

Candidatos vacunales profilácticos de segunda y tercera generación contra el virus del papiloma humano

Elsa T. Pimienta-Rodríguez, Karen Marrero-Domínguez y Rafael Fando-Calzada

Grupo de Biología Molecular, Dirección de Enfermedades Infecciosas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ave. 25 esquina 158. Cubanacán. Playa. La Habana. Cuba. elsa.pimienta@cnic.edu.cu

Recibido: 1 de septiembre de 2016.

Aceptado: 16 de diciembre de 2016.

INTRODUCCION

Las vacunas de primera generación contra el Virus del Papiloma Humano (VPH) representan una vía importante para reducir de forma significativa la incidencia mundial del cáncer cervicouterino (CCU). Más del 80% de los casos de CCU se presentan en mujeres de países en desarrollo,¹ por lo que la carga de esta enfermedad prevenible afecta desproporcionadamente a países con sistemas de pesquiasaje y tratamiento del CCU deficientes o inexistentes.¹⁻³

Las vacunas comerciales disponibles para la prevención de la infección por el VPH tienen como principio activo a las Partículas Semejantes a Virus (VLPs, por sus siglas en inglés, *Virus like Particles*) de la proteína L1, obtenidas de forma recombinante en sistemas eucariontes. El fundamento básico de la vacuna de VLP es que cuando las proteínas L1 son expuestas entre ellas tienen la característica de auto-ensamblarse espontáneamente *in vivo* o *in vitro* a partir de 72 capsómeros o pentámeros, con una simetría icosaédrica (T=7). Las VLPs son morfológicamente idénticas a los viriones VPH nativos, siendo la única diferencia la ausencia del genoma viral en los VLPs.^{4,5} La estructura de la proteína L1 del VPH es importante al conferirle estabilidad a la cápsida mediante el establecimiento de interacciones intra e intercapsoméricas; lo que asegura la integridad viral y antigénica al contener los epítopos que inducen la respuesta inmune protectora. Hasta el momento, los ensayos clínicos en humanos muestran que las VLPs del VPH son inmunogénicas, bien toleradas y proporcionan protección, la cual es mediada por la producción de anticuerpos neutralizantes altamente específicos contra los tipos de VPH que fueron generados.^{3,6} En consecuencia, estas vacunas no protegen contra la infección por otros genotipos del VPH de alto riesgo.³

En el año 2006, la FDA (Agencia para la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, por sus siglas en inglés *US Food and Drug Administration*) le otorgó la licencia sanitaria a Gardasil[®], la primera vacuna comercial disponible para proteger contra la infección por los genotipos 16, 18, 6 y 11 del VPH. Los tipos 16 y 18 del VPH causan aproximadamente el 70% de todos los cánceres cervicales y específicamente el VPH-16 causa entre el 55 – 60% de CCU y cánceres relacionados. Además, Gardasil[®] ofrece protección contra los genotipos de bajo riesgo 6 y 11 del VPH para la prevención de las verrugas genitales o condilomas. Esta vacuna es comercializada por la compañía norteamericana Merck & Co. y utiliza como plataforma de producción de la proteína L1 la cepa recombinante *Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5.^{3,7,8} En el 2007, la Agencia EMA (Agencia Europea de Medicamentos, por sus siglas en inglés, *European Medicines Agency*) le otorgó la licencia sanitaria a Cervarix[®], una vacuna desarrollada por la compañía farmacéutica belga GlaxoSmithKline Biologicals S.A. Esta preparación vacunal está compuesta por VLPs de las proteínas L1 de los genotipos 16 y 18, cada una sintetizada por células de insecto *Trichoplusia ni* Hi-5 y un sistema de expresión de baculovirus.⁽⁹⁾ Gardasil[®] y Cervarix[®] han demostrado alta eficacia, entre 96 - 100%, en la prevención de cambios relacionados con Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC) de tipo 2 y 3, en población virgen a infecciones por el VPH. Ambas vacunas han mostrado alta inmunogenicidad, con altos títulos de anticuerpos, los cuales han sido significativamente superiores a los inducidos por la infección natural. Los títulos para prevenir la infección se han mantenido suficientemente altos con una duración estudiada de 8 años para la vacuna cuadrivalente y 9.4 años para la bivalente.^{10,11} En la actualidad los ensayos continúan para estudiar la efectividad protectora más allá de este tiempo. Ambas vacunas están indicadas únicamente para uso profiláctico y no tienen efecto sobre las infecciones por VPH activas o sobre la enfermedad clínica ya existente, no demostrando tener efecto terapéutico.¹²

A pesar de que Cervarix[®] y Gardasil[®] son vacunas de reconocida inmunogenicidad y protección, tienen limitaciones inherentes que restringen su uso y su potencial efecto en la salud pública. Primero, son administradas en tres inyecciones por vía intramuscular a adolescentes durante seis meses; los cuales, en su mayoría, no tienen acceso rutinario a la asistencia médica. El inicio y especialmente el completamiento del programa de estas vacunas es bajo en

muchos países, incluso en aquellos donde estas vacunas forman parte del programa nacional de vacunación.³ En segundo lugar, ambas vacunas son muy costosas. Los costos de su fabricación y administración son altos. En algunos casos, los productores han disminuido substancialmente los precios, facilitando la introducción de al menos una de las vacunas en varios programas nacionales de vacunación. GlaxoSmithKline y Merck han acordado suministrar vacunas a la alianza GAVI (Alianza Global para las vacunas, por sus siglas en inglés, *Global Alliance for Vaccines and Immunization*) para países elegidos por esta organización a precios de \$5.00 por dosis. Sin embargo, ese precio de las vacunas, unido al costo de la distribución y administración de las tres inyecciones por adolescente, hace que finalmente los precios sean prohibitivos para la mayoría de los países de bajos ingresos, en los cuales es mayor la incidencia de los cánceres asociados al VPH. En último lugar, la protección contra la infección y la enfermedad depende del genotipo del VPH. Cervarix® y Gardasil® ofrecen protección contra la infección por los genotipos 16 y 18, que son los más oncogénicos, pero solo se puede esperar, a lo sumo, una protección entre el 70 y 80% contra la enfermedad, en particular el CCU.^{3,13}

