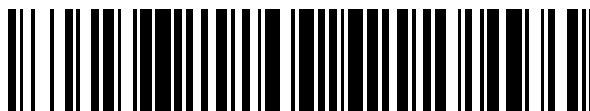


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 916**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (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 12160109 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 2468763**

54 Título: **Epítopo de HPV al que se dirigen células T que infiltran tumores malignos cervicales para su uso en vacunas**

30 Prioridad:

31.05.2007 US 941070 P

31.05.2007 EP 07109281

31.05.2007 EP 07109287

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2014

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 2 496 916 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

Epítopo de HPV al que se dirigen células T que infiltran tumores malignos cervicales para su uso en vacunas

5 Campo de la invención

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

10

Antecedentes de la invención

[0002] El cáncer cervical es el segundo cáncer más común en el mundo (Bosch *et al.* 2003). Los virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo tipo 16 y 18 son 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 son constitutivamente expresadas en las lesiones y cánceres cervicales de alto grado porque son necesarias para la aparición y el mantenimiento del fenotipo celular maligno (Zur Hausen, 1996).

15

20

[0003] La expresión específica del tumor de estas oncoproteínas, al igual que la presencia de bajos niveles de células T específicas de E6 y E7 circulantes 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 contribuyan a la respuesta antitumoral. Para controlar la enfermedad, estas células T deberían al menos ser capaces de alojarse en los sitios tumorales. De hecho, una proporción de carcinomas cervicales son infiltrados por linfocitos (Bethwaite *et al.* 1996, Chao *et al.* 1999, Piersma *et al.* 2007) pero aún falta conocimiento en profundidad sobre la especificidad y el tipo de células T que infiltran estos tumores cervicales, probablemente debido a las dificultades relativas para establecer cultivos de células T a partir de tejido tumoral. Sin embargo, algunos pioneros fueron capaces de aislar linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) específicos de HPV a partir de tumores, dando como resultado la identificación de dos únicos epítomos de células T CD8⁺ de HPV16 (Evans *et al.* 1997, Oerke *et al.* 2005) y dos epítomos de células T CD4 específicos para los subtipos de alto riesgo menos predominantes HPV59 y HPV33 (Hohn *et al.* 1999, Hohn *et al.* 2000). No obstante, estudios más amplios sobre los linfocitos infiltrantes del tejido cervical son necesarios urgentemente para comprender la aportación y el papel de la respuesta inmune adaptativa específica de HPV en el cáncer cervical. Además, esto permitirá el diseño racional de estrategias acertadas de intervención inmune.

25

30

35

[0004] Estudios recientes han mostrado 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 células T efectoras (Li *et al.* 2003). IL-15 es un factor de crecimiento crítico en el inicio de las divisiones de células T y, a diferencia de IL-2 que generalmente se usa para expandir cultivos de TIL, no limita la expansión de células T continuada (Li *et al.* 2001). Además, IL-15 puede también hacer de activador independiente de antígeno de células T de memoria CD8⁺ (Liu *et al.* 2002). Juntas, IL-7 e IL-15 pueden expandir células T de memoria efectoras con alta eficiencia, mientras que las células T de memoria centrales son menos sensibles y las células T vírgenes dejan de responder a la estimulación con estas citocinas (Geginat *et al.* 2001, McKinlay *et al.* 2007, Bacchetta *et al.* 2002).

40

45

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

50

[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.

55

[0007] Strang *et al.* revelan 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.

60

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

65

[0009] La WO 02/090382 divulga las afinidades de enlace para una serie de péptidos solapantes de las proteínas E6 y E7 de HPV16 para las moléculas de HLA-DR que son más predominantes en la población caucásica. La WO 02/090382 además informa de respuestas contra un número de péptidos de E6 y E7 de HPV16 en las PBMC empobrecidas en

CD8 de pacientes con papulosis bowenoide. La WO 2005/060993 describe péptidos de HPV16 sintéticos y su uso para el tratamiento y la prevención de una enfermedad asociada con el HPV.

5 [0010] No obstante, todavía existe una necesidad de conocimiento acerca de la presencia, tipo y especificidad de los linfocitos infiltrantes de los tumores en neoplasias asociadas al HPV, preferiblemente para los subtipos de alto riesgo más predominantes, tales como HPV 16, 18, 31, 33 y 45. Es un objeto de la presente invención proporcionar epítomos de HPV que sean objetivos para los linfocitos infiltrantes de los tumores y que se puedan utilizar en la prevención, terapia y/o diagnóstico de enfermedades asociadas con el HPV.

