



Vacunas terapéuticas contra el VPH: envío de antígenos al retículo endoplásmico

El cáncer de cérvix es una neoplasia maligna que se encuentra relacionada con la presencia del virus del papiloma humano (VPH). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que cada año aparecen cerca de 530,000 nuevos casos y 270,000 muertes en el mundo, y que alrededor de 85% de estos casos se presenta en países subdesarrollados.¹

La distribución mundial de los tipos de VPH es alta y variable, pero se ha reportado una mayor prevalencia de los tipos 16, 18, 31, 52 y 58,² los cuales han sido reportados como virus de alto riesgo oncogénico.³ Las reinfecciones persistentes por VPH predisponen al desarrollo de cáncer, el cual inicia por la integración del genoma viral en la célula y la expresión de las proteínas virales oncogénicas, E6 y E7, que provocan la inactivación de los genes supresores de tumor p53 y pRB, respectivamente, iniciando así con la malignización celular.⁴

Los tratamientos contra el cáncer consisten en la reducción y eliminación de las células tumorales por qui-

mioterapia y radioterapia o la remoción del tumor por cirugía; sin embargo, no suelen ser del todo efectivas y se presentan casos de reincidencia y metástasis.⁵

En los últimos años se han desarrollado vacunas profilácticas para prevenir la infección por VPH, las cuales consisten en la generación de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas estructurales L1/L2 del virus, éstas impiden la entrada viral en la célula y su diseminación; dichas vacunas ya son comercializadas y aplicadas en la población generando altos niveles de protección.⁶

En cuanto al desarrollo de tratamientos terapéuticos, las oncoproteínas E6 y E7 han sido tema de numerosas investigaciones debido a su rol en el desarrollo del cáncer, así como los epítomos que presentan; sin embargo, aún se presentan barreras para obtener una vacuna terapéutica eficiente.⁷

* Universidad Autónoma de Nuevo León.

** Instituto Mexicano del Seguro Social.

Contacto: mariegu_loera@yahoo.com.mx

La mayoría de las estrategias se han enfocado en despertar una respuesta inmune celular, ya que es la más efectiva para la eliminación de células malignizadas. En esta revisión recopilamos los trabajos más relevantes de los últimos años enfocados a despertar una respuesta inmune celular mediante la estrategia del direccionamiento de antígenos al retículo endoplásmico.

EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

El retículo endoplásmico (RE) recibe de manera cotraduccional y postraduccional todas las proteínas destinadas a la vía secretora, a los lisosomas o a la incorporación a la membrana plasmática; esto gracias a una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos llamada péptido señal (SP, por sus siglas en inglés), presente en el extremo N-terminal. Una vez en retículo endoplásmico, las proteínas recién sintetizadas sufren modificaciones postraduccionales, plegamiento y ensamblaje por acción de proteínas con propiedades de chaperonas, isomerasas, peptidasas, oxidoreductasas, entre otras, para posteriormente ser empaquetadas en vesículas y enviadas al aparato de Golgi.

En el caso de las proteínas que no logran ser plegadas de manera adecuada, o cuando se presenta un exceso de proteínas a procesar en retículo endoplásmico, se genera una respuesta aguda de estrés en este orgánulo (también conocida como respuesta a proteínas mal plegadas o UPR, por sus siglas en inglés) que consiste en la activación de genes involucrados en el procesamiento de las proteínas,

con el fin de eliminar la sobrecarga, por medio de la vía de degradación asociada a retículo endoplásmico (ERAD, por sus siglas en inglés), la cual culmina con la ubiquitinización y degradación de dichas proteínas en el proteosoma,^{8,9} sin embargo, cuando el estrés es crónico se activa el proceso de muerte celular programada o apoptosis.¹⁰

PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

En condiciones fisiológicas normales, las células del sistema inmune participan en un proceso de inmunovigilancia para detectar infecciones o alteraciones en las células y éstos se realiza a través del reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) tipo I y II. El MHC-I se expresa en todas las células nucleadas y presenta epítomos de proteínas intracelulares; mientras que el MHC-II se expresa en las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), como macrófagos y células dendríticas, y presenta epítomos de proteínas exógenas; sin embargo, estas células también pueden presentar dichos epítomos por MHC-I mediante el proceso llamado presentación cruzada de antígeno.¹¹

La formación del MHC-I se lleva a cabo en el retículo endoplásmico donde se integra con una cadena pesada anclada a la membrana, una cadena corta soluble de β 2-microglobulina y un epítomo de 8 a 10 aminoácidos cargado en la hendidura de la porción distal de la cadena pesada para ser presentado al receptor TCR (*T-cell receptor*) de los linfocitos. Este complejo presenta principal-



mente epítomos provenientes de proteínas intracelulares degradadas por el proteosoma (incluyendo aquellas derivadas de la vía ERAD), los cuales pueden ser productos de proteínas propias, derivadas del mecanismo de eliminación de proteínas no funcionales, y de proteínas no propias, como antígenos de virus o bacterias.¹²

También se han descrito otras fuentes de péptidos para presentación por MHC-I como la transferencia de péptidos por uniones tipo gap entre células vecinas, la generación de péptidos a través de los productos defectuosos ribosomales (DRiPs, por sus siglas en inglés) y los péptidos ligados generados por el *splicing* alternativo en el core 20S del proteosoma.¹³

Los péptidos generados en el citosol deben ingresar al retículo endoplásmico y esto se logra a través de proteínas de transporte asociado a presentación de antígeno (TAP, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la eficiencia con que esto ocurre es baja, ya que se ha reportado que por cada 10^4 proteínas degradadas sólo se presenta 1 epítomo por MHC-I en la membrana celular.¹⁴ Una vez que dichos péptidos logran entrar al retículo endoplásmico, éstos son editados a través de una serie de cortes en su extremo N-terminal por acción de las aminopeptidasas asociadas a presentación de antígenos (ERAAP, por sus siglas en inglés), formando así los epítomos que serán presentados por el MHC-I.^{15,16}

Además, se sabe que las células tumorales o infectadas por virus han generado mecanismos de evasión al sistema inmune, siendo el más destacado la disminución de la expresión de moléculas de MHC-I para impedir la presentación de antígenos.¹⁷ Por lo anterior, desde hace años se ha trabajado en estrategias que ayuden a direccionar de manera más eficaz los antígenos a las vías de presentación por MHC y de esta manera lograr una mejor activación de la respuesta inmune.¹⁸

ENVÍO DE ANTÍGENOS AL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO A TRAVÉS DE CHAPERONAS

Se ha descrito que la inmunización con chaperonas del retículo endoplásmico obtenidas a partir de lisados de células tumorales o infectadas por virus es capaz de despertar una respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8+, y que dicho efecto se atribuye a que durante la expresión de proteínas en la célula afectada, hay un gran porcentaje de antígenos específicos del tumor o virus,

que se encuentran formando complejos con las chaperonas.¹⁹ Estos complejos son procesados por las vías previamente descritas así como por la vía de presentación cruzada de antígeno, la cual amplifica la respuesta inmune obtenida al compararla con utilizar el antígeno solo.²⁰ Debido a estas observaciones, se ha optado por realizar fusiones génicas de antígenos con diversas chaperonas mediante el uso de la ingeniería genética.

