированного белка, обеспечивающая индукцию более сильного иммунного ответа; – отсутствие иммунного ответа на вектор, обеспечивающее возможность повторных введений; – возможность конструирования ДНК иммуногенов с включением как целевых вакцинных, так и вспомогательных кодирующих последовательностей (адъювантов, цитокинов, факторов роста и т.д.); – стабильность, безопасность, простота производства, хранения и транспортировки; – продолжительность экспрессии закодированного белка, обеспечивающая индукцию более сильного иммунного ответа; – разнообразие способов доставки. 	<ul style="list-style-type: none"> – относительно невысокая иммуногенность; – отсутствие способности амплифицироваться и распространяться по окружающим клеткам, что ограничивает уровень экспрессии; – потенциальный риск интеграции в хромосому, хотя его частота не превышает частоту спонтанной интеграции ДНК <i>E. coli</i>; – потенциальный риск индукции аутоиммунного ответа, хотя показано, что риск минимален и зависит не от введения плазмиды, а от свойств закодированного белка. 	<ul style="list-style-type: none"> – ZYC101a: E6/E7 ВПЧ 16 и 18 (MGI Pharma, США); – VGX-3100: E6/E7 ВПЧ 16 и ВПЧ 18 (Inovio Pharmaceuticals, США); – pNGVL4a-CRT/E7 (Detox): ВПЧ 16 E7 (NCI RAID, США); – pNGVL4a-Sig/E7(Detox)/Hsp70: E7 ВПЧ 16 (NCI, США); – GX-188E: E6/E7 ВПЧ 16 и 18 (Genexine Inc., Корея); – VB10: ВПЧ 16 E6/E7 (Vaccibody AS, Норвегия).
Антиген-презентирующие, в частности, дендритные клетки	<ul style="list-style-type: none"> – высоко иммуногенны; – служат как природный адъювант; – много способов загрузки антигена. 	<ul style="list-style-type: none"> – невозможность применить более, чем к одному пациенту; – персонализированная работа с клетками, требующая много усилий; – высокая стоимость; – отсутствие контроля качества и его критериев. 	<ul style="list-style-type: none"> – аутологичные дендритные клетки, загруженные E7 ВПЧ 16 и 18 (гранты NIH R21 CA094507, Italian Institute of Health); – BVAC-C, В-клетки и моноциты пациентов, загруженные E6 и E7 ВПЧ 16 и 18 путем аденовирусной инфекции (Cellid Co., Ltd), NCT02866006***.
Аллогенные опухолевые клетки	<ul style="list-style-type: none"> – способны презентировать неопределенные опухолеассоциированные антигены. 	<ul style="list-style-type: none"> – соображения безопасности при введении пациенту опухолевых клеток, даже с учетом их предварительной инактивации; – требуются аутологичные опухолевые клетки или доступная культура клеток опухоли, соответствующей опухоли пациента; – неприменимость при предраковых состояниях, когда аутологичные опухолевые клетки еще отсутствуют; – трудоемкость; – слабая презентация антигена. 	<ul style="list-style-type: none"> – MVX-ONCO-1, NCT02999646*** (Swiss Group for Clinical Cancer Research, SAKK, Швейцария); – AlloVax(TM), NCT01998542 (Immunovative Therapies, Ltd, Израиль).

* Недостатки не касаются комбинированных ДНК-РНК репликонов.

** Большинство этих и/или аналогичных вакцин описано в настоящем обзоре.

*** Номера клинических исследований, ClinicalTrials.gov.

перспективе должно способствовать более выраженному терапевтическому эффекту.

Как бактериальный вектор, особый интерес представляют листерии. Они способны инфици-

цировать макрофаги и реплицироваться в цитоплазме клетки-хозяина, избегая лизиса в фагосомах благодаря синтезу токсина листериолизина O (LLO). Эти свойства позволяют клеткам

находиться как в цитоплазме, так и в эндосомальных компартментах, в результате чего бактерии могут доставить пептидные антигены цитотоксичным Т-клеткам в комплексе с молекулами МНС класса I и хелперным Т-клеткам в комплексе с молекулами МНС класса II [45]. Еще в доклинических исследованиях было показано, что компонент листерий LLO снижает популяцию регуляторных Т-клеток и способствует росту популяции CD4⁺ FoxP3⁻ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток у мышей с опухолями, усиливая, таким образом, терапевтическое и противоопухолевое действие вакцины против опухолей, вызванных опухолевыми клетками линии TC-1, экспрессирующими E6/E7 [46]. На основе бактерий штамма *Listeria monocytogenes* (*Lm*), дефектного по гену ключевого регулятора патогенеза *prfA*, была создана терапевтическая вакцина *Lm-LLo-E7* (также известная как ADXs11-001, ADXS-HPV и AXAL), представляющая собой листерии, секретирующие химерный антиген E7 ВПЧ 16, слитый с негемолитическим фрагментом LLO [47]. Безопасность вакцины была подтверждена на фазе I клинических испытаний на 15 пациентах с метастатическим, рефрактерным или рецидивирующим прогрессирующим плоскоклеточным раком шейки матки, для которых химиотерапия, лучевая терапия и/или хирургическое вмешательство не дали положительного результата. После вакцинации у трех пациентов было обнаружено повышение числа E7-специфических IFN γ ⁺ Т-клеток в составе мононуклеарных клеток периферической крови. У 4-х пациентов (30,8%) было зарегистрировано уменьшение общего объема опухоли, что подтверждает наличие терапевтического эффекта [47]. Более определенно эффективность *Lm-LLo-E7* можно будет оценить после завершения серии клинических испытаний вакцины при иммунотерапии ВПЧ-ассоциированного рака анального канала, плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ) [48].

КАНДИДАТНЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ И РНК-РЕПЛИКОНОВ

Вирусные векторы обладают способностью эффективно инфицировать клетки, заставляя их экспрессировать закодированные в вирусе антигены, что вызывает иммунный ответ, имитирующий ответ при abortивной/транзитной вирусной инфекции. Это делает их особо привлекательными для разработки терапевтических вакцин против ВПЧ. Для доставки антигенов E6 и E7 ВПЧ ВКР были предприняты попытки ис-

пользования нескольких вирусных векторов, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, альфа-вирусы и вирус осповакцины.

Высоко эффективными оказались вирусные вакцины на основе модифицированного вируса осповакцины (вакцинного штамма Анкара, MVA). В испытаниях фазы I/II рекомбинантные MVA, экспрессирующие E6 ВПЧ 16, или E7 ВПЧ 16, или E6 ВПЧ 18, или E7 ВПЧ 18 индуцировали ВПЧ-специфический ответ ЦТЛ у 28% пациентов с прогрессирующим РШМ в стадии I/II [49]. В клинических испытаниях фазы II применение данной вакцины обеспечило >40% регрессию поражений у 80% пациентов в возрасте 42–54 года с тяжелыми интраэпителиальными неоплазиями влагалища или матки [41]. Другой рекомбинантный вектор MVA – TG4001, созданный с использованием последовательностей E6/E7 ВПЧ 16 и интерлейкина 2 (IL-2), через 6 месяцев вызвал клинический ответ у 10 из 21 пациентов. Через 12 месяцев была отмечена регрессия плоскоклеточных интраэпителиальных изменений тяжелой степени (HSIL) у 7 из 10 пациентов и отсутствие рецидивов неопластических изменений и реинфекции ВПЧ 16 у 7 из 8 пациентов [50].

В состав MVA были встроены и другие вакцинные кандидаты, не только E6 и E7. В недавних клинических испытаниях фазы III с участием 1356 пациентов мужского и женского пола была испытана вакцина MVA E2 на основе E2 ВПЧ 16. Вакцина продемонстрировала >90% эффективность в лечении ВПЧ-индуцированных аногенитальных интраэпителиальных поражений [51]. У всех пациентов мужского пола наблюдалось развитие ВПЧ-специфического цитотоксического Т-клеточного ответа и была достигнута полная эрадикация поражений. E2 является ингибитором экспрессии E6 и E7 [18]: добавление E2 как компонента генетической, в данном случае рекомбинантной вирусной вакцины, может подавить активность E6 и E7 в инфицированных клетках, снижая их онкогенный потенциал и выживаемость.

Был разработан также ряд кандидатных терапевтических ВПЧ вакцин на основе аденовирусных векторов, в которых они использовались как носители генетического материала и экспонировали иммуногены на поверхности вирусного капсида. Такие вакцины широко использовались в клинических испытаниях для индукции иммунного ответа против ВИЧ-1, вируса гепатита С человека, вируса Эболы, малярии [52], но в отношении ВПЧ исследовались только в доклинических экспериментах [6]. В качестве примера их перспективности можно привести тот факт, что вакцинация дефектным по репли-

кации аденовирусом, кодирующим белок CRT, слитый с E7 (CRT/E7), приводила к успешной эрадикации сформировавшихся у мышей опухолей, экспрессирующих E7 [53].

В течение многих лет велась разработка терапевтических ВПЧ вакцин на основе репликонов РНК-содержащих вирусов, в том числе вируса Синдбис (Sindbis), вируса Венесуэльского энцефалита лошадей (Venezuelan Equine Encephalitis) и вируса Леса Семлики (SFV). Способность к самостоятельной репликации данных векторов обеспечивает стабильную экспрессию антигена и высокую иммуногенность. Поскольку из состава репликона удалены структурные гены вируса, формирования вирусных частиц и индукции нейтрализующих антител не происходит, что позволяет проводить повторную вакцинацию. К преимуществам РНК-репликонов также относится снижение риска хромосомной интеграции и клеточной трансформации.