10 Descripción de la invención

15 [0011] La presente invención proporciona epítomos de células T nuevos que se identifican basándose en nuestro análisis de la presencia y especificidad de HPV16 o HPV18 de células T infiltrantes del cérvix en un grupo grande de 70 pacientes con neoplasias cervicales. Descubrimos que estos linfocitos infiltrantes comprenden células T específicas de HPV. En análisis más detallados, identificamos 17 epítomos nuevos de células T CD4⁺ y CD8⁺ y sus elementos de restricción de HLA, pero también revelamos que la respuesta inmune específica de HPV se dirigía hacia todas partes de las oncoproteínas E6 y E7. De forma imprevista, la gran mayoría de los epítomos de células T CD4⁺ fueron presentados en el contexto de las moléculas de HLA-DP y HLA-DQ menos abundantemente expresadas. Debido a que los epítomos de células T identificados constituyen objetivos fisiológicos en la respuesta inmune para tumores positivos de HPV16 y de 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.

25 [0012] En un aspecto, la presente invención se refiere, de este modo, a secuencias de aminoácidos de epítomos de célula de CTL CD8⁺ y Th CD4⁺ de HPV de reciente identificación, al igual que péptidos sintéticos derivados de HPV y composiciones inmunogénicas que comprenden los mismos son también parte de la presente invención. Tales péptidos dan como resultado una respuesta de memoria y efectora de CTL CD8⁺ mejorada, aumentada y prolongada tras la administración a un amplio abanico de pacientes que tienen una enfermedad asociada al HPV, incluyendo neoplasias relacionadas con el HPV. Tales péptidos pueden también inducir un microentorno proinflamatorio muy mejorado que es más posible que sea infiltrado por células efectoras, como resultado de esta respuesta de Th CD4⁺.

30 [0013] Debido a que los péptidos descritos son preferiblemente usados como vacuna solos o en combinación o como parte de una composición inmunogénica, los péptidos se denominan preferiblemente péptidos de vacuna y la composición composiciones de vacuna.

35 [0014] El uso de péptidos relativamente cortos es altamente preferido para usos médicos ya que se pueden sintetizar *in vitro* eficazmente, los que no es posible o poco rentable para proteínas nativas mayores de aproximadamente 100 aminoácidos. La síntesis química de los péptidos es práctica de rutina y varios métodos adecuados son conocidos por el experto en la materia. La síntesis química de péptidos también supera los problemas asociados con la producción recombinante de proteínas intactas, que es difícil de estandarizar y requiere purificación extensa y medidas de control de la calidad. Los péptidos con una longitud que excede la longitud de los epítomos de HLA de clase I y clase II (p. ej. que tienen una longitud tal y como se indica aquí debajo) son particularmente ventajosos para su uso como componente de vacuna porque son lo suficientemente grandes para ser asimilados por células que presentan antígenos profesionales, en particular DC, como se explica en la WO02/070006 y procesados en la 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 la tolerancia de células T por la presentación sistémica de epítomos mínimos de HLA de clase I en células no presentadoras de antígenos (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 tal y como se indica aquí (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 células Th y/o CTL preferiblemente tienen la longitud suficiente para contener tanto epítomos de HLA de clase I como de HLA de clase II.

50 [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 seleccionada de las secuencias de aminoácidos de longitud total de las proteínas E6 y E7 de HPV de un serotipo de HPV de alto riesgo, tales como los serotipos 16, 18, 31, 33 o 45, más preferiblemente a partir 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 serotipos 16 o 18, de los cuales 16 es el más preferido. La secuencia de aminoácidos de las proteínas E6 y E7 del serotipo de 16 de HPV están representadas en las SEC ID n°: 1 y 2, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las proteínas E6 y E7 del serotipo de 18 de HPV están representadas en las SEC ID n° 3 y 4, respectivamente.

65 [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 tal y como se define 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 anteriormente

definidas, donde el péptido preferiblemente comprende al menos uno de un epítipo de HLA de clase II y un epítipo de HLA de clase I, más preferiblemente ambos al menos un epítipo de HLA de clase II y 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 anteriormente definidas. 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 amino secuencia contigua de la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas de HPV anteriormente definidas. Por razones de claridad, los péptidos descritos preferiblemente comprenden epítipos presentados de HLA de clase I y/o epítipos presentados de HLA de clase II. Cada uno de estos epítipos son presentables y se enlazarán a la molécula de HLA específica correspondiente presente en las células después de haber sido procesados como se describe en la presente. En el contexto de la invención, un epítipo específico del haplotipo de HLA puede por lo tanto también denominarse como un epítipo que se une a, es presentado por y/o está restringido por ese haplotipo de HLA.

[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 aquí, es de 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 los originados a partir de una proteína de HPV o pueden estar hecho totalmente o consistir en una secuencia de aminoácidos originada a partir de una proteína de HPV. La longitud de la secuencia de aminoácidos contigua de una de las proteínas de HPV anteriormente definida comprendida en el péptido, preferiblemente es de al menos 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 de la divulgación consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos contiguas de las proteínas de HPV tal y como se definen aquí, por lo cual se entiende que no hay aminoácidos añadidos a ningún extremo de la secuencia de aminoácidos contigua de la proteína de HPV que no sea contigua con esta secuencia de aminoácidos en la secuencia de la proteína de HPV nativa. Los péptidos de la invención se pueden sintetizar fácilmente y son lo suficientemente grandes para ser asimilados por células que presentan antígenos profesionales, procesados por el proteasoma y tienen capacidad física suficiente 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 N- o C-terminales, 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. 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 o aislada de un ganglio linfático de la región pélvica, que se está drenando de la lesión neoplásica cervical, preferiblemente una célula T que está presente en o aislada de un ganglio linfático de drenaje que comprende células tumorales metastásicas. Un péptido según la invención se usa preferiblemente para inducir una respuesta de células T.

