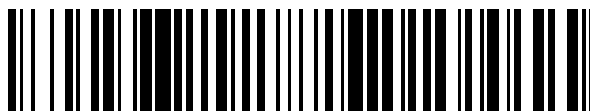


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 059**

51 Int. Cl.:

C07K 14/025 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08753802 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2152729**

54 Título: **Epítomos de HPV objetivos de células T que infiltran malignidades cervicales para su uso en vacunas**

30 Prioridad:

31.05.2007 EP 07109281

31.05.2007 EP 07109287

31.05.2007 US 941070 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.07.2013

73 Titular/es:

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.

LUMC (100.0%)

ALBINUSDREEF 2

2333 ZA LEIDEN, NL

72 Inventor/es:

VAN DER BURG, SJOERD HENRICUS;

KENTER, GEMMA G. y

MELIEF, CORNELIS JOHANNES MARIA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 411 059 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

Epítomos de HPV objetivos de células T que infiltran malignidades cervicales para su uso en vacunas

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la inmunología. En particular, se refiere a epítomos de HPV nuevos que se pueden utilizar para la prevención, la terapia y/o el diagnóstico de enfermedades asociadas al HPV.

10

Antecedentes de la invención

[0002] El cáncer cervical es el segundo cáncer más común en todo el mundo (Bosch *et al.* 2003). El virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo tipo 16 y 18 es la causa del cáncer cervical en alrededor de dos tercios de los pacientes (Bosch *et al.* 1995, Munoz *et al.* 2003). El genoma del HPV codifica dos oncoproteínas, E6 y E7, que se expresan de forma constitutiva en el cáncer y las lesiones cervicales de alto grado porque son necesarias para la aparición y el mantenimiento del fenotipo celular maligno (Zur Hausen, 1996).

[0003] La expresión específica del tumor de estas oncoproteínas al igual que la presencia de niveles bajos de células T circulantes específicas de E6 y E7 detectadas en la sangre periférica de casi la mitad de los pacientes con cáncer cervical (de Jong *et al.* 2004, van der Berg *et al.* 2001, Welters *et al.* 2003, Welters *et al.* 2006, Rensing *et al.* 1996, Bontkes *et al.* 2000, Luxton *et al.* 1996) sugirió que podrían servir como antígenos de rechazo tumoral. No obstante, la existencia de células T específicas de HPV circulantes no implica que éstas contribuyan a la respuesta antitumoral. Para controlar la enfermedad, estas células T deberían al menos ser capaces de albergarse en los sitios tumorales. De hecho, una proporción de los carcinomas cervicales son infiltrados por los linfocitos (Bethwaite *et al.* 1996, Chao *et al.* 1999, Piersma *et al.* 2007) pero sigue faltando el conocimiento en profundidad de la especificidad y el tipo de células T que infiltran estos tumores cervicales, probablemente debido a las dificultades relacionadas con el desarrollo de cultivos de células T a partir de tejido tumoral. Sin embargo, algunos pioneros fueron capaces de aislar linfocitos de infiltración del tumor (TIL) específicos de HPV a partir de los tumores, dando como resultado la identificación de dos únicos epítomos de célula T CD8⁺ de HPV 16 (Evans *et al.* 1997, Oerke *et al.* 2005) y dos epítomos de célula T CD4 específicos para los subtipos HPV59 y HPV33 de alto riesgo menos predominantes (Hohn *et al.* 1999, Hohn *et al.* 2000). No obstante, se requieren estudios más amplios sobre los linfocitos de infiltración del tejido cervical para comprender la aportación y la función de la respuesta inmune adaptativa específica de HPV en el cáncer cervical. Además, esto permitirá el diseño racional de estrategias de intervención inmunológica exitosas.

[0004] Estudios recientes mostraron que dos citocinas, IL-7 e IL-15, tienen un papel principal en la expansión y la supervivencia de células T de memoria efectoras CD4⁺ y CD8⁺. IL-7 proporciona señales de supervivencia para las células T efectoras (Li *et al.* 2003). IL-15 es un factor de crecimiento crítico para iniciar las divisiones de las células T y, a diferencia de IL-2 que generalmente se usa para expandir cultivos de TIL, no limita la expansión continuada de células T (Li *et al.* 2001). Además, IL-15 puede también actuar como activador independiente del antígeno de las células T de memoria CD8⁺ (Liu *et al.* 2002). Juntas, IL-7 y IL-15 pueden expandir con muy alta eficiencia las células T de memoria efectoras, mientras que las células T de memoria centrales son menos sensibles y las células T no responden a la estimulación con estas citocinas (Geginat *et al.* 2001, McKinlay *et al.* 2007, Bacchetta *et al.* 2002).

[0005] Varios estudios precedentes han hablado del reconocimiento restringido por MHC de clase II de péptidos sintéticos que consisten en secuencias de proteínas E6 y/o E7 de HPV16 por la célula T a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

[0006] La WO 02/070006 divulga una respuesta restringida por DR1 contra un péptido que consiste en los aminoácidos 127-142 de la proteína E6 de HPV16, una respuesta restringida por DQ2 contra un péptido que consiste en los aminoácidos 35-50 de la proteína E7 de HPV16, una respuesta restringida por DR3 contra un péptido que consiste en los aminoácidos 43-77 de la proteína E7 de HPV16 y una respuesta restringida por DR15 contra un péptido que consiste en los aminoácidos 50-62 de la proteína E7 de HPV16.

[0007] Strang *et al.* divulgan una respuesta restringida por DR7 en las PBMC de individuos asintomáticos contra un péptido sintético que consiste en los aminoácidos 42-57 de la proteína E6 de HPV16.

[0008] Altmann *et al.* divulgan una respuesta en las PBMC de individuos asintomáticos que son de tipo DR1/DR11 contra un péptido sintético que consiste en los aminoácidos 5-18 de la proteína E7 de HPV16, una respuesta en las PBMC de individuos asintomáticos que son de tipo DR4/DR13 contra un péptido sintético que consiste en los aminoácidos 17-34 de la proteína E7 de HPV16 y una respuesta en las PBMC de individuos asintomáticos que son de tipo DR4/DR13 contra un péptido sintético que consiste en los aminoácidos 69-82 de la proteína E7 de HPV16.

[0009] La WO 02/090382 divulga las afinidades de enlace para una serie de péptidos solapantes a partir de proteínas E6 y E7 de HPV16 para moléculas HLA-DR que son más predominantes en la población caucásica. La WO 02/090382

además informa de respuestas contra varios péptidos E6 y E7 de HPV16 en las PBMC empobrecidas en CD8 de pacientes con papulosis bowenoide.

[0010] No obstante, sigue existiendo una necesidad de saber más sobre la presencia, el tipo y la especificidad de los linfocitos de infiltración tumoral en las malignidades asociadas al HPV, preferiblemente para los subtipos más predominantes de alto riesgo tales como HPV16, 18, 31, 33 y 45. Es un objeto de la presente invención proporcionar epítomos de HPV que sean objetivos para los linfocitos de infiltración tumoral y que se puedan utilizar en la prevención, la terapia y/o el diagnóstico de enfermedades asociadas al HPV.

10 Descripción de la invención

[0011] La presente invención proporciona epítomos de células T nuevos que se identifican basándose en nuestro análisis de la presencia y la especificidad de HPV16 o HPV18 de células T infiltrantes de cérvix en un grupo grande de 70 pacientes con malignidades cervicales: descubrimos que estos linfocitos infiltrantes comprenden células T específicas de HPV. En un análisis más detallado identificamos 17 epítomos de células T CD4⁺ y CD8⁺ nuevos y sus elementos de restricción de HLA, pero también revelamos que la respuesta inmune específica de HPV se dirigía hacia todas las partes de las oncoproteínas E6 y E7. De forma imprevista, la gran mayoría de los epítomos de células T CD4⁺ se presentaban en el contexto de las moléculas HLA-DQ y HLA-DP menos abundantemente expresadas. Dado que los epítomos de células T identificados constituyen objetivos fisiológicos en la respuesta inmune para los tumores positivos de HPV16 y HPV18 son objetivos valiosos para la optimización de la prevención contra las enfermedades relacionadas con el HPV y la inmunoterapia en pacientes con enfermedades relacionadas con el HPV.

[0012] En un aspecto, la presente invención se refiere entonces a secuencias de aminoácidos de epítomos de célula CTL CD4⁺ Th y CD8⁺ recién identificados de HPV, al igual que los péptidos sintéticos derivados de HPV y las composiciones inmunogénicas que comprenden éstos también son parte de la presente invención. Tales péptidos suponen una respuesta de memoria y efectora de CTL CD8⁺ muy mejorada, aumentada y prolongada tras su administración a un amplio número de pacientes con enfermedades asociadas al HPV, incluyendo malignidades relacionadas con el HPV. Tales péptidos pueden también inducir un microambiente proinflamatorio muy mejorado que es más posible que sea infiltrado por células efectoras, como resultado de esta respuesta Th CD4⁺.

[0013] Dado que los péptidos descritos se usan preferiblemente como una vacuna única o en combinación o como parte de una composición inmunogénica, los péptidos se denominan preferiblemente péptidos de vacuna y la composición composiciones de vacuna.

[0014] Se prefiere sumamente el uso de péptidos relativamente cortos para uso médico dado que éstos se pueden sintetizar *in vitro* de forma eficaz, algo que no es posible o rentable para las proteínas nativas superiores a aproximadamente 100 aminoácidos. La síntesis química de péptidos es una práctica rutinaria y varios métodos adecuados son conocidos por el experto en la materia. La síntesis química de péptidos también supera los problemas asociados a la producción recombinante de proteínas intactas, que son difíciles de estandarizar y requieren purificación extensiva y medidas de control de calidad. Los péptidos con una longitud superior a la longitud de los epítomos del HLA de clase I y clase II (p. ej. con una longitud como se indica aquí más adelante) son particularmente ventajosos para su uso como componente de vacuna porque son lo suficientemente grandes para ser absorbidos por los antígenos profesionales que presentan células, en particular DC, como se explica en la WO02/070006, y procesados en las DC antes de que la presentación en la superficie celular de los epítomos de HLA de clase I y clase II contenidos tenga lugar. Por lo tanto, la inducción desventajosa de tolerancia de célula T por la presentación sistémica de epítomos mínimos de HLA de clase I en células no presentadoras de antígenos (como se muestra en Toes *et al.*, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93:7855 y Toes *et al.*, 1996, J. Immunol. 156:3911), se evita mediante la aplicación de los péptidos de la invención que tienen una longitud según se indica en la presente (como se muestra en Zwaveling *et al.*, 2002, J. Immunol. 169:350). Los péptidos que comprenden epítomos que tienen que ser presentados a receptores de células T de CTL y/o células Th tienen preferiblemente la longitud suficiente para contener tanto los epítomos de HLA de clase I como los de HLA de clase II.

[0015] En una divulgación se proporciona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua seleccionada de las secuencias de aminoácidos de longitud total de al menos una de las proteínas E6 y E7 de HPV. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos contigua se selecciona a partir de las secuencias de aminoácidos de longitud total de las proteínas E6 y E7 de HPV de un serotipo de HPV de alto riesgo, tal como los serotipos 16, 18, 31, 33 o 45, más preferiblemente de las secuencias de aminoácidos de los serotipos 16, 18, 31 o 33 de E6 y E7 de HPV, de la forma más preferible de los serotipos 16 o 18, de los cuales el 16 es el más preferido. La secuencia de aminoácidos de las proteínas E6 y E7 del serotipo 16 de HPV se representan en la SEC ID n°: 1 y 2, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las proteínas E6 y E7 del serotipo 18 de HPV se representan en la SEC ID n°: 3 y 4, respectivamente.

[0016] Preferiblemente, el péptido comprende al menos un epítomo de célula Th de HLA de clase II y/o al menos un epítomo de célula T citotóxica de HLA de clase I, preferiblemente un epítomo se define en este caso más adelante con más detalle. Preferiblemente el péptido tiene una longitud de no más de 100 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos contiguos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas de HPV definidas

anteriormente, donde el péptido comprende preferiblemente al menos un epítipo de HLA de clase II y un epítipo de HLA de clase I, más preferiblemente al menos tanto un epítipo de HLA de clase II como al menos un epítipo de HLA de clase I y de la forma más preferible (pero no necesariamente) ambos de la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas de HPV definidas anteriormente. Más preferiblemente, en el péptido al menos un epítipo de HLA de clase II y al menos un epítipo de HLA de clase I están presentes dentro de una aminosecuencia contigua de la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas de HPV definidas anteriormente. Para mayor claridad, los péptidos descritos comprenden preferiblemente epítopos presentados por HLA de clase I y/o epítopos presentados por HLA de clase II. Cada uno de estos epítopos son presentables y se enlazarán con la molécula de HLA específica correspondiente presente en las células después de haber sido procesados como se describe en este caso. En el contexto de la invención, un epítipo específico del haplotipo de HLA puede, por lo tanto, denominarse también como una unión de epítipo a ese haplotipo de HLA o presentado y/o restringido por éste.

[0017] En el contexto de la invención, "un péptido tiene una longitud de no más de 100 aminoácidos" significa preferiblemente que el número de aminoácidos consecutivos que se originan a partir de una proteína de HPV y que están presentes en un péptido tal y como se define en este caso, es 100, 98, 96, 94, 92, 90 o menos. Por lo tanto, por definición, un péptido tal y como se define aquí es diferente de una proteína de HPV de longitud total. Tal péptido puede comprender aminoácidos adicionales a aquéllos originarios de una proteína de HPV o puede estar constituido o consistir en su totalidad en una secuencia de aminoácidos originaria de una proteína de HPV. La longitud de la secuencia de aminoácidos contigua de una de las proteínas de HPV definidas anteriormente comprendida en el péptido, preferiblemente es de al menos 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 aminoácidos y/o preferiblemente no más de 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 60, 50, 45, 40, 35, 33 o 30 aminoácidos, más preferiblemente la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua de una de las proteínas de HPV definidas anteriormente comprendida en el péptido es de 19-45, incluso más preferiblemente de 22-40 aminoácidos, incluso más preferiblemente de 30-35 y de la forma más preferible de 33-35 aminoácidos. En otra forma de realización preferida, el péptido descrito consiste en cualquiera de la secuencia de aminoácidos contiguas de las proteínas de HPV, tal y como se definen en este caso, por lo cual se entiende que ninguno de los aminoácidos es anexo a ningún extremo de la secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de HPV que no es contiguo a esta secuencia de aminoácidos en la secuencia de la proteína de HPV nativa. Los péptidos de la invención se puede sintetizar fácilmente y son los suficientemente grandes para ser asimilados por células presentadoras de antígenos profesionales, procesados por el proteasoma y tienen la suficiente capacidad física y longitud para contener al menos un epítipo de HLA de clase I y/o al menos uno de HLA de clase II. Opcionalmente un péptido puede comprender extensiones de N- o C-terminal, que pueden ser aminoácidos, aminoácidos modificados u otros grupos funcionales que pueden, por ejemplo, mejorar la biodisponibilidad, la absorción celular, el tratamiento y/o la solubilidad.

[0018] Un péptido preferido descrito tiene una longitud de no más de 100, 98, 96, 94, 92 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de al menos una de una proteína E6 y E7 de HPV, donde la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es reconocido por una célula T que infiltra una lesión neoplásica cervical o por una célula T que está presente en un ganglio linfático de la región pelviana o se aísla de éste, que drena desde la lesión cervical neoplásica, preferiblemente una célula T que está presente en un ganglio linfático de drenaje, o se aísla de éste, que comprende células tumorales metastásicas. Un péptido según la invención preferiblemente se usa para inducir una respuesta de células T.

[0019] En otro péptido descrito, la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos 11-32 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 37-68 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 51-72 de una proteína HPV6, los aminoácidos 55-86 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 61-82 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 71-92 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 73-105 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 91-112 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 101-122 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 121-142 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 129-138 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 1-32 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 21- 42 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 51-72 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 76-86 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 13-22 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 29-38 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 129-138 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 137-146 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 149-158 de una proteína E6 de HPV y los aminoácidos 11-19 de una proteína E7 de HPV. En otro péptido descrito más de la invención, la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5 - 26.

[0020] Un péptido preferido descrito comprende al menos un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II específico de HPV. Preferiblemente, un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II comprendido en un péptido según la invención es capaz de inducir o activar una célula Th CD4⁺ en pacientes humanos con una enfermedad asociada al HPV y/o un control sano. La activación se evalúa preferiblemente *ex vivo* o *in vivo*, más preferiblemente en un paciente humano con una enfermedad asociada al HPV, tal como una malignidad asociada al HPV, cuyas células infectadas y/o tumorales expresan una proteína de HPV tal como se ha definido anteriormente. De la forma más preferible, el epítipo de HLA de clase II es capaz de activar una respuesta efectora de Th CD4⁺ y/o de memoria de Th CD4⁺, es decir activar una célula Th CD4⁺ positiva para CD45RO. Esto llevará, en virtud de la señal de 'licencia para matar' a través de la activación

CD40 de las DC (Lanzavecchia; 1998), a una respuesta de CTL de memoria y efectora de CD8⁺ más robusta. En otro caso, las células Th CD4⁺ activadas pueden activar células asesinas no restringidas por HLA del sistema inmunológico.

5 [0021] Un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos 11-32 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 37-68 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 51-72 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 55-86 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 61-82 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 71-92 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 73-105 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 91-112 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 101-122 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 121-142 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 129-138 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 1-32 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 21-42 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 51-72 de una proteína E7 de HPV y los aminoácidos 76-86 de una proteína E7 de HPV. Un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II más preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5 - 21.

15 [0022] Otro epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito es un epítipo que es restringido por un haplotipo seleccionado del grupo que consiste en DR4, DR7, DR12, DR15, DP1, DP0201, DP4, DP14, DP1401, DP17, DQ5, DQ6, DP1901, DQ*0301, DQ*0302, DQ*0308, DQ*0501. Otro epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito es un epítipo que es restringido por un haplotipo DP o DQ, de los cuales DP1, DP0201, DP4, DP14, DP1401, DP17, DQ5, DQ6, DP1901, DQ*0301, DQ*0302, DQ*0308 y DQ*0501 son más preferidos. Un epítipo restringido por HLA-DQ descrito previamente (WO02/070006) consiste en los aminoácidos 35-50 de la proteína E7 de HPV16. Este epítipo es, no obstante, epítipo reconocido por las células T periféricas y no por una célula T que infiltra una lesión cervical neoplásica o por una célula T que está presente en un ganglio linfático de la región pelviana o se aísla de éste, dicho ganglio drenando desde la lesión cervical neoplásica. La secuencia contigua en un péptido descrito preferiblemente no comprende, por lo tanto, un epítipo que consiste en los aminoácidos 35-50 de la proteína E7 de HPV16. Así, un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido según la invención es un epítipo que está restringido por un haplotipo DP o DQ y no por un haplotipo DR. La expresión de las moléculas HLA-DR se conoce por estar sobreexpresada en las células tumorales. La presentación en ese contexto puede llevar, como la presentación de antígenos en células que presentan antígenos no profesionales (APC), a la inducción de tolerancia. La expresión de moléculas HLA-DP o DQ es muy inferior pero los epítopos HLA-DQ y HLA-DP, cuando se presentan en APC profesionales, tal como por ejemplo DC, pueden llevar sin embargo a respuestas inmunológicas eficaces.

35 [0023] Otro epítipo más preferido de célula Th CD4⁺ de clase II comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito es un epítipo que está restringido por un haplotipo DP o DQ y que es un epítipo de una proteína E6 o E7 de HPV, más preferiblemente una proteína E6 o E7 de los serotipos de HPV 16, 18, 31, 33 o 45 y, de la forma más preferible, de los serotipos de HPV 16 o 18, de los cuales el 16 es el más preferido.

40 [0024] Otro epítipo más de célula Th CD4⁺ de clase II comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito es un epítipo seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 11-32 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 37-68 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 51-72 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 55-86 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 61-82 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 71-92 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 73-105 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 91-112 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 101-122 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 121-142 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 1-32 de una proteína E7 de HPV y los aminoácidos 51-72 de una proteína E7 de HPV. Un epítipo más preferido de célula Th CD4⁺ de clase II comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido según la invención se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 18, 19, 20 y 21.