Одними из первых были сконструированы вакцины на основе рекомбинантных вирусных векторов SFV, кодирующие белки E6 и E7 под контролем энхансера трансляции (SFV-enhE6,7). У мышей однократное введение низкой дозы SFV-enhE6,7 приводило к существенному уменьшению опухолей размером 1500 мм³ и полному исчезновению опухолей объемом до 500 мм³ [54]. Наиболее эффективным оказалось внутривенное введение SFV-enhE6,7 татуированием. Хотя уровень синтеза антигенов был на порядок ниже, чем при введении вакцины внутримышечно, иммунизированными мышами был выработан мощный цитотоксический ответ против E6 и E7 [55].

Генная инженерия расширила область применения альфа-вирусных векторов с их доставкой и экспрессией с плазмидной ДНК. Иммунизации, проведенные с использованием таких ДНК-альфа-вирусных векторов, продемонстрировали регрессию опухоли и защиту от заражения опухолевыми клетками в ряде доклинических моделей [56]. Присутствие генов, ответственных за эффективную репликацию РНК, обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгена по сравнению с обычной экспрессией под контролем плазмидной ДНК [56]. Первые варианты комбинированных ДНК-вакцин/РНК-репликонов называли также «суицидальной ДНК», поскольку РНК-репликон включал механизмы апоптоза. Терапевтическая ВПЧ-вакцина, реализованная на этой базе, была успешно испытана в доклинических моделях, показавших индукцию у мышей CD8⁺ Т-клеточного ответа на антигены ВПЧ и противоопухолевый эффект [57]. Однако иммуногенность кандидатной вакцины сочли недостаточной из-за масси-

рованного апоптоза трансфицированных клеток. Для улучшения иммуногенности в суицидальный вектор были включены гены, кодирующие антиапоптотический белок, что повысило выживаемость трансфицированных АПК и улучшило антиген-специфический CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ, а также усилило противоопухолевой эффект по сравнению с использованием вектора «суицидальной ДНК», содержащего только антиген E7 [58].

Комбинированные ДНК-вакцины/РНК-репликоны получили дальнейшее развитие и в настоящий момент демонстрируют высокую эффективность в защите от летальных исходов, связанных с вирусной инфекцией и имплантацией раковых клеток [56], в частности, в доклинических испытаниях терапии индуцированного ВПЧ 16 РШМ на модели мышей [59]. Для этого были созданы ДНК/РНК-репликоны, кодирующие белки E6 и E7 (DREP-6,7), а также их вариант, кодирующий «перетасованную» (reshuffled) версию E7 (DREP-E7sh), и оценен их противоопухолевый эффект. Целью «перетасовки» было сведение к минимуму канцерогенного эффекта, закодированного в вакцинном препарате E7, потенциально сохраняющегося после делеции в белке мотива, участвующего в связывании pRb и направлении его на деградацию протеасомой. Интересно, что DREP-E7sh задерживал рост опухоли, но в меньшей степени, что «неперетасованный» вариант DREP-E6,7. Включение в рекомбинантный вакцинный вектор вспомогательной кассеты, содержащей набор эпитопов Т-хелперных клеток, сигнального пептида и мотива KDEL для импорта и удержания кодируемых белков в эндоплазматическом ретикулуме (DREP-sHelpE6,7; DREP-sHelpE7sh), не приводило к усилению противоопухолевого эффекта, хотя и ускоряло его проявление [59]. Косвенно этот результат свидетельствовал об отсутствии прямой необходимости экстенсивной модификации закодированного в генетической вакцине вирусного белка, помимо удаления или модификации участков белка, имеющих прямой патологический эффект.

В качестве альтернативы альфа-вирусным векторам предлагалось использовать векторный репликон флавивируса Кунжин (Kunjin, KUN). KUN, в отличие от альфавирусных репликонов, не вызывает апоптоза в трансфицированных клетках, обеспечивая прямую презентацию антигена трансфицированными дендритными клетками (ДК) [60]. Закодированный ДНК репликон KUN, несущий последовательность антигена E7 ВПЧ, показал в доклинических моделях индукцию E7-специфичного Т-клеточного ответа и выраженный противоопухолевый эффект [61].

В целом, однако, несмотря на многообещающие результаты, демонстрируемые такими вакцинами в доклинических исследованиях, и проведение клинических испытаний их эффективности в лечении других форм рака [62], репликационные вакцины против ВПЧ и ВПЧ-ассоциированных заболеваний не вышли на стадию клинических испытаний, за исключением описанного выше рекомбинантного вируса Леса Семлики, экспрессирующего Е6/Е7 ВПЧ 16 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03141463>) (Vvax001, ViciniVax B.V, Голландия; таблица). Отчасти, применимость этого типа вакцин ограничивает предсуществующий иммунитет к бактериальным/вирусным антигенам вектора. Кроме того, эффективность вакцин на основе вирусных векторов снижается за счет формирования при вакцинации противовирусного иммунного ответа. Он проявляется в выработке нейтрализующих антител, ограничивающих эффективность повторных введений вакцинного препарата (за исключением РНК-репликационных). Еще одна проблема, связанная с применением живых векторных вакцин, обусловлена патогенным потенциалом вирусных и бактериальных векторов, представляющим определенный риск для безопасности пациентов с ослабленным иммунитетом. Неразрешенность этих проблем стимулировала параллельное развитие других форм терапевтических вакцин.

КАНДИДАТНЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Пептиды, представляющие антигены ВПЧ, не нуждаются (или практически не нуждаются) в процессинге и презентуются молекулами МНС классов I и II непосредственно при поступлении в антиген-презентирующие клетки, что обеспечивает эффективную стимуляцию CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточного иммунного ответа. Пептидные вакцины выгодно отличает хорошая стабильность, безопасность и простота производства (таблица).

Одной из первых была испытана вакцина PerCap, состоящая из 4-х синтетических пептидов, представляющих последовательности эпитопов Е6 ВПЧ 16, усиленных адъювантом Candin [63]. Вакцина PerCap прошла I фазу клинических испытаний на 6 пациентах со ступенчатым повышением дозы от 50 до 500 мкг пептида. Наилучший клинический эффект в плане регрессии неоплазий показала доза 50 мкг, терапевтическая вакцинация этой дозой пептида была проведена дополнительно 10 пациентам. Регрессия неоплазий была достигнута у 50%

вакцинированных, у 3-х перестали детектировать ВПЧ 16, у 9-ти отметили снижение вирусной нагрузки [63]. В настоящий момент вакцина находится на II фазе клинических испытаний (таблица).

Проверку на HLA-A*02+ типированных больных с ВПЧ-ассоциированным неизлечимым раком шеи и головы, ануса и шейки матки проходили также вакцины Nespecta, состоящая из пептидов, представляющих а.о. 71–95 и 127–158 белка Е6 ВПЧ 16 с адъювантом Amplivant – синтетическим лигандом Толл-подобного рецептора 2 (TLR 2) (NCT02821494), DPX-E7, представляющим собой синтетический пептид, соответствующий а.о. 11–19 белка Е7 ВПЧ 16, в сочетании с циклофосфамидом (NCT02865135), и ряд других [64] (таблица). Результаты этих испытаний пока не опубликованы.

Перспективность терапевтических ВПЧ вакцин определяется их иммуногенностью и способностью презентировать эпитопы ВПЧ иммунной системе как можно более широкого спектра пациентов. И то, и другое труднодостижимо при использовании коротких синтетических пептидов. Для усиления иммуногенности таких вакцин к пептидам ковалентно присоединяли липиды и адъюванты – хемокины, цитокины и лиганды TLR [65]. Такие модификации усиливали способность прототипных вакцин активировать врожденный и адаптивный иммунитет, в частности, CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ [12], и позволяли преодолеть ограничение в части низкой иммуногенности, но не ограниченную МНС специфичность. Для обеспечения эффективности пептидных вакцин для каждого человека должны быть идентифицированы специфические, распознаваемые его типом иммунной системы, эпитопы антигенов ВПЧ [66]. Подбор таких эпитопов и «персонализация» вакцины усложняет и удлиняет разработку вакцинного препарата, снижая вероятность своевременного применения персонализированной вакцины больному, у которого уже обнаружены ВПЧ-ассоциированные неоплазии или злокачественные образования. Как следствие, вакцины, базирующиеся на коротких пептидах и их наборах, сочли малоэффективными для широкомасштабной терапии [64, 67].

