

HUMAN PAPİLLOMAVİRÜS AŞILARI

Güzin ÖZARMAĞAN, Zeynep TOPKARCI

İstanbul Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
guzino@istanbul.edu.tr; ztopkarci@yahoo.com

ÖZET

Genital bölgenin prekanseröz lezyonları ve servikal kanser dünya çapında kadın sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardır. Servikal kanser ve displazide primer etyolojik ajan insan papillomavirüsü (HPV)'dir. Bundan dolayı HPV aşuları ile servikal kanser ve HPV ile ilişkili diğer maligniteler engellenebilir veya tedavi edilebilir. İki tip HPV aşısı vardır: 1- Profilaktik aşular nötralizan antikor oluşturmak için L1 viral kapsid proteininden oluşan virüs benzeri parçacıkları (VLP) kullanırlar. 2- Terapötik aşular viral E6 ve /veya E7 onkogenlerini hedef alan spesifik T hücrelerini üretmeyi amaçlar.

Eğer profilaktik ve terapötik HPV aşuları ile insanlar üzerinde başarılı sonuçlar elde edilirse onkojen HPV infeksiyonları ve ilişkili malign hastalıklar aşılama ile kontrol altına alınabilir. Ancak, aşuların kanser insidensi üzerine etkileri uzun yıllar içinde yapılacak çalışmalarla belirlenecektir.

Anahtar sözcükler: aşular, HPV, servikal kanser, virüs benzeri parçacıklar

SUMMARY

Human Papillomavirus Vaccines

Cervical cancer and precancerous lesions of the genital tract are major threats to the health of the women worldwide. Human papillomavirus is the primary etiologic agent of cervical cancer and dysplasia. Thus, cervical cancer and other HPV-associated malignancies might be prevented or treated by HPV vaccines. Two types of HPV vaccines can be distinguished: 1- Prophylactic vaccines are utilising virus-like particles composed of L1 viral capsid protein to induce neutralising antibodies. 2- Therapeutic vaccines are aimed at generating specific T cells targeted at viral E6 and/or E7 oncogens. If these prophylactic and therapeutic HPV vaccines prove successful in patients, then oncogenic HPV infection and its associated malignancies may be controlled by vaccination. The effects of HPV vaccines on future cancer incidence will only be known after decades of follow up.

Keywords: cervical carcinoma, HPV, vaccines, virus-like particles

Human papillomavirüsler (HPV) zarfsız, epiteliotrop, 55 nm'lik ikozahedral kapsidi olan DNA virüsleridir. Türe özgüllük gösterir ve sadece diferansiye skuamöz epitel hücrelerinde ürer. İlk kez 1981 yılında zur Hausen⁽⁴⁴⁾ tarafından HPV-servikal kanser ilişkisine değinilmiştir. Serviks kanseri dünyada kadınlar arasında 2. sıradaki kanser türüdür. Epidemiyolojik ve moleküler kanıtlar göstermektedir ki tüm servikal kanser olguları ve prekürsör intraepitelyal lezyonlar HPV'lerin birinden veya bir alttipinden kaynaklanmaktadır (2,31).

HPV İNFEKSİYONLARINDA PATOGENEZ

HPV genomu 8 kb'lık çift sarmal DNA'dan oluşmaktadır. Viral proteinleri kodlayan bütün dizinler (ORF) tek bir DNA sarmalı üzerindedir ve bütün papillomavirüslerde genetik organizasyon aynıdır. Viral genomda erken (E1-E7) ve geç (L1-L2) proteinleri kodlayan bölgeler (ORF) bulunur. Bazal keratinositleri hedef alan viral infeksiyonlardaki replikasyon zincirinde, viral proteinlerin yüksek derecede ekspresyonu ve viral yük, skuamöz epitelin stratum granulozumunda ve stratum

spinozumun farklılaşan keratinositlerinde ortaya çıkmaktadır (35).