50 [0025] En otra descripción, un péptido comprende al menos un epítipo de CTL CD8⁺ de clase I específico de HPV. Además, dicho epítipo de HLA de clase I es preferiblemente capaz de activar una respuesta de CTL CD8⁺. De la forma más preferible, la capacidad de activación de CTL se ha demostrado *ex vivo* y/o *in vivo* en individuos de control humanos sanos o incluso más preferiblemente en un paciente humano con una enfermedad asociada al HPV, tal como una malignidad asociada al HPV, cuyas células infectadas y/o tumorales expresan una proteína de HPV tal y como se ha definido anteriormente. La presencia de ambos epítopos de HLA de clase I y de clase II dentro de un péptido se ha observado como particularmente ventajosa debido a la sinergia en el montaje y el mantenimiento de una respuesta de célula de CTL eficaz (como se muestra en Zwaveling *et al.*, 2002).

60 [0026] Los péptidos que comprenden epítopos que deben ser presentados a los receptores de célula T de células CTL y/o Th cumplen preferiblemente varios requisitos. Los péptidos tienen preferiblemente la longitud suficiente para contener tanto epítopos de HLA de clase I como HLA de clase II. Además, los péptidos comprenden preferiblemente residuos de anclaje dentro de sus partes de enlace a HLA de clase I para permitir el enlace a las moléculas de clase I, respectivamente. La estabilidad de la interacción entre el péptido y la molécula MHC de presentación es preferiblemente suficiente para generar una respuesta inmune significativa y eficaz. En el contexto de la presente invención, la estabilidad de la interacción entre el péptido y la molécula MHC de presentación es, por lo tanto, preferiblemente de tal manera que el péptido tiene una unión de afinidad de intermedia a alta, por lo cual un IC₅₀ ≤ aproximadamente 5 μM se considera unión de afinidad alta, aproximadamente 5 μM < IC₅₀ ≤ aproximadamente 15 μM se considera unión de

afinidad intermedia, aproximadamente $15 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} \leq 100 \mu\text{M}$ se considera unión de afinidad baja e $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ se considera como ninguna unión, por lo cual la afinidad de enlace de un péptido para una molécula MHC se determina como se describe en van der Burg *et al.*, 1995 y Kessler *et al.*, 2003.

5 [0027] Un sitio de escisión proteasómica específica que genera el C-término del epítipo está preferiblemente presente exactamente después de la secuencia de aminoácidos del epítipo para ser liberado del péptido mayor y presentado en la molécula HLA de clase I. Los requisitos de longitud son mucho menos estrictos para epítipos presentados por HLA de clase II, por lo tanto una necesidad de generación enzimática precisa del péptido de unión de clase II es menos absoluta. Estos requisitos se han usado en la presente invención para localizar y diseñar péptidos en las secuencias de longitud total de proteínas de HPV, particularmente en las proteínas E6 y E7 de HPV, que comprenden epítipos de células Th y CTL preferidos y/o combinaciones de los mismos y de este modo son péptidos altamente adecuados para usos de vacunación.

15 [0028] Por otra parte, los experimentos de células T *in vitro* y *ex vivo* se usan preferiblemente para confirmar la capacidad de los péptidos descritos para inducir respuestas sustanciales de CTL CD8⁺ y Th CD4⁺. Los péptidos descritos proporcionan así una marcada mejoría en la selección de péptidos relativamente cortos que se pueden sintetizar químicamente, que comprenden los epítipos de células T presentados por HLA de clase I y/o de clase II más potentes y de más amplia aplicación, derivados de antígenos tumorales E6 y E7 del HPV. Los péptidos se optimizan particularmente con respecto a su escisión proteasómica y preferiblemente contienen al menos un epítipo de HLA de clase I y de clase II y más preferiblemente ambos epítipos de HLA de clase I y clase II. La liberación de los C-terminales de los epítipos de CTL contenidos en los péptidos de la invención por el proteasoma 20S proporciona fragmentos de unión de HLA de clase I con capacidad estimuladora de CTL CD8⁺.

25 [0029] Los epítipos de HLA de clase I en los péptidos de HPV descritos son preferiblemente capaces de ser presentados en los alelos de HLA que son predominantes en la población de sujetos humanos que se deben tratar. Los epítipos de HLA de clase I preferidos en los péptidos derivados de HPV de la invención son epítipos capaces de enlazarse a HLA-A2, HLA-B7, HLA-B14, HLA-B27, HLA-B57 y HLA*0201. Los epítipos de CTL de HLA de clase I más preferidos son los epítipos de HPV de unión a HLA-B, de los cuales HLA-B7, HLA-B14, HLA-B27, HLA-B57 son los más preferidos. El epítipo de HLA de clase I tiene preferiblemente una alta capacidad de enlace peptídico ($\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$ de péptido) o al menos afinidad intermedia ($5 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < 15 \mu\text{M}$ de péptido). Un epítipo de CTL de clase I preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito es un epítipo que está restringido por el haplotipo de clase I como se ha indicado anteriormente y que es un epítipo de una proteína E6 o E7 de HPV, más preferiblemente una proteína E6 o E7 de los serotipos de HPV 16, 18, 31, 33 o 45 y de la forma más preferible de los serotipos de HPV 16 o 18, de los cuales el 16 es el más preferido.

35 [0030] Un epítipo de CTL de clase I preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos 13-22 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 29-38 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 52-61 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 129-138 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 137-146 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 149-158 de una proteína E6 de HPV y los aminoácidos 11-19 de una proteína E7 de HPV. Un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II más preferido comprendido en (una secuencia contigua en) un péptido descrito se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 7, 14, 22 - 26.

45 [0031] Un epítipo preferido comprendido en un péptido descrito es un epítipo que es presentado por una molécula HLA-B. Preferiblemente, la molécula HLA-B es una molécula HLA-B7, HLA-B 14, HLA-B27 o HLA-B57. Tal epítipo se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 7, 22, 24, 25 y 26.

50 [0032] Otro epítipo preferido comprendido en un péptido descrito es un epítipo que es presentado por una molécula HLA-A. Preferiblemente la molécula HLA-A es una molécula HLA-A2 o HLA*0201. Tal epítipo se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 23 y 26.

[0033] Según una divulgación, los péptidos descritos tienen una longitud de no más de 100, 98, 96, 94, 92 aminoácidos y comprenden una secuencia de aminoácidos contigua de una proteína de HPV seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 1-32 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 19-50 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 41-65 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 55-80 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 71-95 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 85-109 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 91-122 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 109-140 de una proteína E6 de HPV E6, los aminoácidos 127-158 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 1-35 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 22-56 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 43- 77 de una proteína E7 de HPV y los aminoácidos 64-98 de una proteína E7 de HPV. Más preferiblemente, los péptidos descritos consisten en una secuencia de aminoácidos contigua de una proteína de HPV seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 1-32 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 19-50 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 41-65 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 55-80 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 71-95 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 85-109 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 91- 122 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 109-140 de una proteína E6 de HPV E6, los aminoácidos 127-158 de una proteína E6 de HPV, los aminoácidos 1-35 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 22-56 de una proteína E7 de HPV, los aminoácidos 43-77 de una proteína E7 de HPV y los aminoácidos 64-98 de una

proteína E7 de HPV. La secuencia de aminoácidos contigua de las proteínas E6 o E7 de HPV son preferiblemente de los serotipos de HPV 16, 18, 31, 33 o 45 y, de la forma más preferible, de los serotipos de HPV 16 o 18, de los cuales el 16 es el más preferido.

5 [0034] Para un experto en la materia está claro que un péptido tal y como se define en este caso tendrá una propiedad ventajosa y deseada vinculada a la presencia de un epítipo en dicho péptido (por ejemplo, un epítipo que se identifica en la invención por ser presentado por al menos una de una molécula HLA-DQ y HLA-DP y/o por ser reconocido por una célula T que infiltra una lesión cervical neoplásica o por una célula T de un ganglio linfático de drenaje) tan pronto como este epítipo está presente en dicho péptido. Un péptido descrito se usa preferiblemente para inducir una
10 respuesta de células T.

[0035] El experto en la materia entenderá que aunque esta solicitud no identifica cada péptido que se puede diseñar como uno que comprende o que consiste en un epítipo deseado como se identifica en este caso, sin embargo la descripción abarca cualquier péptido, tal y como se define en la presente, que comprenda o que consista en un epítipo
15 como se identifica en la presente. En una descripción, un péptido es diferente de una proteína de HPV. En otra forma de realización preferida, un péptido no comprende o consisten en los aminoácidos 35-50 de E7 de HPV16.

[0036] Por ejemplo, un epítipo preferido es SEC ID n°: 5 (aa 11-32 de E6 de HPV16). Este párrafo es ilustrativo y se puede aplicar a cada epítipo según se identifica en la presente. Cualquier péptido que comprenda la SEC ID n°: 5 está abarcado por la presente divulgación y se pueden utilizar según la presente invención. En esta forma de realización preferida, un péptido es diferente de una proteína de HPV. La longitud de aminoácidos preferida para un péptido descrito ya se ha definido en este documento. Al diseñar un péptido descrito, un péptido puede empezar en el sitio N-terminal de un epítipo dado, como se identifica en este caso, o acabar en el sitio C-terminal de un epítipo dado, como se identifica en este caso. Alternativamente, un epítipo dado (por ejemplo SEC ID n°: 5) puede estar comprendido dentro de un péptido descrito. Utilizando la SEC ID n°: 5 como ejemplo, si diseñamos un péptido que tiene una longitud de 45 aminoácidos, tal péptido puede comprender o consistir en 11-56, 1-45, 2-46, 3-47, 4-48, 5-49, 5-50 de E6 de HPV16. Un péptido descrito puede comprender además cualquier otro epítipo de HPV, tal y como se define aquí o como ya conoce el experto en la materia.

[0037] En esta descripción preferida (SEC ID n°: 5 como epítipo), un péptido no comprende o consiste en los aminoácidos 9-33 de E6 de HPV16, como se describe en la US2005/0142541. En esta forma de realización preferida, un péptido no comprende o consiste en los aminoácidos 1-37 de E6 de HPV16, como se describe en la EP 451 550. En esta descripción preferida, un péptido no comprende o consiste en los aminoácidos 8-37 de E6 de HPV16, como se describe en la US 5 629 161. En una descripción preferida, un péptido que comprende la SEC ID n°: 5 comprende o
35 consiste en 10-32, 1-32, 1-45, 11-56, 2-46, 3-47, 4-48, 5-49, 5-50, los números indican el aminoácido de inicio y el final de E6 de HPV16.

[0038] En otra descripción (SEC ID n°: 8 como epítipo, aa 55-86 de E6 de HPV16), un péptido no comprende o consiste en un fragmento de E6 de HPV16, como se describe en el UniProt con el siguiente número de acceso Q919B2 (1-99, los números indican el aminoácido de inicio y el final de E6 de HPV16) o Q80882 (1-84). Para esta descripción también, un péptido que comprende SEC ID n°: 8 puede comenzar en el sitio N-terminal de este epítipo o terminar en el sitio C-terminal de este epítipo o este epítipo puede estar presente en el péptido. Por ejemplo, si diseñamos un péptido con una longitud de 45 aminoácidos, tales péptidos pueden comprender o consistir en 55-100, 41-86, 45-90. En una descripción preferida, un péptido que comprende SEC ID n°: 8 comprende o consiste en 55-100, 41-86, 45-90, los números indican el aminoácido de inicio y el final en la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 de HPV16.

[0039] Los péptidos derivados de HPV descritos se pueden modificar por eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, por extensión en el N- y/o C-término con aminoácidos o grupos funcionales adicionales, que puede mejorar la biodisponibilidad, dirigiéndose a células T, o comprender o liberar sustancias de modulación inmunológica que proporcionan funciones adyuvantes o (co)estimuladoras. Los aminoácidos opcionales adicionales en el N- y/o C-término preferiblemente no están presentes en las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos nativa de la proteína de HPV, más preferiblemente no son de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de E6 o E7 de HPV (p. ej. SEC ID n°: 1-4). El experto en la materia apreciará que las secuencias de aminoácidos de HPV de los diferentes serotipos de HPV están incluidas expresamente en la invención.

[0040] Los péptidos derivados de HPV descritos se pueden obtener por síntesis química y purificación posterior (p. ej. véase ejemplo 1). Los péptidos derivados de HPV de la invención son preferiblemente solubles en soluciones acuosas fisiológicamente aceptables (p. ej. PBS) comprendiendo no más de 35, 20, 10,5 o 0% de DMSO. En el tal solución, los péptidos son preferiblemente solubles en una concentración de al menos 0,5, 1, 2, 4 u 8 mg de péptido por ml. Más preferiblemente, una mezcla de más de un péptido diferente derivado de HPV de la invención es soluble en una concentración de al menos 0,5, 1, 2, 4 u 8 mg de péptido por ml en tales soluciones. En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido para la producción de un medicamento según las reivindicaciones 1-8.

[0041] Un uso preferido de los péptidos, tal y como se define en las reivindicaciones 1-6, es su uso como un medicamento, por lo cual los péptidos se usan más preferiblemente como una vacuna o un componente activo de la misma. Cada péptido se puede usar solo o preferiblemente en combinaciones de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12,

13,15 y hasta 20 péptidos diferentes de la invención, para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, para la producción de medicamentos, preferiblemente vacunas, destinados al tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada al HPV. Tal medicamento y/o vacuna antitumoral según la invención se puede utilizar para tratar pacientes que sufren o que corren el riesgo de desarrollar las siguiente lista no extensiva de neoplasia cervical intraepitelial del cérvix (CIN), vulva (VIN), vagina (VaIN), ano (AIN) y pene (PIN), al igual que cáncer del cérvix, vulva, vagina, ano, pene y cabeza y cuello.

[0042] En otro aspecto, la presente invención además se refiere a composiciones que pueden ser útiles para el tratamiento y/o la vacunación de sujetos humanos, que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15 y hasta 20 péptidos diferentes, tal y como se definen en la reivindicación 10, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en particular adyuvantes y moduladores inmunológicos. Preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica y/o destinada al uso como medicamento. La composición farmacéutica preferiblemente se destina a la vacunación. La composición farmacéutica preferiblemente se usa para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, para la producción de medicamentos, preferiblemente vacunas, destinadas al tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada al HPV. Ya se ha proporcionado en este documento una lista no exhaustiva de enfermedades asociadas al HPV.

[0043] Así, en un aspecto, la invención se refiere al uso de un péptido, tal y como se define en las reivindicaciones 1-4, para la producción de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad asociada al HPV, donde el péptido tiene una longitud de no más de 100, 98, 96, 94, 92 aminoácidos y comprende al menos 22 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de una proteína E6 de HPV, donde la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es presentado por al menos una molécula HLA-DQ y HLA-DP. Preferiblemente, el epítipo no es el epítipo presentado en el contexto de HLA-DQ2 y que consiste en los aminoácidos 35-50 de la proteína E7 de HPV16. Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida precedente, en otra forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es reconocido por una célula T que infiltra una lesión neoplásica cervical o por una célula T de un ganglio linfático de drenaje. Los péptidos, las secuencias de aminoácidos contiguas y los epítipos son preferiblemente tal y como se han definido aquí anteriormente.

[0044] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un péptido tal y como se define en las reivindicaciones 5-6 para la producción de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el péptido tiene una longitud de no más de 100, 98, 96, 94, 92 aminoácidos y comprende al menos 22 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de al menos una de una proteína E6 y E7 de HPV, donde la secuencia de aminoácidos contiguos comprende un epítipo que es reconocido por una célula T que infiltra una lesión neoplásica cervical o por una célula T de un ganglio linfático de drenaje. Los péptidos, las secuencias de aminoácidos contiguos y los epítipos son preferiblemente tal y como se han definido en este documento anteriormente.

[0045] La formulación de medicamentos, las formas de administración y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen y son habituales en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. Las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la invención se formulan preferiblemente para que sean adecuados para la administración intravenosa o subcutánea o intramuscular, aunque se pueden plantear otras vías de administración, tales como la administración mucosa o la administración intradérmica y/o intracutánea, por ejemplo por inyección. En este caso se prefiere la administración intradérmica. Las ventajas y/o las formas de realización preferidas que están específicamente asociadas a la administración intradérmica se definen más adelante en una sección separada titulada "administración intradérmica".

[0046] Además, la presente invención abarca que la administración de al menos un péptido y/o al menos una composición de la invención se puede realizar como una única administración. Alternativamente, la administración de al menos un péptido y/o al menos una composición se puede repetir si es necesario y/o diferentes péptidos y/o composiciones de la invención se pueden administrar consecutivamente.

[0047] Las composiciones farmacéuticas (también denominadas medicamentos) según la invención pueden comprender preferiblemente al menos un compuesto o adyuvante de estimulación de respuesta inmune. Ventajosamente, la composición farmacéutica según la invención puede comprender adicionalmente uno o más adyuvantes sintéticos. Estos adyuvantes se pueden mezclar con la composición farmacéutica según la invención o se pueden administrar de forma separada al mamífero o humano que se va a tratar. Particularmente, se prefieren aquellos adyuvantes que se conocen por actuar vía los receptores tipo Toll y/o vía una proteína RIG-1 (Gen-1 inducible por ácido retinoico) y/o vía un receptor de endotelina. Los compuestos de modificación inmunológica que son capaces de activar el sistema inmunológico innato se pueden activar particularmente bien mediante receptores tipo Toll (TLRs), incluyendo TLR 1-10. Los compuestos que son capaces de activar los receptores TLR y las modificaciones y derivados de los mismos están bien documentados en la técnica. TLR1 se puede activar por lipoproteínas bacterianas y formas acetiladas de las mismas, TLR2 se puede activar además por glicolípidos bacterianos Gram positivos, LPS, LPA, LTA, fimbria, proteínas de membrana externa, proteínas de choque térmico de bacterias o del huésped y lipoarabinomano micobacteriano. TLR3 se puede activar por dsRNA, en particular de origen vírico, o por el compuesto químico poly(I:C). TLR4 se puede activar por LPS Gram negativo, LTA, proteínas de choque térmico del huésped o de origen bacteriano, revestimiento

vírico o proteínas de revestimiento, taxol o derivados de los mismos, hialuronano que contiene oligosacáridos y fibronectinas. TLR5 se puede activar con flagelos bacterianos o flagelina. TLR6 se puede activar por lipoproteínas micobacterianas y factor soluble lábil al calor de *Streptococcus* del grupo B (GBS-F) o *Staphylococcus modulins*. TLR7 se puede activar por imidazoquinolinas. TLR9 se puede activar por DNA CpG no-metilado o complejos IgG-cromatina.

5 En particular TLR3, TLR7 y TLR9 desempeñan una función importante en la mediación de una respuesta inmune innata contra las infecciones víricas y los compuestos capaces de activar estos receptores se prefieren particularmente para su uso en los métodos de tratamiento y en las composiciones o medicamentos según la invención. Adyuvantes particularmente preferidos comprenden, pero de forma no limitativa, compuestos producidos de forma sintética que comprenden dsRNA, poly(I:C), DNA CpG no-metilado que desencadena los receptores TLR3 y TLR9, IC31, un agonista

10 de TLR 9, IMSAVAC, un agonista de TLR 4, Montanide ISA-51, Montanide ISA 720 (un adyuvante producido por Seppic 7, Francia). La proteína RIG-1 se conoce por ser activada por ds-RNA al igual que TLR3 (Immunity, (2005), 1:19-28. En otra forma de realización preferida, los compuestos del adyuvante sintético están físicamente enlazados a los péptidos de la invención. El enlace físico de adyuvantes y compuestos coestimuladores o grupos funcionales al epítipo de HLA de clase I y de HLA de clase II que comprende péptidos proporciona una respuesta inmune mejorada por estimulación

15 simultánea de células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, que interiorizan, metabolizan y muestran el antígeno. Otro compuesto de modificación inmunológica preferido es un inhibidor de un receptor de endotelina, tal como BQ-788 (Buckanovich RJ *et al.* Nature Medicine (2008), 14:28-36, Ishikawa K, PNAS (1994) 91:4892). BQ-788 es N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gamma-metilleucil-D-1-metoxicarboniltriptofanil-D-norleucina. No obstante, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto de BQ-788 modificado también está abarcado dentro del campo de esta invención.