Как альтернатива, было предложено использовать пептидные вакцины на основе длинных, в том числе перекрывающихся, синтетических пептидов (synthetic long peptides, SLP). Такие иммуногены показали свою эффективность в индукции антиген-специфического Т-клеточного ответа в нескольких доклинических моделях [65, 66] и прошли проверку в серии клини-

ческих испытаний. Одной из первых была испытана пептидная вакцина на основе SLP из состава онкобелков E6 и E7 ВПЧ 16 (HPV16-SLP) [68]. В состав вакцины вошли 9 пептидов из состава E6 и 4 из состава E7 длиной 25–35 а.о., представляющие как ЦТЛ, так и Т-хелперные эпитопы с перекрытием в 10–14 а.о., в сочетании с адьювантом Montanide ISA-51 [68]. Двойные слепые плацебо-контролируемые исследования II-й фазы показали способность вакцины HPV16-SLP индуцировать долговременную иммунологическую память у пациентов с низким уровнем интраэпителиального поражения цервикального канала (LSIL), сохраняющуюся, по крайней мере, в течение года и, в ряде случаев, приводящую к регрессии неоплазий [69]. Клинический ответ был показан у 79% вакцинированных, 45% продемонстрировали полную регрессию неопластических изменений в течение 12 месяцев после завершения вакцинации, однако вирусоидальная активность такой иммунизации – способность элиминировать вирус или хотя бы снизить его нагрузку – показана не была. Вакцина прошла также испытания I/II фазы для лечения рецидивирующего РШМ (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02128126>). Окончательные результаты пока не опубликованы, по предварительным данным, иммунный ответ против SLP коррелировал с увеличением продолжительности жизни пациентов с поздними стадиями РШМ, особенно на фоне химиотерапии [70]. В другом клиническом исследовании II фазы кандидатного вакцинного препарата SLP типа ISA 101 у 56% из 16 протестированных пациентов была показана вызванная вакциной ВПЧ-специфическая пролиферация Т-клеток. Способность выработать сильный иммунный ответ на SLP также коррелировала с продолжительностью жизни пациентов с РШМ после проведения вакцинации. Сочетание вакцинации SLP ISA 101 с ингибиторами иммунных контрольных точек (ИКТ), в частности, с антителами против белка программируемой клеточной смерти (PD-1; лекарственный препарат ниволумаб) показало туморицидную противоплапилломавирусную активность даже у больных с неизлечимыми формами ВПЧ-ассоциированного рака (NCT02426892; [71]), в то время как лечение этими антителами без вакцинации давало терапевтический эффект лишь у незначительного числа пациентов. Клинический ответ наблюдали у 33% пациентов, выживаемость составила 17,5 месяцев, превысив выживаемость пациентов, получавших только ниволумаб [71]. В настоящий момент ISA 101 проходит фазу II клинических испытаний против ВПЧ-ассоциированного ПРГШ, запланированы испытания

фазы III (ISA Pharmaceuticals; <https://adisinsight.springer.com/drugs/800027982>). В целом, терапевтические пептидные вакцины показали свою эффективность в отношении ВПЧ-ассоциированных неоплазий, однако их эффективность в отношении ВПЧ-ассоциированного рака пока остается недостаточно высокой.

КАНДИДАТНЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Белковые вакцины, как и пептидные, безопасны и просты в производстве. Преимущество белковых вакцин состоит в том, что они содержат в своем составе эпитопы, рестрицированные ко всем (или практически всем) известным HLA типам, что позволяет обойти ограничения по HLA типам, присущие пептидным вакцинам [65, 66]. Слабым местом белковых вакцин является экзогенная природа иммуногена – белок процессируется преимущественно по пути лизосомного процессинга и презентации в составе молекул МНС класса II, что индуцирует гуморальный иммунный ответ при ограниченной индукции ответа цитотоксических Т-лимфоцитов [66].

Одно из решений этой проблемы – введение в состав вакцинного препарата адьювантов и иммуностимулирующих молекул. Примером использования такого подхода является субъединичная вакцина TA-CIN, состоящая из белков L2, E6 и E7 ВПЧ 16, прошедшая клинические испытания I и II фазы [72, 73]. Потенциальные вакцины TA-CIN в лечении пациентов с интраэпителиальной неоплазией влагилица 2 или 3 степени (VIN 2 и 3) усилили местным введением иммуномодулятора имиквимода, эффект был протестирован в отдельном исследовании II-й фазы [74]. Пациенты получали три вакцинации по 128 мкг путем инъекции в дельтовидную мышцу с интервалом в месяц и местным нанесением крема, содержащего 5% имиквимода. В отсутствии побочных эффектов было отмечено значительное повышение содержания инфильтрирующих CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток; у 63% пациентов через 52 недели после начала лечения была зафиксированная полная регрессия поражений, при этом регрессия коррелировала со способностью вакцины индуцировать иммунный ответ [74, 75].

Другим вариантом решения стало слияние белков с адьювантами, индуцирующими сильный ЦТЛ ответ и защиту от имплантации клеток опухоли, как, например, TVGV-1 (TheVax Genetics Vaccine Co.), находящаяся на фазе II клинических испытаний на пациентах с HSIL

(NCT02576561) [6]. По такому же пути пошли и при создании белковой терапевтической вакцины против ВПЧ 16 и 18 на основе рекомбинантных белков Е6 и Е7, слитых с каталитически неактивным токсином *Bordetella pertussis* СуаА (GTL001, [76]). Клиническое испытание фазы I (EudraCT № 2010-018629-21) исследовало переносимость и иммуногенность GTL001 у женщин ($n = 47$), инфицированных ВПЧ 16 или ВПЧ 18 без неопластических изменений [76]. Достоверное снижение вирусной нагрузки было отмечено в группе, получавшей 600 мкг белкового препарата GTL001 с имиквимодом. Эта группа продемонстрировала ранний устойчивый клиренс ВПЧ 16 и ВПЧ 18. Интересно, что имиквимод увеличивал силу антиген-специфического Т-клеточного ответа, но не частоту иммунных реакций. Препарат показал себя безопасным и иммуногенным и был рекомендован для дальнейших клинических испытаний [76].

Для повышения иммуногенности белковых вакцин с усилением презентации по пути МНС класса I и индукцией CD8⁺ Т-клеточного ответа иммуногены часто модифицируют путем слияния с сигналами протеасомного процессинга [6]. Экстравагантен альтернативный подход, превращающий белковый иммуноген из экзогенного в эндогенный. Granadillo et al. разработали гибридную белковую вакцину, состоящую из белка Е7 ВПЧ 16 и пептида, полученного из антилипидсахаридного фактора LALF31–52 *Limulus polyphemus* [77]. LALF31–52 – небольшой гидрофобный пептид, обладающий иммуномодулирующими свойствами и обеспечивающий транспорт несущего его белка (cargo) через клеточные мембраны. Слияние LALF31–52 с Е7 (LALF-E7) повысило иммуногенность Е7, улучшив его презентацию. Вакцинированные LALF-E7 химерой мыши были защищены от роста опухолей при имплантации им сингенных опухолевых клеток ТС-1, экспрессирующих Е7 [77]. В терапевтическом эксперименте у мышей с опухолями ТС-1 детектировали Е7-специфический клеточный иммунный ответ и регрессию опухолей. Защита от опухоли и регрессия опухоли были значительно выше по сравнению с контрольными мышами, вакцинированными только Е7 или только LALF. Эти результаты подтвердили потенцирующий эффект проникающего в клетки пептида и показали потенциальную перспективность такого подхода для усиления клеточной иммуногенности белковых вакцин. Эффективным оказалось также сочетание вакцинации белком с другими вакцинными формами (гетерологичная вакцинация). В этом ключе интересны результаты клинического испытания II фазы гетерологичной вакцинации с использова-

нием ТА-CIN и рекомбинантного вируса коревой оспы, экспрессирующего белки ВПЧ 16 (ТА-HPV) на пациентах с аногенитальными и цервикальными интраэпителиальными неоплазиями. Были испытаны стратегии праймирования ТА-CIN + бустирования ТА-HPV и праймирования ТА-HPV + бустирования ТА-CIN. Однако ни одна из этих схем не давала преимуществ по сравнению с иммунизацией рекомбинантным вирусом ТА-HPV [75]. В целом, полученные данные свидетельствуют об относительно невысокой эффективности отдельно взятых белков как формы терапевтической ВПЧ вакцины.

КАНДИДАТНЫЕ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК (ДНК-ВАКЦИНЫ)

ДНК-вакцины безопасны, стабильны, относительно просты и недороги в производстве и обладают способностью поддерживать экспрессию антигенов в клетках в течение достаточно длительного времени, что делает ДНК вакцинацию привлекательным и потенциально эффективным подходом для иммунотерапии ВПЧ инфекции. ДНК-вакцинация заключается в инъекции плазмидной ДНК, кодирующей онкобелки Е6 и Е7 ВПЧ, приводящей к *in vivo* трансфекции клеток реципиента, после чего они сами синтезируют вакцинный антиген, вызывая специфический иммунный ответ. Применение ДНК-вакцин не приводит к формированию нейтрализующих антител к инъекцируемому ДНК-вакцины от живых векторных вакцин и позволяет проводить повторную вакцинацию [12]. Специалисты отмечают способность нынешнего второго поколения ДНК-вакцин вызывать сильный клеточный и гуморальный иммунный ответ [78]. Помимо этого, использование платформы плазмидной ДНК упрощает проведение манипуляций с закодированным материалом, включая вырезание нежелательных потенциально опасных доменов, замену пептидных фрагментов и отдельных а.о., перемещение доменов с целью избавления от их биологической активности при сохранении интактного аминокислотного состава, а также перенаправление на альтернативные пути внутриклеточного процессинга, секрецию, введение сигналов, обеспечивающих связывание и проникновение в отдельные виды клеток, в частности, в дендритные клетки. В применении к Е6 и Е7 ВПЧ ВКР это предполагает модификацию онкобелков Е6 и Е7: (i) исключаящую возможность индукции генетической нестабильности, иммортализации и

трансформации экспрессирующих клеток; (ii) повышающую их иммуногенность. Недостатком ДНК-вакцин является их неспособность амплифицироваться и распространяться из трансфецированных клеток в окружающие, как это происходит в случае живых векторных вакцин. Для преодоления этого недостатка и повышения потенциальности ДНК-вакцин разработано несколько стратегий, направленных на: (i) повышение числа экспрессирующих целевой антиген дендритных клеток; (ii) усиление процессинга антигена и его презентации ДК; (iii) оптимизация взаимодействия между ДК и Т-клетками [5].