[0018] En otro péptido descrito de la invención, 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 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, 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 adicional descrito de la invención, la secuencia de aminoácidos contigua comprende un epítipo que se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID n°: 5 - 26.

[0019] 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 un paciente humano que tiene 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 que tiene una enfermedad asociada al HPV, tal como una neoplasia asociada al HPV, cuyas células infectada y/o tumorales expresan una proteína de HPV tal y 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⁺ CD45RO-positiva. Esto llevará, gracias a la señal de "licencia para matar" a través de la activación CD40 de las DC (Lanzavecchia; 1998) a una respuesta de CTL efectora y de memoria CD8⁺ más robusta. En otra preparación, las células Th CD4⁺ activadas pueden activar células asesinas no restringidas por HLA del sistema inmune.

[0020] Un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua de) 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 de) un péptido descrito se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 5-21.

[0021] Otro epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua de) un péptido descrito es un epítipo que está 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 de) un péptido descrito es un epítipo que está restringido por un haplotipo DP o DQ, de los que DP1, DP0201, DP4, DP14, DP1401, DP17, DQ5, DQ6, DP1901, DQ*0301, DQ*0302, DQ*0308 y DQ*0501 son los más preferidos. Un epítipo restringido por HLA-DQ previamente descrito (WO02/070006) consiste en los aminoácidos 35-50 de la proteína E7 de HPV16. Este epítipo es, no obstante, un epítipo reconocido por células T periféricas y no por una célula T que infiltra una lesión neoplásica cervical o por una célula T que está presente en o es aislada de un ganglio linfático de la región pélvica, que está drenando de la lesión neoplásica cervical. La secuencia contigua de un péptido descrita, por lo tanto, preferiblemente no comprende un epítipo que consiste en el aminoácido 35-50 de la proteína E7 de HPV16. Así, un epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II comprendido en (una secuencia contigua de) 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 moléculas de HLA-DR se conoce por ser sobreexpresada en células tumorales. La presentación en ese contexto puede, como la presentación de antígenos en células presentadoras de antígenos no profesionales (APC), llevar a la inducción de tolerancia. La expresión de moléculas de HLA-DP o DQ es muy inferior pero los epítipos de HLA-DQ y de HLA-DP cuando se presentan en APC profesionales, tal como por ejemplo DC, pueden sin embargo llevar a respuestas inmunes eficaces.

[0022] Otro epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua de) un péptido descrito es un epítipo que es restringido por un haplotipo de 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 16, 18, 31, 33 o 45 de HPV, y de la forma más preferible de los serotipos 16 o 18 de HPV, de los cuales 16 es el más preferido.

[0023] Otro epítipo de célula Th CD4⁺ de clase II preferido comprendido en (una secuencia contigua de) 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 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 de célula Th CD4⁺ de clase II más preferido comprendido en (una secuencia contigua de) 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.

[0024] 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 humanos de control sanos o incluso más preferiblemente en un paciente humano con una enfermedad asociada al HPV, tal como una neoplasia asociada al HPV, cuyas células infectadas y/o tumorales expresan una proteína de HPV tal como se ha definido anteriormente. La presencia de epítipos de HLA de clase I y de clase II dentro de un péptido se ha observado que es particularmente ventajosa debido a la sinergia en el montaje y el mantenimiento de una respuesta de célula CTL eficaz (como se muestra en Zwaveling *et al.*, 2002).

[0025] Los péptidos que comprenden epítipos que tienen que ser presentados a receptores de célula T de células CTL y/o Th preferiblemente cumplen varios requisitos. Los péptidos preferiblemente tienen longitud suficiente para contener tanto los epítipos de HLA de clase I como de clase II. Además, los péptidos preferiblemente comprenden residuos de anclaje dentro de su partes de unión de HLA de clase I para permitir la unión a las moléculas de clase I, respectivamente. La estabilidad de la interacción entre el péptido y la molécula de MHC presentadora preferiblemente es suficiente para generar una respuesta inmune eficaz y significativa. En el contexto de la presente invención, la estabilidad de la interacción entre el péptido y la molécula de MHC presentadora por lo tanto preferiblemente es tal 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 μM < IC₅₀ ≤ 100 μM se considera unión de afinidad baja y IC₅₀ > aproximadamente

100 μM se considera como ninguna unión, por lo cual la afinidad de enlace de un péptido a una molécula de MHC se determina como se describe en van der Burg *et al.*, 1995 y Kessler *et al.*, 2003.

