



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 247**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06733077 .9**
96 Fecha de presentación : **25.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1874312**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Tratamiento para neoplasias intraepiteliales anogenitales inducidas por VPH.**

30 Prioridad: **27.04.2005 EP 05103447**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.07.2011

73 Titular/es: **Leiden University Medical Center
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL**

72 Inventor/es: **Van der Burg, Sjoerd, Hendricus;
Offringa, Rienk;
Melief, Cornelis, Johannes, Maria y
Helmerhorst, Theodorus, Jozef, Maria**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 363 247 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento para neoplasia intraepitelial anogenital inducida por VPH

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular a las áreas de inmuno-modulación, inmunoterapia y profilaxis de infecciones por VPH y de enfermedades neoplásicas.

Antecedentes de la invención

[0002] Las infecciones de tracto anogenital con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo son muy comunes (1-3), causando lesiones en, sobre y/o alrededor de las áreas del ano, recto, pene, vulva, vagina y cérvix. Afortunadamente, la mayoría de los sujetos infectados se curan de la infección (4; 5). Una infección persistente con un VPH de alto riesgo, principalmente VPH16, puede producir una neoplasia del tracto anogenital, entre las cuales la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y el cáncer cervical son las más conocidas (6; 7). La infección del VPH 16 también puede producir un trastorno de piel crónico de a) la vulva conocido como neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) (8-10), b) del ano llamado neoplasia intraepitelial anal (NIA), c) de la vagina designado como NIVA y d) del pene conocido como NIP. A diferencia de la NIC, que en general se trata eficazmente por erradicación del área implicada, estas otras enfermedades tienen una naturaleza crónica con índices de recaída altos después de tratamientos estándar (11-13).

[0003] El uso de modificadores inmunitarios, que producen reacciones inflamatorias, se ha aplicado para el tratamiento de la NIV. En particular una terapia con Imiquimod se ha presentado como un método alternativo para tratar la NIV. Químicamente, el imiquimod es 1-(2-metilpropilo)-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-4-amina. Este modificador de respuesta inmune actúa a través de un receptor de tipo Toll 7 del sistema inmunitario innato dando como resultado la secreción de una multitud de citoquinas proinflamatorias, entre las cuales se encuentra el interferón. Existen pruebas recientes de que el imiquimod también posee una actividad directa pro-apoptótica contra células tumorales (14-16). La aplicación tópica preserva la anatomía y función de la vulva, mientras que la extirpación quirúrgica o la ablación de la piel afectada puede ser extensiva e implicar el riesgo de desfigurar al paciente y puede producir una morbilidad psicosexual considerable. Los índices de éxito clínico difieren y se estiman en un 30-87% (17-21).

[0004] Los antígenos precoces E2, E6 y E7 de VPH 16 se encuentran entre las primeras de las proteínas que se expresan en los epitelios infectados por VPH. Los estudios precedentes sobre una inmunidad de células T específicas al VPH contra estos antígenos precoces mostraron que la memoria de célula T (IFN- γ) de tipo 1 contra los antígenos precoces se puede detectar en la mayoría de individuos saludables y sexualmente activos, pero es débil o está ausente en pacientes con neoplasia cervical inducida por VPH16 (22-24). En combinación con los informes anteriores que demuestran que las células T CD4+ tienen una función importante en la protección contra una infección progresiva por VPH (revisado en 25), los datos sostienen que la respuesta de células T CD4+ de tipo 1 contra los antígenos precoces del VPH 16 puede tener una función importante en la protección contra una enfermedad progresiva inducida por el VPH 16.

[0005] El objetivo de la invención actual consiste por lo tanto en proporcionar métodos mejorados y medios para el tratamiento de neoplasias intraepiteliales inducidas de modo viral del tracto ano-genital, tales como NIV, NIC, NIVA, NIP y NIA.

Resumen de la invención

[0006] La invención es tal y como se define en las reivindicaciones.

[0007] La invención consigue su objetivo mediante el examen para determinar si un sujeto ha desarrollado una respuesta inmune contra antígenos virales precoces. La presente invención demuestra un papel decisivo de la inmunidad de célula T específica al VPH en el éxito o fracaso del tratamiento con modificadores inmunitarios causantes de una inflamación local tales como compuestos activadores de TLR como el imiquimod. La especificación proporciona un análisis detallado con respecto a la magnitud y a la polarización de citoquina de la respuesta de células T CD4+ específicas al VPH16 en pacientes con una NIV de alto grado. La invención demuestra que la exposición crónica del sistema inmunitario a las proteínas virales del VPH produce la inducción de la inmunidad de células T de interferón gamma (IFN γ) en aproximadamente la mitad de los pacientes. De manera importante, la presencia de estas respuestas de células T de tipo 1 (IFN γ) se asocia con una respuesta favorable clínica al tratamiento con modificadores inmunitarios, tales como el imiquimod usado en este ejemplo. Las implicaciones de la invención son que, para poder realizar un tratamiento eficaz con modificadores inmunitarios causantes de una inflamación local, se debe determinar primero una respuesta inmune contra antígenos precoces de VPH. En caso de ausencia de ésta, se puede promover una respuesta inmune contra antígenos precoces de VPH a través de métodos conocidos en la técnica, con el fin de obtener resultados óptimos de tratamiento con compuestos de modificación inmunitaria causantes de respuestas inflamatorias locales. Como se ha demostrado, el uso de modificadores inmunitarios tales como el imiquimod es mucho menos o para nada eficiente en individuos que no tienen una respuesta de células T CD4+ contra antígenos virales precoces, por lo que este grupo de sujetos puede ser tratado primero con medicamentos de manera a producir una respuesta de células T contra antígenos virales. Si no es lo suficientemente exitoso, los individuos refractarios se tratan preferiblemente con otros medios que pueden ser más eficientes, tales como una escisión quirúrgica o ablación de la piel afectada o medicación alternativa. Por otra parte, los efectos secundarios negativos del tratamiento con modificadores inmunitarios causantes de una inflamación local, tales como, picor, ardor y dolor, se pueden evitar en el

grupo de individuos donde dichos compuestos y/o composiciones son menos efectivos o incluso inefectivos, debido a la ausencia de una respuesta inmune contra antígenos virales precoces.

Descripción detallada de la invención

5 [0008] La presente invención provee medios de tratamiento de un sujeto por neutralización de una neoplasia intraepitelial anogenital comprendiendo al menos las etapas que consisten en:

- i) determinar si el sujeto tiene una reactividad de células T con respecto a antígenos virales; y
- ii) un tratamiento local ulterior de la neoplasia con compuestos de modulación inmunitaria que produce una inflamación local, en un paciente que muestra la reactividad de células T contra antígenos de VPH en la fase i).

10 [0009] La reactividad de las células T a antígenos virales, en particular a antígenos de VPH, más particularmente proteínas E2, E6 y E7 de VPH de tipo de alto riesgo, tales como VPH 16, VPH 18 y VPH 33, se puede determinar en muestras de sangre y células aisladas de éstas, usando ensayos estándar tales como los que están descritos en la sección de ejemplos de esta especificación y/o en los ensayos de proliferación de célula T según el documento WO 02/070006, ensayos ELISPOT de INF γ , ensayos múltiple de citoquinas o ensayos ELISA. En particular se ha demostrado que una respuesta de célula T CD4+ que produce el IFN γ (respuesta de células T de tipo 1) es muy apropiada para el tratamiento local de neoplasias intraepiteliales de tracto ano-genital con modificadores inmunitarios. Una respuesta inmune de CD4+ contra antígenos virales precoces o epítomos unidos en moléculas MHC de clase II es en particularmente apropiada. Una parte de la invención es la activación de células que presentan antígenos profesionales tales como células dendríticas, macrófagos y células NK, que son útiles para producir una reacción inflamatoria local efectiva contra células infectadas virales y/o neoplasias en el área anogenital.