[0048] Además, se prefiere el uso de moléculas (co)estimuladoras de células presentadoras de antígenos, como se establece en la WO99/61065 y en la WO03/084999, en combinación con los péptidos y composiciones de la invención. En particular, el uso de ligandos 4-1-BB y/o CD40, anticuerpos agonísticos, ligandos OX40 o fragmentos funcionales y

25 derivados de los mismos, al igual que compuestos sintéticos con actividad agonística similar se administran preferiblemente de forma separada o combinados con los péptidos de la invención a sujetos que deben ser tratados para estimular más el montaje de una respuesta inmune óptima en el sujeto.

[0049] Además, una forma de realización preferida comprende la entrega de los péptidos, con o sin estimulantes inmunológicos adicionales tales como ligandos TLR y/o anticuerpos anti CD40/anti-4-1-BB en un vehículo de liberación lenta tal como aceite mineral (p. ej. Montanide ISA 51) o PLGA. Alternativamente, los péptidos de la invención se pueden administrar de forma intradérmica, por ejemplo por inyección, con o sin estimulantes inmunológicos (adyuvantes). Preferiblemente, para la entrega intradérmica los péptidos de la invención se administran en una composición que consiste en los péptidos y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables inmunológicamente

35 inertes, por ejemplo, soluciones acuosas tamponadas a fuerza iónica fisiológica y/u osmolaridad (tal como por ejemplo PBS).

Administración intradérmica

[0050] En una forma de realización preferida, un péptido o una composición que comprende un péptido tal y como se define en la reivindicación 9 o un medicamento usado en la invención, todos tal y como se definen aquí, se formulan para ser adecuados para la administración o la aplicación intradérmica. El experto en la materia conoce la intradérmica. En el contexto de la invención, intradérmica es sinónimo de intracutánea y es diferente de subcutánea. Una aplicación más superficial de una sustancia es epicutánea (sobre la piel), luego vendría una aplicación intradérmica (en o dentro de la piel), luego una aplicación subcutánea (en los tejidos justo debajo de la piel), luego una aplicación intramuscular (dentro del cuerpo del músculo). Una aplicación intradérmica normalmente se da por inyección. Una inyección intradérmica de una sustancia se hace normalmente para probar una posible reacción, alergia y/o inmunidad celular a ésta. Una aplicación subcutánea también se da normalmente por inyección: se inyecta una aguja en los tejidos situados

40 bajo la piel.

[0051] En otra forma de realización preferida más, el medicamento usado en la invención no comprende ningún adyuvante tal como Montanide ISA-51, esto significa que la formulación del medicamento es más simple: preferiblemente una emulsión basada en aceite y agua no está presente en el medicamento usado. Por consiguiente, el medicamento usado en la invención no comprende un adyuvante tal como Montanide ISA-51 y/o no comprende una emulsión basada en aceite en agua. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el medicamento usado en la invención es una solución acuosa tamponada a fuerza iónica fisiológica y/u osmolaridad, tal como por ejemplo PBS (solución salina de tampón de fosfato) que comprende o que consiste en uno o más péptidos, tal y como se han definido en la presente anteriormente. El experto en la materia sabe cómo preparar tal solución.

55

[0052] El medicamento, tal y como se usa en la invención, tiene otra ventaja, que es que mediante la administración intradérmica de bajas cantidades de un péptido como se ha definido aquí anteriormente, aún se puede conseguir un efecto inmunogénico. La cantidad de cada péptido usado está preferiblemente en el intervalo entre 1 y 1000 µg, más preferiblemente entre 5 y 500 µg, incluso más preferiblemente entre 10 y 100 µg.

60

[0053] En otra forma de realización preferida, el medicamento comprende un péptido como se ha definido en la presente anteriormente y al menos un adyuvante, dicho adyuvante no se formula en una emulsión a base de aceite en agua y/o

65

- no es de un tipo de emulsión de aceite en agua como se ha definido en la presente anteriormente. Este tipo de medicamento se puede administrar como administración única. Alternativamente, la administración de un péptido como se ha definido en la presente anteriormente y/o un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o distintos péptidos y/o adyuvantes diferentes se pueden administrar consecutivamente. La presente invención también abarca que un péptido de la invención se administre de forma intradérmica mientras que un adyuvante tal y como se define en este caso se administre consecutivamente. El adyuvante se puede administrar de forma intradérmica. No obstante, cualquier otra forma de administración se puede utilizar para el adyuvante.
- [0054] La administración intradérmica de un péptido es muy atractiva ya que la inyección de la vacuna se realiza en el sitio de la enfermedad, o lo más cerca posible de éste, dando como resultado la activación local del ganglio linfático de drenaje de la enfermedad, generando una activación local más fuerte del sistema inmunológico. En particular, para VIN, VAIN, AIN, PIN, cáncer de pene, cáncer de vulva, cáncer anal, cáncer de cabeza y de cuello.
- [0055] En una forma de realización preferida, la administración intradérmica se realiza directamente en el sitio de la lesión o de la enfermedad. En el sitio de la lesión se entiende aquí que es dentro de menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 cm del sitio de la lesión.
- [0056] Tras la administración intradérmica de un medicamento, tal y como se define aquí, no sólo se desencadenan respuestas Th2 sino también Th1. Esto es sorprendente dado que ya se ha descubierto que el cebado de antígeno cutáneo vía pistola de genes lleva a una respuesta inmune de Th2 selectiva (Alvarez D. *et al*, 2005). Además, la respuesta inmune observada no sólo se restringe a la piel como cabría esperar sobre la base de (Alvarez D. *et al*, 2005). Demostramos que las células T específicas que secretan IFN γ circulan a través del sistema linfático secundario cuando se detectan en la sangre periférica post-desafío.
- [0057] Otra ventaja crucial del medicamento de la invención es que se pueden utilizar cantidades relativamente bajas de péptidos, en una única inyección, en una formulación simple y sin ningún adyuvante conocido que aporte efectos secundarios indeseados como Montanide ISA-51. Sin querer estar limitados por ninguna teoría, creemos que el péptido o péptidos intradérmicos de HPV usados en la invención se dirigen específica y directamente a las células de Langerhans (LC) epidérmicas presentes en el epitelio. Las células de Langerhans son un subtipo específico de DC que muestran capacidad sobresaliente para iniciar respuestas inmunológicas primarias (Romani N. *et al* 1992). Estas LC se pueden ver como adyuvantes naturales reclutados por el medicamento utilizado en la invención.
- [0058] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al uso de un péptido derivado de las proteínas E2, E6 y/o E7 de HPV para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es para la administración intradérmica como se ha definido anteriormente y donde además un péptido derivado de las proteínas E2, E6 y/o E7 de HPV se utiliza posteriormente para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es para la administración subcutánea.
- [0059] El medicamento para la administración intradérmica ya se ha definido en este documento. El péptido usado para la administración subcutánea es el mismo que el usado para la administración intradérmica y ya se ha definido en este documento. El experto en la materia sabe cómo formular un medicamento adecuado para la administración subcutánea. Preferiblemente, el medicamento adecuado para la administración subcutánea comprende un péptido, como se ha definido ya en la presente, en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes preferidos ya se han mencionado en la presente. Otros adyuvantes preferidos son del tipo de una emulsión de aceite en agua, tal como el adyuvante de Freund incompleto o IFA, Montanide ISA-51 o Montanide ISA 720 (Seppic, Francia). En otra forma de realización preferida, el medicamento adecuado para la administración subcutánea comprende uno o más péptidos, un adyuvante, ambos como se ha definido en la presente anteriormente, y un portador farmacéuticamente aceptable inerte y/o excipientes, todos como se ha definido en la presente anteriormente. La formulación de medicamentos y el uso de recipientes farmacéuticamente aceptables se conocen y son habituales en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21nd Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. El segundo medicamento usado en la invención se formula para que sea adecuado para la administración subcutánea.
- [0060] En esta forma de realización preferida, el medicamento adecuado para la administración intradérmica se puede administrar simultáneamente con el medicamento adecuado para la administración subcutánea. Alternativamente, ambos medicamentos se pueden administrar consecutivamente de forma intradérmica y posteriormente de forma subcutánea o viceversa (primero administración subcutánea seguida de administración intradérmica). En esta forma de realización preferida, como en la forma de realización preferida anterior dedicada a la administración intradérmica, la administración subcutánea y/o intradérmica de un péptido como se ha definido en la presente anteriormente y/o de un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o los diferentes péptidos y/o diferentes adyuvantes se pueden administrar consecutivamente de forma intradérmica y/o subcutánea. También está abarcado por la presente invención que un péptido de la invención se administre de forma intradérmica y/o subcutánea mientras que un adyuvante, tal y como se define aquí, se administre consecutivamente. El adyuvante se puede administrar de forma intradérmica y/o subcutánea. No obstante, cualquier otra forma de administración se puede utilizar para el adyuvante.
- [0061] Esperamos que la combinación de una administración intradérmica y subcutánea de un medicamento según la invención sea ventajosa. Las DC de la epidermis son claramente diferentes de las DC de la dermis y del tejido

5 subcutáneo. La inmunización intracutánea (intradérmica) provocará el tratamiento del antígeno y la activación de las DC (células de Langerhans langerina positivas) epidérmicas que, a través de su red dendrítica, están en contacto cercano con los queratinocitos. Esto activará también de forma óptima las vías inflamatorias en las interacciones entre la célula de Langerhans y los queratinocitos, seguidas del tráfico de célula de Langerhans activada y cargada de antígeno a los ganglios linfáticos que drenan la piel.

10 [0062] La administración subcutánea activará otros subconjuntos de DC, que también se cargarán con antígeno y se desplazarán de forma independiente a los ganglios linfáticos que drenan la piel. Posiblemente, el uso de un medicamento que se pueda administrar tanto de forma intradérmica como subcutánea puede llevar a una estimulación sinérgica de las células T en estos ganglios de drenaje por los diferentes subconjuntos de DC.

15 [0063] En otro aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican los péptidos y/o epítomos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID n°: 5, 6, 8. Los ácidos nucleicos no codifican las proteínas E6 o E7 de HPV de longitud total de tipo salvaje sino que codifican los péptidos y/o epítomos de la invención como tales, o flanqueados por la secuencia de aminoácidos que no son contiguos a las proteínas E6 o E7 de HPV de tipo salvaje. Tales aminoácidos
20 flanqueantes pueden ser de proteínas diferentes de las proteínas E6 o E7 de HPV de tipo salvaje y/o pueden ser de otras ubicaciones dentro de las proteínas E6 o E7 de HPV de tipo salvaje que no sean contiguos al péptido/epítomo que flanquean. En una forma de realización preferida los ácidos nucleicos codifican dos o más péptidos y/o epítomos de la invención dispuestos como cuentas en la cadena, por lo cual los péptidos y/o los epítomos de la invención (las cuentas) se enlazan directamente juntos y/o se enlazan a través de secuencias enlazadoras que son de proteínas diferentes de las proteínas E6 o E7 de HPV de tipo salvaje y/o de otras ubicaciones de las proteínas E6 o E7 de HPV de tipo salvaje
25 que no sean contiguas al péptido/epítomo que flanquean. Las secuencias de aminoácidos que flanquean o enlazan los péptidos/epítomos pueden comprender sitios de escisión proteolítica. Tales ácidos nucleicos se pueden aplicar para entregar los péptidos/epítomos de la invención de varias maneras. Pueden usarse, por ejemplo, en la producción de proteína recombinante en una célula huésped adecuada (p. ej. *E. coli*) de la que se pueden purificar. Alternativamente, el ácido nucleico se puede enlazar operativamente a las secuencias reguladoras de expresión (promotores y similares) e incorporar en los constructos de expresión para las células humanas. Tales células (autólogas) se pueden transfectar o transducir *ex vivo* para ser (re)administradas a un sujeto que necesita las mismas. Alternativamente, el constructo de expresión se puede incorporar en el vector de terapia genética adecuado. Los vectores víricos (basados en un virus defectuoso) son agentes más eficaces para transferir genes en comparación con los agentes no víricos. Los constructos de expresión vírica adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que se basan en adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), retrovirus o vaccinia modificada Ankara (MVA).

35 [0064] En otra descripción, se proporciona una herramienta para aislar moléculas receptoras de células T (TCR) específicas de HPV a partir de células T capaces de interactuar con un epítomo de HPV de la invención como se ha descrito en la presente. Un TCR según esta invención será preferiblemente capaz de interactuar con el epítomo de HPV que comprende péptidos cuando están en el contexto de una molécula de HLA y/o se muestran por ésta, preferiblemente en una célula viva *in vitro* o *in vivo*. Los receptores de célula T y en particular los ácidos nucleicos que codifican TCR según la invención pueden aplicarse, por ejemplo, para transferir tal TCR a células T de pacientes que de otra manera no son capaces de elevar la inmunidad de las células T contra un epítomo de HPV de la invención como se describe en este documento. Por este método de clonación de TCR se pueden proporcionar clones de células T que son esencialmente isogénicos con el receptor que se va a tratar con los clones de células T, es decir, los clones de célula T de expresión de TCR son autólogos para el paciente que sufre una enfermedad asociada al HPV. El método proporciona de este modo clones de células T capaces de reconocer un epítomo de HPV según la invención que se pueden generar y se pueden dirigir específicamente a células tumorales y/o infectadas por el HPV que expresan un epítomo de HPV en un sujeto que requiere el mismo. En una forma de realización preferida, las células T del sujeto se aíslan y transducen con el TCR que reconoce los epítomos de HPV de la invención como se describe en este caso. Tras la selección y la expansión, conocidas por el experto en la materia, estas células T autólogas que ahora expresan un TCR que puede reconocer células tumorales inducidas por el HPV o células infectadas por el HPV, se pueden reinfundir en el paciente, donde se dirigen específicamente a las células tumorales e infectadas por HPV. Por lo tanto, la invención proporciona linfocitos T que codifican y expresan un receptor de célula T capaz de interactuar con un epítomo de HPV seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID n°: 5, 6, 8, preferiblemente en el contexto de una molécula de HLA. Dicho linfocito T puede ser un linfocito T recombinante o seleccionado de forma natural. Los linfocitos T de la invención también se pueden usar para o en los métodos y composiciones farmacéuticas de la invención. Esta especificación proporciona de este modo al menos dos métodos para producir un linfocito T citotóxico de la invención, que comprende el paso de poner en contacto linfocitos indiferenciados con un epítomo de HPV de la invención (o un péptido que comprende el epítomo) bajo condiciones propicias de activación de una respuesta inmune, lo que se puede hacer *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, en un paciente que recibe un injerto, utilizando péptidos según la invención. Alternativamente, se puede realizar *in vitro* mediante la clonación de un gen que codifica el TCR específico para interactuar con un epítomo de HPV de la invención, que se puede obtener a partir de una célula obtenida del método precedente o que se puede obtener de un sujeto que muestra una respuesta inmune contra el epítomo, en una célula huésped y/o un linfocito huésped, preferiblemente un linfocito autólogo y, opcionalmente, diferenciar para linfocito T citotóxico (CTL). Los detalles de los métodos de esta forma de realización se describen en, por ejemplo, De Witte *et al.* 2006 y Schumacher *et al.* 2002.

65 [0065] En otra forma de realización, la invención pertenece al uso de los ácidos nucleicos que codifican los péptidos y/o epítomos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID n°: 5, 6, 8, receptores de células T que reconocen los

epítomos de la invención, ácidos nucleicos que codifican tales receptores de células T, células T (clones) que expresan tales ácidos nucleicos como un medicamento. Preferiblemente, el medicamento se usa para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad asociada al HPV. Tal medicamento según la invención se puede utilizar para tratar a pacientes que sufren o que corren un alto riesgo de desarrollar la siguiente lista no extensiva de neoplasia cervical intraepitelial del cérvix (CIN), vulva (VIN), vagina (VaIN), ano (AIN) y pene (PIN), al igual que el cáncer del cérvix, vulva, vagina, ano, pene y cabeza y cuello.

[0066] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para referirse a que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un", "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto especifique claramente que hay uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un", "uno" o "una" de este modo se refiere normalmente a "al menos uno".

[0067] Los siguientes ejemplos se ofrecen para usos únicamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Descripción de las figuras

Figura 1

[0068] A) Proliferación de cultivos de célula T iniciales aislados del tejido cervical de 4 pacientes diferentes. Todos los cultivos de células T reconocidos procesaron antígeno de forma natural en un ensayo de proliferación de 3 días tras estimulación con proteína recombinante y agrupación de péptidos de E6 o E7 de HPV16 o 18. C265 reconoció la agrupación de péptidos HPV16E6 1-92, C334 la agrupación de péptidos HPV16E6 71-158, C284 la agrupación de péptidos HPV16E7 16 1-98 y C228 la agrupación de péptidos HPV18E7 1-106. B) Mapeo fino de la especificidad de cultivos en masa utilizando péptidos únicos se midió por proliferación y producción de IFN γ . C265 respondió a la estimulación con el péptido HPV16E6 37-68, C334 con el péptido HPV16E6 137-158, C284 con el péptido HPV16E7 71-92 y C228 con el péptido HPV18E7 21-42.

Figura 2

[0069] Análisis del tipo de célula T que responde al antígeno de HPV según se midió por tinción de citocina intracelular para IFN γ . Para la proteína y el péptido positivo, se usó el péptido HPV16E6 41-62 y la proteína HPV16E6 para C265, la proteína HPV16E6 y el péptido 137-158 para C334, la proteína HPV16E7 y el péptido 71-92 para C284 y la proteína HPV18E7 y el péptido 21-42 para C228. Los péptidos y las proteínas de los equivalentes de HPV se usaron como controles negativos. El cultivo de TIL de C265 mostró una respuesta de célula T CD4⁺ y CD8⁺ que ambas respondieron al péptido HPV16 E6 41-62.

Figura 3

[0070] A) Bloqueo de respuestas restringidas CD4 por anticuerpos de HLA de clase II en un ensayo de proliferación de 3 días. Células T derivadas de C265 se estimularon con B-LCL autólogas cargadas de péptido, células T derivadas de C284 se estimularon con monocitos cargados de péptido que fueron compatibles sólo para HLA-DR12 y células T derivadas de C228 se estimularon con monocitos cargados con péptidos, HLA compatibles para DQ*0302. B) Mapeo fino y restricción de HLA de cultivos de TIL. Las células T CD4⁺ del paciente C265 se estimularon con B-LCL autólogas pulsadas con péptidos de 10-meros, cubriendo la secuencia de aminoácidos del péptido más largo reconocido, se evaluó en un ensayo de ELISPOT. Para determinar la restricción de estas células T CD4⁺ éstas se estimularon con monocitos compatibles para HLA-DP2 sólo. De forma similar, el epítipo del péptido mínimo reconocido por las células T CD8 de C334 se determinó mediante la incubación de estas células T con los péptidos indicados de 10-meros en un ensayo de ELISPOT. La restricción de HLA de la respuesta de célula T CD8⁺ de C334 se determinó usando un péptido pulsado con PBMC aisladas de individuos sanos que eran parcialmente compatibles con las moléculas de HLA de clase I del paciente.