5 [0026] Un sitio de escisión proteasómica específico que genera el C-término del epítipo, preferiblemente está presente exactamente después de la secuencia de aminoácidos del epítipo para su liberación del péptido mayor y su presentación en la molécula de HLA de clase I. Los requisitos de longitud son mucho menos estrictos para los epítipos presentados por HLA de clase II, por lo tanto una necesidad para la 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 las proteínas de HPV, particularmente en las proteínas E6 y E7 de HPV, que comprenden epítipos de células CTL y Th preferidos y/o combinaciones de los mismos y son así péptidos altamente adecuados para usos de vacunación.

15 [0027] Por otra parte, experimentos de célula T *in vitro* y *ex vivo* se usan preferiblemente para confirmar la capacidad de los péptidos descritos para inducir respuestas de CTL CD8⁺ y Th CD4⁺ sustanciales. Los péptidos descritos proporcionan así una mejora marcada en la selección de péptidos relativamente cortos que puedan ser químicamente sintetizados, comprendiendo los más potentes y los más ampliamente aplicables epítipos de células T presentados por HLA de clase I y/o clase II derivados de los antígenos tumorales de E6 y E7 del HPV. Los péptidos son particularmente optimizados con respecto a su escisión proteasómica y preferiblemente contienen al menos un epítipo de HLA de clase I y 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 [0028] 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 va a ser tratada. Los epítipos de HLA de clase I preferidos en péptidos derivados de HPV de la invención son epítipos capaces de unirse 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 unión al péptido ($\text{IC}_{50} < \text{aproximadamente } 5 \mu\text{M de péptido}$) o al menos afinidad intermedia ($5 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} < \text{aproximadamente } 15 \mu\text{M de péptido}$). Un epítipo de CTL de clase I preferido comprendido en (una secuencia contigua de) 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 16, 18, 31, 33 o 45 de HPV y de la forma más preferible de los serotipos 16 o 18 de HPV, de los cuales 16 es el más preferido.

35 [0029] Un epítipo de CTL de clase I preferido comprendido en (una secuencia contigua de) 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 de) un péptido descrito se selecciona del grupo que consiste en SEC ID n°: 7, 14, 22 - 26.

45 [0030] Un epítipo preferido comprendido en un péptido descrito es un epítipo que es presentado por una molécula de HLA-B. Preferiblemente, la molécula de HLA-B es una molécula de HLA-B7, HLA-B14, HLA-B27 o HLA-B57. Tal epítipo se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID n°: 7, 22, 24, 25 y 26.

50 [0031] Otro epítipo preferido comprendido en un péptido descrito es un epítipo que es presentado por una molécula de HLA-A. Preferiblemente la molécula de HLA-A es una molécula de HLA-A2 o HLA*0201. Tal epítipo es seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID n° 23 y 26.

55 [0032] 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 16, 18, 31,33 o 45 de HPV, y de la forma más preferible, de los serotipos 16 o 18 de HPV, de los cuales 16 es el más preferido. Está claro para un experto en la materia que un péptido tal y como se define aquí tendrá una propiedad ventajosa y deseada relacionada con la presencia de un epítipo en dicho péptido (por ejemplo, un epítipo que se identifica en la invención como que es presentado por al menos una de una molécula de HLA-DQ y de HLA-DP y/o como que es reconocido por una célula T que infiltra una lesión neoplásica cervical o por una célula T de un ganglio linfático de drenaje) tan pronto como este epítipo esté presente en dicho péptido. Un péptido según lo descrito se usa preferiblemente para inducir una respuesta de célula T. El experto en la materia entenderá que aunque esta solicitud no identifica cada péptido que se puede diseñar como que comprende o consiste en un epítipo deseado como se ha identificado aquí, sin embargo la divulgación abarca cualquier péptido tal y como se define aquí que comprende o consiste en un epítipo según se ha identificado aquí. En una divulgación, un péptido es diferente de una proteína de HPV. En otra forma de realización preferida, un péptido no comprende o consiste en los aminoácidos 35-50 de E7 de HPV16.