20 [0010] Una respuesta de célula T citotóxica CD8+, respondiendo a epítomos virales unidos a MHC de clase I, puede mejorar también una respuesta inmune efectiva contra células infectadas por VPH, en particular en el epitelio anogenital.

25 [0011] La respuesta inmune e inflamación local inducidas aquí, es inducida por un compuesto de modificación inmunitaria como se identifica en la reivindicación 1. Estos compuestos de modificación inmunitaria son capaces de inducir una inflamación local y/o producir una respuesta inflamatoria local.

[0012] Los compuestos de activación inmunitaria comprenden compuestos tales como Imidazoquinolinas (ejemplos: Imiquimod y/o R-848/resiquimod), loxoribina (7-allil-8-oxoguanosina) y bropirimina (2-amin-5-allil-8-oxoguanosina), que han demostrado tener actividades antivíricas y inmuno-estimuladoras potentes y son capaces de inducir citoquinas proinflamatorias tales como, IFN- α , TNF- α , IL-6 y/o IL-12.

30 [0013] Otros compuestos que se pueden aplicar para estimular o también mejorar una respuesta inflamatoria local comprenden quimioquinas y citoquinas que arquean los elementos del trayecto inflamatorio. Los ejemplos son las interferonas de tipo I (interferón α y β) y las citoquinas, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 (CXCL8) y IL-12 y/o las quimioquinas CXCL-1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 13 CCL-2, 3, 4, 5, 11, 18, 20, 27 XCL-1 y CX3CL-1.

35 [0014] Las composiciones farmacéuticas a utilizar según la invención son especialmente adecuadas para el tratamiento de neoplasias intraepiteliales anogenitales inducidas por infecciones virales, en particular por infecciones producidas por Virus del Papiloma Humano (VPH), más particularmente de los tipos de alto riesgo, que comprenden tipos de HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, y 68. No obstante, también otras infecciones o coinfecciones en estas regiones epiteliales con (mico)bacterias, hongos y/u otros virus, tales como los virus del herpes (HSV-1 HPV-2), VIH y/o Citomegalovirus (CMV), que se deben a una deficiencia del sistema inmunitario para proteger contra éstos, se pueden tratar adecuadamente por los métodos y los medicamentos según esta invención. La invención es adecuada para tratar cualquier mamífero (co-)infectado con virus VPH, HSV y CMV, y resulta más adecuada en seres humanos y/o pacientes.

45 [0015] La neoplasia que debe ser tratada según la presente invención puede ser cualquier neoplasia inducida por VPH, preferiblemente en un tejido epitelial, en el área ano-genital y/o tracto ano-genital, comprendiendo la vulva, la vagina, el cérvix, el pene, el escroto, el ano y el recto. Los trastornos neoplásicos que tratar incluyen la Neoplasia Intraepitelial Cervical de varios grados (NIC I, II y III), Neoplasias Intraepiteliales Vulvares de varios grados (NIV I, II y III) y neoplasias intraepiteliales vaginales (NIVa) y neoplasia anal intraepitelial (NAI). Los sujetos masculinos, que también sufren de neoplasias virales inducidas en el área y/o tracto ano-genital, tal como pero sin limitarse a éstas, neoplasia intraepitelial del pene (NIP) y neoplasia anal intraepitelial (NAI), se pueden tratar según esta invención.

50 [0016] En una forma de realización particularmente preferida, la presente invención comprende una etapa para incitar (de novo) o mejorar una respuesta inmune (ya existente) contra una infección viral. Se ha demostrado que una respuesta de célula T, y en particular una respuesta de célula T CD4+, es particularmente ventajosa para esta invención. Por consiguiente, tal respuesta de célula T, puede ser generada, acelerada, prolongada o mejorada a través de varios métodos conocidos en la técnica de inmunología y vacunación. Una respuesta inmune se puede promover o incrementar contra uno o más antígenos virales, en particular VPH, antígenos precoces, aunque los antígenos de otros virus y antígenos (mico)bacterianos también se pueden utilizar o incluso combinar. Se prefiere particularmente el uso de uno o más antígenos precoces de VPH seleccionados a partir de las proteínas tempranas de VPH, E2, E6 y E7 de tipos de alto riesgo. Muchos epítomos CTL y auxiliares T, capaces de inducir respuestas de célula T por ensayos ELISPOT con IFN γ han sido identificados por los presentes inventores (WO 02/070006). Se prefiere el uso de péptidos de longitud

específica, lo suficientemente largos para evitar una unión directa en la ranura MHC. Unos péptidos más largos, preferiblemente más largos que aproximadamente 12, más preferiblemente, aproximadamente 15, 18, y aún más preferiblemente desde 22 hasta 45 aminoácidos, requieren un tratamiento y son lo suficientemente largos como para ser tomados y procesados internamente por células que presentan antígenos profesionales, tales como células dendríticas.

5 El epítipo preferido comprendiendo péptidos de la proteína VPH16 E7 comprende extensiones de aminoácido 1-22 31-52, 41-62, 43-77, 51-72 y 77-98 de SEC ID N° 1. Un epítipo preferido comprendiendo péptidos de la proteína VPH16 E2 comprende extensiones de aminoácidos 31-75, 91-120, 151-195, 271-300, 286-315, 301-330, 316-345 y 331-365 de SEC ID N° 2. Un epítipo preferido comprendiendo péptidos de la proteína VPH16 E6 comprenden extensiones de aminoácido 31-52, 81-102, 91-112, 111-132, 121-158 y 131-1S2 de SEC ID N° 3. La selección de péptidos y epítopos

10 virales adecuados comprendidos ahí no depende del tipo de HLA del sujeto a tratar sino, entre otros factores, de las infecciones virales particulares de las que es portador. El experto en la materia podrá encontrar fácilmente y sustituir las extensiones de aminoácido de estos péptidos VPH16, para los péptidos correspondientes a partir de otros tipos de VPH de alto riesgo y altamente homólogos.

[0017] La administración de antígenos virales para obtener una respuesta de célula T, en particular una respuesta de célula T CD4+, se puede combinar con la administración del receptor CD40 y/o agonistas receptores 4-1-BB. Estos pueden ser anticuerpos (agonísticos) de manera a mejorar y/o prolongar una respuesta inmune de vacunación peptídica por la activación de células dendríticas, que ayudarán en la construcción de una respuesta inflamatoria local.