La búsqueda de un preparado antigénico más asequible para la población de los países en vías de desarrollo y que confiera protección contra la infección de una mayor cantidad de tipos de VPH oncogénicos ha resultado en el desarrollo de una segunda generación de vacuna contra el VPH. Hasta el momento, su único miembro es la vacuna nonavalente Gardasil9®, que el 10 de diciembre de 2014 fue aprobada por la FDA para su uso en adolescentes y jóvenes del sexo femenino de edades comprendidas entre 9 y 26 años y en adolescentes masculinos entre 9 y 15 años. Gardasil9® fue desarrollada por Merck & Co. para incrementar la protección conferida por Gardasil® contra los VPH oncogénicos. Esta vacuna tiene básicamente la misma formulación que su antecesora, pero contiene VLPs de otros cinco genotipos de VPH: 31, 33, 45, 52 y 58, responsables de un 20 % adicional de casos de CCU.³ En un ensayo clínico de eficacia fase III, que compara la vacuna de nueve valencias respecto a la cuadrivalente en aproximadamente 14 000 mujeres de 16 a 26 años, la eficacia de la vacuna nonavalente para la prevención de NIC2 ó 3 vulvar y vaginal fue de 96.7%. En este análisis se utilizó un protocolo denominado “*per protocol*”, el cual solo incluyó a las participantes que fueron negativas, al inicio del estudio, a los cinco nuevos subtipos incluidos en Gardasil9®. En contraste, en el análisis denominado “análisis con intención de tratamiento”, donde se evaluó la efectividad de la vacuna en todas las féminas del estudio -independientemente de su estado basal contra el VPH-, la eficacia de Gardasil9® fue equivalente a la vacuna cuadrivalente. Se evidenció que en la vacuna nonavalente se extiende su cobertura a los subtipos oncogénicos adicionales, pero sólo a los nuevos subtipos en el momento de la vacunación de la población femenina virgen. El perfil de seguridad de Gardasil9® es similar a la cuadrivalente, con la excepción de mayor enrojecimiento e hinchazón en el sitio de inyección cuando se utilizó la nueva vacuna. Estos resultados sugieren que Gardasil9® pudiera ser útil en una estrategia que busque eliminar la infección del VPH, así como la incidencia de todo el cáncer asociados.¹⁴ Posteriormente, en un ensayo clínico fase III se comparó la inmunogenicidad y eficacia de las vacunas de cuatro y nueve valencias en 500 hombres de edades comprendidas entre 16 y 26 años. En un régimen de tres dosis, Gardasil9® indujo una respuesta inmune contra los tipos 6, 11, 16 y 18 del VPH similar a la vacuna cuadrivalente. El perfil de seguridad también fue similar para ambas vacunas. Basado en estos resultados, los autores infieren que la eficacia de la vacuna de nueve valencias es comparable a la de Gardasil®.¹⁵ Además, la vacuna nonavalente es segura cuando se administra con las vacunas meningocócica (Menactra) y Tdap (Adacel)¹⁶ o REPEVAX (Difteria, tétano, pertussis acelular y la vacuna de la poliomieltis inactivada).¹⁷ Sin embargo, como era de esperar, los costos de producción de Gardasil9® son mayores que los de Gardasil®. Se estima que la dosis de Gardasil9® tiene un costo de \$13.00 más que la dosis de Gardasil®.¹⁸ Por lo que a pesar de con Gardasil9® se incrementó la protección antiviral tipo-específica desde aproximadamente el 70 hasta el 90%, la investigación en el sector académico y la industria farmacéutica continúa enfocada al desarrollo de estrategias alternativas para la producción y distribución de nuevas vacunas anti-VPH que sean más adecuadas para países con recursos limitados. Dentro de los principales factores que incrementarían el impacto de las vacunas se incluyen: un precio más bajo, una vida útil más larga, una estabilidad en un rango mayor de temperaturas, ser efectivas con sólo una o dos dosis y proteger contra múltiples tipos del VPH de alto riesgo e inmunidad a largo plazo, sin refuerzos.¹⁹

El presente trabajo resume la información en el Estado del Arte relacionada con las principales estrategias alternativas utilizadas para la obtención de candidatos vacunales preventivos de segunda y tercera generación contra el VPH, examina las plataformas de expresión utilizadas para tales fines, analiza las perspectivas de los candidatos vacunales basados en la proteína L2, la proteína minoritaria de la cápsida del VPH y analiza las perspectivas futuras del desarrollo de candidatos vacunales y en particular, en Cuba.

CANDIDATOS VACUNALES PROFILÁCTICOS DE SEGUNDA GENERACIÓN BASADOS EN LA PROTEÍNA L1 DEL VPH

Las estrategias para el desarrollo de candidatos vacunales profilácticos de segunda generación contra la infección por el VPH se basan en la proteína L1. Estas estrategias alternativas comprenden dos categorías: aquellas que se fundamentan en la administración de las proteínas L1 en subunidades y las asociadas con la utilización de un vector microbiano que produzca la proteína L1.³

De las estrategias basadas en las proteínas L1 purificadas del VPH, Merck utilizó la vía más directa para obtener vacunas de segunda generación, al incrementar el número de los tipos de VLPs de cuatro a nueve en su vacuna Gardasil9®. Tanto Gardasil9® como Gardasil® utilizan un sistema de producción recombinante estable basado en *S.*

cerevisiae, el cual es reconocido por producir bajos niveles de VLPs de los genotipos 6, 11 y 16³ con un tamaño irregular y menor (30–50 nm) que lo esperado (60 nm), lo cual requiere de procesos adicionales de des-ensamblaje en las unidades capsoméricas y re-ensamblaje de las partículas.^{20,21} Varios productores de vacunas, incluyendo a los de países en vías de desarrollo, se encuentran explorando la posibilidad de obtener VLPs de la proteína L1 en sistemas alternativos de producción. El reto fundamental es producir VLPs a bajo costo, con la conformación adecuada y que sean capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra el virus.

***Escherichia coli* como plataforma para la producción de VLPs del VPH**

Una de las ventajas sobresalientes de *Escherichia coli*, junto con *S. cerevisiae*, es su robustez en la producción de productos biofarmacéuticos comerciales. En el año 2014 se informó que el 24% de los biofarmacéuticos aprobados por las Agencias Reguladoras EMA y FDA, entre el 2004 y el 2013, utilizan como cepa productora a *E. coli*.²² Sin embargo, ningún VLP del VPH obtenido a partir de *E. coli* ha alcanzado el mercado, lo cual se relaciona con la imposibilidad de las células procariontas de realizar complejas modificaciones post-traduccionales a las proteínas. Además, las células bacterianas como sistemas de producción de proteínas heterólogas tienen limitaciones para producir productos solubles y de tamaño deseado, libre de toxinas y chaperonas, las cuales comprometen los procesos de recobrado y crean un potencial problema para su separación y un aumento del costo del producto final.²³

A pesar de la alta complejidad estructural de los VLPs del VPH, la compañía Xiamen Innovax Biotech (Xiamen, China) ha alcanzado adecuados niveles de producción de VLPs del VPH en *E. coli* mediante el uso de proteínas L1 truncadas por el extremo amino.²⁴ Este sistema es considerado de bajo costo y deber ser destinado mayormente al mercado chino. La ventaja de esta tecnología es que el material de partida procede de la fracción soluble, lo cual facilita los procesos de recobrado y formación de las VLPs del VPH. En el año 2014, la compañía informó resultados de un Ensayo Clínico Fase I de seguridad con un candidato vacunal bivalente de VLPs de VPH 16 y 18,²⁵ el cual actualmente se encuentra cursando un Ensayo Clínico Fase III de eficacia en China (ClinicalTrials.gov NCT01735006). Adicionalmente, Xiamen Innovax Biotech tiene un Ensayo Clínico Fase I en curso con un candidato vacunal bivalente de VLPs del VPH 6 y 11, producidos igualmente en *E. coli*.³

Levaduras como plataformas para la producción de VLPs del VPH de segunda generación

S. cerevisiae ha sido ampliamente utilizada como plataforma para la producción de biofarmacéuticos desde hace 30 años. Precisamente, la compañía norteamericana Merck & Co. fue la primera farmacéutica en obtener la aprobación regulatoria de la primera vacuna de VLPs del Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (AgsHB).^{26,27} El AgsHB derivado de *S. cerevisiae* no es glicosilado²⁷ y se obtiene inusualmente a altos niveles (hasta el 40% de las proteínas solubles),²⁸ a diferencia de las proteínas L1 del VPH que son obtenidas a muy bajos niveles y se requiere de una cepa genéticamente modificada como *S. cerevisiae* CANADE 3C-5.^{7,29,30} Esta cepa, propietaria de la compañía Merck & Co, tiene delecionado el gen *mmn9* de su genoma, por lo que tiene bloqueada la adición subsecuente de manosas 1,6 α al núcleo de oligosacárido^{7,30} y con ello la posterior adición de residuos de manosas 1,3 α . De estos últimos residuos se ha informado que contienen epítopes muy inmunogénicos en mamíferos.^{31,32}