[0033] 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 para cada epítipo tal y como se identifica aquí. Cualquier péptido que comprenda la SEC ID N°: 5 se encuentra encerrado por la presente divulgación y se puede usar 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 una divulgación de péptido ya se ha definido aquí. Al diseñar un péptido descrito, un péptido puede comenzar en el sitio de N-terminal de un epítipo dado como se ha identificado aquí o acabar en el sitio C-terminal de un epítipo dado como se ha identificado aquí. Alternativamente, un epítipo dado (por ejemplo SEC ID N°: 5) puede estar comprendido dentro de un péptido descrito. Usando la SEC ID N°: 5 como ejemplo, si nosotros diseñamos un péptido con una longitud de 45 aminoácidos, tal péptido puede consistir o comprender 11-56, 1-45, 2-46, 3-47, 4-48, 5-49, 5-50 de E6 de HPV16. Un péptido descrito puede además comprender cualquier otro epítipo de HPV tal y como se ha definido aquí o como ya es conocido por el experto en la materia. En esta divulgación 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 HPV 16 como se describe en la EP451 550. En esta divulgación preferida, un péptido no comprende o consiste en los aminoácidos 8-37 de E6 de HPV16 como se describe en la US5629161. En una divulgación preferida, un péptido que comprende SEC ID N°: 5 consiste en o comprende 10-32, 1-32, 1-45, 11-56, 2-46, 3-47, 4-48, 5-49, 5-50, los números indican los aminoácidos del inicio y del final de E6 de HPV16. En otra divulgación (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 que tiene el siguiente número de acceso Q919B2 (1-99, los números indican los aminoácidos de inicio y de final de E6 de HPV16) o Q80882 (1-84). Para esta divulgación también, un péptido que comprende SEC ID N°: 8 puede comenzar en el sitio de N-terminal de este epítipo o acabar en el sitio de 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 consistir o comprender 55-100, 41-86, 45-90. En una divulgación preferida, un péptido que comprende SEC ID N°: 8 consiste en o comprende 55-100, 41-86, 45-90, los números indican el inicio y el final del aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína E6 de HPV16.

[0034] Los péptidos derivados de HPV descritos se pueden modificar por eliminación o sustitución de uno o varios aminoácidos, por extensión en el N- y/o C-término con aminoácidos adicionales o grupos funcionales, lo que puede mejorar la biodisponibilidad, dirigiéndose a células T, o comprender o liberar sustancias de modulación inmune que proporcionan funciones adyuvantes o (co)estimuladoras. Los aminoácidos adicionales opcionales en el N-y/o C-término no están preferiblemente presentes en las posiciones correspondientes de 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 secuencias de aminoácidos de HPV de los diferentes serotipos de HPV están expresamente incluidas en la invención.

[0035] Los péptidos derivados de HPV descritos se obtienen 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) que comprenden 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 o 8 mg de péptido por ml. Más preferiblemente, una mezcla de más de un péptido derivados de HPV diferente de la invención es soluble en una concentración de al menos 0,5, 1, 2, 4 o 8 mg de péptido por ml en tales soluciones.

[0036] En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido para la producción de un medicamento según las reivindicaciones 1-7.

[0037] Un uso preferido de los péptidos tal y como se define en las reivindicaciones 1-5 es su uso como un medicamento, por lo cual más preferiblemente los péptidos se usan 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, en el tratamiento y/o prevención del cáncer, para la producción de medicamentos, preferiblemente vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el HPV. Tal medicamento y/o vacuna antitumoral según la invención se puede utilizar para tratar pacientes que sufren o están en riesgo de desarrollar la siguiente lista no extensiva de neoplasia intraepitelial cervical 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.

[0038] En otro aspecto, la presente invención se refiere además 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 define en la reivindicación 9, y opcionalmente uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, en particular adyuvantes y moduladores inmunes. Preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica y/o destinada para su uso como un medicamento. La composición farmacéutica está preferiblemente destinada a vacunación. La composición farmacéutica se usa preferiblemente para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, para la producción de medicamentos, preferiblemente vacunas para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada al HPV. Una lista no exhaustiva de unas enfermedades asociadas al HPV ya se ha dado aquí. Así, en un aspecto, la invención se refiere al uso de un péptido tal y como se define en las reivindicaciones 1 a 3 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 de una molécula de HLA-DQ2 y de 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, secuencias de aminoácidos contiguos y epítipos son preferiblemente tal y como se han definido en la presente anteriormente.

[0039] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un péptido tal y como se define en las reivindicaciones 4 a 5 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 una proteína E6 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 de un ganglio linfático de drenaje. Los péptidos, secuencias de aminoácidos contiguos y epítipos son preferiblemente tal y como se han definido en la presente anteriormente.

[0040] Las formulación de medicamentos, 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 medicamentos de la invención son preferiblemente formulados para ser adecuados para su administración intravenosa o subcutánea o intramuscular, aunque otras formas de administración pueden ser previstas, tal como la administración mucosa o intradérmica y/o la administración intracutánea, por ejemplo por inyección. La administración intradérmica se refiere en este caso. Ventajas y/o formas de realización preferidas que están específicamente asociadas a la administración intradérmica se definirán más adelante en una sección separada titulada "administración intradérmica".

[0041] Está también abarcado por la presente invención que la administración de al menos un péptido y/o al menos una composición de la invención se pueda 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.