[0018] Típicamente antes o después de determinar si la respuesta de célula T CD4+ contra antígenos virales está presente, el tratamiento de sujetos con trastornos intraepiteliales del tracto ano-genital según la invención puede consistir en una primera administración de antígenos. Puede por ejemplo comprender una inyección con uno o más antígenos de alto riesgo E2, E6 y/o E7 de VPH, comprendiendo preferiblemente péptidos con epítopos como se ha descrito anteriormente, que puedan ser administrados solos o bien en distintas composiciones farmacéuticas componiendo varios adyuvantes conocidos per se. Preferiblemente se usa un esquema de vacunación que produce una fuerte respuesta de células T específica de antígenos precoces de VPH, preferiblemente de células T CD4+ de tipo 1, que se asocian particularmente a la producción específica de antígenos y de interferón- γ . Los esquemas de vacunación y el uso de adyuvantes se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente a través de la bibliografía publicada en la base de datos online PubMed y puede encontrarse también por ejemplo en Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience 2004. En el valor máximo de la respuesta de células T, comprendiendo una fuerte respuesta de células T CD4+, que generalmente es de aproximadamente 1 a 2 semanas (pero no limitado a este periodo) después de la última

20 vacunación, el agente o los agentes de modificación inmunitaria se aplican localmente en o sobre las lesiones a tratar. El agente de modificación inmunitaria, preferiblemente un agente que induce la inflamación tal como descrito anteriormente se puede aplicar tópicamente por varios métodos conocidos por el médico experto. Esto se puede efectuar por ejemplo usando una pomada o crema, o por aplicación con parches transdérmicos o puede ser inyectado en o alrededor de o cerca de la lesión intraepitelial a tratar. En intervalos regulares el agente inmunitario modificador se aplica localmente para sostener la inflamación local hasta que la lesión haya desaparecido. Opcionalmente, las dosis de refuerzo de los antígenos virales se pueden administrar durante este tratamiento para prolongar o mejorar la respuesta de las células T y mejorar el resultado clínico del tratamiento. Alternativamente, la aplicación local de agentes de modificación inmunitaria o preferiblemente de inducción de inflamación, precede y/o se desarrolla durante y/o después de los procesos de inmunización/vacunación.

[0019] La presente solicitud describe también medicamentos nuevos para su uso en el método de tratamiento según esta invención. La formulación de medicamentos, vías de administración y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables son habituales y se conocen en la técnica y se describen por ejemplo en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21nd Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la invención pueden así comprender ligantes tales como la lactosa, celulosa y derivados de éstos, polivinilpirrolidona (PVP), humectantes, promotores de desintegración, lubricantes, desintegrantes, almidón y derivados de éstos, solubilizantes de azúcar, adyuvantes estimuladores inmunitarios u otros excipientes. La invención provee métodos y medios para formular y producir nuevos medicamentos y/o formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de neoplasias intraepiteliales anogenitales y/o infecciones de estas epiteliales en sujetos que tienen un resultado positivo en una respuesta de células T contra antígenos virales tales como antígenos de VPH, CMV y HSV, en particular antígenos precoces de VPH de alto riesgo. Estos medicamentos comprenden como componente activo un compuesto de modulación inmunológica, capaz de inducir una respuesta inflamatoria local, tal como identificado en la reivindicación 1, que es extremadamente adecuado para su uso en composiciones farmacéuticas y medicamentos según la invención.

[0020] Estos compuestos son Imidazoquinolinas (por ejemplo Imiquimod y/o R-848/resiquimod), loxoribina (de 7 alil-8-oxoguanosina), bropirimina (2-amin-5-alil-8-oxoguanosina) y derivados y análogos de éstas.

[0021] Una composición farmacéutica a utilizar según la invención puede comprender opcionalmente uno o más compuestos capaces de estimular adicionalmente una respuesta inflamatoria local, tales como quimioquinas y citoquinas que son parte de la trayectoria o cascada inflamatoria. Unos ejemplos son el uso de interferones de tipo 1 (α y β) y las citoquinas IL-1, de TNF- α , IL-6, IL-8 (CXCL8) y IL-12 o las quimioquinas CXCL1, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 13 CCL2, 3, 4, 5, 11, 18, 20, 27 XCL-1 y CX3CL1. Además, las sustancias y los compuestos capaces de producir una estimulación de estas citoquinas y quimioquinas in situ también se pueden mezclar de forma apropiada en las composiciones farmacéuticas y medicamentos de esta invención.

[0022] También se describe un conjunto de partes, comprendiendo preferiblemente al menos uno o más componentes

seleccionados a partir de:

un agente de modificación inmunitaria, preferiblemente un agente para inducir la inflamación,

un compuesto o una composición comprendiendo quimioquinas y/o citoquinas capaz de estimular adicionalmente una respuesta inflamatoria local,

5 una vacuna del VPH comprendiendo péptidos derivados del VPH, y/o

péptidos y reactivos del VPH para la detección de una respuesta inmune celular contra el VPH.

Definiciones

[0023] La neoplasia intraepitelial es un crecimiento celular precanceroso, un sinónimo de la displasia. La Neoplasia Intraepitelial Cervical (abreviado "NIC") es una condición cervical provocada por virus sexualmente transmisibles tales como el Virus del Papiloma Humano de alto o bajo riesgo. El NIC también se llama Displasia Cervical. El NIC se clasifica como I, II o III según su gravedad. Se considera que es una anomalía precancerosa. La forma más leve, NIC I raramente se transforma en cáncer. Las formas más graves, NIC II y NIC III pueden desarrollarse en malignidades si no se tratan adecuadamente. La Neoplasia Intraepitelial Vulvar (NIV) es la presencia de células anormales en la piel vulvar. Esto puede ocurrir en un área o en diferentes áreas de la piel vulvar al mismo tiempo. La NIV evoluciona también en tres grados o fases diferentes de gravedad, similares a la NIC. La NIVA se identifica como neoplasia intraepitelial vaginal y es la neoplasia análoga de la vagina.

[0024] Las formas masculinas de neoplasias intraepiteliales comprenden la neoplasia intraepitelial de pene (NIP). La neoplasia intraepitelial de pene es una enfermedad precancerosa rara de la capa de piel (epidermis) externa del pene. También se denomina Eritroplasia de Queyrat, enfermedad de Bowen del pene, carcinoma de célula escamosa in situ del pene o N.I.P.. Las lesiones aparecen normalmente en el glande o aspecto interno del prepucio y casi siempre se detectan en hombres no circuncisos. Si no se trata, el 10 a 30% de los casos evolucionan en carcinoma (cáncer) de célula escamosa invasiva del pene. Los hombres no circuncisos mayores de 50 años tienen más riesgo de contraer Neoplasia intraepitelial de pene, y es raro que ocurra en hombres más jóvenes. La neoplasia intraepitelial de pene se asocia con una infección crónica al Virus del Papiloma Humano (VPH), la causa de verrugas genitales, y supresión inmunitaria por medicamentos o enfermedades.

[0025] La neoplasia anal intraepitelial (NAI) se produce tanto en hombres como en mujeres y se cree que es un precursor de cáncer de célula escamosa anal. Su incidencia está aumentando en grupos de alto riesgo, particularmente aquellos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La etiología de la NAI se vincula intrínsecamente con los virus del papiloma humano, aunque no se excluye la infección o coinfección por otros virus. Aún no existe ninguna gestión estándar para la NAI y se debe principalmente a las dificultades en el diagnóstico como en el tratamiento. Se ha probado una variedad de opciones de tratamiento con logros variables. La cirugía se asocia a una recurrencia significativa, particularmente en pacientes VIH positivos.

[0026] La neoplasia intraepitelial también se refiere a lesiones intraepiteliales escamosas, para las cuales se distinguen formas de alto y bajo grado, análogos a la fase I de NIV, NIC, NIP, NIVa o NIA o fases II - III respectivamente.

35 Leyendas de figuras

Figura 1

[0027] A, unas células mononucleares periféricas de sangre recién aisladas de 20 pacientes con NIV de alto grado asociada al VPH16 fueron evaluadas en ensayos de proliferación a corto plazo usando un conjunto completo de depósitos de péptidos de VPH16 derivados de E2, E6, y E7. Las respuestas fueron positivas cuando la proliferación (cpm) de ≥ 6 de 8 pocillos de prueba superaba la proliferación media + 3x SD de los pocillos de control (sólo medianos), y el índice de estimulación medio de todos los pocillos de prueba con respecto a los pocillos de control era ≥ 3 . La mezcla de respuestas de memoria (MRM), que consiste en una mezcla de antígenos de memoria, se usó en forma de control positivo. Se indican los índices de estimulación de respuestas positivas.