В качестве примеров модификаций приведем включение в состав ДНК-вакцин шаперонов, в частности, белка теплового шока 70 (БТШ70/HSP70). ДНК-вакцина представляла собой плазмиду, кодирующую мутантную форму E7 ВПЧ 16 в связке с белком теплового шока БТШ70 и сигнальным пептидом (pNGVL4a-sig/E7(detox)/HSP70) [79]. В клиническом исследовании этой ДНК-химеры группе из 12 пациентов вводили pNGVL4a-sig/E7(detox)/HSP70 внутримышечно дважды с перерывом в месяц и затем бустировали внутримышечной инъекцией TA-HPV (вектора осповакцины, кодирующего белок E7 ВПЧ 16 и ВПЧ 18) [80]. У 7 из 12 вакцинированных пациентов (58%) развился Т-клеточный иммунный ответ, в основном против E7 ВПЧ 16. Кроме того, несмотря на отсутствие антиген-специфического CD8⁺ Т-клеточного ответа в периферической крови, было показано значительное увеличение антиген-специфических CD8⁺ Т-клеточных инфильтратов в области ВПЧ-ассоциированных поражений. Это исследование одним из первых продемонстрировало индукцию ДНК-вакцинацией местного иммунного ответа в очаге поражения [80]. Проведенное впоследствии клиническое испытание оценило безопасность, эффективность и иммуногенность pNGVL4a-CRT-E7(detox) у пациентов с CIN2/3, ассоциированным с ВПЧ 16 (n = 32) [81]. ДНК-вакцину вводили трижды с интервалом в месяц эпидермально, или внутримышечно, или внутримышечно в шейку матки. Гистологическая регрессия к уровню CIN 1 или менее произошла у 8 из 27 (30%) пациентов, которые получили все три дозы. Наибольшее число интраэпителиальных инфильтратов CD8⁺ Т-клеток и наиболее сильный системный CD8⁺ Т-клеточный ответ отметили в когорте с внутримышечным введением вакцины в шейку матки, что указывало на важность выработки локального иммунного ответа. Выработке такого ответа способствовало слияние вакцинного антигена с убиквитином, а также, как и в случае пептидных вакцин, вакцинация на фоне терапии

ИКТ [82]. Результаты этих испытаний можно рассматривать как демонстрацию потенциальной клинической эффективности ДНК-вакцин в отношении ВПЧ-ассоциированных неоплазий [81].

В описанной серии исследований, как и в целом ряде других работ, ДНК иммунизацию проводили внутримышечно. При таком способе введения ДНК-вакцина в основном трансфецирует миоциты, которые, хоть и экспрессируют целевой антиген, не могут активировать полноценный иммунный ответ, так как не относятся к классу АПК. Ключевую роль в презентации антигена наивным CD8⁺ цитотоксическим Т-клеткам играют дендритные клетки. Во-первых, ДК могут при фагоцитозе захватывать экзогенный антиген, высвобожденный трансфецированным миоцитом, процессировать его и представлять через пути кросс-презентации на молекуле МНС класс I. Кроме того, ДК могут быть прямо трансфецированы при вакцинации и представлять эндогенно экспрессированный целевой антиген через прямую презентацию CD8⁺ Т-клеткам [83]. В связи с этим были предложены различные подходы к внутрикожной ДНК-иммунизации, при которой плазмидную ДНК вводят в ткани, обогащенные АПК, в частности, дендритными клетками. В качестве примеров можно привести успешную иммунизацию плазмидами, кодирующими онкобелки ВПЧ в составе наночастиц при введении их внутрикожными микроиглами [84] или татуированием [85].

В одном из наиболее успешных на сегодняшний день клинических испытаний ДНК-вакцинацию проводили смесью плазмид, экспрессирующих консенсусные онкобелки E6 и E7 ВПЧ 16 и ВПЧ 18 (VGX-3100), вводимых внутримышечной инъекцией с последующей электропорацией на пациентах с интраэпителиальными изменениями CIN2/3 (ClinicalTrials.gov, номер NCT01304524 и EudraCT, номер 2012-001334-33) [9]. Всего в испытаниях приняли участие 167 пациентов, получавших либо VGX-3100 (n = 125), либо плацебо (n = 42). Из 107 реципиентов VGX-3100 53 (49,5%) достигли гистопатологической регрессии, аналогичная цифра в плацебо группе составила 30,6% (11/36, p = 0,034) [9]. VGX-3100 стала первой терапевтической вакциной, продемонстрировавшей эффективность против плоскоклеточных интраэпителиальных изменений тяжелой степени, связанных с ВПЧ 16 и 18. Скептики утверждали, что при большей группе пациентов исследователям не удалось бы выявить разницу с плацебо группой в силу достаточно высокой частоты спонтанной регрессии неоплазий. Действительно, спонтанно регрессировать может 32–43% интраэпителиальных поражений тяжелой степени [86]. Однако дальней-

шие гистологические исследования этой группы вакцинированных подтвердили описанный клинический эффект [87]. В силу этого, терапевтическую ДНК вакцинацию VGX-3100 уже сегодня можно рассматривать как нехирургический вариант терапии ВПЧ-ассоциированных неопластических изменений, что принципиально изменяет перспективы лечения этого распространенного заболевания.

ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ДЕНДРИТНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Еще одной перспективной стратегией для создания терапевтических вакцин против рака является использование аутологичных дендритных клеток. Эта технология включает *ex vivo* введение вакцинных антигенов в ДК путем инфицирования или трансфекции ДНК или РНК, кодирующими антиген ВПЧ или же путем «загрузки» ДК антигенами в форме белков, пептидов или лизатов опухолевых клеток с последующим возвращением ДК пациентам [88]. «Загруженные» ДК работают также, как естественные адьюванты, увеличивая эффективность антиген-специфической иммунотерапии против рака [89]. Для повышения эффективности вакцины можно дополнительно, с помощью коротких интерферирующих РНК (siRNA), подавить в ДК экспрессию трансформирующего фактора роста бета и IL-10, способствующих росту опухолей и иммуносупрессии. В доклинической модели раковых клеток ТС-1, экспрессирующей Е6/Е7 ВПЧ 16, применение данного подхода дает заметное усиление противоопухолевого эффекта [90].

На сегодняшний день описана одна подобная вакцина, представляющая аутологичные ДК, загруженные Е7 ВПЧ 16 и 18 [91]. Пациентки с РШМ ($n = 10$) после радикальной резекции опухолей получали возрастающие дозы аутологичных ДК, пульсированных рекомбинантным онкобелком Е7 ВПЧ 16 и ВПЧ 18 в виде 5 инъекций с интервалом 3 недели. Все участники показали специфический $CD4^+$ и антительный иммунный ответ против Е7, у 80% пациентов был также индуцирован $CD8^+$ Т-клеточный иммунный ответ, однако ни тот, ни другой не зависели от дозы вакцины. Клинический эффект вакцины описан не был. По мнению авторов, результаты свидетельствовали о необходимости клинических испытаний II фазы [91], однако исследования не были продолжены.

Интересно, что вакцинный антиген может быть представлен не только ДК, но и другими АПК. В кандидатной вакцине ВVАС-С антиген

представляли В-клетки и моноциты пациентов, загруженные Е6 и Е7 ВПЧ 16 и 18 путем аденовирусной инфекции [92]. В настоящий момент ВVАС-С испытывается на безопасность, переносимость и клинический эффект в отношении прогрессирующего рефракторного РШМ с высокой степенью метастазирования (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02866006>). Результаты этих клинических испытаний ожидаются после августа 2020 года.

АПК/ДК-вакцины имеют свои ограничения. Так, использование аутологичных ДК для персонализированной терапии представляет определенные технические сложности, из-за которых эта технология плохо масштабируется и не может быть широко внедрена. Различия в методиках культивирования, используемых при приготовлении ДК, могут привести к изменениям качества вакцины при отсутствии стандартных критериев ее оценки. Кроме того, для развития эффективного иммунного Т-клеточного ответа ДК должны быть введены в лимфоидные органы. Оптимальные пути введения таких вакцин, обеспечивающие их максимальную эффективность, пока не определены, что отражается на объемах клинических испытаний этих препаратов, в том числе в отношении ВПЧ-ассоциированных неоплазий и рака.

Использование аутологичных опухолевых клеток в качестве вакцин основано на том, что эти клетки содержат все белки, характерные для их опухоли, антигены, что экономит время и усилия, затрачиваемые на идентификацию и получение опухоль-ассоциированных антигенов. Однако такой подход не исключает возможность развития аутоиммунного ответа. Как правило, для вакцинации используют предварительно облученные опухолевые клетки. Для усиления иммуногенности клетки часто генетически модифицируют, «заставляя» экспрессировать ко-стимуляторные молекулы, лиганды TLR, цитокины. Так, введение мышам с ВПЧ 16-индуцированными опухолями вакцины на основе ВПЧ-трансформированных опухолевых клеток, экспрессирующих IL-2, IL-12 и/или колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF), способствовало дифференцировке наивных Т-клеток в специфические эффекторные и хелперные Т-клетки и стимулировало созревание гранулоцитов [93, 94].

Вакцины на основе опухолевых клеток прошли клинические испытания при терапии меланомы, рака поджелудочной железы, почечно-клеточного рака и колоректального рака, однако число аналогичных клинических испытаний в применении к ВПЧ-ассоциированными опухолями весьма ограничено. Имеются данные

о клинических испытаниях I/II фазы двух персонализированных вакцин против ПРГШ на основе аллогенных опухолевых клеток AlloVax(TM) и MVX-ONCO-1 [64].

Вакцина AlloVax™ базируется на обогащенных шаперонами лизатах опухолей (Chaperone Rich Cell Lysate vaccine/(CRCL)) пациентов с неизлечимым ПРГШ с добавлением адьюванта AlloSim™. Предварительное обогащение клеток шаперонами происходит по тому же принципу, что и в дендритных вакцинах. Клиническое исследование фазы I было закончено в 2016 году, результаты опубликованы не были, и фаза II, запланированная на 2016 год, инициирована не была (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02624999>).