[0042] Las composiciones farmacéuticas (también denominadas medicamentos) según la invención pueden comprender preferiblemente al menos un adyuvante o compuesto de estimulación de respuesta inmune. Ventajosamente, la composición farmacéutica según la invención puede comprender además uno o varios adyuvantes sintéticos. Estos adyuvantes se pueden mezclar con la composición farmacéutica según la invención o se pueden administrar separadamente al mamífero o humano que se va a tratar. Particularmente preferidos son aquellos adyuvantes que se conocen por actuar a través de los receptores de tipo peaje y/o a través de una proteína de RIG-1 (gen-1 inducible por ácido retinoico) y/o a través de un receptor de endotelina. Los compuestos de modificación inmune que son capaces de activar el sistema inmune innato se pueden activar particularmente bien a través de receptores tipo peaje (TLRs), incluyendo los TLR 1-10. Los compuestos que pueden activar los receptores TLR y las modificaciones y derivados de los mismos están bien documentados en la técnica. TLR1 se pueden activar por lipoproteínas bacterianas y formas acetiladas de las mismas, TLR2 se pueden 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 pueden activar por dsRNA, en particular de origen vírico, o por el compuesto químico poly(I:C). TLR4 se pueden activar por LPS Gram negativo, LTA, proteínas de choque térmico del huésped o de origen bacteriano, proteínas de cubierta o revestimiento vírico, taxol o derivados del mismo, hialuronano que contiene oligosacáridos y fibronectinas. TLR5 se pueden activar con flagelina o flagelos bacterianos. TLR6 se pueden activar por lipoproteínas micobacterianas y factor soluble lábil al calor de *Streptococcus* del grupo B (GBS-F) o *Staphylococcus modulins*. TLR7 se pueden activar por imidazoquinolinas. TLR9 se pueden activar por DNA de CpG no metilado o complejos cromatina-IgG. En particular los TLR3, TLR7 y TLR9 desempeñan un papel importante en la mediación de una respuesta inmune innata contra las infecciones víricas, y los compuestos capaces de activar estos receptores son particularmente preferidos 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 sintéticamente que comprenden dsRNA, poly(I:C), DNA de CpG no metilado que activa los receptores TLR3 y TLR9, IC31, un agonista

de TLR 9, IMSAVAC, un agonista de TLR 4, Montanide ISA-51, Montanide ISA 720 (un adyuvante producido por Seppic 7, Francia). La proteína de RIG-1 se conoce por ser activada por ds-RNA, al igual que los TLR3 (Immunity, (2005), 1:19-28). En otra forma de realización preferida, los compuestos adyuvantes sintéticos están físicamente enlazados a los péptidos de la invención. La conexión física de los compuestos adyuvantes y coestimuladores o los grupos funcionales al epítipo de HLA de clase I y HLA de clase II que comprende péptidos proporciona una respuesta inmune mejorada por estimulación simultánea de las células presentadoras de antígenos, en particular las células dendríticas, que interiorizan, metabolizan y muestran el antígeno. Otro compuesto de modificación inmune 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-metoxicarboniltryptofanil-D-norleucina. No obstante, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto de BQ-788 modificado está también abarcado dentro del campo de esta invención.

[0043] Además, se prefiere el uso de moléculas (co)estimuladoras de células presentadoras de antígeno, 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 derivados de los mismos, al igual que compuestos sintéticos con actividad agonística similar son preferiblemente administrados de forma separada o en combinación con los péptidos de la invención a sujetos que van a ser tratados para estimular adicionalmente el montaje de una respuesta inmune óptima en el sujeto.

[0044] Además, una forma de realización preferida comprende la administración de los péptidos, con o sin estimulantes inmunes adicionales tales como los ligandos TLR y/o los anticuerpos anti CD40/anti-4-1 BB en un vehículo de liberación lenta tal como el 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 inmunes (adyuvantes). Preferiblemente, para la administración intradérmica los péptidos de la invención se administran en una composición que consiste en los péptidos y en uno o varios portadores farmacéuticamente aceptables inmunológicamente inertes, por ejemplo, soluciones acuosas tamponadas a fuerza iónica fisiológica y/o osmolaridad (tal como por ejemplo PBS).

Administración intradérmica

[0045] En una forma de realización preferida, un péptido o una composición que comprende un péptido tal y como se ha definido en la reivindicación 8 o un medicamento usado en la invención, todos tal y como se han definido en la presente, se formulan para ser adecuados para la administración o la aplicación intradérmica. Intradérmico es conocido por el experto en la materia. En el contexto de la invención, intradérmico es sinónimo de intracutáneo y es diferente de subcutáneo. 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 (en el cuerpo del músculo). Una aplicación intradérmica normalmente se da por inyección. Una inyección intradérmica de una sustancia normalmente se hace para probar una posible reacción, alergia y/o inmunidad celular a ésta. Una aplicación subcutánea normalmente se da también por inyección: una aguja se inyecta en los tejidos debajo de la piel.

[0046] En otra forma de realización preferida, 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: una emulsión a base de agua en aceite preferiblemente 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 a base de aceite en agua. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el medicamento usado en la invención es una solución acuosa tamponada a osmolaridad y/o fuerza iónica fisiológica, tal como por ejemplo PBS (solución salina tamponada con fosfato) que comprende o consiste en uno o varios péptidos tal y como se han definido en la presente anteriormente. El experto en la materia sabe cómo preparar tal solución.