[0028] B, los sobrenadantes de las respuestas proliferativas positivas indicadas en A fueron analizados para determinar la presencia de IFN γ , factor α de necrosis tumoral, IL-2, IL-4, IL-5, y IL-10 por citometría de flujo. El modelo indicado se usa para las seis citoquinas medidas; un cuadrado relleno representa la producción de citoquinas específica para antígenos. Los valores de corte se basaban en las curvas estándar de las distintas citoquinas (50 pg/ml para IFN γ y 10 pg/ml para las citoquinas restantes). La producción de citoquinas específica para antígenos fue definida como una concentración de citoquina superior al nivel de corte y $>2x$ la concentración del control medio.

50 Figura 2

[0029] A y B, las respuestas de células T específicas 16 del virus del papiloma humano para la producción de IFN γ en 2 pacientes representativos con una NIV de alto grado (#2, izquierda y 10, derecha). Las respuestas de células T se muestran en la semana 0 (antes del tratamiento con imiquimod), en la semana 8 (durante el tratamiento de imiquimod) y en la semana 16 (después del tratamiento imiquimod). La aplicación local de crema con un contenido de 5% de imiquimod no produce una mejora sistémica de respuestas de células T específicas de VPH16. Se observa que la magnitud de las respuestas de células T varía ligeramente en distintos puntos temporales. Se representa el promedio de número de manchas y SE inducidos por el control de medio o los péptidos presentes en los depósitos E2, E6 y E7 por

100,000 PBMC. En forma de control positivo, se utilizó la mezcla de respuestas de memoria (MRM). C y D, pacientes con respuestas preexistentes de tipo 1 auxiliar T específicas del VPH16 muestran respuestas clínicas objetivas después del tratamiento con imiquimod. Se expone un ejemplo típico. C, lesión de NIV3 demostrada por biopsia de paciente #5 antes del tratamiento con imiquimod; D, la misma área vulvar de paciente #5 después de 16 semanas de tratamiento.

5 Figura 3

[0030] Reactividad de IgG e IgA frente a VLPs de VPH 16 con el tiempo en 17 pacientes con NIV3 tratados con imiquimod. Al menos dos muestras de suero fueron probadas en cada paciente. Las respuestas serológicas se muestran en la semana 0 (antes del tratamiento con imiquimod), en la semana 8 (durante el tratamiento con imiquimod) y en la semana 16 (después del tratamiento con imiquimod). Los valores OD se representan como medios \pm SD de respuestas positivas. Los valores OD fueron calculados sustrayendo el valor de respuestas de fondo y el valor OD medio de los sueros para niños.

Ejemplos

Métodos y materiales

Pacientes

15 [0031] Veintinueve mujeres con NIV de alto grado (intervalo de edad, 24-73 años; edad media, 47 años) fueron solicitadas por los departamentos de ginecología del Centro Médico Académico, y del Centro Médico de la Universidad Erasmus y de Leiden, Países Bajos. En un promedio, estos pacientes fueron diagnosticados con NIV3 de 5 a 4 años antes de formar parte del estudio (intervalo de 6 meses a 15 años). Dieciocho mujeres fueron sometidas a tratamientos previos para la NIV3 (escisión quirúrgica, terapia con láser o tratamiento con imiquimod (#21, 24, 27)) antes de participar al estudio.

[0032] Diecisiete de estos 29 sujetos (edad de 29 a 60 años, media de 43 años) fueron tratados experimentalmente con una crema a base de 5% de imiquimod. Se pidió a los pacientes que se aplicaran la crema en las áreas afectadas de la vulva dos veces a la semana por la noche durante un periodo máximo de 16 semanas. Para analizar el efecto de tratamiento con imiquimod en la respuesta inmune específica contra el VPH16, recogimos muestras de sangre y de suero en serie antes de iniciar el tratamiento con imiquimod (T=0), después de 8 semanas de tratamiento (T=8), y al finalizar el tratamiento (T=16). Las lesiones vulvares fueron determinadas desde el inicio por medición directa y registros fotográficos, y después de 8 y 16 semanas de tratamiento. Las respuestas clínicas se definieron en forma de respuesta completa (RC), una respuesta parcial de tipo 1 (PR1), tal y como se define por una reducción en el diámetro de la lesión de 76-99%, una respuesta parcial de tipo 2 (PR2), tal como definida por una reducción del diámetro de lesión de 26 a 75%, o ninguna respuesta clínica.

[0033] Unas células madre de sangre periférica de 20 de 29 mujeres (CMSPs) fueron aisladas y usadas directamente para analizar la reactividad de células T proliferativas específicas de VPH16. De estas 20 mujeres, 8 pacientes participaron también en el estudio con imiquimod. En 6 casos la sangre fue extraída 3 meses (#1), 4 meses (#10), 10 meses (#5) hasta más de 1 año (#12, 13 y 15) después del final del estudio con imiquimod, en los otros 2 casos (# 2, 4) la sangre fue extraída en las 4 semanas después del inicio del tratamiento. El suero fue recogido para estudiar la presencia de la partícula de tipo virus (VLP) de anticuerpos específicos L1.

Todos los sujetos fueron identificados para determinar el tipo de VPH por GP5+/6+ PRC seguido de un análisis de Blot de línea reversa tal y como se describió previamente (26). El diseño del estudio fue aprobado por los Medical Ethical Committees y todas las mujeres dieron su consentimiento informado por escrito.

40 Antígenos

[0034] Un conjunto de péptidos que implica todas las proteínas del VPH 16, E2, E6 y E7 se utilizó para los ensayos de proliferación de células T. Los péptidos E2 consistían en veintidós péptidos 30-mer con una superposición de aminoácidos 15 y péptidos de extremo COOH con una longitud de 35 aminoácidos. Para los ensayos de proliferación de células T, los péptidos E2, péptidos 32-mer de proteína E6, y el péptido 35-mer de la proteína E7 con una superposición de 14 aminoácidos se usaron en depósitos de dos péptidos por depósito. Para los ensayos ELISPOT de detección de IFN γ , los péptidos utilizados incluían la proteína del VPH 16, E2, E6 y E y consistían en las regiones más inmunogénicas de los péptidos (22) E2 30-mer y quince E6 y nueve E7 de superposición de péptidos 22-mer. Los péptidos se sintetizaron y se disolvieron tal como descrito anteriormente (27). Los depósitos de péptidos se indican por el primer y último aminoácido de la región en la proteína recubierta por los dos péptidos (por ejemplo, E21-45, residuos 1-30 y 16-45). En forma de control positivo se utilizó la mezcla de respuestas de memoria (MRM), que consiste en una mezcla de toxoide tetánico (en concentración final de 0.75 limus flocculentius/ml; Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente en Bilthoven, Países Bajos), sonicación de mycobacterium tuberculosis (2.5 μ g/ml; donado generosamente por el Dr. P. Klatser, Instituto Real Tropical de Amsterdam, Países Bajos) y de Candida albicans (0.005%, HAL Allergen Lab. Haarlem, el Países Bajos).