HPV'ler epitel hücrelerinin farklılaşmalarını replikasyonları için kullanırlar. İnfeksiyon bazal tabakadaki kök hücrede başlar ve epizomal DNA replikasyonu olur. Viral çoğalma ile birlikte, bazal tabaka dışındaki bütün epidermal tabakalarda aşırı bir proliferasyon ve sonuçta akantoz, parakeratoz ve hiperkeratoz ortaya çıkmaktadır. E1, E2, E6, E7 proteinlerinin etkisiyle hücre bölünmesi vertikal biçimde ilerler; hücrelerin farklılaşması ve siklusun durması gecikir; hücreler replikasyonu olmayan keratinositlere dönüştüğünden, virüs yapısal proteinleri (L1, L2) sentezlenir. İyi huylu HPV lezyonlarında viral DNA infekte hücrenin çekirdeğinde, ancak kromozomun dışında, yani epizomal olarak bulunmaktadır. Ancak ağır displazi ve kanserlerde HPV-DNA'sının genellikle çekirdekle birleşmiş olduğu görülür. Erken proteinlerden E6 ve E7 kanserli hücrelerce sentezlenir ve bunlar HPV'yi transforme edici niteliktedir. E6 ve E7 erken proteinleri, Rb ve p53 hücrel proteinleriyle kompleksler oluşturabilirler⁽³⁵⁾.

HPV iyi bir immunojen değildir. Erken dönemde çift sarmal DNA aşaması olmadığından uyarı olmamakta, nükleoproteinler salgılanamamakta ve yanıt yetersizliği ortaya çıkmakta; geç dönemde ise E6/E7 ekspresyonu düşük düzeylerde seyretmekte, hücre lizisi, inflamasyonu ve sitoliz olmamakta, proliferasyon sürmekte ve E6 ve E7'nin interferon yanıtını aksatmasıyla tolerans gelişmektedir. Lezyonlarda MHC-1 yolundan antijen sunumu aksar ve sitotoksik T lenfositleri devreye giremez ve bundan dolayı yeterli tanıma oluşmaz. Bu nedenle HPV infeksiyonlarında başlangıçta var olan yanıt, daha sonra kaybolmaktadır.

HPV'ler büyük bir virüs ailesidir. Deri ve mukozaları infekte eder, epitelyal proliferasyonu artırır ve siğilleri ortaya çıkartırlar.

HPV'nin bugün için 130'dan fazla genotipi olup, infeksiyonun lokalizasyonuna göre kutanöz ve mukozal tipler olmak üzere ikiye ayrılmakta; malignite ile ilişkisine göre de yüksek riskli ve düşük riskli tipler olmak üzere iki alt grupta incelenmektedir⁽³⁹⁾ (Tablo 1).

Tablo 1: Servikal onkogenite açısından HPV'lerin sınıflandırılması⁽²⁷⁾.

Risk sınıflaması	HPV tipleri
Yüksek risk	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82
Orta risk	26,53,66
Düşük risk	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81
Riski belirlenmemişler	34,57,83

HPV 6 ve 11 ve bunlarla ilişkili olanlar anogenital siğillere sebep olur ve nadiren malign anogenital hastalıklarda tesbit edilirler. Bunlar düşük riskli, onkojenik olmayan tiplerdir.

HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 45, 58 ve ek olarak diğer 8-10 minör tip, onkojenik virüsler veya yüksek riskli HPV

tipleridir. Kadınlarda serviks, vulva ve anüs; erkeklerde penis ve anüs bölgesindeki kanserlerle ilişkilidir. En sık birliktelik servikal kanser ve yüksek riskli HPV-DNA arasındadır.

HPV infeksiyonları cinsel aktif erişkinlerde en yaygın cinsel yolla bulaşan hastalık olarak kabul edilmektedir^(26,27). Yüksek riskli HPV infeksiyonlarının bulaşıcılığı öncelikle cinsel yolla olmaktadır⁽²²⁾. Ayrıca horizontal ve vertikal geçişi de tanımlanmıştır⁽²⁵⁾. Geçişin bu alternatif yollarla da olması özellikle HPV ile ilişkili hastalıkları olan çocuklar açısından aşılama stratejileri üzerinde önemli rol oynamıştır.

HPV AŞILARI

Onkojenik HPV tipleri ile inatçı infeksiyonun servikal kanser gelişiminde rol oynamasından dolayı, aşılar üzerinde çalışılmaktadır. Bunlar viral nötralizan antikor salınımı ile yeni infeksiyonlara karşı koruyucu profilaktik aşılar ve HPV ile infekte epitelyal hücrelerde, hücrel immüniteyi arttıran terapötik aşılar şeklinde ikiye ayrılabilir^(34,38) (Tablo 2).

Tablo 2: HPV aşıları.