La calreticulina es una proteína chaperona de 63 kDa residente en el lumen del retículo endoplásmico, por lo cual presenta un péptido señal y una señal KDEL, para su retención en este orgánulo, además de sitios de unión a Ca^{+2} .²¹ Ésta es una de las proteínas que participan en el complejo de carga de antígeno (PLC, por sus siglas en inglés), compuesto además por las proteínas de transporte asociado a presentación de antígeno (TAP), la tapasina, ERp57 y calnexina.²² Además, la calreticulina también presenta funciones como regulador de los niveles citosólicos de Ca^{+2} , y como señal de fagocitosis para células preapoptóticas, entre otras funciones.²³

En un estudio *in vitro* se determinó que la deficiencia de calreticulina provoca una disminución del MHC-I, ya que participa estabilizándolo para su migración a la membrana celular.²⁴ Asimismo, se ha reportado que participa en la recaptura y reciclaje de dicho complejo desde el aparato de Golgi y favorece el cargado correcto de los epítomos.²⁵

Otra característica importante de la calreticulina es su rol en la membrana celular como señal para estimular la fagocitosis de células apoptóticas por fagocitos profesionales y no profesionales. Este proceso ha sido catalogado como muerte inmunogénica.^{26,27} Sin embargo, se ha demostrado que esta señal se encuentra bloqueada por la expresión de CD47, por lo que algunos tratamientos que interfieren con CD47 han demostrado mejorar la respuesta inmune.²⁸

Se ha reportado que al fusionar el antígeno E7 del VPH16 a calreticulina, e inmunizar ratones con dichas construcciones se obtiene un aumento de la respuesta inmune específica al antígeno.^{29,30} Asimismo, en un estudio comparativo con vacunas de ADN donde se fusionó el antígeno E7 del VPH16 a señales de envío a lisosomas o a calreticulina, HSP70 o la exotoxina A de *P. aeruginosa* para su direccionamiento al retículo endoplásmico, se observó que con el envío dirigido hacia el RE, y en particular mediante la fusión a calreticulina, se obtiene una mayor respuesta inmune antitumoral específica.³¹ Poste-



riormente se demostró que este sistema era reproducible para la proteína E6 del VPH16, donde además se utilizó la señal VP22 del virus del herpes simple tipo I para la diseminación intercelular del antígeno, con lo cual se podría aumentar el número de células que presenten el antígeno. Con esta estrategia se obtuvo una buena protección; sin embargo, la fusión a calreticulina prevaleció como la mejor estrategia para la obtención de un mayor número de linfocitos CD8+ específicos, así como una mejor respuesta antitumoral.³² A pesar de esto, se ha reportado que estas vacunas antitumorales no eran eficaces en estadios avanzados de la enfermedad, por lo que se ha optado por combinarlas con terapias adyuvantes,^{33,34} así como continuar con la búsqueda para mejorar los resultados. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios de evaluación de la respuesta inmune empleando la calreticulina fusionada a diversos antígenos, que han resultado en un aumento de linfocitos CD8+ específicos, así como en una mayor supervivencia en los ensayos antitumorales *in vivo* tanto en modelos profilácticos como terapéuticos de la enfermedad.^{29,30,35-38} Donde además se ha buscado no sólo mejorar la presentación de antígenos, sino también la supervivencia y funcionalidad de las células presentadoras de antígeno con el objetivo de optimizar dicho mecanismo.³⁹

Hay que mencionar que hay múltiples fusiones de los antígenos del VPH a otras chaperonas residentes del retículo endoplásmico, como a gp96, la cual fue capaz de

generar una respuesta celular tipo Th1 reduciendo así el crecimiento tumoral;³⁴ lo mismo se reportó con la fusión de un epítipo de E7 a las chaperonas ER-60, tapasina y calnexina.⁴⁰ Sin embargo, la fusión a calreticulina es una estrategia que ha avanzado en diversos ensayos preclínicos y clínicos.⁴¹

Por otro lado, en estudios recientes se ha reportado que la sobreexpresión de calreticulina en algunos tipos de cáncer está relacionada con la capacidad de invasión celular y metástasis; esto posiblemente se deba a la participación de la calreticulina en la homeostasis de Ca^{+2} intracelular así como en múltiples vías de señalización involucradas en la adhesión y motilidad celular.⁴² Esto representa una posible desventaja en el uso de las estrategias que involucren la sobreexpresión de proteínas propias de la célula, ya que esto podría afectar el equilibrio intracelular; aun así, deben realizarse más estudios para determinar si la sobreexpresión transitoria de la calreticulina que ocurre durante la inmunización representa un verdadero riesgo.