Además de la compañía Merck & Co., otros grupos también utilizan esta plataforma para producir VLPs del VPH. Entre ellos, el más avanzado corresponde al candidato bivalente EG-HPV de la compañía Eyegene Inc., Seoul, Korea, que tiene como antígenos a los VLPs de los tipos 16 y 18, el cual concluyó satisfactoriamente un Ensayo Clínico Fase I en Korea y se encuentra en fase de preparación para un Fase II.³³ EG-HPV tiene un nuevo adyuvante propietario EGvac, el cual aumenta la respuesta inmune contra el VPH a través de la estimulación de la respuesta de células T y B.³⁴ El candidato EG-HPV ha mostrado en el modelo de ratón el doble de capacidad respecto a la vacuna bivalente de inducir anticuerpos IgG sérico contra las VLPs del VPH 16 y 18, y de incrementar los niveles de secreción de interferón γ y el conteo de células B de memoria en los esplenocitos.³⁵

Las limitaciones de *S. cerevisiae* se han puesto de manifiesto al aumentar de manera significativa el número de sistemas de expresión basados en otras levaduras, los cuales exhiben mejores propiedades como productoras de determinadas proteínas heterólogas. Entre estos hospederos se encuentran *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis*; las cuales crecen rápidamente en medios con fuentes de carbono económicas como el metanol. De las levaduras metilotróficas, *P. pastoris*, recientemente reclasificada como *Komagataella pastoris*, es la levadura que más se utiliza, después de *S. cerevisiae*, para la producción de biofarmacéuticos.³⁶ Entre las principales ventajas de las levaduras metilotróficas se encuentran: una manipulación genética simple, alcanzan densidades celulares elevadas y las proteínas recombinantes obtenidas a partir de ellas están generalmente bien plegadas y con modificaciones post-traduccionales como la glicosilación, que se asemeja más a la de organismos eucariotas superiores que las realizadas por *S. cerevisiae*.³⁷ Estas levaduras también se están empleando en la producción de VLPs del VPH y pudieran generar rendimientos de producción mayores a un costo menor que la producción de los VLPs de VPH a partir de *S. cerevisiae*.

India es uno de los países que más trabajos ha informado sobre la utilización de levaduras metilotróficas para la obtención de VLPs del VPH, en búsqueda de una vacuna preventiva de segunda generación con precios accesibles a su población.³⁸ En contraste, en los últimos años, las instituciones indias informan pocos estudios sobre la utilización de *E. coli* para la obtención de la proteína L1, lo cual puede estar relacionado con que la inmunogenicidad de las

vacunas basadas en VLPs dependen de que mimetice la configuración natural del virus, idealmente una geometría T=7,³⁸ y desde este punto de vista, las levaduras son superiores a la bacteria *E. coli*.

Uno de los candidatos de origen hindú es el desarrollado por Serum Institute of India Ltd., que es la compañía productora de vacunas más grande del mundo, de acuerdo al número de dosis producidas. Sus vacunas comerciales están calificadas por la Organización Mundial de la Salud. Este candidato preventivo tiene como principio activo a las VLPs de las proteínas L1 de los serotipos 6, 11, 16 y 18, las cuales son obtenidas a partir de la levadura metilotrófica *H. polymorpha*.³⁹ Otra compañía, Indian Immunologicals Ltd., también ha informado sobre la obtención de las proteínas L1 de VPH 16 y 18, utilizando a *P. pastoris* como plataforma de expresión.⁴⁰

Como se señaló anteriormente, las compañías chinas también han trabajado en el desarrollo de candidatos vacunales contra el VPH. De acuerdo a la información consultada, el único reporte de un Ensayo Clínico en curso de un candidato vacunal contra el VPH, que utiliza a una levadura metilotrófica como plataforma, es el Fase III denominado “A Phase III Double Blinded, Randomized Controlled Study to Evaluate Efficacy of Protection Against HPV-16 and 18 Related Diseases, Immunogenicity and Safety of HPV-16/18 Vaccine in Healthy Females Aged 18-30 Years” (ClinicalTrials.gov [NCT02733068](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02733068)), cuyo patrocinador es la Compañía Shanghai Zerun Biotechnology Co. Ltd, China. La plataforma de expresión utilizada es *P. pastoris*, con la cual se obtuvieron altos rendimientos de las proteínas L1 solubles. En el caso de la proteína L1 de VPH-16, los niveles de expresión estuvieron en el orden de los 900 mg/L, los cuales fueron aproximadamente tres veces superiores a los obtenidos para la proteína L1 del VPH-18. No obstante, los rendimientos alcanzados para la proteína L1 del VPH-18 son las mayores cantidades informadas hasta el momento para esta proteína obtenida por vía recombinante.⁴¹

Plantas como plataformas para la producción de VLPs del VPH

Varios grupos académicos han producido VLPs de la proteína L1 en plantas, ya sea por clones transgénicos, que expresan L1 mediante la expresión transitoria después de la infección con virus de plantas recombinantes,^{42,43} o por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* recombinantes.^{44,45} En teoría, la producción de los VLPs por plantas ofrece la posibilidad de la producción y distribución de vacunas de bajo costo, especialmente si esta puede ser administrada por vía oral. Desafortunadamente, la producción de proteínas heterólogas en plantas generalmente ha resultado en bajos rendimientos y con un ensamblaje ineficiente de las proteínas L1 en VLPs.^{3,46} Sin embargo, la producción de la proteína L1 aumentó significativamente cuando se expresó un gen L1, con uso optimizado de codones de humanos, a través de su expresión transitoria en los cloroplastos de plantas de tabaco transgénico. Los extractos concentrados, enriquecidos con la proteína recombinante producida, resultaron muy inmunogénicos en el biomodelo de ratón, después de su administración subcutánea, y mostraron altos títulos de actividad neutralizante.⁴⁴ Recientemente, Zahin y cols (2016) informaron sobre la expresión de un gen L1 del VPH-16, con secuencia optimizada para planta de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), fusionado a una secuencia señal de cloroplasto para promover el ensamblaje de las proteínas L1 en dichos orgánulos. Los VLPs se obtuvieron en altos rendimientos y fueron antigénicamente similares a los VLPs producidos en el sistema de expresión de baculovirus (Cervarix).⁴⁷

Capsómeros como estrategia para la producción de candidatos vacunales preventivos contra el VPH

Los cloroplastos de las plantas de tabaco también han sido utilizados como plataformas para la expresión de proteínas L1 con la finalidad de obtener capsómeros, 72 de los cuales se ensamblan normalmente para formar un VLP.⁴⁸ La ventaja fundamental de las vacunas basadas en capsómeros es que estas son estables, pueden ser fácilmente producidas y purificadas, con altos rendimientos y en consecuencia, son potencialmente más económicas que las vacunas de VLP, pues no requieren cadena de frío para su distribución. Los resultados han sido inicialmente alentadores debido a que las proteínas L1 se han obtenido solubles en los cloroplastos y se han ensamblado correctamente en capsómeros, a los que se le ha demostrado su antigénicidad.^{49,50}

E. coli también ha sido evaluada en los últimos años como plataforma para la obtención de capsómeros del VPH. Los pentámeros obtenidos a partir de esta bacteria han generado anticuerpos neutralizantes *in vitro* y han protegido en experimentos de reto en modelos animales de infección por virus del papiloma.⁵¹ Recientemente, Hassett y cols (2015) evaluaron formulaciones de capsómeros del VPH-16 que contenían hidróxido de aluminio o este adyuvante unido al lípido A de glicopiranosido. La inmunogenicidad de las formulaciones de los capsómeros fue equivalente a la vacuna comercial Cervarix®. Además, se conservó su actividad neutralizante completa después de su almacenamiento a altas temperaturas.⁵² A pesar de que los candidatos vacunales basados en capsómeros son promisorios, en la comunidad científica existe preocupación sobre una probable respuesta de anticuerpos menos duradera y potencialmente menor que las vacunas basadas en VLPs, lo cual no ha sido evaluado en ensayos clínicos en humanos.