Profilaktik HPV aşıları
HPV L1 kapsid protein aşıları (VLP)
HPV L2 kapsid protein aşıları
Terapötik HPV aşıları
Viral vektör aşıları (Vaccinia virus aşıları, adenovirus aşıları, alfavirüs aşıları)
Bakteriyel vektör aşıları (Listeria aşıları, diğer bakteriyel aşılar (Salmonella, BCG))
Peptid/protein aşıları
Nükleik asid aşıları (DNA aşıları, RNA replikasyon aşıları)
Hücre kaynaklı aşılar (Dendritik hücre kaynaklı aşılar, tümör hücresi kaynaklı aşılar)
Kombine profilaktik ve terapötik aşılar
HPV şimerik VLP'ler, HPV psödovirion aşıları

*VLP: virus benzeri parçacıklar

PROFİLAKTİK HPV AŞILARI

Profilaktik aşılar, sonradan ortaya çıkabilecek temaslarda oluşacak hastalıklardan korur ve virüsün L1 ve daha az oranla da L2 proteinlerine karşı nötralizan antikor gelişimini hedef alırlar. Hücre kültürleri olmadığı için canlı HPV aşısı geliştirilememektedir, rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır^(29,38). Denatüre monomerik L1 nötralizan antikor yapamamaktadır fakat büyük deneysel ilerlemeler göstermiştir ki L1 proteini rekombinant bakülovirüs veya mantar gibi vektörlerce sunulunca, kendiliğinden virüs benzeri parçacıklara (VLP) dönüşmektedir^(21,43). VLP gerçek virion yapısına benzer ve immunojeniktir, ancak viral genom içermediği için zararlı değildir^(20,38). Yüksek titrede antikor sentezi sağlar.

Koruyucu aşılarda özelliği tip spesifik olmasıdır. Bundan

dolayı HPV 16 L1 VLP ile yapılacak aşılama HPV 16 enfeksiyonuna karşı koruyucu olurken diğer 34 tip genital HPV için koruyucu olmayabilir. Sadece HPV 6 ve HPV 11, HPV 31 ve HPV 33, HPV 18 ve HPV 45 nötralizan epitoplarnı ortak kullanmaktadır^(5,17). Servikal kanserde sıklıkla rastlanılan tipler olan HPV 16, 18, 31, 45 ve 59'a karşı yapılacak aşılama ile % 80 oranında, eklenecek diğer 6 tipler de % 90 oranında kansere karşı koruma sağlanabilir. Şu anda VLP aşılıları sadece HPV 16 ve HPV 18'i içermektedir. Merck ve GlaksoSmith Klein firmalarının tetraavalan (HPV 16, 18, 6, 11) aşı projeleri vardır.

VLP'ler sadece nötralizan antikor oluşturmamakta aynı zamanda hücrel yanıtı da uyarmaktadır⁽¹¹⁾. Bu da yardımcı T hücre epitoplarnının serolojik ayrı genotiplere karşı koruyabilirliği olabileceğini düşündürmektedir⁽¹⁵⁾.

Hayvan modellerine dayanılarak bu aşılıların virüsle karşılaşmadan önce yapılırsa etkin olacağı şeklinde varsayımlar bulunmaktadır. Genital HPV enfeksiyonu genellikle cinsel yolla bulaşır ve bu nedenle immunizasyon için seksüel olgunlaşmayı beklemeli, aşılama için hedef toplum 9-10 yaş prepubertal kız çocukları olmalıdır.

İmmüsuprese hastalarda kullanımıyla ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Oral veya intranazal uygulamalar denenmektedir, ancak henüz yeterli antikor cevabı alınmamıştır^(28,44).

Klinik çalışmalar

Sağlıklı gönüllülerde yapılan doz-araştırma faz 1 çalışmalarda 6 ayda bir yapılan toplam 3 doz 20-100 µg L1 VLP enjeksiyonu ile yüksek immunojenite ve yüksek titrede anti-L1 antikor oluşumu görülmüştür^(1,12,15,42).

Dominant antikor cevabı IgG1 alt tipidir^(12,23). Şu anda faz 3 çalışmalarda yeralan 2 tip L1 VLP aşısı vardır: 1-

GlaxoSmithKline çalışması ve 2- Merck çalışması (Tablo 3).