55 Ensayo de proliferación de células T a corto plazo

[0035] Las PBMCs recién aisladas se incubaron con 12 depósitos de péptidos 30-mer derivados de VPH 16 E2, 4 depósitos de péptidos 32-mer de E6, y 2 depósitos de péptidos 35-mer de E7 (cada agrupación consistía en dos péptidos superpuestos). Las PBMCs fueron sembradas en una densidad de 1.5 x 10⁵ células/pocillo en una placa de

fondo en forma de U con 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 125 µl de Iscove medio (Bio Whittaker) suplementado con 10% de suero autólogo. Los péptidos del VPH16 derivados de E2, E6, y E7 fueron añadidos a una concentración de 10 µg/ml/péptido. El medio solo fue tomado como control negativo, y la MRM (dilución, 1: 50) se usó como control positivo. Para cada depósito de péptidos, ocho microcultivos paralelos fueron incubados. Se tomaron cincuenta µl de sobrenadante de los microcultivos el 6º día después de la incubación y se almacenaron a -20°C hasta el análisis de citoquina. La proliferación específica de péptidos se midió el 7º día por incorporación de [3H]-timidina. Los cultivos resultaron ser positivos cuando la proliferación de $\geq 75\%$ de los pocillos de prueba excedía la proliferación de promedio $+3 \times SD$ de los pocillos de control que contenían el medio solo, y el índice de estimulación, definido como el promedio de todos los pocillos de prueba divididos por el promedio de los pocillos de control, era $\geq 3(22)$.

10 Análisis de citocinas asociado a respuestas proliferativas específicas del VPH16

[0036] La detección de citoquinas en los sobrenadantes de los ensayos de proliferación a corto plazo se realizó usando la citometría de flujo (CBA) (Becton Dickinson). Esta técnica permite la detección simultánea de seis citoquinas IFN γ diferentes Th1 y Th2, factor α de necrosis tumoral, interleuquina (IL)-2, IL-4, IL-5, y IL-10. La CBA se realizó según las instrucciones del fabricante. Los valores de corte se basaban en las curvas estándar de las diferentes citoquinas (100 pg/ml para IFN γ y 10 pg/ml para las citoquinas restantes). La producción de citoquina específica para antígenos se definió como una concentración de citoquinas superior al nivel de corte y $> 2x$ la concentración del medio de control (23; 28).

Análisis de reactividad de células T específicas del VPH16 por ELISPOT de IFN γ

[0037] El número de IFN γ que producen células T específicas del VPH, presente en la sangre periférica de los 17 pacientes tratados con imiquimod, fueron cuantificados usando ELISPOT que se llevó a cabo tal y como se ha descrito previamente (29; 30). En resumen, las PBMC se descongelaron, se lavaron y se sembraron en una densidad de 2×10^6 células por pocillo de placa de 14 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 1ml de IMDM (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) enriquecida con 10% de suero humano AB, en presencia o ausencia de los depósitos de péptidos del VPH 16, E2, E6 y E7 indicados. Los péptidos se usaron en depósitos de 4-5 péptidos en una concentración de 5µg/m/péptido. Los péptidos, como indicados en su primer y último aminoácido en la proteína, se usaron en los siguientes depósitos: E2-I: 1-30, 16-45, 31-60, 46-75 E2-II: 61-90, 76-105, 91-120, 106-135 E2-III: 121-150, 136-165, 151-180, 166-195 E2-IV: 271-300, 286-315, 301-330, 316-345, 331-365 E6-I: 1-22, 11-32, 21-42, 31-52 E6-II: 41-62, 51-72, 61-82, 71-92 E6-III: 81-102, 91-112, 101-122, 111-132 E6-IV: 111-132, 121-142, 131-152, 137-158 E7-I: 1-22, 11-32, 21-42, 31-52 E7-II: 41-62, 61-82, 71-92, 77-98. Los 4 días siguientes de incubación a 37 °C, las PBMC fueron recolectadas, lavadas, y sembradas en cuatro pocillos de réplica en una densidad de 105 células por pocillo en 100µl de IMDM enriquecido con 10% de FCS en una placa Multiscreen de 96 pocillos (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) revestido con un anticuerpo captor de IFN γ (Mabtech AB, Nacha, Suecia). Otras incubaciones de anticuerpos y el desarrollo de ELISPOT se realizaron según las instrucciones del fabricante (Mabtech). Las manchas se contaron con un sistema de análisis totalmente automatizado de video e imágenes asistido por ordenador (Bio Sys). Las manchas específicas se calcularon por sustracción del número de manchas de promedio $+ 2 \times SD$ del control de medio de los números de manchas de promedio en pocillos experimentales a condición de que el número de manchas de promedio de los pocillos de control de medio sea < 10 o bien > 10 con una desviación estándar $< 20\%$ del promedio. Se consideró que las frecuencias de las células T específicas de antígenos aumentaban cuando las frecuencias de células T específicas eran $\geq 1/10,000$ y al menos $\geq 2x$ de fondo. (30). El número de fondo de manchas era de $2,6 \pm 2,2$ (promedio $\pm SD$), con una excepción (#23, 51 ± 10 manchas).

ELISA de VLP VPH16

[0038] Para detectar anticuerpos específicos frente al VPH16 en suero, utilizamos el método ELISA descrito previamente por Kirnbauer et al (31). Cada muestra de suero fue evaluada para determinar la reactividad contra partículas de tipo virus VPH 16 (VLP, cápsidas expresadas en baculovirus comprendiendo la proteína L1) y contra cápsidas de papilomavirus bovino (PVB), éstas últimas fueron frenadas en su desarrollo por un tratamiento con 0.1M de tampón carbonato en forma de control negativo. Ambos VLP y PVB fueron proporcionados amablemente por el Prof. Dr. J. Dillner (Universidad de LUNDS, Suecia). Los pacientes fueron evaluados para determinar ambos IgG e IgA específicos al VPH16. Un conjunto de sueros de niños en buena salud ($n=8$, edad media 7.3 años, intervalo 4.3-14.1 años) fueron evaluados para determinar la reactividad de fondo. Para respuestas de tipo IgG de VPH16 L1-VLP se usó un valor OD de corte de 0.230 (OD de promedio=0.060 intervalo -0.056 a 0.150; promedio $+ 2$ veces la desviación típica =0.230). Para respuestas de tipo IgA, se utilizó un corte de OD=0.215 (OD de promedio =0.189; intervalo 0.171 a 0.205).

Análisis estadístico

[0039] El análisis estadístico del respuestas proliferativas específicas de VPH16 asociado a la producción de citoquina se realizó usando una prueba exacta Fisher. La prueba exacta de Fisher (2 colas) se utilizó para analizar la inmunidad específica contra el VPH con respecto a la respuesta clínica al tratamiento con imiquimod. Los análisis específicos se realizaron usando el Graphpad Instat Software (versión 3.0).

Ejemplo 1

[0040] Las respuestas humorales y celulares específicas contra el VPH16 en pacientes con un alto grado de NIV forman

un único aspecto de enfermedad inducida por VPH ya que los pacientes se tratan con frecuencia, pero la infección persiste a menudo. El VPH-16 se descubre casi siempre. Para obtener un entendimiento más profundo de la respuesta de células T CD4+ contra el VPH16 en la NIV, realizamos un gráfico de la magnitud, especificidad y funcionalidad de las respuestas específicas de células T proliferativas del VPH16, E2, E6 y E7 en un grupo de 20 mujeres con NIV de alto grado asociada al VPH16.

[0041] Las PBMC aisladas de pacientes con NIV fueron estimuladas con péptidos derivados de proteínas de VPH16, E2, E6 y E7 así como con una mezcla de antígenos de memoria comunes (MRM), en un ensayo de proliferación a corto plazo. Hemos visto previamente que este ensayo se orienta hacia la detección de respuestas de células T CD4+ (23). Las respuestas de células T proliferativas específicas de VPH16 contra E2 y/o E6 se detectaron en 10/20 pacientes (Fig. 1A). Las respuestas específicas de E7 se detectaron en 5/20 sujetos. El análisis de los sobrenadantes de estos cultivos de células T para detectar la presencia de citoquinas de tipo 1 y de tipo 2 reveló la secreción de la citoquina Th1 IFN γ en 8/20 pacientes. En algunos de los pacientes la producción de TNF- α , IL-5 y IL-10 se detectó ocasionalmente (Fig. 1B). Aunque la frecuencia global de respuestas proliferativas es similar cuando se compara con la que se encontró previamente en pacientes con cáncer cervical, el número de pacientes con respuestas de células T específicas de VPH asociada al IFN γ en estos pacientes con NIV era más alto (8/20 versus 4/17, respectivamente (23)).