DIRECCIONAMIENTO DE ANTÍGENOS UTILIZANDO UN PÉPTIDO SEÑAL

Como ya mencionamos anteriormente, el péptido señal consiste en una pequeña secuencia de aminoácidos presente en el extremo N-terminal de todas las proteínas destinadas a la vía secretora, y éste es escindido durante la maduración de la proteína. Su principal función es en-

marcar el envío de las proteínas recién sintetizadas a su orgánulo correspondiente; además, se ha reportado que en algunos casos esta señal puede estar involucrada en la regulación de los niveles de transcripción del gen asociado.⁴³

Se ha demostrado que epítomos cortos de 9-11 aminoácidos expresados por minigenes fusionados a un péptido señal pueden entrar directamente al retículo endoplásmico y derivar en un aumento en la presentación de estos epítomos por el MHC-I.^{44,45} Esto representa una buena estrategia para mejorar la presentación de antígenos ya que aumenta la presencia del epítomo específico en el retículo endoplásmico, y gracias a su tamaño podría pasar directamente a ser cargado al MHC-I; sin embargo, es necesario mencionar que existen limitantes debido a los distintos haplotipos de MHC de la población. Por lo anterior, se siguen buscando estrategias que involucren el uso de proteínas completas o tandems de epítomos, que al ser degradados nos puedan otorgar los epítomos más inmunogénicos para cada individuo.

FUSIÓN DE ANTÍGENOS A UNA SEÑAL KDEL

Debido a la dinámica que presenta el retículo endoplásmico, pueden presentarse pérdidas de proteínas residentes de este orgánulo hacia el cis-Golgi o, eventualmente, al espacio extracelular; por lo tanto, es necesaria la presencia de señales específicas que permitan su recaptura hacia el retículo endoplásmico.⁴⁶ Para esto existen principalmente dos señales, KDEL (para proteínas solubles) y KKXX (para proteínas transmembranales), la primera muestra valores de mayor eficiencia en la recaptura de proteínas desde compartimentos post-RE.⁴⁷

La señal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) se encuentra en el extremo C-terminal de las proteínas residentes en el lumen del retículo endoplásmico. Esta señal interacciona con el receptor KDEL presente en membranas de vesículas posRE, donde su afinidad aumenta en las condiciones ligeramente ácidas de las vesículas de la vía secretora, pero decrece en el pH neutro del retículo endoplásmico.⁴⁸

En un estudio se demostró que el antígeno E7 fusionado a KDEL podía ser usado como una estrategia para direccionamiento intracelular y mejorar así la presentación de antígenos por células dendríticas cultivadas *in vitro*, las cuales al ser utilizadas *in vivo* demostraron que son capaces de generar una regresión tumoral y un aumento en la supervivencia de los ratones tratados;⁴⁹ induciendo la producción de TNF- α IFN- γ .⁵⁰ Esto nos sugiere

que no solamente la fusión de los antígenos a proteínas residentes del retículo endoplásmico promueve una mejora en la respuesta inmune específica, sino también el aumentar la estada de los mismos en el retículo endoplásmico es capaz de promover un efecto similar.