Vectores virales y bacterianos que expresan VLPs como estrategia para la producción de candidatos vacunales vivos preventivos contra el VPH

Vectores virales

Tanto los vectores recombinantes virales como los bacterianos se han utilizado como candidatos vacunales para la prevención de la infección por el VPH, basados en la proteína L1.⁵³⁻⁵⁶ Las vacunas basadas en vectores virales tienen ventajas potenciales, entre las que se destacan: menores costos de producción y probablemente menos dosis que las

vacunas comerciales. Sin embargo, debido a que los vectores virales involucran microorganismos genéticamente modificados, los ensayos clínicos pueden ser complejos debido a los requerimientos de contención viral y de monitoreo para evitar la diseminación ambiental. Hasta el momento, estos candidatos solo se han evaluado en modelos animales.³ Probablemente uno de los enfoques más atractivos, desde el punto de vista de su implementación, puede ser la producción de los VLPs del VPH por una vacuna viva atenuada que esté en uso en el mercado, como la cepa Berna que produce el virus atenuado del sarampión. La compañía Zydus Cadila (anteriormente Etnavax), Ahmedabad, India, generó una construcción genéticamente estable de la cepa comercial Berna (Moraten®-Berna measles virus), que produce la proteína L1 del VPH-16. Este virus recombinante indujo altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el VPH-16 después de una sola dosis en ratones genéticamente modificados, sin reducción de los títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus del sarampión. Los rendimientos de la producción fueron comparables con los de la cepa parental.⁵³ La evaluación clínica futura de este candidato se justifica, sin embargo, el gran reto para los investigadores de este estudio es la identificación de una población elegible, que no haya sido previamente vacunada contra el virus del sarampión, considerando que la mayor parte de la población mundial ha sido vacunada contra el virus del sarampión.

Vectores bacterianos

Uno de los exponentes más interesantes de este enfoque ha sido el de la compañía Indian Immunological Ltd. que desarrolló, en colaboración con la Universidad de Lausanne (Lausanne, Suiza), candidatos vacunales de *Salmonella entérica* que expresan las proteínas L1 del VPH 16 y 18. La bacteria *Salmonella entérica* es el vector vivo atenuado que se administra oralmente para prevenir la fiebre tifoidea. En 1997, Nardelli-Haeffliger y cols informaron sobre la expresión de las VLPs del VPH-16 en *S. enterica* serovar *typhimurium*⁵⁷ y posteriormente, en el 2004, la obtención de altos títulos de anticuerpos neutralizantes en ratón al administrar la bacteria viva portando un gen L1 de VPH-16, con uso de codones para dicha bacteria.⁵⁵ En los últimos trabajos se ha utilizado un plásmido de expresión del gen L1 de VPH-16, con el marcador del gen de resistencia a kanamicina, en cepas de *S. enterica* serovar *Typhi*. Particularmente, la cepa recombinante de *S. Typhi* Ty21a -la actual vacuna viva licenciada- ha inducido altos títulos de anticuerpos neutralizantes en el suero y secreciones genitales en el modelo intranasal de ratón.^{56,58} Con este candidato se finalizó la etapa de evaluación preclínica y han informado que la compañía Indian Immunological Ltd. se encuentra preparando un ensayo clínico fase I con 3 dosis de Ty21 VPH-16 + Ty21 VPH-18.⁵⁹

CANDIDATOS VACUNALES PROFILÁTICOS DE TERCERA GENERACION BASADOS EN LA PROTEINA L2 DEL VPH

L2 es la proteína minoritaria de la cápsida del VPH que tiene hasta una copia por capsómero de L1 y un máximo de 72 copias por virión. Los epítomos esenciales de L2, contra los que se dirigen los anticuerpos neutralizantes, se encuentran localizados hacia el C-terminal después del sitio de corte de la furina en L2. Los inmunógenos que contienen L2 o sus péptidos pueden inducir anticuerpos de amplio espectro de reactividad cruzada, a diferencia de los VLPs de L1.⁶⁰⁻⁶² Sin embargo, los títulos inducidos por L2 contra el virus homólogo son generalmente al menos diez veces menores que los títulos inducidos por los VLPs de L1.⁶³ En contraste con los VLPs de L1, los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra L2 parecen reconocer epítomos lineales.⁶⁴ Los candidatos vacunales basados en L2 han mostrado protección *in vivo* en los modelos de reto de ratón, conejo y ternero. Además, la protección inducida por L2 puede ser transmitida por vía pasiva con suero inmune,⁶⁴ por lo que la actividad neutralizante cruzada de los anticuerpos anti-L2 brindan la posibilidad de que una vacuna monovalente pueda proteger contra un amplio rango de tipos de papilomas genitales, de mucosa y quizás de los tipos cutáneos del VPH que causan verrugas en la piel de manos y pies.

Por otra parte, debido a que las vacunas L2 no están fundamentadas en la compleja producción de los VLPs del VPH, estas pueden ser fáciles, económicas y potencialmente más asequibles a las poblaciones de bajos recursos, que es la que más las necesitan.⁸ El mayor reto en el desarrollo de una vacuna basada en la proteína L2 radica en lograr una respuesta inmune fuerte y específica contra L2. Las proteínas L1 y L2 se pueden co-exresar por vía recombinante y ensamblarse en VLPs, pero la proteína L2 es inmunológicamente subdominante respecto a la proteína L1.⁶⁰

Shantha Biotechnics (Hyderabad, India) y Acambis (Boston MA, USA), establecieron programas de desarrollo de vacunas profilácticas basadas en L2. Sin embargo, ambas compañías fueron adquiridas por Sanofi Pasteur en el año 2009, quien al parecer fusionó los dos programas. Su inmunógeno fundamental parece ser una proteína de fusión multimérica (concatámeros) producida en *E. coli*, con los aminoácidos 11-88 de cinco u ocho tipos genitales del VPH. Estos inmunógenos de L2 concatenados indujeron anticuerpos protectores con reactividad cruzada, así como respuesta genotipo-específica en estudios de reto en un modelo cervicovaginal en ratones.⁶⁵

De forma equivalente a los candidatos vacunales basados en capsómeros de la proteína L1, la principal interrogante en el caso de las vacunas basadas en L2 es si inducirán una respuesta de anticuerpos de larga duración como la inducida por las vacunas comerciales con VLPs de L1.⁶⁶

Varias estrategias en curso pueden incrementar la inmunogenicidad respecto a las vacunas actuales e incrementar la duración de la respuesta. Entre ellas, las que utilizan estructuras semejantes a virus de alta densidad u otros tipos de presentación del péptido L2 con mayor actividad neutralizante. Una estrategia que se utiliza es generar VLPs de L1 del VPH en los cuales un lazo en la superficie de la proteína L1 es reemplazado por un péptido de L2. Este VLP

recombinante debe retener algún epítipo neutralizante específico a L1 y también debe inducir anticuerpos de reactividad cruzada neutralizante amplia contra el péptido de L2.⁶⁷⁻⁶⁹ En Japón, la compañía Takeda Pharmaceutical Company Ltd. (Takeda, Osaka, Japan) obtuvo los derechos exclusivos de patentes sobre el candidato vacunal "Kanda HPV", desarrollado por el Dr. Tadahito Kanda. Este candidato vacunal preventivo contra el VPH se encuentra en etapa de desarrollo preclínico.³³ "Kanda HPV" tiene como ingrediente farmacéutico activo a VLPs quiméricos, obtenidos a partir de células de insectos mediante la inserción de un péptido, que comprende las regiones 64-81 y 108-120 de la proteína L2, en un lazo de la proteína L1 de los serotipos 16, 18, 31, 33, 35, 52 y 6 del VPH.⁷⁰ Sin embargo, este candidato vacunal ha sido diseñado para los genotipos específicos circulantes en ese país asiático.