Figura 4

[0071] Análisis de reactividad de célula T presente en ganglio linfático de drenaje de tumor de C427. A) Reactividad de cultivos de células T después de 3 semanas tras la estimulación con B-LCL autólogas pulsadas con péptido HPV16E6 medida en un ensayo de proliferación de 3 días. B) Panel superior: patrón de reconocimiento del cultivo de células T tras estimulación con B-LCL autólogas pulsadas con péptidos únicos de 22-meros. Paneles inferiores: gráficos del epítipo mínimo reconocido por clones de células T derivados de este cultivo de LNMC iniciales. El clon de célula T CD4 C427.47 se estimuló y evaluó en un ensayo de proliferación de 3 días (panel izquierdo). El clon de célula T CD8 C427.78 se evaluó en un ensayo de ELISPOT de IFN γ (panel derecho). C) El tipo de célula T respondedora se determinó por tinción de citocina intracelular. El péptido HPV16E6 11-32 (panel superior) y el péptido 137-158 (panel inferior) se usaron como péptidos positivos. El péptido y la proteína HPV18E7 se usaron como controles negativos. D) El elemento de restricción se analizó usando anticuerpos de bloqueo de HLA de clase II en B-LCL parcialmente

compatibles para clase II (C427.47, panel superior) y en B-LCL parcialmente compatibles para HLA de clase I (C427.78, panel inferior), indicando que la respuesta de células T CD4⁺ estaba restringida por HLA-DP 14 y las células T CD8⁺ por HLA-B 14.

5 Figura 5

[0072] Una visión de conjunto del número, día de aparición y antígeno inyectado que indujo unas reacciones cutáneas positivas en el grupo de 19 donantes sanos (HD). Las reacciones cutáneas se consideraron positivas cuando aparecieron pápulas superiores a 2 mm de diámetro no menos de 2 días después de la inyección. La disposición indicada se usa para las 8 agrupaciones de péptidos, se indica el primer y el último aminoácido de la proteína de la agrupación de péptidos usada. La disposición impresa en negrita indica al menos una reacción positiva dentro de este plazo; un cuadrado relleno representa una reacción cutánea positiva de nuevo desarrollo para la agrupación de péptidos indicada.

15 Figura 6

[0073] Detección de células T específicas de HPV16 por ELISPOT de IFN γ en la muestra de sangre pre-desafío de donantes sanos se correlaciona significativamente con la aparición de una reacción cutánea positiva temprana (<13 días) para la agrupación de péptidos reconocida ($p=0,0003$, prueba exacta de Fisher de dos colas). Se calcularon las respuestas específicas mediante la substracción del número medio de puntos + 2xSD del control de medio a partir del número medio de puntos presentes en los pocillos experimentales. Se da el número de puntos específicos por 100.000 PBMC. Las respuestas se consideraron positivas si las frecuencias de células T específicas de la agrupación de péptidos era ≥ 5 en 100.000 PBMCs.

25 Figura 7

[0074] A. Asociación entre la aparición de una reacción cutánea positiva y la detección simultánea (ELISPOT de IFN γ) de células T específicas de HPV16 circulantes en la muestra de sangre post-desafío de donantes sanos ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher de dos colas). De un total de 88 pruebas de piel, 39 fueron positivas. Veinticinco de estas 39 reacciones estaban asociadas a una reacción positiva en el ELISPOT (frecuencia de células T ≥ 5 en 100.000 PBMCs). De los 49 sitios de prueba de piel que no mostraron una reacción cutánea, 10 estaban asociados a un ELISPOT positivo.

35 Figura 8

[0075]

A. Las respuestas de células T específicas de HPV16 detectadas por ELISPOT de IFN γ en la muestra de sangre post-desafío de donantes sanos mostró una reacción cutánea positiva. El número medio de puntos por 100.000 PBMCs está representado. La mezcla de respuestas de memoria (MRM) se usó como control positivo. La barra rellena indica el sitio de reacción cutánea positiva del que se tomó una biopsia por perforación y se puso en cultivo.

B. Se evaluaron los linfocitos T que se exfiltraron de las biopsias por perforación, después de un periodo de 14 a 28 días de expansión dirigida por citocina, para su capacidad para proliferar tras estimulación con monocitos pulsados con péptidos (10 $\mu\text{g/ml}$), según se inyectaron en la prueba de piel, o con proteína (20 $\mu\text{g/ml}$). La fitohemaglutinina (PHA) sirvió como control positivo. La proliferación se midió por incorporación de [³H]timidina y una respuesta proliferativa se definió específica cuando el índice de estimulación (SI) ≥ 3 . El donante sano 17 (HD17) es un ejemplo de un sitio de reacción cutánea positiva que consiste en células T no específicas.

C. Sobrenadantes de las respuestas proliferativas en B se analizaron para la presencia de IFN γ , interleuquina 4 (IL4), IL5 y factor de necrosis tumoral α , IL2, IL10 (no se muestra) por Cytometric Bead Array. Los valores de corte se basaron en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 $\mu\text{g/ml}$ de IFN γ y 20 $\mu\text{g/ml}$ para las citocinas restantes). La producción de citocina específica del antígeno se definió como una concentración de citocina por encima del nivel de corte y $>2x$ la concentración del control de medio. El donante sano 15 (HD15) muestra un alto nivel de base de IL5, pero se aumenta $>2x$ después de la estimulación con antígeno.

Figura 9

[0076] El cultivo de células T de la biopsia de piel de la agrupación 4 (E641-65, E655-80, E671-95) del donante sano 15 (HD15) consiste en ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de HPV 16. La especificidad del cultivo se evaluó en una tinción de citocina intracelular (ICS) contra la proteína (20 $\mu\text{g/ml}$) y los péptidos (1,0 $\mu\text{g/ml}$) correspondientes con la prueba de piel inyectada. Notablemente, en 3 de 4 biopsias se detectaron células T específicas de HPV 16 CD8⁺.

65 Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación y caracterización de epítomos de HPV nuevos

1. Métodos

5 1.1 Sujetos

[0077] Mujeres que presentaban neoplasia cervical histológicamente probada en el departamento de ginecología del Leiden University Medical Centre y Leyenburg Hospital the Hague se inscribieron en el estudio CIRCLE, que investiga la inmunidad celular contra las lesiones cervicales positivas de HPV 16, después de aportar el consentimiento informado. El diseño del estudio fue aprobado por los comités éticos médicos de ambos hospitales. Los sujetos se evaluaron para estado de HPV utilizando cebadores específicos de HPV16 y HPV18 en el ADN aislado de muestras de resección quirúrgica (Claas *et al.* 1989). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para análisis de restricción de HLA se obtuvieron de donantes de sangre sanos anónimos tipificados de HLA previo consentimiento informado.

15 1.2 Antígenos

[0078] Un conjunto de péptidos solapantes que abarca la proteína E6 y E7 tanto de HPV16 como de HPV18 se usó para ensayos de estimulación de células T. E6 y E7 de HPV16 y HPV 18 consistían en 22-meros solapando 12 residuos. Los péptidos se sintetizaron y disolvieron como se ha descrito anteriormente (van der Burg *et al.* 2001, Welters *et al.* 2006). Se produjeron proteínas E6 y E7 de HPV recombinantes en *E. coli* recombinante, como se ha descrito anteriormente (van der Burg *et al.* 2001). Por otra parte, se produjo un conjunto de 10-meros solapantes (solapando 9 aminoácidos) de E6 y E7 de HPV16 para determinar el epítomo del péptido mínimo reconocido por células T específicas de HPV 16.

25 1.3 Células que presentan antígenos

[0079] Las líneas celulares B (B-LCL) transformadas por el Virus de Epstein-Barr de los pacientes se mantuvieron en IMDM con 10% de FCS. Se generaron monocitos a partir de linfocitos de sangre periférica como se ha descrito anteriormente (de Jong *et al.* 2002).

30 1.4 Aislamiento y cultivo de células T

[0080] Se obtuvieron biopsias de tumor cervical después de histerectomía radical, se obtuvo tejido de neoplasia cervical de pacientes con CIN III después de la biopsia. El tejido fresco cervical se deshizo en piezas de aproximadamente 1 mm³ y se cultivó en IMDM (BioWhittaker, Verviers, Bélgica), suplementado con 10% de suero humano AB (Sigma, St. Louis MO, EE.UU.), 10% de factor de crecimiento de célula T (TCGF, Zeptomatrix, Buffalo NY, EE.UU.) y 5 ng/ml de IL-15 (PeproTech, Rocky Hill NJ, USA). Durante el primer día 5 ng/ml de IL-7 (PeproTech) se añadió a los cultivos para asegurar el crecimiento de células T. Después de 2-3 semanas se evaluó la especificidad de los cultivos de células T (TIL, CIL) y los cultivos positivos se expandieron usando una mezcla de B-LCL autólogas irradiadas y 5 µg/ml de péptido cognado.

[0081] Los ganglios linfáticos se obtuvieron de la región pelviana y contenían células tumorales, indicativo de cáncer metastásico. Los ganglios linfáticos se cortaron en pedazos y se incubaron durante una hora a 37 °C en presencia de colagenasa (200 IU/ml, Sigma) y ADNasa (50 µg/ml, Sigma), después de lo cual las células mononucleares del ganglio linfático se pasaron por un depurador celular (BD, Erebodemgem, Bélgica) para obtener una única suspensión celular. Los cultivos de LMNC separadas se estimularon con agrupaciones de péptidos E6 o E7 de HPV16 o 18 y se cultivaron durante 2-3 semanas.

[0082] Los clones de células T se aislaron usando una dilución limitante según un protocolo adaptado de Evans *et al.* (Evans *et al.* 2001), sustituyendo IL-2 por 10% de TCGF y 5 ng/ml de IL-15 y añadiendo 0,5 µg/ml de fitohemaglutina (PHA, Murex Diagnostics, Dartford, UK) para activar el receptor de célula T. Después de la dilución limitante, los clones de células T se evaluarán para su especificidad y se mantuvieron en IMDM con 10% de suero fetal de ternera (FCS, PAA laboratories, Pasching, Austria), 10% de TCGF y 5 ng/ml de IL-15. Los clones de célula T se expandieron usando una mezcla de medio de cultivo, PBMC irradiadas de 3 donantes diferentes, B-LCL y 0,5 µg/ml de PHA.

55 1.5 Análisis de especificidad de célula T

[0083] Se evaluaron cultivos de células T (25.000-50.000 células/pocillo) en monocitos autólogos pulsados o EBVs autólogos irradiados para el reconocimiento de proteína (10 µg/ml) y péptidos (5 µg/ml) E6 y E7 de HPV16 y 18 por triplicado en un ensayo de proliferación de 3 días. Después de 48 horas, el sobrenadante se cosechó y se almacenó a -20°C para análisis de citocina. Durante las últimas 16 horas de cultivo se añadió 0,5 µCi/pocillo de [³H]timidina para medir la proliferación (van der Burg *et al.* 2001). La producción de IFNγ antígenoespecífica se midió por ELISA como se ha descrito anteriormente (van der Burg *et al.* 1999).

[0084] Se realizaron experimentos de bloqueo de MHC de clase II como se ha explicado anteriormente usando anticuerpos monoclonales murinos contra HLA-DR (B8.11.2), HLA-DQ (SPV.L3) y HLA-DP (B7/21) (van der Burg *et al.*

1999). Se incubaron APC pulsadas con péptidos con anticuerpos anti-MHC clase II durante 2 horas antes de la adición de células T.

[0085] Se llevó a cabo la enumeración de células T productoras de IFN γ según se midió por tinción de citocina intracelular, como se ha descrito anteriormente (de Jong *et al.* 2005). Brevemente, las APC se cargaron con péptido cognado o proteína recombinante y se incubaron con cultivos de célula T. Después de 1 hora de incubación se añadió 10 μ g/ml de brefeldina A (Sigma) y se incubó durante toda la noche. A partir de ahí, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído (Sigma) y se permeabilizaron con 0,1% de Saponin. Las muestras se mancharon posteriormente con CD4-APC, CD8-PerCP e IFN γ -PE y se analizaron por citometría de flujo.

[0086] El péptido mínimo reconocido por células T CD8 se analizó por ELISPOT de IFN γ (van der Burg *et al.* 2001, Welters *et al.* 2006, de Jong *et al.* 2002). Se sembraron líneas de célula T CD8 en pocillos por triplicado a una densidad de 2×10^4 en una placa multipantalla de 96-pocillos (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) revestida con un anticuerpo de captura de IFN γ (Mabtech. Nacha, Suecia). Los microcultivos se estimularon con 5 μ g/ml de péptidos de 10-meros y se incubaron durante toda la noche. Se realizó un análisis de restricción de HLA de células T CD8 usando 5 μ g/ml de PBMC pulsadas con péptidos de 10-meros o B-LCL cocultivadas con igual números de células T. Los puntos específicos de IFN γ se mancharon según las instrucciones del fabricante (Mabtech). El número de puntos se analizó en un sistema de formación de imágenes de vídeo asistido por ordenador completamente automatizado (BIOSYS).

2. Resultados

2.1 Las células T específicas de HPV están presentes en los linfocitos de infiltración de neoplasia cervical

[0087] En el presente estudio analizamos la presencia, el tipo y la especificidad de células T específicas de HPV16 y HPV 18 en lesiones neoplásicas cervicales, que es donde las células T específicas de HPV encuentran su antígeno cognado y deberían ejercer su función efectora. En total se analizaron 74 pacientes. Se obtuvo tejido cervical de 61 pacientes con cáncer cervical y de 9 pacientes más con CIN III. Se cultivaron los pedazos desmenuzados de tejido durante 2-3 semanas en presencia de una mezcla de citocinas que contenía IL-15 y TCGF. Para evitar un posible perjuicio en el crecimiento de células T específicas de tumores no se aportó ningún antígeno de HPV exógeno a estos cultivos. Dentro de los 14-21 días de cultivo, las células T expandidas por citocina se cosecharon y analizaron por FACS. El porcentaje medio de células T CD3 $^+$ presente en estos cultivos aumentó de 41 % en 2 semanas a 68% en 3 semanas. En general, el método de cultivo no favoreció el crecimiento selectivo de un tipo de células T como indica el porcentaje de células T CD3 $^+$ CD4 $^+$ (34% \pm 22%) y células T CD3 $^+$ CD8 $^+$ (52% \pm 22%) en 2 semanas o en 3 semanas (38% \pm 21%; 48% \pm 24%, respectivamente). Ocasionalmente, un cultivo individual mostró una expansión más pronunciada de las células T CD4 $^+$ o CD8 $^+$ (no se muestra). Para analizar la presencia de células T específicas de HPV, los cultivos se estimularon con monocitos autólogos pulsados con agrupaciones diferentes de péptidos solapantes que abarcan las proteínas E6 y E7 de HPV16 y HPV18, al igual que con las proteínas recombinantes respectivas. En 19 de los 51 pacientes positivos de HPV16 o HPV18 fuimos capaces de detectar células T específicas de HPV por proliferación (Tabla 1, Figura 1a). Estos cultivos respondieron a monocitos cargados tanto con péptido como con proteína, indicando que las células T reconocidas de forma natural procesaban antígeno. En 8 cultivos, se detectaron células T específicas de E6, en 10 cultivos las células T respondieron a E7 y en un cultivo de células T se detectó una respuesta tanto para E6 como para E7. De manera importante, no se detectó ninguna respuesta de célula T específica de HPV 16 o 18 en tejidos cervicales negativos de HPV16 y 18 (n=19), indicando que las respuestas específicas de HPV16- y 18 observadas no se indujeron *in vitro* (Tabla 1).

2.2 Ambas células T CD4 y CD8 específicas de HPV infiltran tejido tumoral

[0088] Después de la evaluación de reactividad específica de HPV, las 19 líneas de células T respondedoras se expandieron por estimulación con péptido cognado, mezcla de citocina y células alimentadoras. Quince de estos cultivos específicos de HPV se pudieron expandir lo suficiente para más análisis. La especificidad fina de las células T específicas de HPV se determinó en ensayos de estimulación a corto plazo usando péptidos únicos. Cinco cultivos reconocieron 2 o más péptidos diferentes, mientras que los otros 10 cultivos reconocieron un único péptido (Figura 1b, Tabla 1). Para valorar el tipo de célula T que respondió a la estimulación antigénica, los cultivos de célula T se estimularon con su péptido cognado y antígenos de proteína y la respuesta se analizó por tinción de IFN γ intracelular (Figura 2). La mayoría de los cultivos de TIL contenía linfocitos T infiltrantes de CD4 $^+$ específicas de HPV (n=13 pacientes, 13 péptidos diferentes reconocidos), mientras que los linfocitos T infiltrantes de células T CD8 $^+$ específicas de HPV se encontraron en 6 cultivos. En 9 de las líneas de células T específicas de HPV sólo se detectó una respuesta de células T CD4 $^+$, en 4 líneas de células T reaccionaron tanto células T CD4 $^+$ como células T CD8 $^+$ y en 2 líneas de células T sólo se detectó una respuesta de células T CD8 (Tabla 1, Figura 2).

2.3 Restricción de HLA de linfocitos de infiltración tumoral

[0089] Los loci de HLA de clase I y II implicados en la presentación de péptidos de HPV para células T CD8 $^+$ y células T CD4 $^+$ se estudiaron utilizando anticuerpos de bloqueo y APC parcialmente compatibles con HLA aisladas de donantes sanos. Una amplia variedad de moléculas de HLA de clase II se descubrió que estaban implicadas en la presentación de los antígenos E6 y E7 de HPV16 y HPV18 (Tabla 2). El uso de anticuerpos de bloqueo contra el HLA-DR, HLA-DQ y

HLA-DP reveló que 3 de las respuestas detectadas se restringían por HLA-DR, 3 por HLA-DQ y 3 por HLA-DP (Figura 3a, Tabla 2). Para determinar el elemento de restricción de HLA exacto implicado en la presentación del antígeno de HPV, se usaron APC de donantes sanos que son compatibles sólo para un alelo de HLA (Figura 3). En 6 casos no

5

[0090] En el caso del paciente C265, tanto las células T CD4⁺ como CD8⁺ específicas de HPV respondieron al mismo péptido (Figura 2). Para discriminar entre estas dos respuestas de célula T, se crearon clones de célula T a través de dilución limitante. Desafortunadamente, sólo se obtuvieron clones de célula T CD4⁺ y, como tal, sólo el elemento de restricción de HLA de clase II se pudo crear. Por lo tanto, sólo fue posible determinar el péptido mínimo y la restricción en los otros 5 cultivos diferentes de células T CD8⁺ específicas de HPV (Tabla 2). Como ejemplo, la Figura 3 muestra la determinación del epítipo de péptido mínimo y la restricción de la respuesta de célula T CD8 (Figura 3c) del cultivo de TIL obtenido del paciente C334. Esta respuesta se restringió por HLA-B27 ya que este cultivo de célula T CD8 respondió sólo tras estimulación con APC cargadas con péptido compatibles de HLA-B27 y no con otras APC parcialmente compatibles de HLA de clase I de otros donantes (Figura 3c). Un paciente (C265) mostró una respuesta de célula T CD8⁺ para dos epítipos diferentes y 2 pacientes (C176 y C334) respondieron al mismo epítipo de CTL restringido por HLA-B27 (Tabla 2).

10

15

2.4 Células T específicas de HPV en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor

20

[0091] Los ganglios linfáticos de drenaje del tumor son el sitio en el que las células T específicas de HPV se ceban y activan y, por lo tanto, la respuesta de células T específicas de HPV también se estudió en los ganglios linfáticos de drenaje del tumor de 6 pacientes diferentes con cáncer cervical. Se aislaron suspensiones de células únicas de células mononucleares de ganglio linfático (LNMC) de pacientes cervicales que mostraban metástasis en sus ganglios linfáticos. No pudimos detectar directamente respuestas específicas de HPV *ex vivo* en LNMC recientemente aisladas (datos no mostrados). Por lo tanto, las LNMC se expandieron primero en una ronda de estimulación *in vitro* con agrupaciones de péptidos E6 y E7 de HPV16 o 18. En 4 casos, las LNMC respondieron a HPV 16 y en 1 paciente se detectó una respuesta de HPV18 por proliferación y producción de IFN γ (Tabla 1, Figura 4A). Al igual que para los cultivos de TIL, los pacientes con tumores positivos de HPV16 reaccionaron sólo a HPV16 mientras que el paciente diagnosticado con un cáncer cervical positivo de HPV 18 reaccionó sólo contra el HPV18. No se detectó ninguna respuesta para HPV16 o HPV18 en las LNMC de un paciente negativo de HPV 16/18, a pesar del hecho de que las LNMC se estimularon con péptidos de HPV16 y HPV18 *in vitro* (Tabla 1). Los clones de célula T aislados de estos cultivos de LNMC se caracterizaron con respecto a su especificidad fina y elemento de restricción de HLA. Se encontraron reactividades de células T CD4⁺ para 10 péptidos diferentes, 7 de los cuales no se detectaron en los cultivos de TIL. Tres de estos epítipos fueron restringidos por HLA-DQ y los otros 4 por HLA-DP. Además, se identificó un epítipo de célula T CD8⁺ restringido por HLA-A*0201 y uno restringido por HLA-B 14 (Tabla 2). La figura 4 muestra un ejemplo del análisis de un cultivo de LNMC. Después de una ronda de estimulación, los cultivos de LNMC respondieron específicamente a APC cargadas con agrupaciones de péptidos HPV16E6 o proteína recombinante (Figura 4A). El análisis de la reactividad contra los péptidos únicos mostró el reconocimiento de un repertorio amplio de péptidos (Figura 4B) y los clones de células T CD4⁺ y CD8⁺ aislados de este cultivo reconocieron su antígeno cognado cuando se procesaron de forma natural a partir de proteína recombinante (Figura 4 C). La restricción se determinó además utilizando anticuerpos de bloqueo de HLA de clase II y APC de donantes parcialmente compatibles (Figura 4D).