Aşılama ile persistan HPV 16 ve HPV 18 enfeksiyonlarına karşı koruyuculuğun olduğu gösterilen bu veriler, HPV 6, 11, 16 ve 18' i içeren tetraavalan aşı ile yapılan faz 2 etkinlik çalışmalarında da elde edilmiştir⁽⁴⁰⁾. Plasebo (n=233) ile karşılaştırıldığında dörtlü aşılama yapılan grupta (n=235) persistan HPV 6, 11, 16 ve 18 enfeksiyonlarında % 90 oranında azalma tesbit edilmiştir. Ayrıca aşılama grupta servikal intraepitelyal neoplazi (SIN) veya dış genital siğili (DGS) olan olgu bulunmamış, fakat plasebo grupta 3 SIN ve 3 DGS olgusu görülmüştür. Çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar güçlü şekilde kanıtlamaktadır ki, HPV 16 veya HPV 18 L1 VLP aşılması kadınları HPV 16 veya HPV 18 enfeksiyonlarına ve düşük dereceli intraepitelyal lezyonların oluşumuna karşı korumaktadır.

Koruyuculuk süresi

Faz 2 çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki aşılama sonrası antikor seviyeleri pik seviyelerden oldukça yavaş düşmektedir ve aşılama 48 hafta sonrasına kadar ölçülebilir seviyelerde seyretmektedir. Hayvan modellerinde dolaşan antikor seviyesinin düşük olmasına rağmen uzun süreli koruma görülmektedir⁽⁶⁾.

Doğal olarak enfekte olmuş kadınların % 50'sinde servikovaginal HPV-DNA'sının tesbitinden sonraki 10. yılında bile seropozitiflik saptanması⁽³⁾ aşılama sonrası virüsle temas durumunda aşının doğal güçlendirici etki yaratabileceğini düşündürmektedir.

VLP aşılıları yüksek titrede nötralizan serum antikoruna ortaya çıkartır ve koruma seviyesi ile serum antikor titresi arasında korelasyon olduğundan bahsedilmektedir⁽⁴²⁾. Lokal mukozal antikorun korumada aracılık etmediği düşünülmektedir⁽¹⁾. Serumdaki IgG'nin servikal epitelden virüs parçacık-

Tablo 3: HPV enfeksiyonundan korunmada kullanılan profilaktik aşılıların karşılaştırılması.

Çalışma	Koutsky ve ark. ⁽²³⁾ (Merck)	Harper ve ark. ⁽¹⁹⁾ (GlaxoSmithKline)
Tasarım	Randomize çift kör kontrollü	Randomize çift kör kontrollü
Yaş	16-25	15-25
Olgu sayısı	765 plasebo, 768 aşılı	553 plasebo, 560 aşılı
Yer	ABD'de 16 bölge	Kuzey Amerika ve Brezilya'da 32 bölge
Antijen	40 µg HPV-16 L1 VLP	20 µg HPV 16 L1 VLP 20 µg HPV 18 L1 VLP
Adjuvan	225 µg alüminyum hidroksifosfat sulfat	500 µg alüminyum hidroksit ve 50 µg 3-deaktilat monofosforil lipid (ASO4)
Aşılama programı	0., 2. ve 6. ay	0., 1. ve 6. ay
Takip	48 ay	27 ay
Doğal enfeksiyonla spesifik titrasyonun karşılaştırılması	60 kat daha fazla	HPV-16 için 50 kat HPV-18 için 80 kat daha fazla
Klinik sonuç	Persistan HPV-16 enfeksiyonuna karşı % 100 koruyucu. Histolojik veya sitolojik anormallik yok.	Persistan HPV-16 enfeksiyonuna karşı % 100 koruyucu. Sitolojik anormallikleri önlemede % 93 etkili.
Yan etki	Önemli yan etki yok	Önemli yan etki yok

larını bağlayabilecek yeterli yüksek konsantrasyonda geçtiği, infeksiyonu önlediği düşünülmektedir. Serum anti-L1 antikor seviyesi ve antikor cevabı koruma düzeyinin ölçümü için kritik immun belirteçler olabilir⁽³⁶⁾.