Вакцина MVX-ONCO-1 содержит убитые радиацией клетки опухоли пациентов с ПРГШ. Опухолевые клетки обогащают иммуномодулятором GM-CSF и вводят в составе имплантируемых подкожно наночастиц, обеспечивающих непрерывную подачу. В настоящий момент MVX-ONCO-1 проходит фазу II клинических испытаний против плоскоклеточного рака ПРГШ (с возможной ассоциацией с ВПЧ) на пациентах, не отвечающих на другие виды терапии. Результаты данных испытаний пока не опубликованы (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02999646>).

Скудность клинических примеров и отсутствие видимых успехов говорит об ограниченной применимости этого подхода для терапии ВПЧ-ассоциированных неоплазий и рака. Основное преимущество данного типа вакцин, состоящее в нетребовательности к информации об ОАА, утрачивается, поскольку при ВПЧ-ассоциированных неоплазиях и раке онкобелки хорошо известны. По сравнению с другими вариантами вакцин, вакцины на основе опухолевых клеток дороги в приготовлении и требуют больших трудозатрат. Кроме того, вакцинация с использованием опухолевых клеток потенциально могут вызвать новые формы рака у предрасположенных к этому пациентов, что не позволяет проводить клинические испытания с привлечением пациентов с легкими ВПЧ-ассоциированными дисплазиями или предраковыми поражениями эпителия, т.е. проводить иммунотерапию предраковых состояний. В совокупности, это снижает вероятность того, что опухолевые клетки послужат основой иммунотерапевтических вакцин против ВПЧ.

Основными мишенями для вакциноотерапии ВПЧ инфекции являются онкобелки ВПЧ ВКР Е6 и Е7, конститутивно экспрессирующиеся в предраковых и опухолевых тканях. Их высокая консервативность открывает возможность к

созданию универсальной вакцины, по крайней мере в отношении вирусов, относящимся к одному типу ВПЧ ВКР. Создание вакцины, направленной против нескольких типов ВПЧ одновременно, по всей видимости, невозможно, так как перекрестно распознается только узкий спектр Т-клеточных эпитопов.

Онкобелки Е6 и Е7 могут быть представлены иммунной системе в составе различных вакцинных форм. И Е6, и Е7 – факторы, способствующие иммортизации и трансформации инфицированных ВПЧ клеток, также ответственные за их уход от иммунного ответа. Прямое использование этих онкобелков в качестве компонентов ВПЧ вакцины невозможно, требуется существенная модификация, ограничивающая их онкогенный потенциал и повышающая иммуногенность. Подобные модификации удобно реализовать на платформе генетических вакцин, таких как плазмидная ДНК, комбинация ДНК с РНК-репликационными, живые вирусные или бактериальные вектора.

Важным для вакциноотерапии достижением в области иммунотерапии рака является появление иммунных ингибиторов контрольных точек (таких, как Keytruda®, пембролизумаб). Эти препараты рекомендованы для комбинированной вакцинации/иммунотерапии ВПЧ-ассоциированных неоплазий и рака [95]. Учитывая их эффективность, терапевтические ВПЧ вакцины будущего, скорее всего, будут комбинированными и включают сочетанную иммунизацию различными формами генетических вакцин с одновременной терапией ингибиторами иммунных контрольных точек.

Пока же, при всем разнообразии испытанных иммунотерапевтических вакцин, ни одной из них, включая комбинации с иммуномодуляторами, не удалось обеспечить полной необратимой регрессии неопластических опухолей. Для создания вакцины с таким действием нужны дальнейшие масштабные сравнительные исследования с длительным отслеживанием вирусологического, цитологического и иммунного статуса вакцинированных.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17_54_30002 и 17_04_00583).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо оригинальных исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arbyn, M., Xu L., Simoons, C., and Martin-Hirsch, P.P.L. (2018) Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **5**, CD009069, doi: 10.1002/14651858.CD009069.pub3.
- Прилепская В.Н., Зардиашвили М.Д., Хлебкова Ю.С., Некрасова М.Е. (2016) Вакцинация против ВПЧ-ассоциированных заболеваний и рака шейки матки теоретические и практические аспекты, *Мед. совет.*, **12**, 120–125, doi: 10.21518/2079-701X-2016-12-120-125.
- Cutts, F.T., Franceschi, S., Goldie, S., Castellsague, X., de Sanjose, S., Garnett, G., Edmunds, W.J., Claeys, P., Goldenthal, K.L., Harper, D.M., and Markowitz, L. (2007) Human papillomavirus and HPV vaccines: a review, *Bull. World Health Organ.*, **85**, 719–726, doi: 10.2471/BLT.06.038414.
- Вонский М.С., Шабаетова М.Г., Рунов А.Л., Лебедева Н.Н., Палефский Д., Исагулянц М.Г. (2019) Канцерогенез, ассоциированный с инфекцией вирусами папилломы человека, его механизмы и возможности иммунотерапии, *Биохимия*, **84**, 995–1015.
- Yang, A., Farmer, E., Wu, T.C., and Hung, C.F. (2016) Perspectives for therapeutic HPV vaccine development, *J. Biomed. Sci.*, **23**, 75, doi: 10.1186/s12929-016-0293-9.
- Chabeda, A., Yanez, R.J., Lamprecht, R., Meyers, A.E., Rybicki, E.P., and Hitzeroth, I.I. (2017) Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases, *Papillomavirus Res.*, **5**, 46–58, doi: 10.1016/j.pvr.2017.12.006.
- Петрова Г.В., Грецова О.П., Шахзадова А.О., Простов М.Ю., Простов Ю.И., Самсонов Ю.В. (2018) В кн. *Злокачественные образования в России в 2017 г. Заболеваемость и смертность* (под ред. Каприна А. Д., Старинского В. В., Петровой Г.В.), «МНИОИ им. П.А. Герцена», Москва, с. 4–130.
- Аляутдина О.С., Дармостукова М.А. (2018) Современные аспекты вакцинации против вируса папилломы человека, *Безопасность и риск фармакотерапии*, **6**, 111–117, doi: 10.30895/2312-7821-2018-6-3-111-117.
- Trimble, C.L., Morrow, M.P., Краунык, К.А., Shen, X., Dallas, M., Yan, J., Edwards, L., Parker, R.L., Denny, L., Giffear, M., Brown, A.S., Marozzi-Pierce, K., Shah, D., Slager, A.M., Sylvester, A.J., Khan, A., Broderick, K.E., Juba, R.J., Herring, T.A., Boyer, J., Lee, J., Sardesai, N.Y., Weiner, D.B., and Bagarazzi, M.L. (2015) Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial, *Lancet*, **386**, 2078–2088, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00239-1.
- Wong, K.K., Li, W.A., Mooney, D.J., and Dranoff, G. (2016) Advances in therapeutic cancer vaccines, *Adv. Immunol.*, **130**, 191–249, doi: 10.1016/bs.ai.2015.12.001.
- Kash, N., Lee, M.A., Kollipara, R., Downing, C., Guidry, J., and Tyring, S.K. (2015) Safety and efficacy data on vaccines and immunization to human papillomavirus, *J. Clin. Med.*, **4**, 614–633, doi: 10.3390/jcm4040614.
- Ma, B., Maraj, B., Tran, N.P., Knoff, J., Chen, A., Alvarez, R.D., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2012) Emerging human papillomavirus vaccines, *Expert Opin. Emerg. Drugs*, **17**, 469–492, doi: 10.1517/14728214.2012.744393.
- Wise-Draper, T.M., and Wells, S.I. (2008) Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets, *Front. Biosci.*, **13**, 1003–1017.
- Vande Pol, S.B., and Klingelhutz, A.J. (2013) Papillomavirus E6 oncoproteins, *Virology*, **445**, 115–137, doi: 10.1016/j.virol.2013.04.026.
- Miller, J., Dakic, A., Chen, R., Palechor-Ceron, N., Dai, Y., Kallakury, B., Schlegel, R., and Liu, X. (2013) HPV16 E7 protein and hTERT proteins defective for telomere maintenance cooperate to immortalize human keratinocytes, *PLoS Pathog.*, **9**, e1003284, doi: 10.1371/journal.ppat.1003284.
- Edmonds, C., and Vousden, K.H. (1989) A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein, *J. Virol.*, **63**, 2650–2656.
- Zine El Abidine, A., Tomaic, V., Bel Haj Rhouma, R., Massimi, P., Guizani, I., Boubaker, S., Ennaifer, E., and Banks, L. (2017) A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site, *Virology*, **500**, 218–225, doi: 10.1016/j.virol.2016.10.023.
- Doorbar, J. (2016) Model systems of human papillomavirus-associated disease, *J. Pathol.*, **238**, 166–179, doi: 10.1002/path.4656.
- Song, S., Pitot, H.C., and Lambert, P.F. (1999) The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals, *J. Virol.*, **73**, 5887–5893.
- De Azambuja, K., Barman, P., Toyama, J., David, E.D., Lawson, G.W., Williams, L.K., Chua, K., Lee, D., Kehoe, J.J., Brodkorb, A., Schwiebert, R., Kitchen, S., Bhimani, A., and Wiley, D.J. (2014) Validation of an HPV16-mediated carcinogenesis mouse model, *In Vivo*, **28**, 761–767.
- Iuliano, M., Mangino, G., Chiantore, M.V., Zangrillo, M.S., Accardi, R., Tommasino, M., Fiorucci, G., and Romeo, G. (2018) Human Papillomavirus E6 and E7 oncoproteins affect the cell microenvironment by classical secretion and extracellular vesicles delivery of inflammatory mediators, *Cytokine*, **106**, 182–189, doi: 10.1016/j.cyto.2017.11.003.
- Mirabello, L., Yeager, M., Yu, K., Clifford, G.M., Xiao, Y., Zhu, B., Cullen, M., Boland, J.F., Wentzensen, N., Nelson, C.W., Raine-Bennett, T., Chen, Z., Bass, S., Song, L., Yang, Q., Steinberg, M., Burdett, L., Dean, M., Roberson, D., Mitchell, J., Lorey, T., Franceschi, S., Castle, P.E., Walker, J., Zuna, R., Kreimer, A.R., Beachler, D.C., Hildesheim, A., Gonzalez, P., Porras, C., Burk, R.D., and Schiffman, M. (2017) HPV16 E7 genetic conservation is critical to carcinogenesis, *Cell*, **170**, 1164–1174, doi: 10.1016/j.cell.2017.08.001.
- Zhang, G.L., Riemer, A.B., Keskin, D.B., Chitkushev, L., Reinherz, E.L., and Brusic, V. (2014) HPVdb: a data mining system for knowledge discovery in human papillomavirus with applications in T cell immunology and vaccinology, *Database (Oxford)*, **2014**, bau031, doi: 10.1093/database/bau031.
- Chan, P.K., Liu, S.J., Cheung, J.L., Cheung, T.H., Yeo, W., Chong, P., and Man, S. (2011) T-cell response to human papillomavirus type 52 L1, E6, and E7 peptides in women with transient infection, cervical intraepithelial neoplasia, and invasive cancer, *J. Med. Virol.*, **83**, 1023–1030, doi: 10.1002/jmv.21889.
- Nakagawa, M., Kim, K.H., Gillam, T.M., and Moscicki, A.B. (2006) HLA class I binding promiscuity of the CD8 T-cell epitopes of human papillomavirus type 16 E6 protein, *J. Virol.*, **81**, 1412–1423, doi: 10.1128/JVI.01768-06.
- De Vos van Steenwijk, P.J., Heusinkveld, M., Ramwadhoebe, T.H., Lowik, M.J., van der Hulst, J.M., Goedemans, R., Piersma, S.J., Kenter, G.G., and van der Burg, S.H. (2010) An unexpectedly large polyclonal repertoire of HPV-specific T cells is poised for action in patients with cervical cancer, *Cancer Res.*, **70**, 2707–2717, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4299.
- Grabowska, A.K., Kaufmann, A.M., and Riemer, A.B. (2015) Identification of promiscuous HPV16-derived