De forma análoga, péptidos L2 similares también han sido desplegados en otros VLPs, por ejemplo, en los VLPs de virus adeno-asociados,^{71,72} y en los VLPs del virus del mosaico del tabaco,⁷³ entre otros. Todas estas plataformas de despliegue generaron anticuerpos anti-L2 con actividad neutralizante cruzada *in vitro* y actividad protectora cruzada en modelo de reto cervicovaginal *in vivo* en ratones. La respuesta de anticuerpos a los VLPs, que exponen péptidos de L2, parece ser duradera.^{67,74} Sin embargo, aún falta por conocer la durabilidad de las respuestas de anticuerpos anti-L2 de los VLPs con L2, comparados con los concatámeros de L2 u otras formas de complejos de polipéptidos L2 monoméricos o multiméricos.

También se ha evaluado el potencial de las vacunas de ADN con los genes L2 para la prevención de la infección por el VPH. Las vacunas de ADN del VPH probablemente son seguras, estables, fáciles de administrar y baratas. Sin embargo, ellas pueden carecer de potencia en relación con las vacunas virales. Hitzeroth y cols (2009) clonaron el gen L2 del VPH-16 en el vector de expresión de mamíferos pTH, el cual ha sido utilizado en los ensayos de las vacunas de ADN del virus de inmunodeficiencia humana. La inyección intramuscular de la vacuna de ADN de L2 en ratones resultó en títulos bajos de anticuerpos no neutralizantes.⁷⁵ Otro candidato de vacuna de ADN del VPH tuvo resultados más promisorios. Esta vacuna de ADN codifica para la calreticulina, para aumentar las respuestas inmunes humoral y de células T, y para las proteínas E6, E7 y L2 del VPH-16. Esta vacuna de ADN indujo anticuerpos neutralizantes anti-L2 en ratones. Además, este candidato indujo una potente respuesta inmune de células T CD8+ específica a E6/E7, resultando en un efecto terapéutico significativo contra las células tumorales que expresan E6/E7.⁷⁶

Mientras muchas de las estrategias con L2 son promisorias, ninguna de ella ha sido evaluada en ensayos clínicos, de acuerdo al sitio clinicaltrials.com; lo cual sugiere que si alguna de ellas logra vencer todas las barreras regulatorias pasarán al menos 10 años para su introducción en los programas de inmunización.

VACUNAS COMBINADAS CONTRA EL VPH

Una de las mejoras de las vacunas profilácticas actuales contra el VPH es que estas también estimulen respuestas de células T para eliminar las células infestadas y así tratar a los pacientes actualmente infestados por el VPH. Dado que los antígenos de la cápsida (L1 y L2) no se expresan en las células epiteliales basales, que sufren infecciones persistentes por el VPH, las vacunas terapéuticas tienen como finalidad inducir respuestas de células T citotóxicas contra los productos génicos virales E1, E2, E5, E6 y/o E7. E6 y E7 son los más frecuentes utilizados debido a que se expresan en todas las células infectadas por el VPH y son necesarios para la viabilidad de las células cancerosas.⁷⁷ El antígeno E7 ha sido el más evaluado debido a que es expresado a mayores niveles y es más conservado que la proteína E6.⁷⁸

Los esfuerzos iniciales para generar una combinación de antígenos preventivo-terapéutico se centró en fusiones de L2 con E7 (por ejemplo, VPH6 L2E7, denominado "TA-GW", que se ensayó para el tratamiento de las verrugas genitales),⁷⁹ o en fusiones de E6 y E7 (por ejemplo, VPH-16 L2E7E6, denominado "TA-CIN", que se ensayó en voluntarios sanos, así como para el tratamiento de neoplasia intraepitelial anogenital de alto grado asociada al VPH-16).⁸⁰ Si bien estas vacunas mostraron resultados promisorios en los ensayos clínicos, su eficacia terapéutica no se ha demostrado.

Los antígenos virales tempranos del VPH también se han incorporado en los VLP (y en capsómeros) mediante fusión a la proteína L1. Específicamente, la vacuna quimérica CVLP fue evaluada en un ensayo clínico fase I en pacientes diagnosticadas de neoplasias intraepiteliales 2 y 3. Este candidato estuvo compuesto por la proteína L1 del VPH-16, truncada en los últimos 34 residuos de aminoácidos, la cual se fusionó a los residuos 1-55 de la proteína E7. A pesar de que este candidato fue seguro, bien tolerado y promovió respuesta de células T citotóxicas anti-E7 y anti-L1, la respuesta celular no se correlacionó con la reducción de las neoplasias intraepiteliales anogenitales.⁸¹

Las vacunas combinadas de ADN de los genes del VPH también han sido evaluadas, dado las ventajas de este tipo de vacunas, anteriormente mencionadas. Recientemente, Fazeli y cols (2015) evaluaron un candidato basado en los genes E6/E7/L1 del VPH-16 insertados en el vector de expresión de mamífero pcDNA3, en un modelo de ratón. La co-administración de los genes L1, E6 y E7 indujo respuestas inmune celular específica al VPH-16 y también protegió *in vivo* contra los tumores inducidos por las células tumorales TC-1, al compararse con los controles negativos.⁸²

EL FUTURO DE LAS VACUNAS PROFILÁCTICAS CONTRA EL VPH

La generalización de las vacunas profilácticas contra el VPH plantea la incógnita sobre cómo se va a comportar la población de genotipos víricos y el posible cambio en la distribución de los mismos, con el potencial riesgo de que algunos tipos prácticamente irrelevantes desde el punto de vista poblacional reemplacen a los actualmente incluidos

en las vacunas. Debido a esta gran preocupación, se recomienda promover la vigilancia en la etapa post-vacunación con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre el impacto de las vacunas contra el VPH sobre la distribución de los genotipos y la aplicación de los métodos diagnósticos en la población.⁸³⁻⁸⁵

En la actualidad, las vacunas de segunda generación contra el VPH tienen un único exponente; la vacuna nonavalente de Merck. Esta vacuna probablemente se convierta en el estándar contra el cual los futuros candidatos vacunales serán comparados. Los resultados con esta vacuna probablemente puedan guiar a la comunidad científica y productora de los países en vías de desarrollo a conocer donde se deben enfocar los esfuerzos, si en la protección contra los tipos 16 y 18 o en incrementar la complejidad productiva, los costos y presumiblemente en la adición de otros tipos oncogénicos.