TERAPÖTİK AŞILAR

HPV infeksiyonuna karşı koruyucu olmak üzere geliştirilmekte olan aşılarda heyecan verici olsa da uzun yıllardan beri HPV ile infekte olmuş ve benign ve malign HPV ile ilişkili hastalıklara maruz kalan kişilerin sayısı giderek artmaktadır. Varolan HPV infeksiyonlarına çözüm olmazsa gelecek 20 yılda şimdiki infekte olan 5 milyon servikal kanserli hastanın kaybedileceği bilinmektedir. Bu nedenle etkin immunoterapiler araştırılmaktadır.

Servikal kanserlerde özellikle SIN 2/3'te, viral gen ekspresyonunda kısıtlamalar kaldırılmıştır ve E6 ve E7 genleri eksprese edilir. Bu onkogenlerin sürekli ekspresyonu hastalığın ilerlemesi ve malign fenotip kazanabilmesi için gereklidir. Sonuçta sadece iki olası antijenik hedef vardır: E6 ve E7. E6 ve E7 gen ürünleri tümörsüpresör genlerin (p53, pRB) işlevlerini bozarlar.

Hücrelerde ölümsüzlük ve onkojenik transformasyon gerçekleşir.

Terapötik aşılama amaç hücrel immunitenin uyarılmasıdır. CD4+ ve CD8+ T hücreleri uyarılarak sitotoksikite ve sitokinler aracılığı ile viral DNA'yı integre etmiş E6 ve E7 proteinlerini aşırı üreten infekte hücreler yıkılır. Terapötik aşı etkenle temas sonrasında, düşük dereceli hastalıkta ve yüksek dereceli intraepitelyal kanserde etkili olmalıdır. Aşılarla yenilmesi güç olan problemler SIN 2/3 ve invaziv kanserlerde neoplastik fenotiple ilişkilidir. Buna dayanarak terapötik aşılama için de cevapsızlık ile tam ve tama yakın iyileşmeye kadar çeşitli sonuçlar elde edilebilir.

İnsan hücrel proteinleri ile benzerlik göstermedikleri için kuramsal olarak otoimmun yanıtı tetikleme riskleri yoktur⁽³⁶⁾.

İlerlemiş servikal hastalığın kontrolünde HPV 16 spesifik T hücre cevabıyla ilgili INF γ 'nın önemli rolü olduğuna dair kanıtlar vardır^(10,33,41).

Çeşitli tipte terapötik aşılarda mevcuttur. Viral vektör (adenovirus, adeno-asosiated virus ve alfavirus) aşılı^(8,9,24); Bakteriyel vektör (*Listeria*, *Salmonella* ve BCG) aşılı^(7,18); Peptid/protein aşılarda^(13,16); Nükleik asid (DNA ve RNA) aşılı⁽³²⁾; Hücrel (dendritik hücre ve tümör hücre kaynaklı) aşılarda^(4,14) tanımlanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4: HPV aşılı ve klinik çalışmaları⁽³¹⁾.

	Antijen	HPV tipi	Hastalık grubu	Çalışma fazı	Sponsor
Profilaktik aşılarda					
VLP	L1	16/18		III	MedImmune/GSK
Rekombinant VLP	L1	6/11/16/18		III	Merck (www.merck.com)
VLP	L1	11		II	MedImmune/GSK
VLP	L1	16		II/III	NCI/Novavax
VLP	L1	16		III	Merck/CSL(www.merck.com)
DNA	L1	16		Preklinik	Merck/Vical(www.merck.com)
Plasmid DNA				Preklinik	Apollon/Wyeth-Lederle
Terapötik aşılarda					
Enkapsüle polinükleotid	E7	16	AIN/SIN	II	Zycos (www.zycos.com)
Füzyon proteini	E6-E7	16	SIN	I	CSL/Merck
Füzyon proteini	E7	16	SIN2/SIN3	II	Stressgen/Roche (www.stressgen.com)
Peptid	E7	16	SHK	I/II	Cytel Corp.
Dendritik hücre	E7	16/18	SHK	I	Deutsche Forschungsgemeinschaft
Peptid	E7	16	SHK	II	University of Queensland (www.cicr.uq.edu.au)
Peptid		16	SIN2/SIN3/SHK	Preklinik	Epimmune/Innogenetics
Rekombinant vaccinia	E6-E7	16/18	SIN3/SHK	II	Xenova (www.cantab.co.uk)
Rekombinant vaccinia	E6-E7	16/18	SIN3/SHK	I	Transgene
Füzyon proteini	E6-E7	16/18	SIN/SHK	II	Xenova (www.cantab.co.uk)
A0201 peptid	E7	16	SIN/VIN	I	Norris Comprehensive Cancer Center
BCG-HSP füzyon prt.	E7	16	Siğil	II	Stressgen/Roche (www.stressgen.com)
VLP	L1	6	Siğil	I	University of Queensland/CSL (www.cicr.uq.edu.au)
Şimerik aşılarda					
Füzyon proteini	L2-E6-E7	16/18		I/II	Xenova (www.cantab.co.uk)
Füzyon proteini	L2-E7	6	Siğil	II	Xenova/GSK (www.cantab.co.uk)
VLP	L1-E7	16		I/II	MediGene (www.medigene.com)
VLP	L1-E7	16		Preklinik	NCI/Novavax
VLP	L1-E7	16		Preklinik	University of Queensland (www.cicr.uq.edu.au)
Rekombinant BCG	L1-E7	16		Preklinik	University of Queensland (www.cicr.uq.edu.au)