25

30

35

40

[0092] Tomado en conjunto, el análisis tanto de TIL como de células del ganglio linfático de drenaje del tumor reveló que en 23 de los 54 diferentes pacientes positivos de HPV16 o de HPV18 se puede detectar una respuesta de célula T específica para en total 25 diferentes péptidos derivados de E6 o E7. Sobre todo, 13 epítipos de péptido de célula T CD4⁺ fueron restringidos por HLA-DQ o HLA-DP, 3 por HLA-DR y en 6 casos no pudimos distinguir entre HLA-DQ-DP y HLA-DR (Tabla 2). De las respuestas de célula T CD8⁺ encontradas, 2 fueron restringidas por HLA-A, 4 por HLA-B y 2 fueron indeterminadas (Tabla 2).

45

50

3. Discusión

[0093] Las oncoproteínas E6 y E7 codificadas por HPV 16 pueden servir como antígenos de rechazo tumoral en modelos animales (Zwaveling *et al.* 2002, Peng *et al.* 2005) lo que sugiere que es posible que también puedan servir como antígenos objetivo para linfocitos de infiltración del tumor en el cáncer cervical, pero esto no se ha analizado nunca sistemáticamente en un grupo grande de pacientes. Pudimos establecer un alto número de TIL y cultivos de linfocitos de infiltración de CIN (CIL) reactivos contra el HPV16 y HPV18, que son los tipos de HPV más prominentemente asociados al cáncer cervical (Bosch *et al.* 1995, Munoz *et al.* 2003). La mezcla de citocina usada aseguró el crecimiento tanto de células T CD4 como CD8, sin una preferencia manifiesta para la expansión de cualquier tipo de célula T. En el transcurso de nuestro estudio, se establecieron 19 cultivos de TIL de pacientes diagnosticados con un tumor positivo para un tipo de HPV diferente del HPV16 o HPV18. Ninguno de estos cultivos reaccionó a la estimulación con antígenos E6 y E7 de HPV16 o HPV18. En particular, TIL y CIL de pacientes positivos de HPV 16 no respondieron a E6 y E7 de HPV18 y viceversa (Tabla 1). Por lo tanto, las respuestas de célula T específica de HPV observadas en TIL y CIL de los pacientes positivos de HPV16 o HPV 18 no son el resultado de respuestas de célula T inducidas *in vitro*, sino un reflejo de la respuesta anti-tumoral *in vivo*. Recientemente, mostramos que este protocolo también tuvo éxito en la expansión de cultivos de TIL de una pequeña cohorte de pacientes con cáncer ovárico (Lambeck *et al.* 2007).

60

65

[0094] Números similares de cultivos de TIL respondieron a E6 y E7 (Tabla 1). La identificación de los epítomos de péptido cognados y los elementos de restricción de HLA de las respuestas inmunológicas específicas de HPV revelaron que la inmunidad específica de HPV no estaba restringida a una región inmunodominante específica sino que se dirigía a todos los dominios de las oncoproteínas E6 y E7 (Tabla 2), lo que sugiere que las células T específicas tanto de E6 como de E7 de HPV contribuirán a la respuesta antitumoral. Sorprendentemente, nuestro análisis reveló que la gran mayoría de las respuestas de células T CD4⁺ específicas de HPV fueron restringidas por HLA-DQ o DP (13/16) y no por HLA-DR (Tabla 2). Esto fue inesperado porque HLA-DR es la molécula de HLA de clase II más abundante en la superficie celular de las APC (Schwartz *et al.* 1988) al igual que en las células cancerosas cervicales con expresión de HLA de clase II *de novo* (Hilders *et al.* 1994). Además, en otros antígenos tumorales, la mayor parte de los epítomos de células T CD4⁺ identificados están presentes en el contexto de HLA-DR (80/93; véase la base de datos en <http://www.cancerimmunity.org>). No obstante, en el cáncer cervical parece existir una función más prominente para las células T restringidas por HLA-DQ y HLA-DP, argumentando esas estrategias, incorporando algoritmos informáticos, identificar respuestas de célula T funcionales contra el HPV no debería centrarse en el HLA-DR sólo (Warrino *et al.* 2004, Facchinetti *et al.* 2005).

[0095] En 7 pacientes se detectó una respuesta de célula T CD8⁺. Además de la identificación de 3 nuevos epítomos de células T CD8 restringidos por HLA-B7, HLA B14 y HLA-B27, confirmamos la presencia de células T CD8⁺ de infiltración del tumor restringidas por HLA-A*0201 que reconocieron el epítomo HPV 16 E7,11-20 (Evans *et al.* 1997, Oerke *et al.* 2005), sin embargo esta reactividad más fuerte se observó contra la secuencia peptídica 11-19. Además, se detectaron células T CD8⁺ reactivas al epítomo restringido por HLA-B57 HPV16E6.52-61. Sobre la base de la detección de células T CD8⁺ específicas de HPV16E6.52-61 restringidas por HLA-B57 en la sangre periférica de sujetos sanos se ha sugerido que este epítomo de CTL puede desempeñar un papel importante en el despeje de la infección de HPV 16 (Nakagawa *et al.* 2004, Nakagawa *et al.* 2007). No obstante, la detección de CTL que responde a este epítomo en pacientes con cáncer hace que sea menos posible.

[0096] Nuestro estudio muestra que en al menos 23 de los 54 diferentes pacientes positivos de HPV16 o HPV 18, se puede detectar una respuesta de célula T específica para E6 y/o E7 (Tabla 1). Esto facilitará las estrategias de vacunación dirigidas a la inducción de una respuesta de célula T para estos antígenos con el fin de rehabilitar una respuesta eficaz antitumoral en pacientes con una respuesta inmune preexistente. Es importante destacar que los epítomos de células T reconocidos por las células T en este estudio constituyen objetivos fisiológicos en la respuesta inmune para los tumores positivos de HPV16 y HPV18. Como tales, serán valiosos para el análisis integrado de la magnitud y la funcionalidad de los subconjuntos de células T específicas de HPV en diferentes estadios de la enfermedad y la inmunoterapia de control. La frecuente presencia de células T específicas de HPV en pacientes con cáncer cervical también puede constituir una fuente valiosa de células T específicas del tumor que se pueden usar en terapias de transferencia de células T adoptivas.

Ejemplo 2: Administración intradérmica de un péptido

40 Materiales y métodos

Diseño del estudio

[0097] Se realizó un estudio piloto de corte transversal para analizar respuestas de células T específicas de E2, E6 y E7 de HPV16, según se midió por inyección intradérmica de agrupaciones de péptidos de HPV16 de grado clínico en la parte superior del brazo, en pacientes con trastornos relacionados con el HPV del cérvix y en individuos sanos. Dado que una reacción de tipo hipersensibilidad retardada representa una respuesta de células T de memoria, no hubo ningún prerequisite para positividad de HPV16 en el momento del análisis.

50 Sujetos

[0098] Un grupo de diecinueve individuos sanos (HD) participó en este estudio después de aportar el consentimiento informado. El grupo de individuos sanos presentaba una edad media de 31 años (intervalo de 20- 51 años) y estaba compuesto por 80 % de mujeres y 20 % de hombres. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron de todos los sujetos inmediatamente antes de la administración de la prueba de piel. La aparición tardía de pruebas de piel positivas en individuos sanos dio como resultado el aislamiento de una segunda muestra de sangre de 11 de los 19 voluntarios sanos. El diseño del estudio fue aprobado por el comité ético médico del Leiden University Medical Centre.

60 Prueba de piel DTH

[0099] Las pruebas de piel, basadas en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), se pueden usar como un método simple y sensible para la medición *in vivo* de respuestas inmunológicas celulares específicas de HPV (Hopfl, 2000 Hopfl, 1991). Las preparaciones de las pruebas de piel consistieron en 8 agrupaciones de péptidos sintéticos de grado clínico largos que abarcan toda la proteína E6 y E7 de HPV y las regiones más inmunogénicas de la proteína E2 de HPV 16 (de Jong, 2004). Estos péptidos de grado clínico se produjeron en la instalación GMP interdepartamental del

LUMC. Cada agrupación de la prueba de piel consistía en 2 o 3 péptidos sintéticos, denominados por el primero y el último aminoácido de la región en la proteína cubierta por los péptidos. Agrupación 1: E2₃₁₋₆₀, E2₄₆₋₇₅, agrupación 2: E2₃₀₁₋₃₃₀, E2₃₁₆₋₃₄₅, agrupación 3: E6₁₋₃₁, E6₁₉₋₅₀, agrupación 4: E6₄₁₋₆₅, E6₅₅₋₈₀, E6₇₁₋₉₅, agrupación 5: E6₈₅₋₁₀₉, E6₉₁₋₁₂₂, agrupación 6: E6₁₀₉₋₁₄₀, E6₁₂₇₋₁₅₈, agrupación 7: E7₁₋₃₅, E7₂₂₋₅₆, agrupación 8: E7₄₃₋₇₇, E7₆₄₋₉₈. La agrupación 3 comprende la SEC ID 5, 22 y 23. La agrupación 4 comprende las SEC ID 7-9. La agrupación 5 comprende las SEC ID 11 y 12. La agrupación 6 comprende las SEC ID 13, 14, 24 y 25. La agrupación 7 comprende las SEC ID 15 y 26. La agrupación 8 comprende las SEC ID 16 y 17. Por agrupación de péptidos 0,05 ml de 0,2 mg/ml de péptidos en 16% de DMSO en 20 mM de tampón de fosfato isotónico (10 µg/péptido) se inyectó por vía intracutánea. Los agrupaciones de péptidos y un control negativo (disolventes sólo) se inyectaron por separado en sitios de prueba de piel individuales de la parte superior del brazo. Los sitios de prueba de piel se inspeccionaron al menos tres veces, a las 72 horas y a los 7 días después de la inyección (Hopfl) de los péptidos y a las 3 semanas después del primer informe de una reacción cutánea muy tardía en uno de los primeros sujetos sanos. Las reacciones se consideraron positivas cuando aparecieron pápulas mayores de 2 mm de diámetro no menos de 2 días después de la inyección. Se obtuvieron biopsias por perforación de sitios de reacción cutánea positiva (4 mm), se cortaron en pequeños pedazos y se cultivaron en IMDM con 10% de suero humano AB, 10 % de TCGF y 5 ng/ml de IL7 e IL15 para permitir la emigración de linfocitos desde el tejido de piel. Después de 2 a 4 semanas de cultivo, las células T expandidas se cosecharon y evaluaron para sus reactividad específica de HPV.

Antígeno para ensayos inmunológicos *in vitro*

[0100] Un conjunto de péptidos, similar a los péptidos usados en la prueba de piel, se usó para ensayos de estimulación de células T y ensayos por ELISPOT de IFN γ . Los cuatro péptidos E2 de HPV 16 constaban de péptidos de 30-meros solapando 15 residuos, E6 de HPV 16 constaba de 32-meros y E7 de HPV 16 de 35-meros, ambos solapando 14 residuos. Los péptidos se sintetizaron y disolvieron tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg, 1999). En particular, en los ensayos por ELISPOT de IFN γ los agrupaciones de péptidos 4 y 5 difirieron ligeramente de las agrupaciones peptídicas usadas en la prueba de piel, la agrupación 4 contenía los péptidos E6₃₇₋₆₈, E6₅₅₋₈₆, E6₇₃₋₁₀₄ y la agrupación 5 comprendía los péptidos E6₇₃₋₁₂₂, E6₉₁₋₁₂₂.

[0101] La mezcla de respuesta de memoria (MRM 50x), que consiste en una mezcla de toxoide tétanico (0,75 *Limus flocculentius*/ml; National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Países Bajos), sonicato de *Mycobacterium tuberculosis* (5 µg/ml; generosamente donado por Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, Ámsterdam, Países Bajos) y *Candida albicans* (0,15mg/ml, HAL Allergen Lab., Haarlem, Países Bajos) se usó como control positivo. Se produjeron proteínas E2, E6 y E7 de HPV 16 recombinantes en *Escherichia coli* recombinante como se ha descrito previamente (van der Burg, 2001).

Análisis de células Th específicas del antígeno por ELISPOT de IFN γ

[0102] La presencia de células Th específicas de HPV 16 se analizó por ELISPOT, como se ha descrito previamente (van der Burg, 2001). En resumen, se sembraron PBMCs frescas a una densidad de 2×10^6 células/pocillo de una placa de 24-pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 1 ml de IMDM (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) enriquecido con 10% de suero humano AB, en presencia o ausencia de las agrupaciones de péptidos E2, E6 y E7 del HPV 16 indicadas. Se usaron péptidos en una concentración de 5µg/ml/péptido. Después de 4 días de incubación a 37°C, las PBMCs se cosecharon, se lavaron y se sembraron en cuatro pocillos replicados a una densidad de 10^5 células por pocillo en 100µl de IMDM enriquecido con 10% de FCS en una placa multipantalla de 96-pocillos (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) revestida con un anticuerpo de captura de IFN γ (Mabtech AB, Nacha, Suecia). Se llevó a cabo más incubación y desarrollo de anticuerpos del ELISPOT según las instrucciones del fabricante (Mabtech). Se contaron los puntos con un sistema de análisis de formación imágenes de vídeo asistido por ordenador completamente automatizado (Bio Sys). Se calcularon los puntos específicos mediante la substracción del número medio de puntos + 2xSD del control de medio a partir del número medio de puntos en pocillos experimentales (van der Burg, 2001).

Ensayo de proliferación de células T

[0103] Se evaluaron los cultivos de células T de las biopsias de piel para reconocimiento de la proteína y los péptidos específicos en un ensayo de proliferación de 3 días (van der Burg, 2001). En resumen, se aislaron los monocitos autólogos a partir de PBMCs mediante la adherencia a una placa de fondo plano de 96-pocillos durante 2 h en el medio X-vivo 15 (Cambrex) a 37°C. Se usaron los monocitos como APCs, cargados durante toda la noche con 10 µg/ml de péptido y 20 µg/ml de proteína. Se sembraron linfocitos de infiltración de la prueba de piel a una densidad de $2-5 \times 10^4$ células/pocillo en IMDM suplementado con 10% de suero AB. El medio solo se adoptó como control negativo, la fitohemaglutinina (0,5 µg/ml) sirvió como control positivo. Se midió la proliferación por incorporación de [³H]timidina (5 µCi/mmol). Una respuesta proliferativa se definió específica cuando el índice de estimulación (SI) ≥ 3 . Los sobrenadantes de los ensayos de proliferación se cosecharon 48 horas después de la incubación para el análisis de producción de citocina específica del antígeno.

Análisis de citocinas asociadas a respuestas proliferativas específicas de HPV 16

65

[0104] La detección simultánea de seis citocinas Th1 y Th2 diferentes: IFN γ , factor α de necrosis tumoral, interleuquina 2 (IL2), IL4, IL5 e IL10 se realizó usando el Cytometric Bead Array (Becton Dickinson) según las instrucciones del fabricante. Los valores de corte se basaron en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 pg/ml de IFN γ y 20 pg/ml para el resto de las citocinas). La producción de citocina específica del antígeno se definió como una concentración de citocina por encima del nivel de corte y >2x la concentración del control de medio (de Jong, 2004).

Tinción de citocina intracelular (ICS)

[0105] La especificidad y el carácter de los cultivos de células T derivados de sitios de reacción cutánea positiva se evaluó por ICS como se ha descrito previamente (de Jong, 2005). En resumen, los linfocitos de infiltración de prueba de piel, se cosecharon, se lavaron y se suspendieron en IMDM + 10% de suero AB y $2-5 \times 10^4$ células se añadieron a los monocitos autólogos que se pulsaron durante toda la noche con 50 μ l de péptido (10 μ g/ml) o proteína (20 μ g/ml) en el medio X vivo. El medio solo se adoptó como control negativo, la fitohemaglutinina (0,5 μ g/ml) sirvió como control positivo. Las muestras se mancharon de forma simultánea con IFN γ de ratón-antihumano marcado con FITC (0,5 g/ml, BD PharMingen), IL5 de ratón-antihumano marcado con PE (0,2 mg/ml, BD PharMingen), anti-CD4 marcado con APC (BD Bioscience) y anti-CD8 marcado con PerCP (BD Bioscience). Tras la incubación a 4°C, las células se lavaron, se fijaron con 1% de paraformaldehído y se analizaron por citometría de flujo (FACScan, BD Biosciences).

Análisis estadístico

[0106] Se usó la prueba exacta de FISHER (de 2 colas) para analizar la relación entre la detección de células T específicas de HPV productoras de IFN γ en PBMC, la presencia de una reacción de prueba de piel o la presencia de células T específicas de HPV en las biopsias de piel, al igual que las diferencias entre pacientes y controles sanos con respecto al tamaño o el número de las reacciones cutáneas dentro de estos grupos. Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando Graphpad InStat Software (versión 3.0) y Graphpad Prism 4.

Resultados

Reacciones cutáneas para inyección intracutánea con péptidos E2, E6 y E7 de HPV 16

[0107] Estudiamos las reacciones cutáneas en sujetos sanos después de la inyección intracutánea con péptidos E2, E6 y E7 de HPV 16. Las reacciones cutáneas positivas aparecieron como pápulas rojizas planas de 2 a 20 mm de diámetro, que surgieron dentro del intervalo de 2 a 25 días después de la inyección. Se detectó una reacción cutánea positiva en 46 de las 152 pruebas de piel en los voluntarios sanos. Sobre todo, cada agrupación de péptidos de la prueba de piel podía dar lugar a una reacción cutánea positiva. Se observaron más frecuentemente reacciones contra E231-75 (10 de los 19 sujetos), E637-104 (9/16) y E743-98 (7/19) en el grupo de control. Este patrón de reacción se asemeja al que observamos previamente en las PBMC (de Jong, 2002 Welters, 2003) (Figura 5). Estas reacciones cutáneas se correspondieron con la presencia de una respuesta de célula T específica del péptido como la detectada en las PBMC de estos individuos (datos no mostrados).

Las reacciones cutáneas en donantes sanos están asociadas a frecuencias más altas de células T específicas de HPV 16 en la sangre periférica.

[0108] Para comparar los resultados de la prueba de piel con la presencia de células T de tipo 1 específicas de HPV 16 circulantes, se llevó a cabo un ensayo de ELISPOT de IFN γ con las PBMC recogidas antes de que se diera el desafío de péptido intradérmico. En 5 de los 19 voluntarios sanos pudimos detectar una respuesta inmune específica de HPV 16 por ELISPOT de IFN γ . La detección de ≥ 5 células T específicas de HPV 16 circulantes por 100.000 PBMC en la muestra de sangre pre-desafío de individuos sanos estaba asociada a una reacción cutánea positiva temprana (≤ 13 días) a la misma secuencia peptídica ($p = 0.0003$, prueba exacta de Fisher de dos colas; Figura 6). No se detectó ninguna célula T circulante específica de HPV 16 en la muestra de sangre pre-desafío de los donantes sanos para péptidos que inducían una reacción cutánea positiva tardía (14 a 25 días). Esto sugiere que la frecuencia de células específicas del antígeno circulantes determina el tiempo de retardo para que aparezcan reacciones cutáneas.