[0047] El medicamento, como se usa en la invención, tiene otra ventaja, que es que mediante la administración intradérmica en bajas cantidades de un péptido tal y como se ha definido anteriormente aquí, se puede conseguir todavía un efecto inmunogénico. La cantidad de cada péptido usada está preferiblemente en el rango de entre 1 y 1000 µg, más preferiblemente entre 5 y 500 µg, incluso más preferiblemente entre 10 y 100 µg.

[0048] En otra forma de realización preferida, el medicamento comprende un péptido tal y como se ha definido en la presente anteriormente y al menos un adyuvante, dicho adyuvante no está formulado en una emulsión a base de aceite en agua y/o no es del tipo emulsión de aceite en agua como se ha definido en la presente anteriormente. Este tipo de medicamento se puede administrar como una única administración. Alternativamente, la administración de un péptido como se ha definido anterior aquí y/o un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o diferentes péptidos y/o diferentes adyuvantes se pueden administrar consecutivamente. Además, está abarcado por la presente invención que un péptido de la invención se administre de forma intradérmica, mientras que un adyuvante tal y como se ha definido aquí se administre consecutivamente. El adyuvante se puede administrar de forma intradérmica. No obstante, cualquier otra forma de administración se puede utilizar para el adyuvante.

[0049] La administración intradérmica de un péptido es muy atractiva debido a que la inyección de la vacuna se realiza en o lo más cerca posible del sitio de la enfermedad, dando como resultado la activación local del ganglio linfático de

drenaje de la enfermedad, provocando una activación local más fuerte del sistema inmune. En particular para VIN, VAIN, AIN, PIN, cáncer de pene, cáncer de vulva, cáncer anal y cáncer de cabeza y cuello.

5 [0050] En una forma de realización preferida, la administración intradérmica se realiza directamente en el sitio de la lesión o enfermedad. En el sitio de la lesión se entiende aquí que está a menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 cm del sitio de la lesión.

10 [0051] Mediante la administración intradérmica de un medicamento tal y como se define aquí, se desencadenan respuestas no solo de Th1, sino también de Th2. Esto es sorprendente dado que ya se ha descubierto que el cebado con antígeno cutáneo mediante pistola de genes lleva a una respuesta inmune de Th2 selectiva (Alvarez D. *et al.*, 2005). Además, la respuesta inmune observada no está sólo restringida a la piel como se podría esperar según (Alvarez D. *et al.*, 2005). Demostramos que las células T específicas que secretan IFN γ circulan a través del sistema linfático secundario según se detectan en la sangre periférica después de la inoculación.

15 [0052] Otra ventaja crucial del medicamento de la invención es que cantidades relativamente bajas de péptidos se pueden utilizar, en una única inyección, en una simple formulación y sin ningún adyuvante conocido por generar efectos secundarios no deseados, tal como Montanide ISA-51. Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, creemos que el/los péptidos intradérmicos de HPV usados en la invención específicamente y directamente se dirigen 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 inmunes primarias (Romani N. *et al.* 1992). Estas LC se pueden ver como adyuvantes naturales reclutados por el medicamento usado en la invención.

25 [0053] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al uso de un péptido derivado de la proteína 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 administración intradérmica como se ha definido anteriormente y donde además un péptido derivado de la proteína E2, E6 y/o E7 de HPV se usa posteriormente para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es para administración subcutánea.

30 [0054] El medicamento para administración intradérmica ya se ha definido en la presente. El péptido usado para la administración subcutánea es el mismo que el usado para la administración intradérmica y ya se ha definido en la presente. 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 ya se ha definido 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 varios péptidos, un adyuvante tal y como se ha definido en la presente anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable inerte y/o excipientes, todos como se han definido en la presente anteriormente. Las formulación de medicamentos 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, 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.

45 [0055] 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 anteriormente preferida dedicada a la administración intradérmica, la administración intradérmica y/o subcutánea de un péptido tal y como se ha definido anteriormente aquí y/o de un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o de diferentes péptidos y/o de diferentes adyuvantes se puede administrar consecutivamente de forma intradérmica y/o subcutánea. Además 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 administra consecutivamente. El adyuvante se puede administrar de forma intradérmica y/o subcutánea. No obstante, cualquiera otra forma de administración se puede utilizar para el adyuvante.

55 [0056] Esperamos que una combinación de una administración intradérmica y una subcutánea de un medicamento según la invención sea ventajosa. Las DC de la epidermis son claramente diferente de las DC de la dermis y del tejido subcutáneo. La inmunización intracutánea (intradérmica) provocará el procesamiento del antígeno y la activación de las DC epidérmicas (células de Langerhans langerina positivas) que a través de su red dendrítica están en contacto cercano con los queratinocitos. Esto activará también óptimamente las vías inflamatorias de las interacciones entre la célula de Langerhans y los queratinocitos, seguido de tráfico de antígeno cargado y célula de Langerhans activada en los ganglios linfáticos de drenaje de la piel.