Una de las industrias biotecnológicas más establecidas de los países en vías de desarrollo es la cubana, que ha desarrollado un candidato vacunal terapéutico contra el VPH,⁸⁶ dado que el CCU es el cuarto más frecuente en las mujeres cubanas. Se estima que cada año mueren alrededor de 569 féminas de CCU en Cuba.¹ Además, se han realizado varios estudios de prevalencia y distribución de genotipos del VPH en la población femenina cubana. Soto y cols (2014) analizaron muestras cervicales de mujeres con edades comprendidas entre los 15 y 59 años en La Habana y detectaron un predominio casi absoluto de genotipos oncogénicos, con mayor incidencia de los genotipos 16 (41%), 18 (10,2 %) y 31 (11,6 %). En el caso de pacientes con cáncer o lesiones de alto grado, los genotipos del VPH con mayor prevalencia fueron: 16, 18 y 45.^{87,88} A pesar de esta problemática, la población adolescente cubana no tiene acceso a las vacunas preventivas disponibles, dado el alto precio de dichas vacunas en el mercado internacional. No obstante, actualmente se está trabajando en el desarrollo de un candidato vacunal preventivo contra el VPH, pero todavía se encuentra en un estadio inicial. Una de las posibles estrategias de desarrollo pudiera emplear las plataformas *Escherichia coli* o la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* para producir candidatos vacunales bivalentes contra los genotipos oncogénicos 16 y 18, considerando que instituciones de países en vías de desarrollo se encuentran evaluando este tipo de candidatos en estudios preclínicos o clínicos.^{25,41} Además, en Cuba se dispone de amplia experiencia en el empleo de ambas plataformas para la obtención de biofarmacéuticos.⁸⁹⁻⁹¹

CONCLUSIONES

A pesar del éxito de las vacunas profilácticas comerciales contra el VPH existe un gran interés académico, corporativo e industrial en desarrollar estrategias alternativas para la obtención de candidatos vacunales contra el VPH. Los productores de países en vías de desarrollo también han mostrado interés en investigar sobre candidatos vacunales contra el VPH. Estos últimos deben decidir si tomar el camino más seguro de producir un biosimilar de las vacunas comerciales de primera generación o si dirigir los esfuerzos a desarrollar una nueva vacuna que pueda resolver una o más limitaciones inherentes de las vacunas actuales. Estas decisiones podrán verse afectadas por el desarrollo tecnológico y la capacidad financiera de los productores, unido a la percepción que se tenga de las barreras de la propiedad intelectual y los mercados potenciales. Afortunadamente, varias compañías productoras han anunciado sus programas de vacunas contra el VPH. Se espera que los candidatos vacunales de segunda generación, basados en la proteína L1, que inducen respuestas de anticuerpos de calidad, cantidad y duración comparables, sean similarmente efectivos a las vacunas comerciales. Los productores tienen a su favor que disponen de sistemas analíticos y modelos animales para evaluar los candidatos, pero se desconoce la relación entre la respuesta inmune de los candidatos basados en la proteína L2 y su eficacia clínica. Sin embargo, la habilidad de los candidatos basados en la proteína L2 de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes de amplia reactividad cruzada y protección en experimentos de reto contra diversos tipos del VPH, en varios modelos animales, muestran una fuerte racionalidad para su evaluación en ensayos clínicos. Una vacuna preventiva de amplio espectro, que pueda proteger contra el surgimiento de verrugas anogenitales y verrugas y que pueda ser administrada como parte de un programa nacional de vacunación de la infancia pudiera evitar las dificultades inherentes a la vacunación en la adolescencia y contribuir al control de la propagación de la infección por el VPH y con ello, del CCU y los cánceres asociados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Serrano B, Brotons M, Cosano R, Muñoz J, et al. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Cuba. Summary Report 7 October 2016 [consultado: 14 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/CUB.pdf>
2. Romanowski B. Long term protection against cervical infection with the human papillomavirus: review of currently available vaccines. *Human vaccines*. 2011;7(2):161-9.
3. Schiller JT, Muller M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Lancet Oncology*. 2015;16(5):e217-25.
4. Bryan JT. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine*. 2007;25(16):3001-6.
5. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy D, Schiller J. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(24):12180-4.

6. Garland SM, Smith JS. Human papillomavirus vaccines: current status and future prospects. *Drugs*. 2010;70(9):1079-98.
7. BIOPHARMA. Full monograph Gardasil, HPV vaccine, rDNA/Merck. Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets, 2013 Web database, (12th edition) [consultado: 3 de junio de 2014]. Disponible en: http://biopharma.fmsdb.com/full7.lasso?order=184&site=Fox&DB_test=&S=&-token=149408&-nothing
8. Castle PE, Maza M. Prophylactic HPV vaccination: past, present, and future. *Epidemiology and infection*. 2016;144(3):449-68.
9. BIOPHARMA. Full monograph Cervarix, HPV vaccine, HPV vaccine, rDNA/GSK. Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets, 2013 Web database, (12th edition) [consultado: 3 de junio de 2014]. Disponible en: http://biopharma.fmsdb.com/full7.lasso?order=184&site=Fox&DB_test=&S=&-token=149408&-nothing.
10. Ferris D, Samakoses R, Block SL, Lazcano-Ponce E, Restrepo JA, Reisinger KS, *et al.* Long-term study of a quadrivalent human papillomavirus vaccine. *Pediatrics*. 2014;134(3):e657-e65.
11. Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, de Borba PC, Sanchez N, *et al.* Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(8):2147-62.
12. Full monograph Human Papillomavirus (HPV) Vaccines, BIOPHARMA: Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets 2013 Web database, (12th edition) [consultado: 3 de junio de 2014]. Disponible en: http://biopharma.fmsdb.com/full7.lasso?order=183&site=Fox&DB_test=&S=&-token=149408&-nothing
13. Madrid-Marina V, Torres-Poveda K, Lopez-Toledo G, Garcia-Carranca A. Advantages and disadvantages of current prophylactic vaccines against HPV. *Archives of medical research*. 2009;40(6):471-7
14. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, *et al.* A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *The New England journal of medicine*. 2015;372(8):711-23.
15. Van Damme P, Meijer CJ, Kieninger D, Schuyleman A, Thomas S, Luxembourg A, *et al.* A phase III clinical study to compare the immunogenicity and safety of the 9-valent and quadrivalent HPV vaccines in men. *Vaccine*. 2016;34(35):4205-12.
16. Pediatrics AAo. Coadministration of a 9-Valent Human Papillomavirus Vaccine With Meningococcal and Tdap Vaccines. *Pediatrics*. 2015:peds. 2014-4199d.
17. Kosalaraksa P, Mehlsen J, Vesikari T, Forstén A, Helm K, Van Damme P, *et al.* An open-label, randomized study of a 9-valent human papillomavirus vaccine given concomitantly with diphtheria, tetanus, pertussis and poliomyelitis vaccines to healthy adolescents 11–15 years of age. *The Pediatric infectious disease journal*. 2015;34(6):627-34.
18. Petrosky E, Bocchini JA, Hariri S, Chesson H, Curtis CR, Saraiya M, *et al.* Use of 9-Valent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine: Updated HPV Vaccination Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2015;64(11).
19. PATH. Estrategias de vacunación contra el VPH. Recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud. 2010 [consultado: 13 de julio de 2016]. Disponible en: http://www.rho.org/aps/learn-vaccination_strategies.htm
20. Mach H, Volkin DB, Troutman RD, Wang B, Luo Z, Jansen KU, *et al.* Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *Journal of pharmaceutical sciences*. 2006;95(10):2195-206.
21. Zhao Q, Modis Y, High K, Towne V, Meng Y, Wang Y, *et al.* Disassembly and reassembly of human papillomavirus virus-like particles produces more virion-like antibody reactivity. *Virology journal*. 2012;9:52.
22. Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, *et al.* Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories*. 2014;13:141.
23. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert review of vaccines*. 2010;9(10):1149-76.
24. Zhao H, Lin ZJ, Huang SJ, Li J, Liu XH, Guo M, *et al.* Correlation between ELISA and pseudovirion-based neutralisation assay for detecting antibodies against human papillomavirus acquired by natural infection or by vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(3):740-6.