[0109] Para valorar la frecuencia de células T específicas de HPV al mismo tiempo que aparecía una reacción cutánea tardía se tomaron muestras de sangre adicionales de 11 voluntarios sanos. En estos individuos 39 de las 88 pruebas de piel fueron positivas. En 25 de las 39 reacciones cutáneas positivas y en 10 de las 49 reacciones cutáneas negativas ≥ 5 células T específicas de HPV 16 se detectaron por 100.000 PBMC. En este punto, se encontró una correlación significativa entre la detección de células T productoras de IFN γ circulantes específicas de HPV en la muestra de sangre post-desafío y la presencia de una reacción cutánea ($p < 0,0001$, prueba exacta de FISHER; Figura 7). Esto muestra que la frecuencia de células T específicas de HPV 16 en la sangre de voluntarios sanos es significativamente más alta después de un desafío intradérmico con péptido de HPV16 e indica que la inyección intracutánea de antígenos peptídicos mejora el número de células T específicas de HPV 16 en la sangre de los voluntarios sanos.

Las biopsias de los sitios de reacción cutánea positiva constaban de células T específicas de HPV 16 CD4+ y CD8+ Th1/Th2.

[0110] Aproximadamente el 25% de las reacciones cutáneas positivas de los voluntarios sanos no estaban asociadas a la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 en la sangre, lo que sugiere que otros tipos de células T no productoras de IFN γ pueden infiltrar la piel después de la inyección intradérmica de péptidos de HPV16.

[0111] Para caracterizar las células en un sitio de reacción cutánea positiva se tomaron biopsias por perforación. En total, se tomaron 8 biopsias de distintos sitios de reacción cutánea positiva de 7 controles sanos y se cultivaron con un cóctel de citocinas que permitió el crecimiento de células T *in vitro* sin estimulantes antigénicos. En 7 de los 8 casos, las células T exfiltraron el tejido y se expandieron dentro de un periodo de 3-4 semanas. Las células T expandidas se evaluaron para su especificidad en un ensayo de proliferación a corto plazo. La figura 8 muestra ejemplos de cultivos de células T que proliferaron específicamente tras la estimulación con monocitos autólogos pulsados con la agrupación de péptidos, también inyectados en este sitio durante la prueba de piel (HD2, HD10, HD15) al igual que para monocitos pulsados con proteína E6 de HPV16 (Figura 8AB). Esto indica que estas células T fueron capaces de reconocer sus complejos HLA-péptido cognados después de que el antígeno fuera procesado naturalmente y presentado. El análisis de los sobrenadantes de estos cultivos de células T proliferativas reveló un perfil de citocina de Th1/Th2 mezclado en el que las células T específicas de HPV 16 producían IFN γ , IL-4 e IL-5 (Figura 8C).

[0112] En cada caso en el que se detectaron células T específicas de HPV en el cultivo de biopsia (4 de 8) esto coincidió con la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 circulantes en la muestra de sangre post-desafío por ELISPOT (compárense las figuras 8A y B). En 3 de las otras 4 biopsias de reacción cutánea positiva (HD2, HD17, HD18) las células T no respondieron a los péptidos de HPV 16 (Figura 8; HD17) y en un caso ninguna célula T exfiltró el tejido en absoluto (HD13). En estos 4 casos no pudimos detectar células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 en la muestra de sangre post-desafío.

[0113] La cotinción de las células T de biopsia mediante marcadores de superficie celular CD4 y CD8 mostró que no sólo las células T CD4⁺ específicas de HPV 16 sino que también las CD8⁺ específicas de HPV 16 infiltraron el sitio piel tras el desafío intradérmico con péptido de HPV16 (Figura 9). En total, en 3 de las 4 biopsias infiltradas por células T específicas de HPV 16, pudimos detectar células T CD8⁺ específicas de HPV 16. Las células T CD8⁺ aisladas de la biopsia (agrupación 6) de HD2 respondieron a ambos péptidos solapantes de la prueba de piel inyectada: HPV16 E6109-140 y E6127-158 (datos no mostrados), mientras que las células T CD8⁺ de ambos sujetos HD15 y HD16 respondieron a HPV16 E637-68 (véase ejemplo para HD15, Fig 5).

[0114] Tomada en conjunto, la población de células inmunológicas que migran dentro de la piel tras un desafío intradérmico con péptidos de HPV16 comprende células T citotóxicas CD4⁺ Th1-, Th2- y CD8⁺ específicas de HPV 16. Esta infiltración está unida a la aparición de células T productoras de IFN γ circulantes específicas de HPV 16 en la sangre.

Discusión

[0115] Las pruebas de piel se usan comúnmente como un ensayo simple para la medición *in vivo* de la inmunidad mediada por célula. Hemos validado el uso del ensayo de prueba de piel para la medición de respuesta inmune celular específica de HPV16 contra los antígenos tempranos E2, E6 y E7 *in vivo* mediante la comparación de los resultados con los de las mediciones paralelas de la reactividad de células T por ensayos *in vitro*.

[0116] En el grupo de voluntarios sanos aparecieron reacciones cutáneas tempranas dentro de los 4 a 12 días después del desafío con antígeno intradérmico. En estos individuos, conocidos por mostrar respuestas de célula T de tipo 1 específicas de HPV16 *in vitro* (de Jong, 2002; Welters, 2003), la aparición de una reacción cutánea temprana (dentro de un periodo de 13 días) estaba significativamente asociada a la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 a una frecuencia de al menos 1 por 20.000 PBMC (Figura 6, $p < 0,001$). Los mismos criterios de corte para una reacción positiva en el ensayo de ELISPOT de IFN γ son recomendados por Jeffries *et al* (Jeffries; 2006), quien utilizó herramientas matemáticas para definir el corte apropiado del ELISPOT en relación con las pruebas de Mantoux. El bajo número de células T de memoria circulantes (Figura 6) puede explicar por qué las reacciones cutáneas aparecen un tanto retardadas en comparación con las pruebas DTH tradicionales. Las células T necesitan ser impulsadas o reactivadas y comienzan a dividirse antes de que se hayan producido suficientes células para causar una reacción inflamatoria local: la prueba de piel positiva. De hecho, cuando aparece una reacción cutánea positiva, se puede detectar una frecuencia más alta de respuestas de Th1 específicas de HPV 16 en la sangre periférica (Figura 7).

[0117] Históricamente se ha considerado que la célula Th1 induce respuestas DTH, no obstante, diferentes estudios han mostrado actualmente que también lo hacen las células Th2 que infiltran los sitios de prueba de piel (Wang, 1999; Woodfolk, 2001). De forma similar, este estudio muestra que los sitios de prueba de piel positiva de voluntarios sanos contienen ambas células T de tipo Th1 y Th2 específicas de HPV 16 (figuras 8 y 9). Además, las reacciones cutáneas positivas también pueden ser el resultado del flujo de células T no-específicas, como se puso de manifiesto en dos estudios en profundidad de los sitios de prueba de piel positiva utilizados para evaluar la respuesta inmune específica tras la vacunación de pacientes con melanoma o cáncer de células renales (Bleumer, 2007). Este estudio también mostró que varios sitios de prueba de piel positiva de sujetos sanos estaban infiltrados con células T que no respondían a los antígenos de HPV 16 inyectados. Hasta el momento, la causa de reacciones cutáneas positivas

específicas permanece incierta. De forma imprevista, observamos que la mayoría de las reacciones cutáneas en individuos sanos aparecían de 2 a 3 semanas después de la inyección intradérmica del antígeno. Aunque que estas reacciones cutáneas positivas tardías no se correlacionaban con la detección de células T de memoria CD4⁺ específicas de HPV circulantes en la sangre pre-desafío (Figura 6), la constitución inmunológica de estos sitios de prueba de piel es similar a la de las pruebas de DTH clásicas (Platt, 1983 Poulter, 1982) y comprende células Th1- y Th2- CD4⁺ específicas de HPV 16, así como células T CD8⁺ específicas de HPV 16 (Figura 8 y 9). Tenemos la hipótesis de que estas reacciones pueden ser el resultado del cebado con célula T. Esto también se ha observado en el 29% de los pacientes que fueron sometidos a un protocolo de prueba de piel de tuberculina de 2 pasos y que sólo fueron positivos en la segunda ronda de la prueba (Akçay, 2003). En general, las respuestas de célula T inducidas por la vacuna tienen el valor máximo de 10 a 14 días después de la vacunación y no a las tres semanas. No obstante, debemos tener presente que en tal protocolo se inyectó una dosis más alta de antígeno, así como de adyuvantes. Por lo tanto, es razonable asumir que las respuestas de células T inducidas por el desafío intradérmico se desarrollan más lentamente y alcanzan su valor máximo más tarde. Dado que el desafío de péptido intradérmico en voluntarios sanos produce la inducción tanto de células T CD4⁺ como CD8⁺ específicas de HIV16, por lo tanto, debería considerarse como una vacunación única de dosis baja.

[0118] El objetivo principal de este estudio piloto fue validar el uso de la prueba de piel específica de HPV 16 para detectar respuestas inmunológicas de tipo 1 *in vivo*. En voluntarios sanos, una reacción cutánea positiva dentro de 13 días está relacionada, de hecho, con la presencia de células T de memoria productoras de IFN γ circulantes, según se detecta por el ELISPOT de IFN γ *in vitro*. De manera importante, también observamos discrepancias entre los resultados obtenidos por la prueba de piel y el ELISPOT. En varios casos, se detectaron células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 circulantes en las muestras de sangre post-desafío, pero sin una reacción cutánea concomitante y viceversa (Figura 7), y esto se puede considerar como un resultado falso negativo o falso positivo. Para entender completamente el impacto que tiene esto en la interpretación de la detección de la inmunidad de tipo 1 contra el HPV, hemos iniciado una prueba de campo en un grupo grande de pacientes positivos de HPV y voluntarios sanos en Indonesia.

Lista de referencias

- [0119]
- Akçay, A., Erdem, Y., Altun, B., Usalan, C., Agca, E., Yasavul, U., Turgan, C., and Caglar, S. The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am.J.Infect.Control*, 31: 371-374, 2003.
- Altmann *et al.*, *Eur J Cancer* 28:326-33, 1992.
- Alvarez D. *et al.*, *J. of Immunology*, 174:1664-1674, 2005
- Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M. G. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol*, 32: 2237-2245, 2002.
- Bethwaite, P. B., Holloway, L. J., Thornton, A., and Delahunt, B. Infiltration by immunocompetent cells in early stage invasive carcinoma of the uterine cervix: a prognostic study. *Pathology*, 28: 321-327, 1996.
- Bleumer, I., Tiemessen, D. M., Oosterwijk-Wakka, J. C., Voller, M. C., De Weijer, K., Mulders, P. F., and Oosterwijk, E. Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. *J.Immunother.*, 30: 116-122, 2007.
- Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., van den Muysenberg, A. J., Verheijen, R. H., Stukart, M. J., Meijer, C. J., Scheper, R. J., Stacey, S. N., Duggan-Keen, M. F., Stem, P. L., Man, S., Borysiewicz, L. K., and Walboomers, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 88: 92-98, 2000.
- Bosch, F. X. and de Sanjose, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 3-13, 2003.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., and Shah, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87: 796-802, 1995.
- Chao, H. T., Wang, P. H., Tseng, J. Y., Lai, C. R., Chiang, S. C., and Yuan, C. C. Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB escamosa cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur J Gynaecol Oncol*, 20: 136-140, 1999.

- Claas, E. C., Melchers, W. J., van der Linden, H. C., Lindeman, J., and Quint, W. G. Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 135: 703-709, 1989.
- 5 de Jong, A., van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Franken, K. L., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Kenter, G., Vermeij, P., Melief, C. J., and Offringa, R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res*, 62: 472-479, 2002.
- 10 de Jong, A., van der Hulst, J. M., Kenter, G. G., Drijfhout, J. W., Franken, K. L., Vermeij, P., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Rapid enrichment of human papillomavirus (HPV)-specific polyclonal T cell populations for adoptive immunotherapy of cervical cancer. *Int J Cancer*, 114: 274-282, 2005.
- 15 de Jong, A., van Poelgeest, M. I., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res*, 64: 5449-5455, 2004. De Witte *et al.*, *Blood*, Aug 1;108(3):870-7, 2006
- 20 Evans, M., Borysiewicz, L. K., Evans, A. S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V., and Man, S. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol*, 167: 5420-5428, 2001.
- Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S., and Borysiewicz, L. K. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*, 57: 2943-2950, 1997.
- 25 Facchinetti, V., Seresini, S., Longhi, R., Garavaglia, C., Casorati, G., and Protti, M. P. CD4+ T cell immunity against the human papillomavirus-18 E6 transforming protein in healthy donors: identification of promiscuous naturally processed epitopes. *Eur J Immunol*, 35: 806-815, 2005.
- 30 Geginat, J., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 194: 1711-1719, 2001.
- Hilders, C. G., Houbiers, J. G., Krul, E. J., and Fleuren, G. J. The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 101: 5-12, 1994.
- 35 Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Hilmes, C., Kaufmann, A., Seliger, B., and Maeurer, M. J. CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol*, 163: 5715-5722, 1999.
- 40 Hohn, H., Pilch, H., Gunzel, S., Neukirch, C., Freitag, K., Necker, A., and Maeurer, M. J. Human papillomavirus type 33 E7 peptides presented by HLA-DR*0402 to tumor-infiltrating T cells in cervical cancer. *J Virol*, 74: 6632-6636, 2000.
- 45 Hopfl, R., Heim, K., Christensen, N., Zumbach, K., Wieland, U., Volgger, B., Widschwendter, A., Haimbuchner, S., Muller-Holzner, E., Pawlita, M., Pfister, H., and Fritsch, P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV 16 oncoprotein E7. *Lancet*, 356: 1985-1986, 2000.
- Hopfl, R., Sandbichler, M., Sepp, N., Heim, K., Muller-Holzner, E., Wartusch, B., Dapunt, O., Jochmus-Kudielka, I., ter Meulen, J., Gissmann, L., and. Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 337: 373-374, 1991.
- 50 Jeffries, D. J., Hill, P. C., Fox, A., Lugos, M., Jackson-Sillah, D. J., Adegbola, R. A., and Brookes, R. H. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in The Gambia. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.*, 10: 192-198, 2006.
- 55 Kessler *et al.*, *Hum Immunol*. 64:245, 2003.
- Lanzavecchia, *Nature* 393:413, 1998.
- 60 Lambeck, A. J. A., Leffer, N., Hoogeboom, B. N., Sluiter, W. J., MHamming, L. E., Klip, H., ten Hoor, K. A., Esajas, M., van Oven, M., Drijfhout, J. W., Platteel, I., Offringa, R., Hollema, H., Melief, C. J. M., van der Burg, S. H., van der Zee, A. G. J., Daemen, T., and Nijman, H. W. P53-specific T cell responses in patients with malignant and benign ovarian tumors: implications for p53 based immunotherapy. *Int J Cancer*, in press, 2007.
- 65 Li, J., Huston, G., and Swain, S. L. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med*, 198: 1807-1815, 2003.

- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells *in vivo*. *Nat Med*, 7: 114-118, 2001.
- 5 Liu, K., Catalfamo, M., Li, Y., Henkart, P. A., and Weng, N. P. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 6192-6197, 2002. Luxton, J. C., Rowe, A. J., Cridland, J. C., Coletart, T., Wilson, P., and Shepherd, P. S. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J Gen Virol*, 77 (Pt 7): 1585-1593, 1996.
- 10 McKinlay, A., Radford, K., Kato, M., Field, K., Gardiner, D., Khalil, D., Burnell, F., Hart, D., and Vuckovic, S. Blood monocytes, myeloid dendritic cells and the cytokines interleukin (IL)-7 and IL-15 maintain human CD4+ T memory cells with mixed helper/regulatory function. *Immunology*, 120: 392-403, 2007.
- 15 Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348: 518-527, 2003.
- 20 Nakagawa, M., Kim, K. H., Gillam, T. M., and Moscicki, A. B. HLA class I binding promiscuity of the CD8 T-cell epitopes of human papillomavirus type 16 E6 protein. *J Virol*, 81: 1412-1423, 2007.
- Nakagawa, M., Kim, K. H., and Moscicki, A. B. Different methods of identifying new antigenic epitopes of human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11: 889-896, 2004.
- 25 Oerke, S., Hohn, H., Zehbe, I., Pilch, H., Schicketanz, K. H., Hitzler, W. E., Neukirch, C., Freitag, K., and Maeurer, M. J. Naturally processed and HLA-B8-presented HPV 16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer*, 114: 766-778, 2005.
- 30 Peng, S., Trimble, C., Ji, H., He, L., Tsai, Y. C., Macaes, B., Hung, C. F., and Wu, T. C. Characterization of HPV-16 E6 DNA vaccines employing intracellular targeting and intercellular spreading strategies. *J Biomed Sci*, 12: 689-700, 2005.
- Piersma, S. J., Jordanova, E. S., van Poelgeest, M. I., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Kenter, G. G., Fleuren, G. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res*, 67: 354-361, 2007.
- 35 Platt, J. L., Grant, B. W., Eddy, A. A., and Michael, A. F. Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. *J.Exp.Med.*, 158: 1227-1242, 1983.
- 40 Poulter, L. W., Seymour, G. J., Duke, O., Janossy, G., and Panayi, G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol.*, 74: 358-369, 1982.
- Remington; *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia.
- 45 Rensing, M. E., van Driel, W. J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M. P., Hartman, M., Anholts, J. D., Schreuder, G. M., ter Harmsel, W. B., Fleuren, G. J., Trimbos, B. J., Kast, W. M., and Melief, C. J. 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*, 56: 582-588, 1996.
- 50 Romani N. *et al*, *Springer Semin Immunopathol.*, 13:265-279, 1992.
- Schwartz, B. D. Diversity and regulation of expression of human leukocyte antigen class II molecules. *Am J Med*, 85: 6-8, 1988.
- 55 Schumacher *et al.*, *Nat Rev Immunol*. 2(7):512-9, Jul 2002.
- Strang *et al.*, *J Gen Virol*. 71:423-31, 1990
- Toes *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:7855, 1996
- 60 Toes *et al.*, *J. Immunol*. 156:3911, 1996 van den Burg *et al.*, *Hum Immunol*. 44:189-198, 1995
- 65 van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., Geluk, A., van der Kruk, M., Pontesilli, O., Hovenkamp, E., Franken, K. L., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Ottenhoff, T. H., Melief, C. J., and Offringa, R. 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*, 162: 152-160, 1999.

- van der Burg, S. H., Piersma, S. J., de Jong, A., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., van den Hende, M., Welters, M. J., Fleuren, G. J., Melief, C. J. M., Kenter, G., and Offringa, R. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. submitted, 2007.
- 5 van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., and Offringa, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer*, 91: 612-618, 2001.
- 10 Wang, S., Fan, Y., Brunham, R. C., and Yang, X. IFN-gamma knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. *Eur.J.Immunol.*, 29: 3782-3792, 1999.
- 15 Warrino, D. E., Olson, W. C., Knapp, W. T., Scarrow, M. I., D'Ambrosio-Brennan, L.J., Guido, R. S., Edwards, R. P., Kast, W. M., and Storkus, W. J. Disease-stage variance in functional CD4(+) T-cell responses against novel pan-human leukocyte antigen-D region presented human papillomavirus-16 E7 epitopes. *Clin Cancer Res*, 10: 3301-3308, 2004.
- 20 Welters, M. J., van der Logt, P., van den Eeden, S. J., Kwappenberg, K. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G. G., Melief, C. J., van der Burg, S. H., and Offringa, R. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4+ T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. *Int J Cancer*, 118: 950-956, 2006.
- 25 Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. 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*, 63: 636-641, 2003.
- 30 Woodfolk, J. A. and Platts-Mills, T. A. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. *J.Immunol.*, 167: 5412-5419, 2001.
- zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*, 9: F55-78, 1996.
- 35 Zwaveling, S., Ferreira Mota, S. C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G. B., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol*, 169: 350-358, 2002.