- T helper cell epitopes for therapeutic HPV vaccine design, *Int. J. Cancer*, **136**, 212–224, doi: 10.1002/ijc.28968.
28. Evans, M., Borysiewicz, L.K., Evans, A.S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V., and Man, S. (2001) Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6, *J. Immunol.*, **167**, 5420–5428, doi: 10.4049/jimmunol.167.9.5420.
 29. Peng, S., Trimble, C., Wu, L., Pardoll, D., Roden, R., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2007) HLA-DQB1*02-restricted HPV-16 E7 peptide-specific CD4⁺ T-cell immune responses correlate with regression of HPV-16-associated high-grade squamous intraepithelial lesions, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 2479–2487, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2916.
 30. Van den Henden, M., Redeker, A., Kwappenberg, K.M., Franken, K.L., Drijfhout, J.W., Oostendorp, J., Valentijn, A.R., Fathors, L.M., Welters, M.J., Melief, C.J., Kenter, G.G., van der Burg, S.H., and Offringa, R. (2010) Evaluation of immunological cross-reactivity between clade A9 high-risk human papillomavirus types on the basis of E6-Specific CD4⁺ memory T cell responses, *J. Infect. Dis.*, **202**, 1200–1211, doi: 10.1086/656367.
 31. Kim, K.H., Dishongh, R., Santin, A.D., Cannon, M.J., Bellone, S., and Nakagawa, M. (2006) Recognition of a cervical cancer derived tumor cell line by a human papillomavirus type 16 E6 52-61-specific CD8 T cell clone, *Cancer Immunol.*, **6**, 9.
 32. Christensen, N.D., Budgeon, L.R., Cladel, N.M., and Hu, J. (2016) Recent advances in preclinical model systems for papillomaviruses, *Virus Res.*, **231**, 108–118, doi: 10.1016/j.virusres.2016.12.004.
 33. Lin, K.Y., Guarneri, F.G., Staveley-O'Carroll, K.F., Levitsky, H.I., August, J.T., Pardoll, D.M., and Wu, T.C. (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen, *Cancer Res.*, **56**, 21–26.
 34. Cheng, W.F., Hung, C.F., Lin, K.Y., Ling, M., Juang, J., He, L., Lin, C.T., and Wu, T.C. (2003) CD8⁺ T cells, NK cells and IFN- γ are important for control of tumor with downregulated MHC class I expression by DNA vaccination, *Gene Ther.*, **10**, 1311–1320, doi: 10.1038/sj.gt.3301982.
 35. Beyranvand, N.E., van der Sluis, T.C., van Duikeren, S., Yagita, H., Janssen, G.M., van Veelen, P.A., Melief, C.J., van der Burg, S.H., and Arens, R. (2016) Tumor eradication by cisplatin is sustained by CD80/86-mediated costimulation of CD8⁺ T cells, *Cancer Res.*, **76**, 6017–6029, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0881.
 36. Liu, Z., Zhou, H., Wang, W., Fu, Y.X., and Zhu, M. (2016) A novel dendritic cell targeting HPV16 E7 synthetic vaccine in combination with PD-L1 blockade elicits therapeutic antitumor immunity in mice, *Oncoimmunology*, **5**, e1147641, doi: 10.1080/2162402X.2016.1147641.
 37. Mkrtychyan, M., Chong, N., Abu, E.R., Wallecha, A., Singh, R., Rothman, J., and Khleif, S.N. (2013) Anti-PD-1 antibody significantly increases therapeutic efficacy of *Listeria monocytogenes* (Lm)-LLO immunotherapy, *J. Immunother. Cancer*, **1**, 15, doi: 10.1186/2051-1426-1-15.
 38. Song, L., Yang, M.C., Knoff, J., Wu, T.C., and Hung, C.F. (2014) Cancer immunotherapy employing an innovative strategy to enhance CD4⁺ T cell help in the tumor microenvironment, *PLoS One*, **9**, e115711, doi: 10.1371/journal.pone.0115711.
 39. Peng, S., Qiu, J., Yang, A., Yang, B., Jeang, J., Wang, J.W., Chang, Y.N., Brayton, C., Roden, R.B., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2016) Optimization of heterologous DNA-prime, protein boost regimens and site of vaccination to enhance therapeutic immunity against human papillomavirus-associated disease, *Cell Biosci.*, **6**, 16, doi: 10.1186/s13578-016-0080-z.
 40. Nakagawa, M., Stites, D.P., Patel, S., Farhat S., Scott, M., Hills, N.K., Palefsky, J.M., and Moscicki, A.B. (2000) Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens, *J. Infect. Dis.*, **182**, 595–598, doi: 10.1086/315706.
 41. Baldwin P.J., van der Burg, S.H., Boswell, C.M., Offringa, R., Hickling, J.K., Dobson, J., Roberts, J.S., Latimer, J.A., Moseley, R.P., Coleman, N., Stanley, M.A., and Sterling, J.C. (2003) Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulval and vaginal intraepithelial neoplasia, *Clin. Cancer Res.*, **9**, 5205–5213.
 42. Cordeiro, M.N., De Lima, R.C.P., Paolini, F., Melo, A.R.D.S., Campos, A.P.F., Venuti, A., and De Freitas, A.C. (2018) Current research into novel therapeutic vaccines against cervical cancer, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **18**, 365–376, doi: 10.1080/14737140.2018.1445527.
 43. Kawana, K., Adachi, K., Kojima, S., Taguchi, A., Tomio, K., Yamashita, A., Nishida, H., Nagasaka, K., Arimoto, T., Yokoyama, T., Wada-Hiraike, O., Oda, K., Sewaki, T., Osuga, Y., and Fujii, T. (2014) Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients, *Vaccine*, **32**, 6233–6239, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.020.
 44. Komatsu A., Igimi S., and Kawana K. (2018) Optimization of human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal E7-specific IFN γ -producing cells, *Vaccine*, **36**, 3423–3426, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.009.
 45. Peters, C., and Paterson, Y. (2003) Enhancing the immunogenicity of bioengineered *Listeria monocytogenes* by passaging through live animal hosts, *Vaccine*, **21**, 1187–1194, doi: 10.1016/S0264-410X(02)00554-6.
 46. Chen, Z., Ozbun, L., Chong, N., Wallecha, A., Berzofsky, J.A., and Khleif, S.N. (2014) Episomal expression of truncated listeriolysin O in LmddA-LLO-E7 vaccine enhances antitumor efficacy by preferentially inducing expansions of CD4⁺FoxP3⁻ and CD8⁺ T cells, *Cancer Immunol. Res.*, **2**, 911–922, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0197.
 47. Maciag, P.C., Radulovic, S., and Rothman, J. (2009) The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix, *Vaccine*, **27**, 3975–3983, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.041.
 48. Miles, B.A., Monk, B.J., and Safran, H.P. (2017) Mechanistic insights into ADXS11-001 human papillomavirus-associated cancer immunotherapy, *Gynecol. Oncol. Res. Pract.*, **4**, 9, doi: 10.1186/s40661-017-0046-9.
 49. Kaufmann, A.M., Stern, P.L., Rankin, E.M., Sommer, H., Nuessler, V., Schneider, A., Adams, M., Onon, T.S., Bauknecht, T., Wagner, U., Kroon, K., Hickling, J., Boswell, C.M., Stacey, S.N., Kitchener, H.C., Gillard, J., Wanders, J., Roberts, J.S., and Zwierzina, H. (2002) Safety and immunogenicity of TA-HPV, a recombinant vaccinia virus expressing modified human papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 genes, in women with progressive cervical cancer, *Clin. Cancer Res.*, **8**, 3676–3685.
 50. Brun, J.L., Dalstein, V., Leveque, J., Mathevet, P., Raulic, P., Baldauf, J.J., Scholl, S., Huynh, B., Douvier, S., Riethmuller, D., Clavel, C., Birembaut, P., Calenda, V., Baudin, M., and Bory, J.P. (2011) Regression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with TG4001 targeted immunotherapy, *Am. J. Obst. Gynecol.*, **204**, e1–e8, doi: 10.1016/j.ajog.2010.09.020.