DIRECCIONAMIENTO DE ANTÍGENOS AL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO A TRAVÉS DE LA EXOTOXINA A DE PSEUDOMONAS

Otra estrategia para direccionar antígenos al retículo endoplásmico consiste en utilizar las características propias de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha toxina por sí sola es capaz de translocarse desde el espacio extracelular hacia el retículo endoplásmico y afectar la síntesis de proteínas debido a su acción de ADP-ribosilasa, convirtiéndose así en una herramienta para estudios de citotoxicidad antitumoral y en una estrategia para el direccionamiento de antígenos al RE.⁵¹

Inicialmente se evaluó la fusión de E7 a la exotoxina A (la cual carecía del dominio catalítico, PE(Δ III)) en vacunas de ADN, generando una respuesta CD8+ específica, así como la capacidad de erradicar tumores establecidos.⁵² Posteriormente, al evaluar una fusión similar en un sistema de vacunas proteicas, se determinó que el dominio II era insuficiente para despertar una respuesta inmune específica, pero que al añadir la señal de KDEL en el extremo C-terminal se lograba obtener dicha respuesta.⁵³ Los autores de este trabajo mencionan que la señal KDEL podría aumentar la estada del antígeno en el RE, lo que podría traducirse en un mejor procesamiento y presentación del antígeno. Asimismo, en otros trabajos se han evaluado otras construcciones, en las que se ha concluido que es necesaria la coadministración de las fusiones PE(Δ III)/E6 y PE(Δ III)/E7 para obtener un efecto protector total;⁵⁴ así como el uso de las proteínas PE(Δ III) y KDEL fusionadas a E6 y E7 en combinación de agentes quimioterapéuticos,⁵⁵ donde además se demostró que versiones de E6 y E7 no oncogénicas presentan una mayor inmunogenicidad que sus formas nativas.

ENVÍO Y RETENCIÓN DE ANTÍGENOS EN RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

En nuestro equipo de investigación se ha trabajado con la estrategia de fusionar antígenos a las señales de envío y retención en retículo endoplásmico. En un primer traba-

jo se evaluó la fusión del antígeno E7 al péptido señal y la señal KDEL de la calreticulina (SP-E7-KDEL); esta construcción se probó mediante terapia génica adenoviral en un modelo murino de cáncer *in situ*, obteniendo un potente efecto antitumoral y la liberación de IFN- γ de manera específica de antígeno;⁵⁶ esto concuerda con experimentos posteriores en los que hemos probado esta misma estrategia con vacunas de ADN que expresan versiones mutantes de los antígenos E6 y E7 sin capacidad oncogénica, las cuales son administradas por biobalística en un modelo murino terapéutico de cáncer *in situ* o metastásico con resultados muy prometedores (artículo pendiente de publicación). Actualmente nos encontramos evaluando el grado de participación de cada una de las señales en el efecto antitumoral observado, así como el posible mecanismo de procesamiento de los antígenos para la activación del sistema inmune.

Por todo lo anterior, creemos que la fusión del péptido señal de la calreticulina en el extremo N-terminal y la señal KDEL al extremo C-terminal de un antígeno puede ser una estrategia segura y eficaz para despertar una respuesta inmune antitumoral. Esta estrategia podría ser utilizada con otros antígenos en los que sea necesario despertar una respuesta inmune de tipo celular. Sin embargo, se necesitarán más estudios para esclarecer a detalle su mecanismo de acción, así como su efectividad en otros modelos.

CONSIDERACIONES FINALES

Hemos recapitulado diversas estrategias de inmunización con antígenos del VPH fusionados a chaperonas, o fragmentos de ellas, con el fin de enviarlos (y aumentar su

Tabla I. Incógnitas no resueltas sobre el sistema de envío dirigido de antígenos a retículo endoplásmico.