ES 2 411 059 T3

Tabla 1 respuestas específicas de HPV16 y 18 detectadas en linfocitos de infiltración.

Estado de HPV	Origen	Paciente	Edad	Tipo de célula	Estado de la enfermedad	Reactividad	SI*	Nº de péptidos reconoci-dos	Tipo de célula T
HPV16	TIL								
		176	45	escamosa	FIGO 1B	E6	80	2	CD4/CD8
		178	40	escamosa	FIGO 1B	E7	11	1	CD4
		185	56	escamosa	FIGO 3B	E7	6	1	CD8
		192	37	escamosa	FIGO 1B				
		194	67	adeno	FIGO 2A	E7	5		
		226	56	escamosa	FIGO 1B	E6	3	1	CD4
		229	42	escamosa	FIGO 1B				
		230	45	escamosa	FIGO 1A				
		246	31	escamosa	FIGO 1B				
		265	44	escamosa	FIGO 1B	E6	104	2	CD4/CD8
		267	49	escamosa	FIGO 1B	E6	109	2	CD4
		271	40	escamosa	FIGO 1B				
		281	35	escamosa	FIGO 1B				
		283	51	escamosa	FIGO 1B				
		308	39	escamosa	FIGO 1B				
		312	30	adeno	FIGO 1B				
		331	65	escamosa	FIGO 1B	E6	3	2	CD4/CD8
		332	32	escamosa	FIGO 1B				
		334	41	escamosa	FIGO 1B	E6	5	1	CD8
		338	34	escamosa	FIGO 1B				
		340	29	escamosa	FIGO	1B			
		343	51	desconocida	FIGO 1B				
		344	43	escamosa	FIGO 2A				
		363	45	escamosa	FIGO 1B				

ES 2 411 059 T3

	369	33	adeno	FIGO 1A					
	371	31	escamosa	FIGO 1B					
	372	72	escamosa	FIGO 1B					
	390	33	adeno	FIGO 1B	E6/E7		4		
	398	48	escamosa	FIGO 1B					
	405	41	escamosa	FIGO 2B					
	418	34	escamosa	FIGO 1B					
	415	46	escamosa	FIGO 1B					
	424	35	escamosa	FIGO 1B					
	441	51	escamosa	FIGO 1B					
	446	29	escamosa	FIGO 1B	E6		4	4	CD4/CD8
CIL									
	279	60	desconocida	CIN3					
	284	36	escamosa	CIN2	E7		13	1	CD4
	285	27	escamosa	CIN3					
	310	46	escamosa	CIN3					
	314	34	escamosa	CIN3	E7		11		
	355	47	escamosa	CIN3					
	356	26	escamosa	CIN3	E7		3.5	1	CD4
LN									
	148	46	escamosa	FIGO 1B	E6/E7		9/3		CD4
	267	49	escamosa	FIGO 1B	E6		4		CD4
	271	40	escamosa	FIGO 1B	E6/E7		1.5/2		CD4
	427	28	escamosa	FIGO 1B	E6		9		CD4/CD8
HPV18									
TIL									
	187	43	escamosa	FIGO 1B	E6		2	1	CD4
	196	48	adenoesca-mosa	FIGO 2A					

ES 2 411 059 T3

	209	55	escamosa	FIGO 1B					
	214	42	adeno	FIGO 1B	E7	15	1		CD4
	228	37	escamosa	FIGO 2A	E7	18	1		CD4
	251	39	adenoescamosa	FIGO 2A	E7	3			
	261	38	escamosa	FIGO 1B					
	335	33	adeno	FIGO 1B					
	378	40	adeno	FIGO 1B	E7	8	1		CD4
	LN								
	151	43	escamosa	FIGO 1B	E6/E7	2/3			CD4
HPV16- 18-	TIL								
	181	40	escamosa	FIGO 1B					
	182	80	escamosa	FIGO 2B					
	215	31	escamosa	FIGO 1B					
	245	41	escamosa	FIGO 1B					
	248	46	escamosa	FIGO 2A					
	264	35	adeno	FIGO 1B					
	280	31	escamosa	FIGO 1B					
	287	61	carcino-sarcoma	FIGO 2B					
	289	45	adeno	FIGO 1B					
	292	32	escamosa	FIGO 1B					
	324	51	escamosa	FIGO 1B					
	353	35	adeno	FIGO 1A					
	373	55	escamosa	FIGO 1B					
	377	85	escamosa	FIGO 1B					
	381	80	adeno	FIGO 1B					
	384	75	escamosa	FIGO 1B					
	CIL	414	64	escamosa	FIGO 2A				
		348	35	escamosa	CIN3				
	LN	354	39	escamosa	CIN3				
		426	40	escamosa	FIGO 1B				

* SI= Índice de estimulación de células T respondedoras

ES 2 411 059 T3

Tabla 2: epítomos de células T reconocidos por pacientes con cáncer cervical

Tipo de células T	Epítomo reconocido	Restricción	Origen	Paciente	SEQ ID
CD4	HPV16E6.11-32	DP17	LN	C148	5
	HPV16E6.11-32	DP1401	LN	C271, C427	5
	HPV16E6.37-68	DP0201	TIL	C226	6
	HPV16E6.52-61	DP0201	TIL	C265	7
	HPV16E6.55-86	desconocida	LN,TIL	C267	8
	HPV16E6.61-82	DP1 o DP14	LN	C427	9
	HPV16E6.73-105	DP4	LN	C148	10
	HPV16E6.73-105	desconocida	LN, TIL	C267	10
	HPV16E6.91-112	DR15 o DQ5	TIL	C331	11
	HPV16E6.91-112	desconocida	LN	C267	11
	HPV16E6.101-122	DQ6	LN,TIL	C427,C446	12
	HPV16E6.121-142	DP0201 o DQ5	TIL	C265	13
	HPV16E6.121-142	desconocida	TIL	C187	13
	HPV16E6.129-138	DR7	TIL	C176	14
	HPV16E7.21-42	DR4	TIL	C178	15
	HPV16E7.51-72	DP1901	CIL	C356	16
	HPV16E7.76-86	DR12	CIL	C284	17
	HPV18E6.51-72	DQ*0301	LN	C151	18
	HPV18E6.71-92	DQ*0501	LN	C151	19
	HPV18E7.1-32	DQ*0302, DQ*0308	TIL	C214	20
	HPV18E7.1-32	desconocida	TIL	C378	20
HPV18E7.21-42	DQ*0302	TIL	C228	21	
CD8	HPV16E6.13-22	HLA-B7	TIL	C446	22
	HPV16E6.29-38	HLA-A2	LN	C427	23
	HPV16E6.52-61	HLA-B57	TIL	C331	7
	HPV16E6.52-61	desconocida	TIL	C265	7
	HPV16E6.129-138	desconocida	TIL	C265	14
	HPV16E6.137-146	HLA-B27	TIL	C176, C334	24
	HPV16E6.149-158	HLA-B14	LN	C427	25
	HPV16E7.11-19	HLA*0201	TIL	C185	26

Listado de secuencias

[0120]

- 5 <110> Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC
<120> Epítupos de HPV reconocidos por células T que infiltran malignidades cervicales para su uso en vacunas
<130> P6015052PCT
- 10 <150> US 60/941,070
<151> 2007-05-31
- 15 <150> EP 07109287.8
<151> 2007-05-31
- <150> EP 07109281.1
<151> 2007-05-31
- 20 <160> 26
<170> Versión de patentIn 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 158
<212> PRT
- <213> Papilomavirus humano tipo 16
- 30 <400> 1

ES 2 411 059 T3

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
 1 5 10 15
 Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
 20 25 30
 Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
 35 40 45
 Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
 50 55 60
 Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
 85 90 95
 Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
 100 105 110
 Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
 115 120 125
 Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 130 135 140
 Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150 155

- <210> 2
- <211> 98
- <212> PRT
- <213> Papilomavirus humano tipo 16
- <400> 2

5

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95

Lys Pro

<210> 3

<211> 158

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 18

<400> 3

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
 1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys
 20 25 30

Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala
 35 40 45

Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala
 50 55 60

Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His
 65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr
 85 90 95

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu

5

10

ES 2 411 059 T3

100 105 110

Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His
 115 120 125

Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg
 130 135 140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
 145 150 155

5 <210> 4
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 18
 <400> 4

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
 20 25 30

Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
 35 40 45

Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
 50 55 60

Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
 65 70 75 80

Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe
 85 90 95

Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 100 105

10 <210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 15 <213> Papilomavirus humano tipo 16
 <400> 5

Asp Pro Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu
 1 5 10 15

Gln Thr Thr Ile His Asp
 20

20 <210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16
 25 <400> 6

Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe
 1 5 10 15

Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala
 20 25 30

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 7

Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr
 1 5 10

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 8

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
 20 25 30

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 9

Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe
 1 5 10 15

Tyr Ser Lys Ile Ser Glu
 20

<210> 10

<211> 33

<212> PRT

30 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 10

Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr
 1 5 10 15

Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys
 20 25 30
 Asp

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 11

Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu
 1 5 10 15

Leu Ile Arg Cys Ile Asn
 20

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 12

Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Cys Pro Glu Glu Lys
 20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

10 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 13

Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg
 1 5 10 15

Gly Arg Trp Thr Gly Arg
 20

<210> 14

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg
 1 5 10

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 14

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

25 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 15

Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Glu Ile Asp Gly Pro Ala
 20

<210> 16

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 16

His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Cys Val Gln Ser Thr
 20

40

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16

5 <400> 17

Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
 1 5 10

10 <210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 18

15 <400> 18

Arg Glu His Gly Ile Gln Thr Leu Asn His Gln Val Val Pro Ala Tyr
 1 5 10 15

Asn Ile Ser Lys Ser Lys
 20

20 <210> 19
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 18

<400> 19

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
 1 5 10 15

Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly
 20

25 <210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 18

30 <400> 20

Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15

Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
 20 25 30

35 <210> 21
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 18

<400> 21

Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Asp Glu Ile Asp
 20

40 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 22
Gln Glu Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu
1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16

 <400> 23
Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
1 5 10
 10 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16

 15 <400> 24
Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys
1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Papilomavirus humano tipo 16

 <400> 25
Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
1 5 10
 25 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16

 30 <400> 26
Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un péptido para producir un medicamento para el tratamiento de pacientes que sufren o corren el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el HPV, donde una secuencia de aminoácidos contigua a partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína E6 de HPV está presente en el péptido, donde dicha secuencia de aminoácidos contigua no contiene más de 100 aminoácidos y contiene al menos 22 aminoácidos contiguos, donde la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es presentado por al menos una molécula de HLA-DQ y HLA-DP y donde el epítipo se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6, y donde la enfermedad relacionada con el HPV se selecciona del grupo que consiste en: neoplasia cervical intraepitelial del cérvix (CIN), vulva (VIN), vagina (VaIN), ano (AIN) y pene (PIN) y cáncer del cérvix, vulva, vagina, ano, pene y cabeza y cuello.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es reconocido por una célula T que infiltra una lesión neoplásica cervical o por una célula T de un ganglio linfático de drenaje.
- 15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el epítipo es un epítipo de un serotipo de HPV 16, 18, 31, 33 o 45, preferiblemente 16, 18, 31 o 33 y de manera más preferible 16 o 18.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua es de 22-45 aminoácidos, preferiblemente de 22-35 aminoácidos y más preferiblemente de 33-35 aminoácidos.
- 25 5. Uso de un péptido para la producción de un medicamento para el tratamiento de pacientes que sufren o que corren el riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con el HPV, donde una secuencia de aminoácidos contigua derivada de la secuencia de aminoácidos de una proteína E6 de HPV está presente en el péptido, donde dicha secuencia de aminoácidos contigua no contiene más de 100 aminoácidos y contiene al menos 22 aminoácidos contiguos, donde la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es reconocido por una célula T que infiltra una lesión cervical neoplásica o por una célula T de un ganglio linfático de drenaje y donde el epítipo se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6, 8 y donde la enfermedad relacionada con el HPV se selecciona del grupo que consiste en: neoplasia cervical intraepitelial del cérvix (CIN), vulva (VIN), vagina (VaIN), ano (AIN) y pene (PIN) y cáncer del cérvix, vulva, vagina, ano, pene y cabeza y cuello.
- 30 6. Uso según la reivindicación 5, donde la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que es presentado por una molécula HLA-B, preferiblemente donde la molécula HLA-B es una molécula HLA-B7, HLA-B14, HLA-B27 o HLA-B57.
- 35 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el medicamento comprende al menos dos péptidos diferentes, tal y como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferiblemente donde el medicamento comprende además al menos un adyuvante, y más preferiblemente donde el adyuvante actúa por medio de un receptor tipo Toll.
- 40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el medicamento es para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, mucosa, intradérmica y/o intracutánea.
9. Péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID n°: 5, 6,8 para su uso como medicamento.
- 45 10. Composición que comprende un péptido y un portador farmacéuticamente aceptable, donde el péptido se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6, 8.
- 50 11. Composición según la reivindicación 10, que comprende además al menos un adyuvante, donde el adyuvante actúa preferiblemente a través de un receptor tipo Toll.
12. Molécula de ácido nucleico que codifica al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6, 8.
- 55 13. Molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de célula T que reconoce un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6 y 8.
14. Célula T aislada que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13.
- 60 15. Célula T aislada que comprende un receptor de célula T que reconoce un epítipo seleccionado del grupo que consiste en SEC ID n°: 5, 6 y 8.