51. Rosales, R., Lopez-Contreras, M., Rosales, C., Magallanes-Molina, J.R., Gonzalez-Vergara, R., Arroyo-Cazarez, J.M., Ricardez-Arenas, A., Del Follo-Valencia, A., Padilla-Arriaga, S., Guerrero, M.V., Pirez, M.A., Arellano-Fiore, C., and Villarreal, F. (2014) Regression of human papillomavirus intraepithelial lesions is induced by MVA E2 therapeutic vaccine, *Hum. Gene Ther.*, **25**, 1035–1049, doi: 10.1089/hum.2014.024.
52. Vujadinovic, M., and Vellinga, J. (2018) Progress in adenoviral capsid-display vaccines, *Biomedicines*, **6**, 81, doi: 10.3390/biomedicines6030081.
53. Gomez-Gutierrez, J.G., Elpek, K.G., Montes de Oca-Luna, R., Shirwan, H., Sam Zhou, H., and McMasters, K.M. (2007) Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice, *Cancer Immunol. Immunother.*, **56**, 997–1007, doi: 10.1007/s00262-006-0247-2.
54. Daemen, T., Riezebos-Brilman, A., Regts, J., Dontje, B., van der Zee, A., and Wilschut, J. (2004) Superior therapeutic efficacy of alphavirus-mediated immunization against human papilloma virus type 16 antigens in a murine tumour model: effects of the route of immunization, *Antivir. Ther.*, **9**, 733–742.
55. Van de Wall, S., Walczak, M., van Rooij, N., Hoogeboom, B.N., Meijerhof, T., Nijman, H.W., and Daemen, T. (2015) Tattoo delivery of a Semliki Forest virus-based vaccine encoding human papillomavirus E6 and E7, *Vaccines (Basel)*, **3**, 221–238, doi: 10.3390/vaccines3020221.
56. Lundstrom, K. (2019) Plasmid DNA-based alphavirus vaccines, *Vaccines*, **7**, 29, doi: 10.3390/vaccines7010029.
57. Hsu, K.F., Hung, C.F., Cheng, W.F., He, L., Slater, L.A., Ling, M., and Wu, T.C. (2001) Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by linking Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 to an antigen, *Gene Ther.*, **8**, 376–383, doi: 10.1038/sj.gt.3301408.
58. Kim, T.W., Hung, C.F., Juang, J., He, L., Hardwick, J.M., and Wu, T.C. (2004) Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by delaying suicidal DNA-induced cell death, *Gene Ther.*, **11**, 336–342, doi: 10.1038/sj.gt.3302164.
59. Van de Wall, S., Ljungberg, K., Ip, P.P., Boerma, A., Knudsen, M.L., Nijman, H.W., Liljestrum, P., and Daemen, T. (2018) Potent therapeutic efficacy of an alphavirus replicon DNA vaccine expressing human papilloma virus E6 and E7 antigens, *Oncimmunology*, **7**, e1487913, doi: 10.1080/2162402X.2018.1487913.
60. Varnavski, A.N., Young, P.R., and Khromykh, A.A. (2000) Stable high-level expression of heterologous genes *in vitro* and *in vivo* by noncytopathic DNA-based Kunjin virus replicon vectors, *J. Virol.*, **74**, 4394–4403, doi: 10.1128/JVI.74.9.4394-4403.2000.
61. Herd, K.A., Harvey, T., Khromykh, A.A., and Tindle, R.W. (2004) Recombinant Kunjin virus replicon vaccines induce protective T-cell immunity against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour, *Virology*, **319**, 237–248, doi: 10.1016/j.virol.2003.10.032.
62. Sebastian, M., Papachristofilou, A., Weiss, C., Früh, M., Cathomas, R., Hilbe, W., Wehler, T., Rippin, G., Koch, S.D., Scheel, B., Fotin-Mlecsek, M., Heidenreich, R., Kallen, K.J., Gnad-Vogt, U., and Zippelius, A. (2014) Phase Ib study evaluating a self-adjuvanted mRNA cancer vaccine (RNAActive®) combined with local radiation as consolidation and maintenance treatment for patients with stage IV non-small cell lung cancer, *BMC Cancer*, **14**, 748, doi: 10.1186/1471-2407-14-748.
63. Coleman, H.N., Greenfield, W.W., Stratton, S.L., Vaughn, R., Kieber, A., Moerman-Herzog, A.M., Spencer, H.J., Hitt, W.C., Quick, C.M., Hutchins, L.F., Mackintosh, S.G., Edmondson, R.D., Erickson, S.W., and Nakagawa, M. (2016) Human papillomavirus type 16 viral load is decreased following a therapeutic vaccination, *Cancer Immunol. Immunother.*, **65**, 563–573, doi: 10.1007/s00262-016-1821-x.
64. Wang, C., Dickie, O., Sutavani, K.M., Pointer, C., Thomas, G.J., and Savelyeva, N. (2018) Targeting head and neck cancer by vaccination, *Front. Immunol.*, **9**, 830, doi: 10.3389/fimmu.2018.00830.
65. Lin, K., Doolan, K., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2010) Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines, *J. Formos. Med. Assoc.*, **109**, 4–24, doi: 10.1016/S0929-6646(10)60017-4.
66. Su, J.H., Wu, A., Scotney, E., Ma, B., Monie, A., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2010) Immunotherapy for cervical cancer: Research status and clinical potential, *BioDrugs*, **24**, 109–129, doi: 10.2165/11532810-000000000-00000.
67. Hung, C.F., Ma, B., Monie, A., Tsen, S.W., and Wu, T.C. (2008) Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **8**, 421–439, doi: 10.1517/14712598.8.4.421.
68. Zwaveling, S., Ferreira Mota, S.C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G.B., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J. (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides, *J. Immunol.*, **169**, 350–358, doi: 10.4049/jimmunol.169.1.350.
69. De Vos van Steenwijk, P.J., van Poelgeest, M.I., Ramwadhoebe, T.H., Lowik, M.J., Berends-van der Meer, D.M., van der Minne, C.E., Loof, N.M., Stynenbosch, L.F., Fathers, L.M., Valentijn, A.R., Oostendorp, J., Osse, E.M., Fleuren, G.J., Nooij, L., Kagie, M.J., Hellebrekers, B.W., Melief, C.J., Welters, M.J., van der Burg, S.H., and Kenter, G.G. (2014) The long-term immune response after HPV16 peptide vaccination in women with low-grade pre-malignant disorders of the uterine cervix: a placebo-controlled phase II study, *Cancer Immunol. Immunother.*, **63**, 147–160, doi: 10.1007/s00262-013-1499-2.
70. Melief, C.J., Gerritsen, W.R., Welters, M., Vergote, I., Kroep, J.R., Kenter, G., Ottevanger, P.B., Tjalma, W.A., Denys, H., Nijman, H., van Poelgeest, M.I.E., Reyners, A.K.L., Velu, T.J., Blumenstein, B.A., Goffin, F., Lalisang, R.I., Stead, R.B., and van der Burg, S. (2017) Correlation between strength of T-cell response against HPV16 and survival after vaccination with HPV16 long peptides in combination with chemotherapy for late-stage cervical cancer, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 140, doi: 10.1200/JCO.2017.35.7 suppl.140.
71. Massarelli, E., William, W., Johnson, F., Kies, M., Ferrarotto, R., Guo, M., Feng, L., Lee, J.J., Tran, H., Kim, Y.U., Haymaker, C., Bernatchez, C., Curran, M., Zecchini Barrese, T., Rodriguez Canales, J., Wistuba, I., Li, L., Wang, J., van der Burg, S.H., Melief, C.J., and Glisson, B. (2019) Combining immune checkpoint blockade and tumor-specific vaccine for patients with incurable human papillomavirus 16-related cancer: a phase 2 clinical trial, *JAMA Oncol.*, **5**, 67–73, doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4051.
72. Van der Burg, S.H., Kwappenberg, K.M., O'Neill, T., Brandt, R.M., Melief, C.J., Hickling, J.K., and Offringa, R. (2001) Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens, *Vaccine*, **19**, 3652–3660.
73. de Jong, A., O'Neill, T., Khan, A.Y., Kwappenberg, K.M., Chisholm, S.E., Whittle, N.R., Dobson, J.A., Jack, L.C., St Clair Roberts, J.A., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Hickling, J.K. (2002) Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immuni-