VLP, virüs benzeri parçacık; AIN, anal intraepitelyal neoplazi; SIN, servikal intraepitelyal neoplazi; SHK, skuamöz hücreli karsinom; GSK, GlaksoSmithKlein

SONUÇ

HPV infeksiyonları genç kadınlar arasında görülen en sık cinsel yolla bulaşan hastalıktır. Birçok HPV infeksiyonu benign olmasına karşın persistan tiplerde yüksek oranda servikal malignite potansiyeli vardır. HPV aşılıları ile immunprofilaksi teorik olarak servikal kanseri korunabilir bir hastalık olarak göstermektedir ve önümüzdeki 1-2 yıl içerisinde bu aşilar lisans alacaktır. Etkin bir korunma oluşturulması için aşilama mutlaka prepubertal dönemde uygulanmalıdır. Şu an için aşiların izlem süreleri çok kısa olup, kanser insidansını düşürmeye olan etkileri ancak onlarca yıllık izlem sonrası belirlenebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Ault KA, Giuliano AR, Edwards RP et al: A phase I study to evaluate a human papillomavirus (HPV) type 18 L1 VLP vaccine, *Vaccine* 2004; 22(23-24):3004-7.
2. Bosch FX, Sanjose S: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality, *J Natl Cancer Ins Monogr* 2003;(31):3-13.
3. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP et al: Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection, *J Infect Dis* 2000;181(6):1911-9.
4. Chang EY, Chen CH, Ji H et al: Antigen specific cancer immunotherapy using a GM-CSF secreting allogenic tumor cell-based vaccine, *Int J Cancer* 2000;86(5):725-30.
5. Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Hall K, Leiserowitz GS: Monoclonal antibodies to HPV-6 L1 virus-like particles identify conformational and linear neutralizing epitopes on HPV-11 in addition to type-specific epitopes on HPV-6, *Virology* 1996;224(2):477-86.
6. Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Han R, Kreider JW: Immunization with viruslike particles induces long term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus, *J Virol* 1996;70(2):960-5.
7. Chu NR, Wu HB, Wu TC, Boux LJ, Siegel MI, Mizzen LA: Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7, *Clin Exp Immunol* 2000;121(2):216-25.
8. Daemen T, Pries F, Bungener L, Kraak M, Regts J, Wilschut J: Genetic immunization against cervical carcinoma: induction of cytotoxic T lymphocyte activity with a recombinant alphavirus vector expressing human papillomavirus type 16 E6 and E7, *Gene Ther* 2000;7(21):1859-66.
9. Davidson EJ, Boswell CM, Sehr P et al: Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins, *Cancer Res* 2003;63(18):6032-41.
10. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM et al: Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6, *Cancer Res* 2004;64(15):5449-55.
11. Emeny RT, Wheeler CM, Jansen K et al: Priming of human papillomavirus type 11- specific humoral and cellular immune responses in college-aged women with a virus-like particle vaccine, *J Virol* 2002;76(15):7832-42.
12. Evans TG, Bonnez W, Rose RC et al: A phase I study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers, *J Infect Dis* 2001;183(10):1485-93.
13. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP et al: Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells, *Eur J Immunol* 1993;23(9):2242-9.
14. Ferrara A, Nonn M, Sehr P et al: Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer II: results of a clinical pilot study in 15 individual patients, *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129(9):521-30.
15. Fife KH, Wheeler CM, Koutsky LA et al: Dose-ranging studies of the safety and immunogenicity of human papillomavirus Type 11 and Type 16 virus-like particle candidate vaccines in young healthy women, *Vaccine* 2004;22(21-22):2943-52.
16. Gerard CM, Baudson N, Kraemer K et al: Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumour growth, *Vaccine* 2001;19(17-19):2583-9.
17. Giroglou T, Sapp M, Lane C et al: Immunological analyses of human papillomavirus capsids, *Vaccine* 2001;19(13-14):1783-93.
18. Gunn GR, Zubair A, Peters C, Pan ZK, Wu TC, Paterson Y: Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papillomavirus -16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16, *J Immunol* 2001;167(11):6471-9.
19. Harper DM, Franco EL, Wheeler C et al: Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial, *Lancet* 2004;364(9447):1757-65.
20. Harro CD, Pang YY, Roden RB et al: Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine, *J Natl Cancer Inst* 2001;93(4):284-92.
21. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT: Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic, *Proc Natl Acad Sci* 1992;89(24):12180-4.
22. Kjaer SK, Chackerian B, van der Brule AJ et al: High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse), *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(2):101-6.
23. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM et al: A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine, *N Engl J Med* 2002;347(21):1645-51.
24. Liu DW, Tsao YP, Kung JT et al: Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer, *J*