Fig 1a

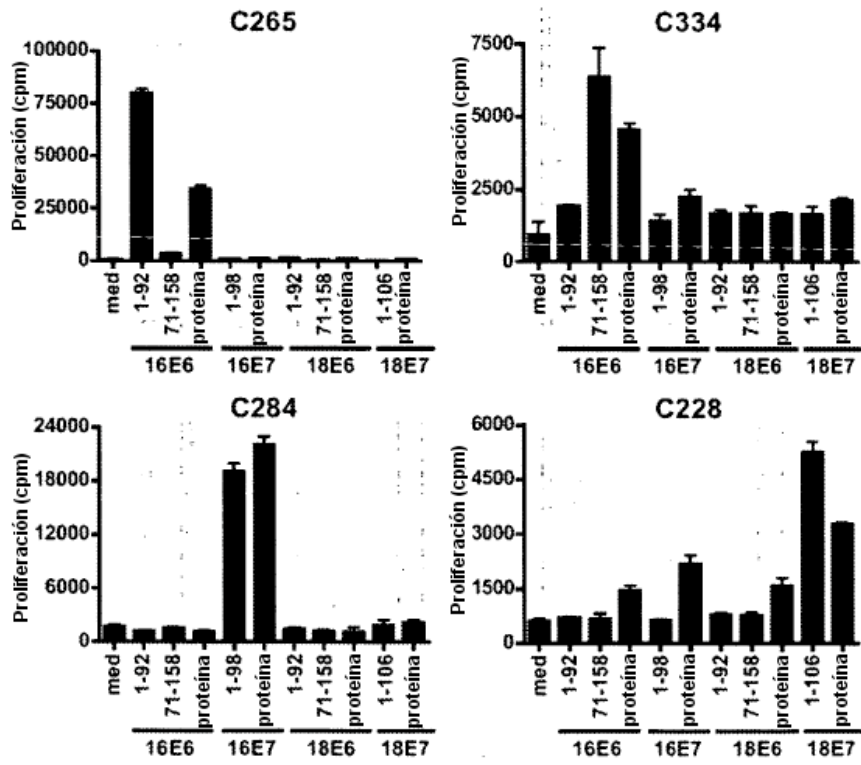


Fig 1b

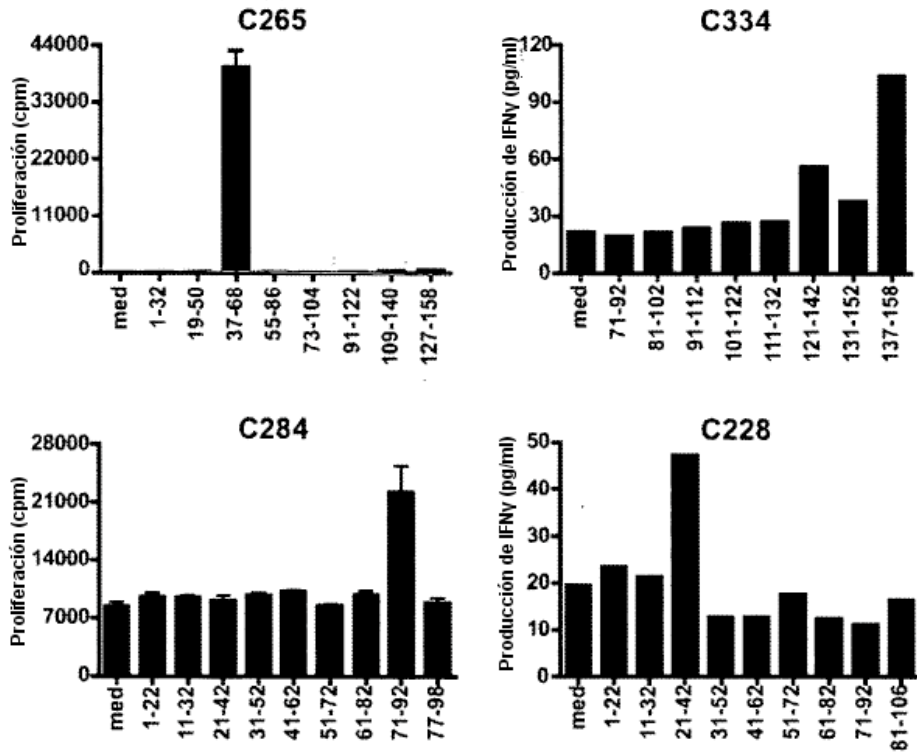


Fig 2

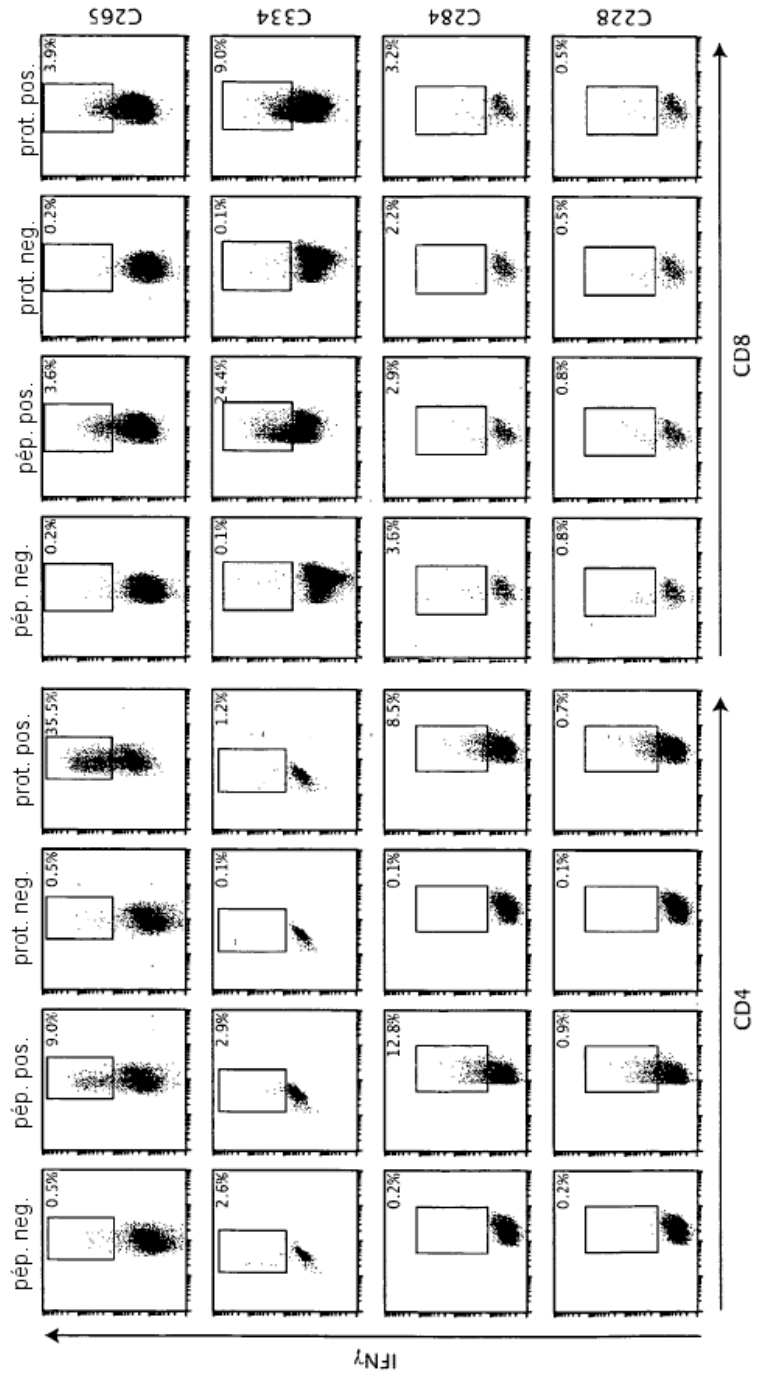


Fig 3a

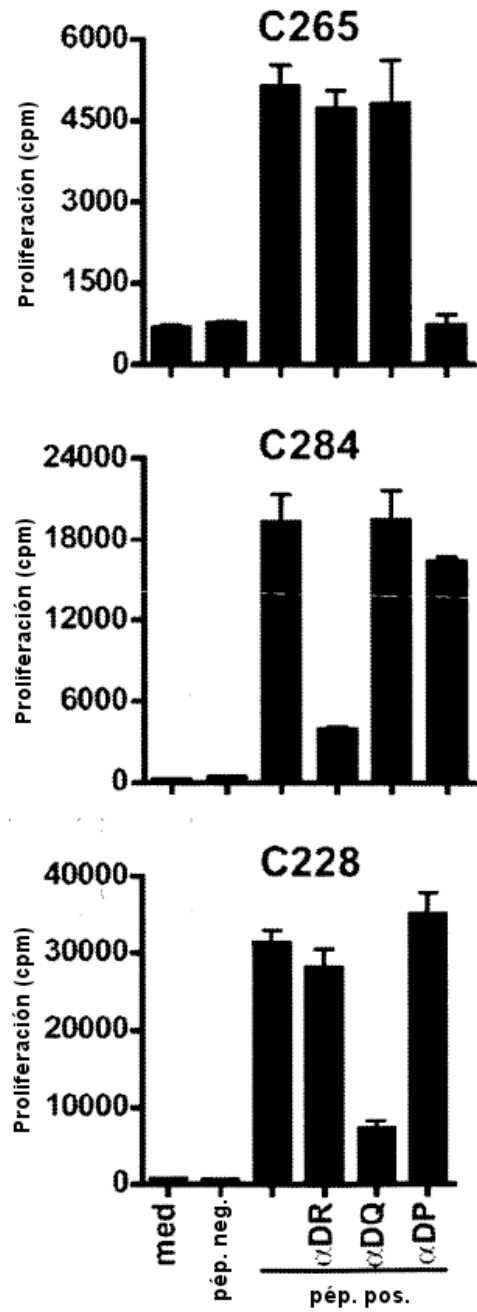


Fig 3b

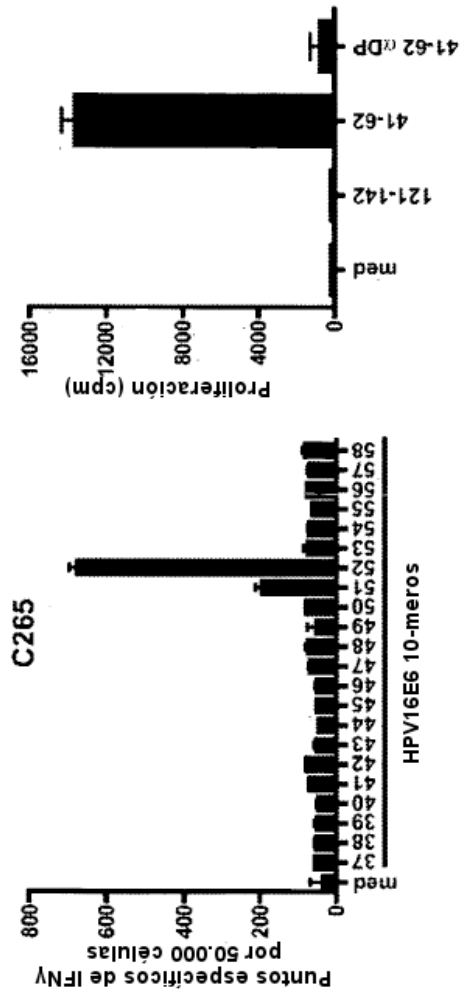


Fig 3c

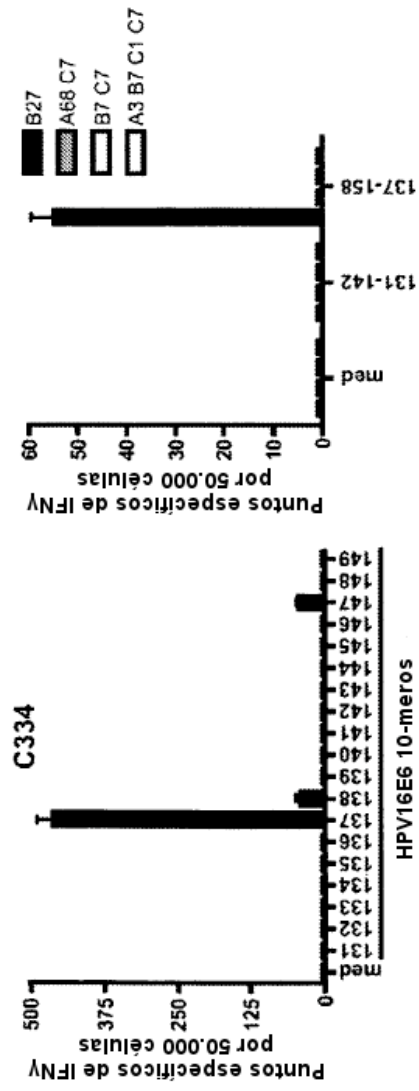


Fig 4a

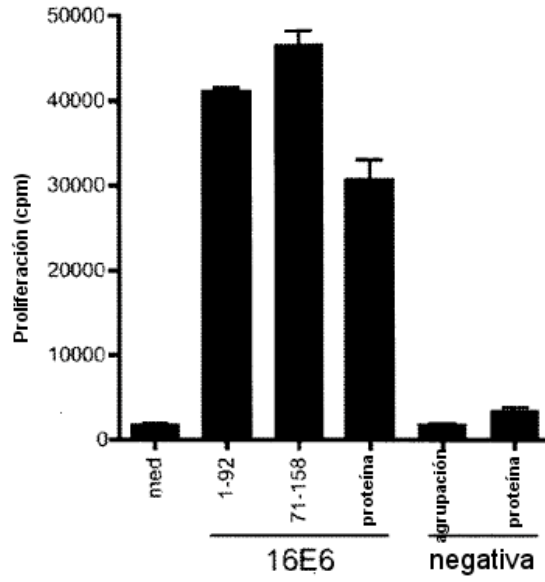


Fig 4b

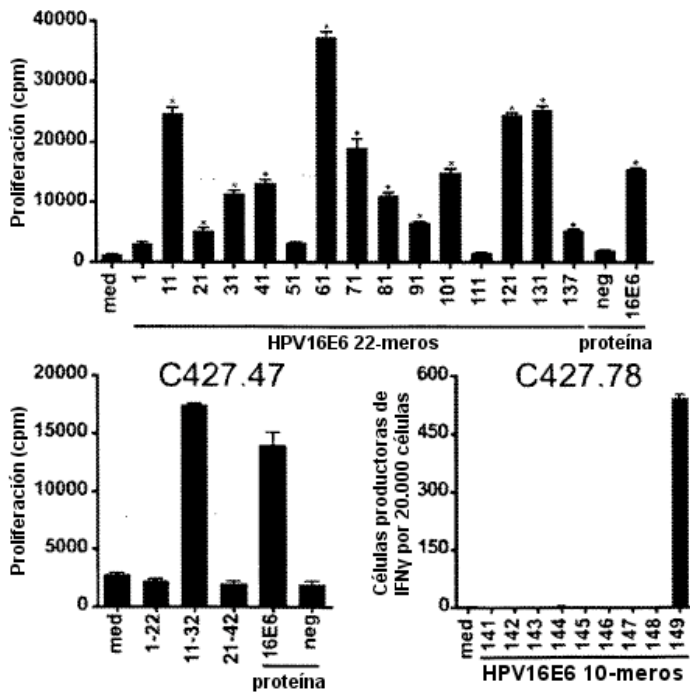


Fig 4c

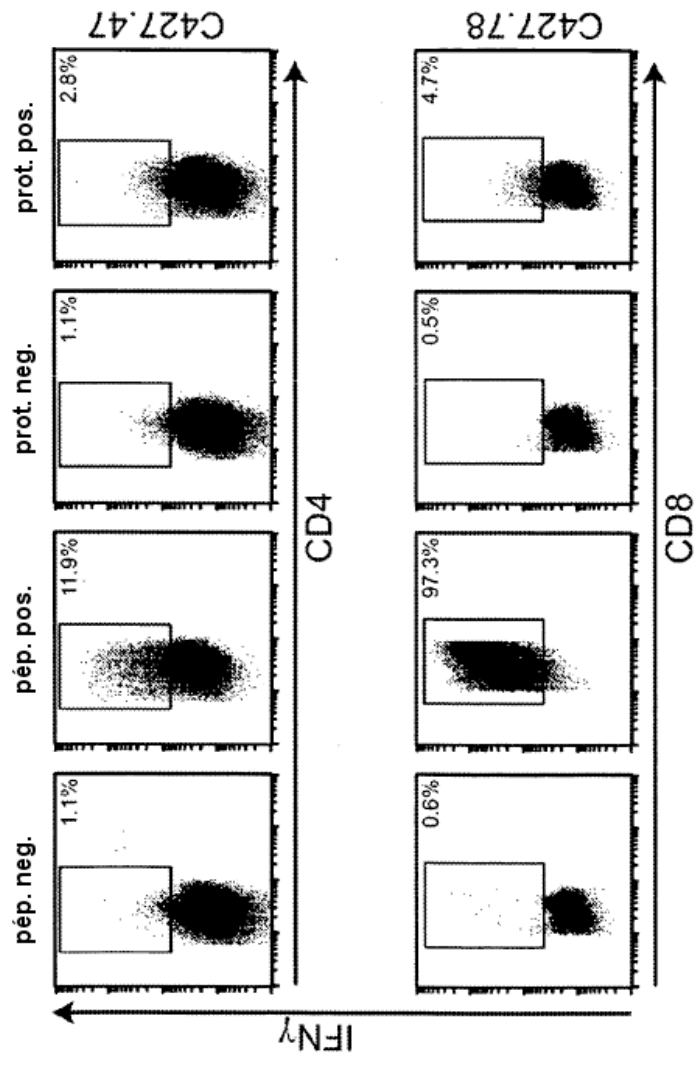


Fig 4d

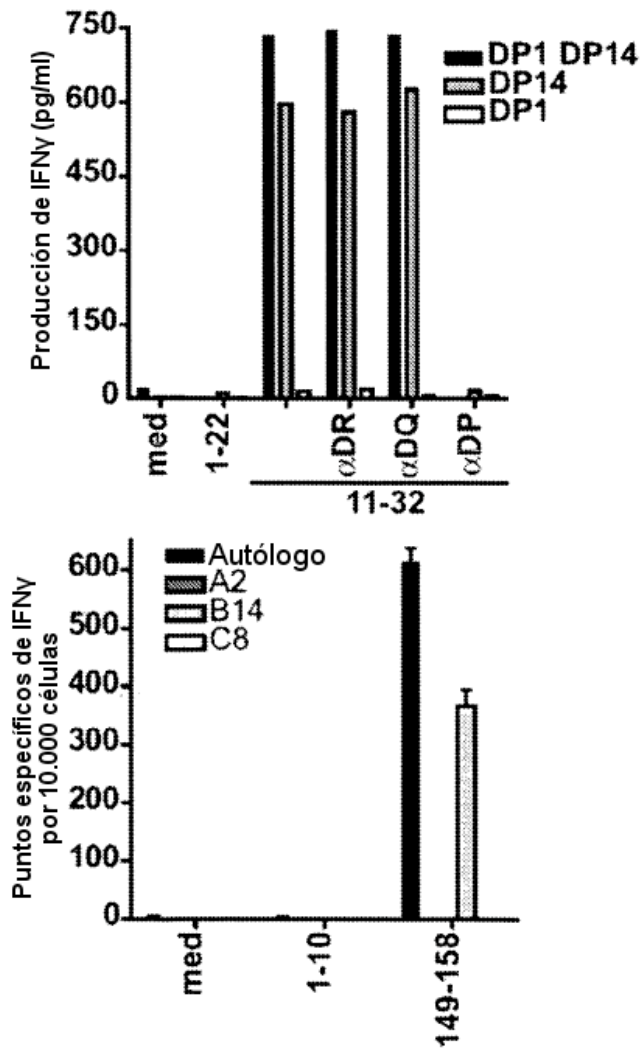


Fig 5

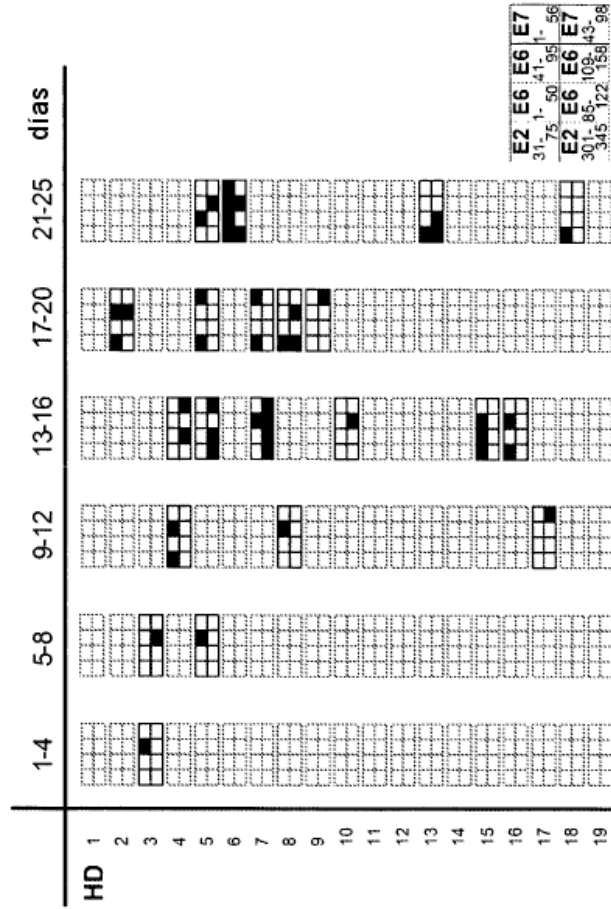


Fig 6

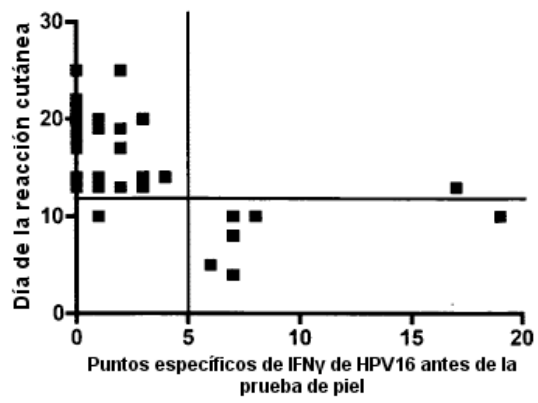


Fig 7

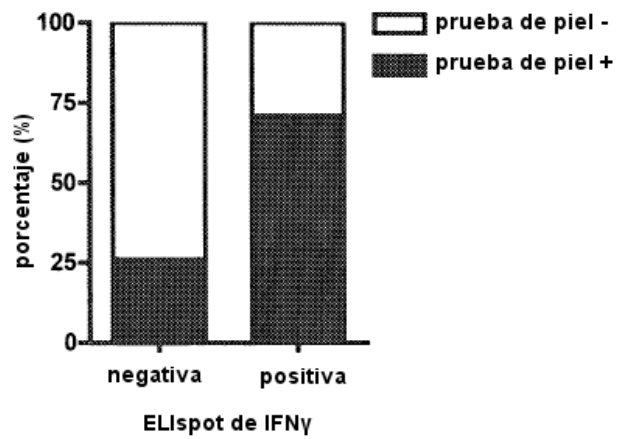


Fig 8

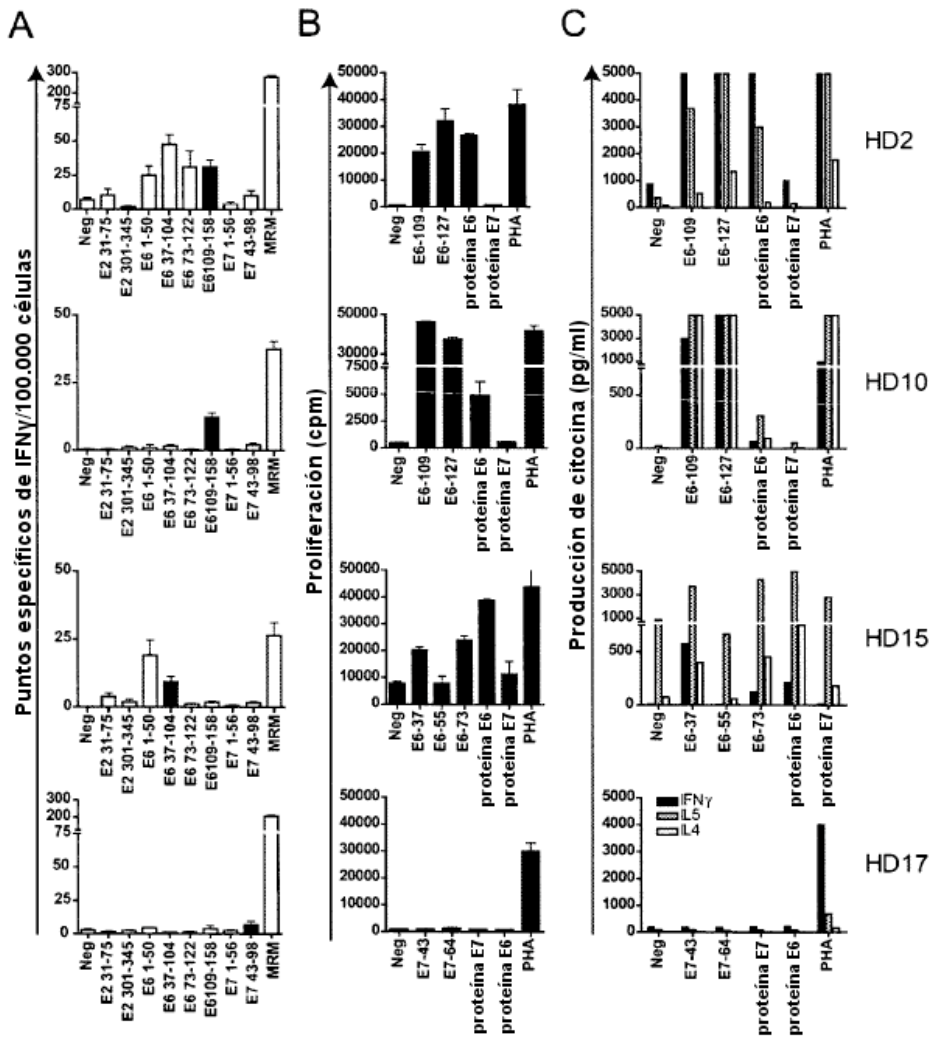


Fig 9