[0042] Además de la inmunidad de células T, la respuesta humoral al VPH16 se midió en 28 pacientes con NIV por ELISA usando VPH16 L1-VLP como antígeno. Globalmente, los anticuerpos IgG e IgA del VPH16 L1-VLP se detectaron en 25 sujetos de 28 (89%) y 13 sujetos de 28 (46%), respectivamente (Tabla 1). En base a los valores OD, la respuesta IgG específica al VPH16 L1-VLP excedía la de IgA (tabla 1). En general, las respuestas de IgA específicas frente al VPH16 se detectaron cuando los pacientes mostraban niveles relativamente altos de IgG específicos al VPH16. Si los valores OD de IgG eran ≥ 0.5 , 11/19 (58%) de las muestras contenían IgA específicos al VPH16 L1, mientras que en niveles de IgG < 0.5 sólo 2/9 de las muestras eran seropositivas para IgA.

[0043] En conclusión, la inmunidad humoral específica al VPH16 L1 se detectó en la gran mayoría de los pacientes, mientras que se detectó la reactividad de las células T de tipo 1 asociadas al IFN γ específicas al VPH16, E2-, E6 y/o E7 en aproximadamente la mitad de los pacientes evaluados.

Ejemplo 2

La inmunidad específica del VPH16 se asocia con un tratamiento inmunomodulador de respuesta clínica más favorable con Imiquimod

[0044] Nuestro análisis de proliferación específica de VPH16 indica que un alto número de respuestas de células T proliferativas se asocia con la producción de IFN γ . Para examinar la función de estas respuestas específicas de VPH16 de célula T de tipo 1 con respecto al éxito o fracaso del tratamiento con el inmunomodulador imiquimod, estudiamos esta respuesta inmunitaria en un grupo de pacientes con un alto grado de VPH16+ NIV. Las PBMC se aislaron antes (T=0), durante (T=8), y después (T=16) del tratamiento, y se almacenaron en nitrógeno líquido. La reactividad de células T específicas al VPH contra los péptidos de VPH16, E2, E6 y E7 se analizó por ELISPOT de IFN γ . Este es un método sensible para el análisis de reactividad de células T de tipo 1 específicas de antígenos en material congelado (32; 33). Tres de estos pacientes fueron tratados con imiquimod un año antes de su inclusión en nuestro estudio (Tabla 2, # 21, 24 y 27). De estos 17 pacientes, 15 eran VPH16 positivos. Las respuestas preexistentes de células T asociadas al IFN γ (T=0) se detectaron en 8 de 15 pacientes por ELISPOT de IFN γ . En 5/15 pacientes, se detectó la reactividad de células T específicas al VPH16 contra E2, mientras que 4/15 pacientes desarrollaron una respuesta contra E6 (Tabla 2). Ninguno de estos pacientes mostró tener respuestas de células T preexistentes contra el VPH16 E7. En 2 casos la muestra T=0 no estaba disponible y se muestra la reacción en PBMC de T=8 (Tabla 2, #1 y 22).

[0045] A pesar de que para algunos pacientes no estaba disponible una de las dos muestras de seguimiento (#5, 13, 27, 28), estaba claro que no podríamos detectar una influencia directa de imiquimod en los números de células T específicas al VPH. En ninguno de los pacientes se detectó un aumento evidente de células T específicas al VPH16 durante el tratamiento con imiquimod (Fig. 2ab). En algunos casos, los pacientes ya habían sido tratado con un tratamiento a base de imiquimod antes de este estudio, pero incluso con este tratamiento repetido no se obtuvo un aumento de células T específicas al VPH 16 (Tabla 2; #21 y 24). Además, la respuesta de IgG e IgA específica para el VPH16 VLP no cambiaba mucho cuando pacientes eran tratados con imiquimod (Figura 3).

[0046] Trece de las 17 mujeres tratadas (76%) mostraron una respuesta clínica manifiesta al tratamiento con imiquimod tal como indicado con un 76-100% de reducción del tamaño de su lesión (CR o PR1, Tabla 2 y Fig. 2cd). Tres pacientes no mostraron ninguna reducción del tamaño del área afectada de la enfermedad vulvar, y una mujer mostró solo una mejora mínima durante el tratamiento.

[0047] De manera importante, cuando el grupo de pacientes VPH16+ (n=15) fue dividido en pacientes con o sin una respuesta inmunitaria Th1 específica frente al VPH, los 8 pacientes con una respuesta inmunitaria específica frente al VPH mostraron una respuesta clínica completa o casi completa (RC o PR1) a lo largo del tratamiento con imiquimod (Tabla 2). En cambio, los pacientes sin respuesta inmunitaria específica frente al VPH no demostraron una tal mejora clínica ($p = 0.03$, prueba exacta de Fisher de 2 colas).

[0048] En conjunto, la exposición crónica a antígenos virales puede provocar una inmunidad de células T CD4+ de tipo 1 contra los antígenos precoces E2, E6 y E7 de VPH16 en pacientes con NIV3. La presencia de estas células Th1

específicas de VPH16 como se detectó por ELISPOT de IFN γ , aunque no sea esencial para la regresión inducida por imiquimod de lesiones de NIV, aumenta la probabilidad de obtener una respuesta clínica fuerte. La presencia de reactividad humoral específica de L1 no estaba correlacionada con regresiones inducidas por imiquimod.

Referencias

5 [0049]

1. Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis* 1996;23:333-41 .
2. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997;102:3-8 .
3. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;14-9 .
4. Evander M, Edlund K, Gustafsson A, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995;171:1026-30 .
5. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8 .
6. Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61: 306-11 .
7. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ* 2002;325:572 .
8. van Beurden M, ten Kate FJ, Smits HL, et al. Multifocal vulvar intraepithelial neoplasia grade III and multicentric lower genital tract neoplasia is associated with transcriptionally active human papillomavirus. *Cancer* 1995;75:2879-84 .
9. Buscema J, Naghashfar Z, Sawada E, Daniel R, Woodruff JD, Shah K. The predominance of human papillomavirus type 16 in vulvar neoplasia. *Obstet Gynecol* 1988;71:601-6 .
10. Hording U, Junge J, Poulsen H, Lundvall F. Vulvar intraepithelial neoplasia III: a viral disease of undetermined progressive potential. *Gynecol Oncol* 1995;56:276-9 .
11. Sykes P, Smith N, McCormick P, Frizelle FA. High-grade vulvar intraepithelial neoplasia (VIN 3): a retrospective analysis of patient characteristics, management, outcome and relationship to squamous cell carcinoma of the vulva 1989-1999. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2002;42:69-74 .
12. Andreasson B, Bock JE. Intraepithelial neoplasia in the vulvar region. *Gynecol Oncol* 1985;21:300-5 .
13. Rettenmaier MA, Berman ML, DiSaia PJ. Skinning vulvectomy for the treatment of multifocal vulvar intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1987;69:247-50 .
14. Schon MP and Schon M. Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis* 2004;9:291-8 .
15. Geisse J, Caro I, Lindholm J, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *Am Acad Dermatol* 2004;50:722-33 .
16. Sauder DN. Imiquimod: modes of action. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:5-8 .
17. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:571-7 .
18. Marchitelli C, Secco G, Perrotta M, Lugones L, Pesce R, Testa R. Treatment of bowenoid and basaloid vulvar intraepithelial neoplasia 2/3 with imiquimod 5% cream. *J Reprod Med* 2004;49:876-82 .
19. Todd RW, Etherington IJ, Luesley DM. The effects of 5% imiquimod cream on high-grade vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2002;85:67-70 .
20. van Seters M, Fons G, van Beurden M. Imiquimod in the treatment of multifocal vulvar intraepithelial neoplasia 2/3. Results of a pilot study. *J Reprod Med* 2002;47:701-5 .
21. Wendling J, Saiag P, Berville-Levy S, Bourgault-Villada I, Clerici T, Moyal-Barracco M. Treatment of undifferentiated vulvar intraepithelial neoplasia with 5% imiquimod cream: a prospective study of 12 cases. *Arch Dermatol* 2004;140:1220-24 .
22. de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res* 2002;62:472-9 .