25. Hu YM, Huang SJ, Chu K, Wu T, Wang ZZ, Yang CL, et al. Safety of an Escherichia coli-expressed bivalent human papillomavirus (types 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine: an open-label phase I clinical trial. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(2):469-75.
26. Hilleman MR. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection.* 1987;15(1):3-7.
27. Lunsdorf H, Gurramkonda C, Adnan A, Khanna N, Rinas U. Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the hepatitis B surface antigen. *Microbial cell factories.* 2011;10:48.
28. Kniskern PJ, Hagopian A, Montgomery DL, Burke P, Dunn NR, Hofmann KJ, et al. Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1986;46(1):135-41.
29. Cook JC, Joyce JG, George HA, Schultz LD, Hurni WM, Jansen KU, et al. Purification of virus-like particles of recombinant human papillomavirus type 11 major capsid protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein expression and purification.* 1999;17(3):477-84.
30. Jansen KU, Cook III JC, George HA, Hofmann KJ, Joyce JG, Lehman ED, et al. Recombinant Papillomavirus Vaccines. U.S. 5,888,516 1997.
31. De Pourcq K, De Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology.* 2010;87(5):1617-31.
32. Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, Yoshida A, Ikenaga H, Takeuchi M, et al. Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(41):26298-304.
33. Kim KS, Park SA, Ko KN, Yi S, Cho YJ. Current status of human papillomavirus vaccines. *Clinical and experimental vaccine research.* 2014;3(2):168-75.
34. Inc. E. EG-HPV: Human papillomavirus vaccine based on Virus-Like Particle (VLP) technology (HPV 16 & 18 L1 VLP) and a novel proprietary immune adjuvant EGvac (adjuvant system CIA05+alum) that enhances the immune response against HPV through both B cell (humoral) and T cell (cellular) immune stimulation. 2015 [consultado: 7 de diciembre de 2015]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKewig-NXJxMrJAhWqqIMKHxuUAaIQFggcMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.biokorea.org%2Fupload_2013%2Fdownload.asp%3Ffn%3D20150304150729_001057.pdf%26fd%3DTECH&usg=AFQjCNHp00BKpFOW0Vcb0nsEofodjDTgPQ&bvm=bv.108538919,d.amc
35. Han JE, Wui SR, Park SA, Lee NG, Kim KS, Cho YJ, et al. Comparison of the immune responses to the CIA06-adjuvanted human papillomavirus L1 VLP vaccine with those against the licensed HPV vaccine Cervarix in mice. *Vaccine.* 2012;30(28):4127-34.
36. Kim H, Yoo SJ, Kang HA. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS yeast research.* 2014.
37. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology.* 2014;98(12):5301-17.
38. Bharati K, Ganguly NK. Does India need an indigenous HPV vaccine and why? *Journal of public health policy.* 2013;34(2):272-87.
39. India S/o. Research & Development. Product pipeline. 2016 [consultado: 19 de julio de 2016]. Disponible en: http://www.seruminstitute.com/content/prod_pipe2.htm
40. Hanumantha Rao N, Baji Babu P, Rajendra L, Sriraman R, Pang YY, Schiller JT, et al. Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. *Vaccine.* 2011;29(43):7326-34.
41. Zhang G, Shen Q, Lei J, Yuan J, Zhang M, Zhang Q, et al. Genes encoding major capsid protein L1 of human papilloma virus. *US 8,795,676 B2.* 2008.
42. Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Willmitzer L, Muller M. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *Journal of virology.* 2003;77(17):9211-20.
43. Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson A-L, et al. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *Journal of virology.* 2003;77(16):8702-11.
44. Maclean J, Koekemoer M, Olivier AJ, Stewart D, Hitzeroth, II, Rademacher T, et al. Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *The Journal of general virology.* 2007;88(Pt 5):1460-9.
45. Varsani A, Williamson AL, Rose RC, Jaffer M, Rybicki EP. Expression of Human papillomavirus type 16 major capsid protein in transgenic *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Archives of virology.* 2003;148(9):1771-86.

46. Schiller JT, Nardelli-Haeffliger D. Chapter 17: Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/147-53.
47. Zahin M, Joh J, Khanal S, Husk A, Mason H, Warzecha H, et al. Scalable production of HPV16 L1 protein and VLPs from tobacco leaves. *PloS one*. 2016;11(8):e0160995.
48. Waheed T. Expression of human papillomavirus-16 L1 capsomeres in chloroplasts of *Nicotiana tabacum*: a novel approach towards cost-effective second-generation vaccines against cervical cancer. PhD dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree Drnattedchn at the University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria. 2012.
49. Lossl AG, Waheed MT. Chloroplast-derived vaccines against human diseases: achievements, challenges and scopes. *Plant biotechnology journal*. 2011;9(5):527-39.
50. Waheed MT, Thones N, Muller M, Hassan SW, Razavi NM, Lossl E, et al. Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic research*. 2011;20(2):271-82.
51. Gersch ED, Gissmann L, Garcea RL. New approaches to prophylactic human papillomavirus vaccines for cervical cancer prevention. *Antiviral therapy*. 2012;17(3):425-34.
52. Hassett KJ, Meinerz NM, Semmelmann F, Cousins MC, Garcea RL, Randolph TW. Development of a highly thermostable, adjuvanted human papillomavirus vaccine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;94:220-8.
53. Cantarella G, Liniger M, Zuniga A, Schiller JT, Billeter M, Naim HY, et al. Recombinant measles virus-HPV vaccine candidates for prevention of cervical carcinoma. *Vaccine*. 2009;27(25-26):3385-90.
54. Lee HJ, Park N, Cho HJ, Yoon JK, Van ND, Oh YK, et al. Development of a novel viral DNA vaccine against human papillomavirus: AChERV-HP16L1. *Vaccine*. 2010;28(6):1613-9.
55. Baud D, Ponci F, Bobst M, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. Improved efficiency of a Salmonella-based vaccine against human papillomavirus type 16 virus-like particles achieved by using a codon-optimized version of L1. *Journal of virology*. 2004;78(23):12901-9.
56. Fraillery D, Baud D, Pang SY, Schiller J, Bobst M, Zosso N, et al. Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever. *Clinical and vaccine immunology: CVI*. 2007;14(10):1285-95.
57. Nardelli-Haeffliger D, Roden RB, Benyacoub J, Sahli R, Kraehenbuhl JP, Schiller JT, et al. Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated Salmonella typhimurium elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infection and immunity*. 1997;65(8):3328-36.
58. Vivotif® Typhoid Vaccine Live Oral Ty21a. Package Insert USA. September 2013. [consultado: 12 de septiembre de 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM142807.pdf>
59. Nardelli-Haeffliger D. Virus-like particles (VLPs) as vaccines, vectors and adjuvants. Mucosal Immunity induced by VLPs. Fondation Mérieux, Les Pensières - Annecy, France, 1 March - 2 April 2014. [consultado: 11 de Septiembre de 2014]. Disponible en: <http://www.globe-network.org/sites/default/files/en/network/resource/nardelli-haeffliger-mucosal-immunity-induced-by-vlps.pdf>
60. Roden RB, Yutzy WHt, Fallon R, Inglis S, Lowy DR, Schiller JT. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology*. 2000;270(2):254-7.
61. Gambhira R, Gravitt PE, Bossis I, Stern PL, Viscidi RP, Roden RB. Vaccination of healthy volunteers with human papillomavirus type 16 L2E7E6 fusion protein induces serum antibody that neutralizes across papillomavirus species. *Cancer research*. 2006;66(23):11120-4.
62. Gambhira R, Jagu S, Karanam B, Gravitt PE, Culp TD, Christensen ND, et al. Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *Journal of virology*. 2007;81(21):11585-92.
63. Pastrana DV, Gambhira R, Buck CB, Pang YY, Thompson CD, Culp TD, et al. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology*. 2005;337(2):365-72.
64. Karanam B, Jagu S, Huh WK, Roden RB. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunology and cell biology*. 2009;87(4):287-99.
65. Jagu S, Kwak K, Karanam B, Huh WK, Damotharan V, Chivukula SV, et al. Optimization of multimeric human papillomavirus L2 vaccines. *PloS one*. 2013;8(1):e55538.
66. Amanna IJ, Slifka MK. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunological reviews*. 2010;236:125-38.
67. Schellenbacher C, Kwak K, Fink D, Shafti-Kerammat S, Huber B, Jindra C, et al. Efficacy of RG1-VLP vaccination against infections with genital and cutaneous human papillomaviruses. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(12):2706-13.