- Virology 2000;74(6):2888-94.
25. Mant C, Cason J, Rice P, Best JM: Non-sexual transmission of cervical cancer-associated papillomaviruses: an update, *Papillomavirus Rep* 2000;11:1-5.
 26. Maw R: Critical appraisal of commonly used treatment for genital warts, *Int J STD AIDS* 2004;15(6):357-64.
 27. Munoz N, Bosch FX, De Sanjose S et al: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer, *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
 28. Nardelli-Haeffliger D, Roden R, Balmelli C, Potts A, Schiller J, De Grandi P: Mucosal but not parenteral immunization with purified human papillomavirus type 16 virus-like particles induces neutralizing titers of antibodies throughout the estrous cycle of mice, *J Virol* 1999;73 (11): 9609-13.
 29. Rapini RP: *Dermatology*, s.1217-35, Mosby Co., Barcelona (2003).
 30. Rensing ME, van Driel WJ, Brandt RM et al: Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma, *J Immunother* 2000;23(2):255-66.
 31. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J et al: Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia, *JAMA* 2001;286(24):3106-14.
 32. Smahel M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V: Modified HPV16 E7 genes as DNA vaccine against E7-containing oncogenic cells, *Virology* 2001; 281(2):231-8.
 33. Smyth LJ, Van Poelgeest MI, Davidson EJ et al: Immunological responses in women with human papillomavirus type 16 (HPV-16) associated anogenital intraepithelial neoplasia induced by heterologous prime-boost HPV-16 oncogene vaccination, *Clin Cancer Res* 2004;10(9):2954-61.
 34. Stanley MA: Genital papillomaviruses-prospects for vaccination, *Curr Opin Infect Dis* 1997;10(1):55-61.
 35. Stanley MA: Pathobiology of Human Papillomaviruses, *Viruses, Cell Transformation and Cancer*, s.129-44, Elsevier, London (2000).
 36. Stanley MA: HPV vaccines. Best practice and research, *Clin Obstet Gynaecol* 2006;20(2):1-15.
 37. Ting PT, Dytoch MT: Therapy of external anogenital warts and molluscum contagiosum: a literature review, *Dermatol Ther* 2004;17(1):68-101.
 38. Tjalma WA, Arbyn M, Paavonen J, Waes TR, Bogers JJ : Prophylactic human papillomavirus vaccines: the beginning of the end of cervical cancer, *Int J Gynecol Cancer* 2004;14(5):751-61.
 39. Tjong MY, Out TA, TerSchegget J, Burger MP, Van Der Vange N: Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract: a review, *Int J Gynecol Cancer* 2001;11(9):9-17.
 40. Villa LL, Costa RL, Petta CA et al: Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial, *Lancet Oncol* 2005;6(5):271-8.
 41. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ et al: Frequent display of human papillomavirus type-16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter, *Cancer Res* 2003;63(3):636-41.
 42. White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA: In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16, *J Virol* 1998;72(2):959-64.
 43. Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH: Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles, *Virology* 1991;185(1):251-7.
 44. zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application, *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-50.