23. 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;64:5449-55 .
- 5 24. 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;63:636-41 .
25. Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;41-6 .
- 10 26. van den Brule AJ, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, MeijerCJ, Snijders PJ. GP5+/6+ PRC followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):779-87 .
27. van der Burg SH, Kwappenberg KM, Geluk A, et al. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T-cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J Immunol* 1999;162:152-60 .
- 15 28. van der Burg SH, Menon AG, Redeker A, et al. Magnitude and polarization of P53-specific T-helper immunity in connection to leukocyte infiltration of colorectal tumors. *Int J Cancer* 2003;107:425-33 .
29. de Jong A, O'Neill T, Khan AY, et al. Enhancement of human papillomavirus (HPV) type 16 E6 and E7-specific T-cell immunity in healthy volunteers through vaccination with TA-CIN, an HPV 16 L2E7E6 fusion protein vaccine. *Vaccine* 2002;20:3456-64 .
- 20 30. van der Burg SH, Rensing ME, Kwappenberg KM, et al. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (VPH16) E7-derived peptide epitopes in patients with VPH16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II- restricted epitopes. *Int J Cancer* 2001;91:612-18 .
- 25 31. Kimbauer R, Hubbert NL, Wheeler CM, Becker TM, Lowy DR, Schiller JT. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:494-9 .
32. Baldwin PJ, van der Burg SH, Boswell CM, et al. Vaccinia-expressed human papillomavirus 16 and 18 e6 and e7 as a therapeutic vaccination for vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res* 2003;9:5205-13 .
- 30 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;10:2954-61 .
34. Todd RW, Roberts S, Mann CH, Luesley DM, Gallimore PH, Steele JC. Human papillomavirus (HPV) type 16- specific CD8+ T-cell responses in women with high grade vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 2004;108:857-62 .
- 35 35. Davidson EJ, Sehr P, Faulkner RL, et al. Human papillomavirus type 16 E2- and L1-specific serological and T- cell responses in women with vulvar intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 2003;84:2089-97 .
36. Todd RW, Steele JC, Etherington I, Luesley DM. Detection of CD8+ T-cell responses to human papillomavirus type 16 antigens in women using imiquimod as a treatment for high-grade vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2004;92:167-74 .
- 40 37. Bontkes HJ, de Gruijl TD, van den Muysenberg AJ, et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2000;88:92-8 .
38. Rensing ME, van Driel WJ, Celis E, et al. Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A *0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* 1996;56:582-8 .
- 45 39. Nimako M, Fiander AN, Wilkinson GW, Borysiewicz LK, Man S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res* 1997;57:4855-61 .
40. Youde SJ, Dunbar PR, Evans EM, et al. Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* 2000;60:365-71 .
- 50 41. Gul N, Ganesan R, Luesley DM. Characterizing T-cell response in low-grade and high-grade vulvar intraepithelial neoplasia, study of CD3, CD4 and CD8 expressions. *Gynecol Oncol* 2004;94:48-53 .
42. Abdel-Hady ES, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, et al. Immunological and viral factors associated with the response of vulvar intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res* 2001;61:192-6 .

43. Davidson EJ, Boswell CM, Sehr P, et al. Immunological and clinical responses in women with vulvar intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins. *Cancer Res* 2003;63:6032-41 .
- 5 44. Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium. *Clin Exp Immunol* 1999;116:33-40 .
45. Giannini SL, Hubert P, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Influence of the mucosal epithelium microenvironment on Langerhans cells: implications for the development of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Int J Cancer* 2002;97:654-9 .
- 10 46. Pao CC, Lin CY, Yao DS, Tseng CJ. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:1146-51 .
47. Matsumoto K, Leggatt GR, Zhong J, et al. Impaired antigen presentation and effectiveness of combined active/passive immunotherapy for epithelial tumors. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1611-19 .
48. van Mierlo GJ, Boonman ZF, Dumortier HM, et al. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J Immunol* 2004;173:6753-59 .
- 15 49. Villada IB, Barracco MM, Zioli M, et al. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res* 2004;64:8761-66 .
- 20 50. Davidson EJ, Faulkner RL, Sehr P, et al. Effect of TA-CIN (HPV 16 L2E6E7) booster immunisation in vulvar intraepithelial neoplasia patients previously vaccinated with TA-HPV (vaccinia virus encoding HPV 16/18 E6E7). *Vaccine* 2004;22:2722-9 .
51. Shizuo Akira, Hiroaki Hemmi, Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family, *Immunology Letters* (85) 2003 p85-95 .

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso en el tratamiento de una neoplasia intraepitelial anogenital en un sujeto donde dicho compuesto de modificación inmunitaria es capaz de inducir una inflamación local en un sujeto que tiene una respuesta de células T CD4+ contra un antígeno viral precoz de VPH. 5
2. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para un uso según la reivindicación 1, donde el antígeno precoz es un antígeno E2, E6 o E7 de VPH.
3. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para un uso según la reivindicación 1 o 2, donde la neoplasia es un Neoplasia Intraepitelial Vulvar (NIV). 10
4. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para un uso según la reivindicación 1-3, donde el tratamiento comprende también un(os) compuesto(s) implicado(s) directamente en la vía inflamatoria seleccionado(s) en el grupo que consiste en un(s) interferón(s), una(s) citoquina(s) y una(s) quimioquina(s). 15
5. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso según todas las reivindicaciones precedentes, donde la respuesta detectable de células T CD4+ contra un(os) antígeno(s) precoz(ces) de VPH es el resultado de una administración previa o simultánea de dicho antígeno al sujeto.
6. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso según la reivindicación 5, donde la inmunización previa o simultánea se hacía/hace con un(os) péptido(s) de 12 a 45 aminoácidos de longitud, que comprende un antígeno precoz de VPH de proteínas E2, E6 o E7 de VPH. 20
7. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso según la reivindicación 5 o 6 donde el(los) péptido(s) usado(s) para dicha administración previa o simultánea es un péptido que 25
 - (i) comprende un epítipo(s) de células T; y
 - (ii) es capaz de inducir una respuesta IFN γ :
8. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso según la reivindicación 7, donde los péptidos usados son seleccionados en el grupo de péptidos que consisten en: 30
 - (a) una secuencia que corresponde a los residuos 1-22, 31-52, 41-62, 43-77, 51-72 y 77-98 de SEC ID N° 1,
 - (b) una secuencia que corresponde a los residuos 31-75, 91-120, 151-195, 271-300, 286-315, 301-330, 316-345 y 331-365 de SEC ID N° 2, o 35
 - (c) una secuencia que corresponde a los residuos 31-52, 81-102, 91-112, 111-132, 121-158 y 131-152 de SEC ID N° 3.
9. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde el tratamiento comprende también la administración al sujeto de un anticuerpo agonístico contra un receptor CD40. 40
10. Compuesto de modificación inmunitaria seleccionado en el grupo que consiste en Imiquimod, R₈₄₈ /Resiquimod, Loxoribina y Bropirimina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el tratamiento comprende también la administración al sujeto un anticuerpo agonista contra un receptor 4-1BB. 45