Puntos de interés
¿La sobreexpresión de antígenos en retículo endoplásmico puede causar una respuesta de estrés en dicho orgánulo?
En caso de generarse el estrés en RE, ¿se genera una respuesta para sobrevivencia o muerte celular?
¿A qué factor se le atribuye la mejora en la respuesta inmune: al aumento de la presentación de antígeno o a la presentación cruzada del mismo? ¿O es resultado de un sinergismo entre ambas?
¿Podría generarse algún efecto adverso (como autoinmunidad) por la sobreexpresión de proteínas propias de la célula?
¿Podrían mejorar los efectos observados con esta estrategia al realizar modificaciones a los antígenos (como aumentar la susceptibilidad a degradación)?
¿Funcionará esta estrategia en otros padecimientos?

estadía) al retículo endoplásmico, las cuales han demostrado ser eficaces en la mejora de la respuesta inmune obtenida; sin embargo, los mecanismos involucrados aún son desconocidos. A pesar de enfocarnos en el cáncer cervical, el uso de estas estrategias no está restringido a este padecimiento, por lo que pueden ser aplicadas en otros tipos de tumores, así como con distintos sistemas adyuvantes, mejorando así las perspectivas terapéuticas.

Algunos de los eventos que suponemos podrían estar involucrados se basan en la sobreexpresión de los antígenos en retículo endoplásmico y posiblemente la activación de una respuesta de estrés en retículo endoplásmico.⁵⁷ En aquellas células en las cuales la inmunización promueva una expresión prolongada (debido al vector de expresión) se podría activar la apoptosis, y posteriormente la fagocitosis por APC de los fragmentos celulares cargados con antígenos solos o fusionados a chaperonas, generando así un proceso de presentación cruzada que podría aumentar la respuesta inmune. Mientras que aquellas células que solamente generen una respuesta de estrés en retículo endoplásmico de manera aguda, podría procesarse el antígeno mediante la vía ERAD, y esto generaría péptidos que podrían reingresar a retículo endoplásmico para ser presentados por el MHC-I. Sin embargo, ambos procesos pueden estar involucrados en mejorar la respuesta inmune específica para el antígeno en cuestión.

A pesar de que estas estrategias han demostrado ser efectivas, hay algunos factores (mencionados a lo largo de la revisión) que deben analizarse durante el diseño de los candidatos a vacunas basados en estas estrategias para garantizar la funcionalidad y seguridad de los mismos; asimismo, es importante resolver algunas incógnitas (tabla I) acerca del procesamiento de antígenos para la presentación de epítotos y cómo utilizar este conocimiento para la obtención de vacunas terapéuticas contra esta y otras enfermedades.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer (Ed.^(Eds).
2. Bruni L., Diaz M., Castellsagué X., Ferrer E., Bosch FX., de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, 202(12), 1789-1799 (2010).
3. Muñoz N., Bosch FX., de Sanjosé S. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated

- with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527 (2003).
4. Münger K., Howley P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89(2), 213-228 (2002).
 5. Denny L. Cervical cancer: prevention and treatment. *Discov Med*, 14(75), 125-131 (2012).
 6. Toft L., Storgaard M., Müller M. et al. Comparison of the Immunogenicity and Reactogenicity of Cervarix(R) and Gardasil(R) Human Papillomavirus Vaccines in HIV-infected Adults: A Randomized, Double-Blind, Clinical Trial. *J Infect Dis*, (2013).
 7. Sasagawa T., Takagi H., Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother*, 18(6), 807-815 (2012).
 8. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32(5-6), 235-249 (2002).
 9. Boelens J., Lust S., Offner F., Bracke M.E., Vanhoecke B.W. Review. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs. *In Vivo*, 21(2), 215-226 (2007).
 10. Martinon F. The endoplasmic reticulum: a sensor of cellular stress that modulates immune responses. *Microbes Infect*, 14(14), 1293-1300 (2012).
 11. Shresta S., Pham C.T., Thomas D.A., Graubert T.A., Ley T.J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol*, 10(5), 581-587 (1998).
 12. Imai J., Hasegawa H., Maruya M., Koyasu S., Yahara I. Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol*, 17(1), 45-53 (2005).
 13. Neeffjes J., Jongmsa M.L., Paul P., Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, 11(12), 823-836 (2011).
 14. Yewdell J.W. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol*, 11(7), 294-297 (2001).
 15. Hearn A., York I.A., Bishop C., Rock K.L. Characterizing the specificity and cooperation of aminopeptidases in the cytosol and endoplasmic reticulum during MHC class I antigen presentation. *J Immunol*, 184(9), 4725-4732 (2010).
 16. Kanaseki T., Lind K.C., Escobar H. et al. ERAAP and tapasin independently edit the amino and carboxyl termini of MHC class I peptides. *J Immunol*, 191(4), 1547-1555 (2013).
 17. Hewitt E.W. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, 110(2), 163-169 (2003).
 18. Gross G., Margalit A. Targeting tumor-associated antigens to the MHC class I presentation pathway. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 7(2), 99-109 (2007).
 19. Srivastava P.K. Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes. *Curr Oncol Rep*, 7(2), 104-108 (2005).
 20. Binder R.J., Srivastava P.K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol*, 6(6), 593-599 (2005).
 21. Sönnichsen B., Füllekrug J., Nguyen Van P., Diekmann W., Robinson D.G., Mieskes G. Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 107 (Pt 10), 2705-2717 (1994).
 22. Wright C.A., Kozik P., Zacharias M., Springer S. Tapasin and other chaperones: models of the MHC class I loading complex. *Biol Chem*, 385(9), 763-778 (2004).
 23. Gold L.I., Eggleton P., Sweetwyne M.T. et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*, 24(3), 665-683 (2010).
 24. Gao B., Adhikari R., Howarth M. et al. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity*, 16(1), 99-109 (2002).
 25. Howe C., Garstka M., Al-Balushi M. et al. Calreticulin-dependent recycling in the early secretory pathway mediates optimal peptide loading of MHC class I molecules. *EMBO J*, 28(23), 3730-3744 (2009).
 26. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*, 13(1), 54-61 (2007).
 27. Obeid M. ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *J Immunol*, 181(4), 2533-2543 (2008).
 28. Raghavan M., Wijeyesakere S.J., Peters L.R., Del Cid N. Calreticulin in the immune system: ins and outs. *Trends Immunol*, 34(1), 13-21 (2013).
 29. Cheng W.F., Hung C.F., Chai C.Y. et al. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest*, 108(5), 669-678 (2001).
 30. Gomez-Gutierrez J.G., Elpek K.G., Montes de Oca-Luna R., Shirwan H., Sam Zhou H., McMasters K.M. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother*, 56(7), 997-1007 (2007).
 31. Kim J.W., Hung C.F., Juang J. et al. Comparison of HPV DNA vaccines employing intracellular targeting strategies. *Gene Ther*, 11(12), 1011-1018 (2004).
 32. Peng S., Trimble C., Ji H. et al. Characterization of HPV-16 E6 DNA vaccines employing intracellular targeting