68. Varsani A, Williamson AL, de Villiers D, Becker I, Christensen ND, Rybicki EP. Chimeric human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 particles presenting the common neutralizing epitope for the L2 minor capsid protein of HPV-6 and HPV-16. *Journal of virology*. 2003;77(15):8386-93.
69. Schellenbacher C, Roden R, Kirnbauer R. Chimeric L1-L2 virus-like particles as potential broad-spectrum human papillomavirus vaccines. *Journal of virology*. 2009;83(19):10085-95.
70. Takeda. Annual Report. Takeda Pharmaceutical Company Limited 2011 [consultado: 8 de diciembre de 2015]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjKysWR3szJAhXvuYMKHSFrDPQQFggdMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.takeda.com%2Finvestor-information%2Fannual%2Fpdf%2Findex%2Far2011_en.pdf&usq=AFQjCNGXCVc3SqNGml-MbubBdQIQQUqdkw
71. Nieto K, Weghofer M, Sehr P, Ritter M, Sedlmeier S, Karanam B, *et al.* Development of AAVLP(HPV16/31L2) particles as broadly protective HPV vaccine candidate. *PloS one*. 2012;7(6):e39741.
72. Nieto K, Stahl-Hennig C, Leuchs B, Muller M, Gissmann L, Kleinschmidt JA. Intranasal vaccination with AAV5 and 9 vectors against human papillomavirus type 16 in rhesus macaques. *Human gene therapy*. 2012;23(7):733-41.
73. Smith ML, Lindbo JA, Dillard-Telm S, Brosio PM, Lasnik AB, McCormick AA, *et al.* Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications. *Virology*. 2006;348(2):475-88.
74. Tumban E, Peabody J, Peabody DS, Chackerian B. A universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants. *Vaccine*. 2013;31(41):4647-54.
75. Hitzerth II, Passmore J-AS, Shephard E, Stewart D, Müller M, Williamson A-L, *et al.* Immunogenicity of an HPV-16 L2 DNA vaccine. *Vaccine*. 2009;27(46):6432-4.
76. Kim D, Gambhira R, Karanam B, Monie A, Hung C-F, Roden R, *et al.* Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine*. 2008;26(3):351-60.
77. Khallouf H, Grabowska AK, Riemer AB. Therapeutic vaccine strategies against human papillomavirus. *Vaccines*. 2014;2(2):422-62.
78. Jochmus-Kudielka I, Schneider A, Braun R, Kimmig R, Koldovsky U, Schneeweis KE, *et al.* Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(22):1698-704.
79. Lacey C, Thompson H, Monteiro E, O'Neill T, Davies M, Holding F, *et al.* Phase IIa safety and immunogenicity of a therapeutic vaccine, TA-GW, in persons with genital warts. *Journal of Infectious Diseases*. 1999;179(3):612-8.
80. Daayana S, Elkord E, Winters U, Pawlita M, Roden R, Stern PL, *et al.* Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. *British journal of cancer*. 2010;102(7):1129-36.
81. Kaufmann AM, Nieland JD, Jochmus I, Baur S, Friese K, Gabelsberger J, *et al.* Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). *International Journal of Cancer*. 2007;121(12):2794-800.
82. Fazeli M, Soleimanjahi H, Dadashzadeh S. Further stimulation of cellular immune responses through association of HPV-16 E6, E7 and L1 genes in order to produce more effective therapeutic DNA vaccines in cervical cancer model. *Iranian journal of cancer prevention*. 2015;8(1):18.
83. Fischer S, Bettstetter M, Becher A, Lessel M, Bank C, Krams M, *et al.* Shift in prevalence of HPV types in cervical cytology specimens in the era of HPV vaccination. *Oncology Letters*. 2016;12(1):601-10.
84. Safaeian M, Rodriguez AC. Invited commentary: multiple human papillomavirus infections and type replacement—anticipating the future after human papillomavirus vaccination. *American journal of epidemiology*. 2014;180(11):1076-81.
85. Kavanagh K, Pollock K, Potts A, Love J, Cuschieri K, Cubie H, *et al.* Introduction and sustained high coverage of the HPV bivalent vaccine leads to a reduction in prevalence of HPV 16/18 and closely related HPV types. *British journal of cancer*. 2014;110(11):2804-11.
86. Solares AM, Baladron I, Ramos T, Valenzuela C, Borbon Z, Fanjull S, *et al.* Safety and Immunogenicity of a Human Papillomavirus Peptide Vaccine (CIGB-228) in Women with High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: First-in-Human, Proof-of-Concept Trial. *ISRN obstetrics and gynecology*. 2011;article ID 292951:9 pages.
87. Soto Y, Torres G, Kouri V, Limia CM, Goicolea A, Capo V, *et al.* Molecular epidemiology of human papillomavirus infections in cervical samples from Cuban women older than 30 years. *Journal of lower genital tract disease*. 2014;18(3):210-7.
88. Soto Y, Kouri V, Limia C, Torres G, Goicolea B, López L, *et al.* Epidemiología Molecular de las Infecciones por Papilomavirus Humano en Mujeres Cubanas entre 15 y 59 años. 8th Cuban Congress on

- Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba. La Habana, October 14-16, 2014. 2014.
89. Santana H, Martínez E, Sánchez JC, Moya G, Sosa R, Hardy E, *et al.* Molecular characterization of recombinant human interferon alpha-2b produced in Cuba. *Biotechnol Apl.* 1999;16:154-9.
 90. Hernández L, Marrero MA. Streptokinase: about of a thrombolytic patented in Cuba. *Biología Aplicada.* 2005;22:191-8.
 91. Muzio V, Cinza Z, Ortega A, Véliz G, Delgado M, Delgado G, *et al.* Estudios postlicenciamiento de la vacuna cubana contra la hepatitis B. *Heberbiovac-HB Biología Aplicada April.* 2001:103-4.