Fig 1a

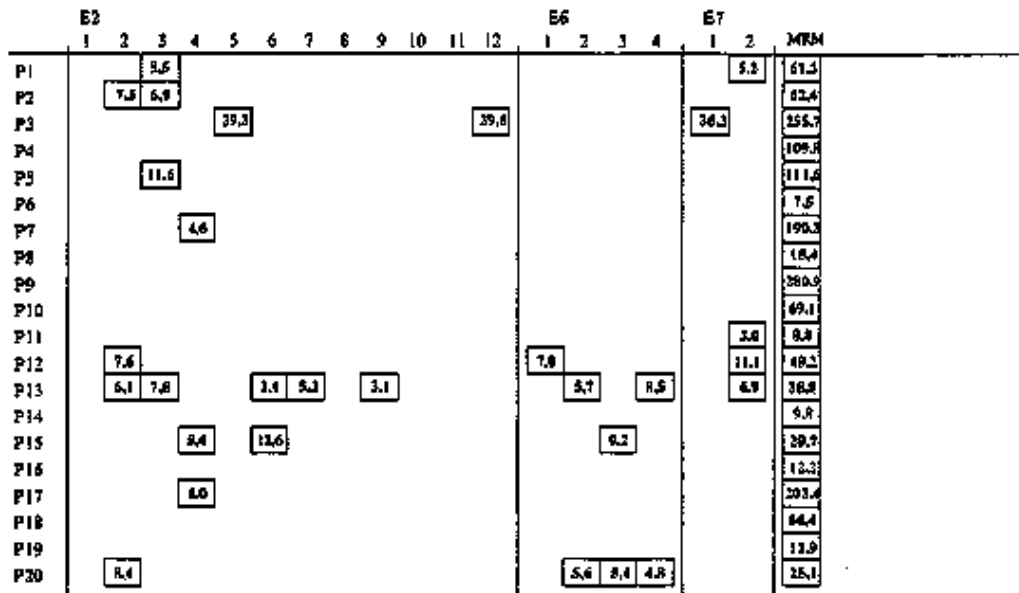


Fig 1b

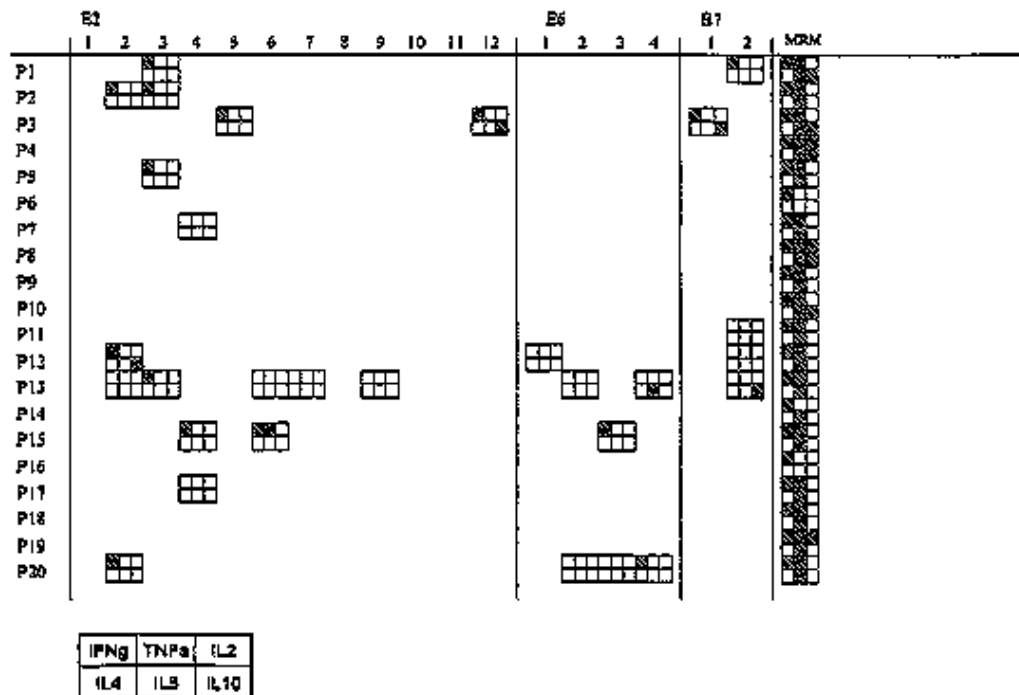


Fig 2a

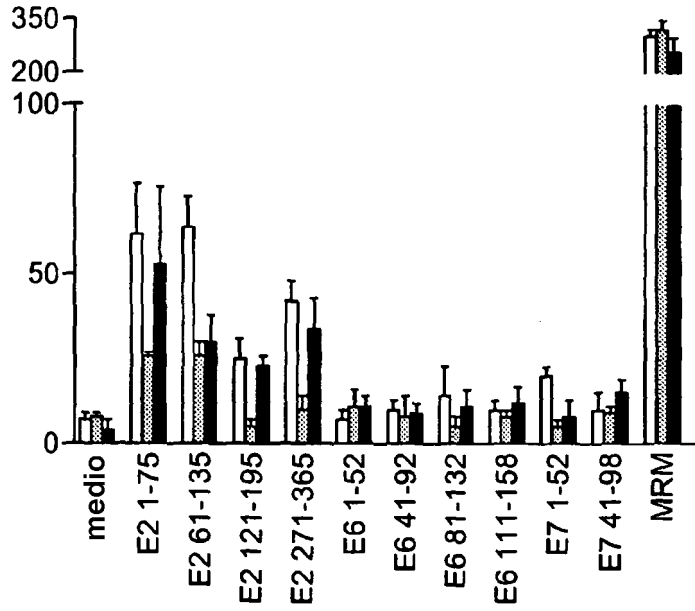


Fig 2b

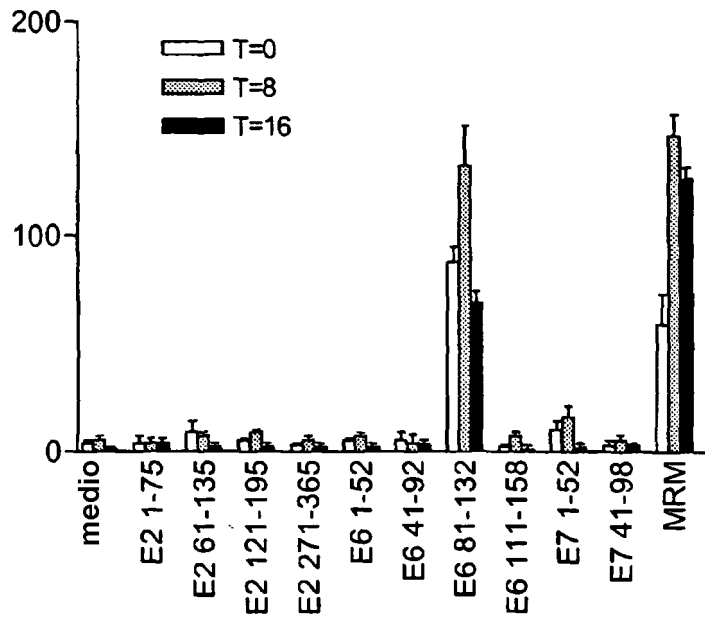


Fig 2c



Fig 2d



Fig 3