- and intercellular spreading strategies. *J Biomed Sci*, 12(5), 689-700 (2005).
33. Mao C.P., Hung C.F., Kang T.H. et al. Combined administration with DNA encoding vesicular stomatitis virus G protein enhances DNA vaccine potency. *J Virol*, 84(5), 2331-2339 (2010).
 34. Mohit E., Bolhassani A., Zahedifard F., Taslimi Y., Rafati S. The contribution of NT-gp96 as an adjuvant for increasing HPV16 E7-specific immunity in C57BL/6 mouse model. *Scand J Immunol*, 75(1), 27-37 (2012).
 35. Kim T.W., Hung C.F., Zheng M. et al. A DNA vaccine co-expressing antigen and an anti-apoptotic molecule further enhances the antigen-specific CD8+ T-cell immune response. *J Biomed Sci*, 11(4), 493-499 (2004).
 36. Kim D., Gambhira R., Karanam B. et al. Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine*, 26(3), 351-360 (2008).
 37. Peng S., Ji H., Trimble C. et al. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. *J Virol*, 78(16), 8468-8476 (2004).
 38. Peng S., Tomson T.T., Trimble C., He L., Hung C.F., Wu T.C. A combination of DNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 generates potent antitumor effects. *Gene Ther*, 13(3), 257-265 (2006).
 39. Kim D., Hoory T., Wu T.C., Hung C.F. Enhancing DNA vaccine potency by combining a strategy to prolong dendritic cell life and intracellular targeting strategies with a strategy to boost CD4+ T cell. *Hum Gene Ther*, 18(11), 1129-1139 (2007).
 40. Lin C.T., Chang T.C., Chao A. et al. Enhancement of DNA vaccine potency through linkage of antigen gene to ER chaperone molecules, ER-60, tapasin, and calnexin. *J Biomed Sci*, 12(2), 279-287 (2005).
 41. Ma B., Maraj B., Tran N.P. et al. Emerging human papillomavirus vaccines. *Expert Opin Emerg Drugs*, 17(4), 469-492 (2012).
 42. Zamanian M., Veerakumarasivam A., Abdullah S., Rosli R. Calreticulin and cancer. *Pathol Oncol Res*, 19(2), 149-154 (2013).
 43. Alken M., Rutz C., Köchl R. et al. The signal peptide of the rat corticotropin-releasing factor receptor 1 promotes receptor expression but is not essential for establishing a functional receptor. *Biochem J*, 390(Pt 2), 455-464 (2005).
 44. Leifert J.A., Rodríguez-Carreno MP, Rodríguez F, Whitton J.L. Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways. *Immunol Rev*, 199, 40-53 (2004).
 45. Anderson K., Cresswell P., Gammon M., Hermes J., Williamson A., Zweierink H. Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med*, 174(2), 489-492 (1991).
 46. Dancourt J., Barlowe C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem*, 79, 777-802 (2010).
 47. Stornaiuolo M., Lotti L.V., Borgese N. et al. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Mol Biol Cell*, 14(3), 889-902 (2003).
 48. Wilson D.W., Lewis M.J., Pelham H.R. pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem*, 268(10), 7465-7468 (1993).
 49. Yin R., Zheng W., Hao F., Yang X.C., Zhong B.Y., Li Q.J. HPV16E7 tumor antigen modified by KDEL sequence induce specific cytotoxic T lymphocytes-dependent antitumor immunity. *J Dermatol Sci*, 55(2), 116-122 (2009).
 50. Wheeler M.C., Rizzi M., Sasik R., Almanza G., Hardiman G., Zanetti M. KDEL-retained antigen in B lymphocytes induces a proinflammatory response: a possible role for endoplasmic reticulum stress in adaptive T cell immunity. *J Immunol*, 181(1), 256-264 (2008).
 51. Wolf P, Elsässer-Beile U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol*, 299(3), 161-176 (2009).
 52. Hung C.F., Cheng W.F., Hsu K.F. et al. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res*, 61(9), 3698-3703 (2001).
 53. Liao C.W., Chen C.A., Lee C.N. et al. Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic responses and antitumor effects. *Cancer Res*, 65(19), 9089-9098 (2005).
 54. Cheng W.F., Chang M.C., Sun W.Z. et al. Fusion protein vaccines targeting two tumor antigens generate synergistic anti-tumor effects. *PLoS One*, 8(9), e71216 (2013).
 55. Chen S., Liao C., Lai Y. et al. De-oncogenic HPV E6/E7 vaccine gets enhanced antigenicity and promotes tumoricidal synergy with cisplatin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46(1), 6-14 (2014).
 56. Loera-Arias M.J., Martínez-Pérez A.G., Barrera-Hernández A et al. Targeting and retention of HPV16 E7 to the endoplasmic reticulum enhances immune tumour protection. *J Cell Mol Med*, 14(4), 890-894 (2010).
 57. Martinon F. Targeting endoplasmic reticulum signaling pathways in cancer. *Acta Oncol*, 51(7), 822-830 (2012).