- ty in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 fusion protein vaccine, *Vaccine*, **20**, 3456–3464.
74. Daayana, S., Elkord, E., Winters, U., Pawlita, M., Roden, R., Stern, P.L., and Kitchener, H.C. (2010) Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia, *Br. J. Cancer*, **102**, 1129–1136, doi: 10.1038/sj.bjc.6605611.
 75. Hibbitts, S. (2010) TA-CIN, a vaccine incorporating a recombinant HPV fusion protein (HPV16 L2E6E7) for the potential treatment of HPV16-associated genital diseases, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **12**, 598–606.
 76. Van Damme, P., Bouillette-Marussig, M., Hens, A., De Coster, I., Depuydt, C., Goubier, A., Van Tendeloo, V., Cools, N., Goossens, H., Hercend, T., Timmerman, B., and Bissery, M.C. (2016) GTL001, a therapeutic vaccine for women infected with human papillomavirus 16 or 18 and normal cervical cytology: results of a phase I clinical trial, *Clin. Cancer Res.*, **22**, 3238–3248, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0085.
 77. Granadillo, M., Vallespi, M.G., Batte, A., Mendoza, O., Soria, Y., Lugo, V.M., and Torrens, I. (2011) A novel fusion protein-based vaccine comprising a cell penetrating and immunostimulatory peptide linked to human papillomavirus (HPV) type 16 E7 antigen generates potent immunologic and anti-tumor responses in mice, *Vaccine*, **29**, 920–930, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.11.083.
 78. Ferraro, B., Morrow, M.P., Hutnick, N.A., Shin, T.H., Lucke, C.E., and Weiner, D.B. (2011) Clinical applications of DNA vaccines: current progress, *Clin. Infect. Dis.*, **53**, 296–302, doi: 10.1093/cid/cir334.
 79. Maldonado, L., Teague, J.E., Morrow, M.P., Jotova, I., Wu, T.C., Wang, C., Desmarais, C., Boyer, J.D., Tycko, B., Robins, H.S., Clark, R.A., and Trimble, C.L. (2014) Intramuscular therapeutic vaccination targeting HPV16 induces T cell responses that localize in mucosal lesions, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 221ra13, doi: 10.1126/scitranslmed.3007323.
 80. Trimble, C., Lin, C.T., Hung, C.F., Pai, S., Juang, J., He, L., Gillison, M., Pardoll, D., Wu, L., and Wu, T.C. (2003) Comparison of the CD8⁺ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe, *Vaccine*, **21**, 4036–4042.
 81. Alvarez, R.D., Huh, W.K., Bae, S., Lamb, L.S.Jr., Conner, M.G., Boyer, J., Wang, C., Hung, C.F., Sauter, E., Paradis, M., Adams, E.A., Hester, S., Jackson, B.E., Wu, T.C., and Trimble, C.L. (2016) A pilot study of pNGVL4a-CRT/E7(detox) for the treatment of patients with HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3), *Gynecol. Oncol.*, **140**, 245–252, doi: 10.1016/j.ygyno.2015.11.026.
 82. Chandra, J., Dutton, J.L., Li, B., Woo, W.P., Xu, Y., Tolley, L.K., Yong, M., Wells, J.W., R Leggatt, G., Finlayson, N., and Frazer, I.H. (2017) DNA vaccine encoding HPV16 oncogenes E6 and E7 induces potent cell-mediated and humoral immunity which protects in tumor challenge and drives E7-expressing skin graft rejection, *J. of Immunother.*, **40**, 62–70, doi: 10.1097/CJI.000000000000156.
 83. Lu, S., Wang, S., and Grimes-Serrano, J.M. (2008) Current progress of DNA vaccine studies in humans, *Expert Rev. Vaccines*, **7**, 175–191. doi: 10.1586/14760584.7.2.175.
 84. Ali, A.A., McCrudden, C.M., McCaffrey, J., McBride, J.W., Cole, G., Dunne, N.J., Robson, T., Kissenpennig, A., Donnelly, R.F., and McCarthy, H.O. (2017) DNA vaccination for cervical cancer; a novel technology platform of RALA mediated gene delivery via polymeric microneedles, *Nanomedicine*, **13**, 921–932, doi: 10.1016/j.nano.2016.11.019.
 85. Samuels, S., Marijine Heeren, A., Zijlmans, H.J.M.A.A., Welters, M.J.P., van den Berg, J.H., Philips, D., Kvistborg, P., Ehsan, I., Scholl, S.M.E., Nuijen, B., Schumacher, T.N.M., van Beurden, M., Jordanova, E.S., Haanen, J.B.A.G., van der Burg, S.H., and Kenter, G.G. (2017) HPV16 E7 DNA tattooing: safety, immunogenicity, and clinical response in patients with HPV-positive vulvar intraepithelial neoplasia, *Cancer Immunol. Immunother.*, **66**, 1163–1173, doi: 10.1007/s00262-017-2006-y.
 86. Ostor, A.G. (1993) Natural history of cervical intraepithelial neoplasia – a critical review, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **12**, 186–192.
 87. Morrow, M.P., Kraynyak, K.A., Sylvester, A.J., Dallas, M., Knoblock, D., Boyer, J.D., Yan, J., Vang, R., Khan, A.S., Humeau, L., Sardesai, N.Y., Kim, J.J., Plotkin, S., Weiner, D.B., Trimble, C.L., and Bagarazzi, M.L. (2018) Clinical and immunologic biomarkers for histologic regression of high-grade cervical dysplasia and clearance of HPV16 and HPV18 after immunotherapy, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 276–294, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2335.
 88. Santos, P.M., and Butterfield, L.H. (2018) Dendritic cell-based cancer vaccines, *J. Immunol.*, **200**, 443–449, doi: 10.4049/jimmunol.1701024.
 89. Santin, A.D., Bellone, S., Roman, J.J., Burnett, A., Cannon, M.J., and Pecorelli, S. (2005) Therapeutic vaccines for cervical cancer: dendritic cell-based immunotherapy, *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 3485–3500.
 90. Ahn, Y.H., Hong, S.O., Kim, J.H., Noh, K.H., Song, K.H., Lee, Y.H., Jeon, J.H., Kim, D.W., Seo, J.H., and Kim, T.W. (2015) The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor-beta receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8(+) T cell immunity, *Clin. Exp. Immunol.*, **181**, 164–178, doi: 10.1111/cei.12620.
 91. Santin, A.D., Bellone, S., Palmieri, M., Zanolini, A., Ravaggi, A., Siegel, E.R., Roman, J.J., Pecorelli, S., and Cannon, M.J. (2007) Human papillomavirus type 16 and 18 E7-pulsed dendritic cell vaccination of stage IB or IIA cervical cancer patients: a phase I escalating-dose trial, *J. Virol.*, **82**, 1968–1979, doi:10.1128/JVI.02343-07.
 92. Brun, J.L., Rajaonarison, J., Nocart, N., Hoarau, L., Brun, S., and Garrigue, I. (2018) Targeted immunotherapy of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia: expectations from clinical trials, *Mol. Clin. Oncol.*, **8**, 227–235, doi: 10.3892/mco.2017.1531.
 93. Mikyskova, R., Indrova, M., Simova, J., Jandlova, T., Bieblova, J., Jinoch, P., Bubenik, J., and Vonka, V. (2004) Treatment of minimal residual disease after surgery or chemotherapy in mice carrying HPV16-associated tumours: cytokine and gene therapy with IL-2 and GM-CSF, *Int. J. Oncol.*, **24**, 161–167, doi: 10.3892/ijo.24.1.161.
 94. Chang, E.Y., Chen, C.H., Ji, H., Wang, T.L., Hung, K., Lee, B.P., Huang, A.Y., Kurman, R.J., Pardoll, D.M., and Wu, T. (2000) Antigen-specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogeneic tumor cell-based vaccine, *Int. J. Cancer*, **86**, 725–730.
 95. Schneider, K., Gronhoj, C., Hahn, C.H., and von Buchwald, C. (2018) Therapeutic human papillomavirus vaccines in head and neck cancer: a systematic review of current clinical trials, *Vaccine*, **36**, 6594–6605, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.09.027.

**THERAPEUTIC VACCINES AGAINST HUMAN PAPILLOMA VIRUSES,
ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS****M. S. Vonsky^{1,2}, A. L. Runov^{1,2,3}, I. V. Gordeychuk^{3,4,5}, and M. G. Isagouliants^{3,4,6,7*}**¹ *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia; E-mail: m.vonsky@gmail.com*² *Almazov National Medical Research Center, 197341 St. Petersburg, Russia*³ *Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology,
123098 Moscow, Russia; E-mail: maria.issagouliantis@rsu.lv*⁴ *Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products,
Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia*⁵ *Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: lab.gord@gmail.com*⁶ *Karolinska Institutet, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, SE-171 77 Stockholm, Sweden*⁷ *Riga Stradins University, Department of Pathology, LV-1007, Riga, Latvia*

Received April 3, 2019

Revised April 15, 2019

Accepted April 21, 2019

Human papillomaviruses of high carcinogenic risk (HR HPVs) are major etiological agents of malignant diseases of the cervix, vulva, penis, anal canal, larynx, head, and neck. Prophylactic vaccination against HPV, which mainly covers girls and women under 25, does not prevent vertical and horizontal HPV transmission in infants and children and does not have a therapeutic effect. As a result, a significant proportion of the population is not protected from the HPV infection and development of HPV-associated neoplastic transformation and cancer, which indicates the need for rapid development and introduction of therapeutic HPV vaccines. Unlike prophylactic vaccines aimed at the formation of virus-neutralizing antibodies, therapeutic vaccines elicit cellular immune response leading to the elimination of infected and malignant cells expressing viral proteins. The ideal targets for vaccine immunotherapy are highly conserved HR HPV oncoproteins E6 and E7 expressed in precancerous and tumor tissues. Here, we describe expression of these proteins during different stages of HPV infection, their antigenic and immunogenic properties, and T-cell epitopes, the response to which correlates with natural regression of HPV-induced neoplastic changes. The review describes patterns of E6 and E7 oncoproteins presentation to the immune system as components of candidate vaccines along with the results of the most promising preclinical trials and animal models used in these trials. Special attention is paid to vaccine candidates which have shown efficacy in clinical trials in patients with HPV-associated neoplastic changes.

Keywords: human papilloma virus (HPV), squamous cancer, neoplasia, E6 and E7 oncoproteins, therapeutic vaccination, genetic vaccines, immune response