60 [0057] La administración subcutánea activará otros subconjuntos de DC, que también se cargarán con antígeno y se desplazarán independientemente a los ganglios linfáticos de drenaje de piel. Posiblemente, el uso de un medicamento

que se pueda administrar tanto de forma intradérmica como subcutánea puede llevar a una estimulación sinérgica de células T en estos ganglios de drenaje por los diferentes subconjuntos de DC.

[0058] En otro aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican el péptido y/o epítipo que consiste en SEC ID n°: 12. 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 los epítipos de la invención como tales o flanqueados por la secuencia de aminoácidos que no sea contigua de las proteínas E6 o E7 de HPV de tipo salvaje. Tales aminoácidos flanqueantes pueden ser de proteínas diferentes a 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 contiguas al péptido/epítipo que flanquean. En una forma de realización preferida, los ácidos nucleicos codifican dos o más péptidos y/o epítipos de la invención dispuestos como microesferas en cadena, por lo cual los péptidos y/o los epítipos de la invención (las microesferas) están enlazados directamente entre sí y/o están enlazados a través de secuencias enlazadoras que son de proteínas distintas 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 que no sean contiguas al péptido/epítipo que flanquean. Las secuencias de aminoácidos flanqueantes o que conectan los péptidos/epítipos pueden comprender sitios de escisión proteolítica. Tales ácidos nucleicos se pueden aplicar para administrar los péptidos/epítipos de la invención de varias maneras. Se pueden usar, 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 puede estar operativamente enlazado a secuencias reguladoras de expresión (promotores y similares) e incorporado en los constructos de expresión para 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 génica adecuado. Los vectores víricos (basados en un virus defectuoso) son agentes más eficaces para transferencia de genes en comparación con los agentes no víricos. Los constructos de expresión víricos adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que se basan en adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus o Vaccinia Ankara modificado (MVA).

[0059] En otra divulgación, se proporciona una herramienta para aislar las moléculas del receptor de célula T (TCR) específico de HPV de las células T capaces de interactuar con un epítipo de HPV de la invención como se ha descrito en la presente. Un TCR según esta invención preferiblemente será capaz de interactuar con el epítipo de HPV que comprende los péptidos cuando están en el contexto de y/o son mostrados por una molécula de HLA, preferiblemente en una célula viva *in vivo* o *in vitro*. Receptores de célula T y en particular ácidos nucleicos que codifican TCR según la invención se pueden aplicar, por ejemplo, para transferir tales TCR en las células T de los pacientes, quienes de otro modo no son capaces de elevar la inmunidad de la célula T contra unos epítipos de HPV de la invención como se ha descrito en la presente. Por este método de clonación de TCR, se pueden proporcionar clones de célula T que sean esencialmente isogénicos con el receptor que se va a tratar con los clones de célula 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 célula T capaces de reconocer un epítipo de HPV según la invención que se pueda generar para y que pueda dirigirse específicamente a células tumorales y/o infectadas por el HPV que expresan un epítipo de HPV en un sujeto que tiene necesidad de los mismos. En una forma de realización preferida, las células T del sujeto se aíslan y se transducen con el TCR que reconoce los epítipos de HPV de la invención como se han descrito en la presente. Tras la selección y la expansión, conocidas por el experto en la materia, estas células T autólogas que están ahora expresando un TCR que puede reconocer células tumorales inducidas por el HPV o células infectadas por el HPV, se pueden reinfundir en el paciente, donde específicamente se dirigen a las células tumorales e infectadas por el HPV. Por lo tanto, la invención proporciona linfocitos T que codifican y expresan un receptor de célula T capaz de interactuar con un epítipo de HPV que consiste en la SEC ID N°: 12, preferiblemente en el contexto de una molécula de HLA. Dicho linfocito T puede ser un linfocito T recombinante o naturalmente seleccionado. Los linfocitos T de la invención también se puede usar para o en los métodos y las composiciones farmacéuticas de la invención. Esta especificación proporciona así al menos dos métodos para producir un linfocito T citotóxico de la invención, que comprenden el paso de poner en contacto linfocitos indiferenciados con un epítipo de HPV de la invención (o un péptido que comprende el epítipo) bajo condiciones conductivas de activación de una respuesta inmune, que se puede hacer *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, en un paciente que recibe un injerto, usando los péptidos según la invención. Alternativamente, puede ser portado *in vitro* mediante la clonación de un gen que codifica los TCR específicos para interactuar con un epítipo 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 epítipo, en una célula huésped y/o un linfocito huésped, preferiblemente un linfocito autólogo, y opcionalmente diferenciar linfocitos T citotóxicos (CTL). Detalles de los métodos de esta forma de realización se describen en, por ejemplo, De Witte *et al.* 2006 y Schumacher *et al.* 2002.

[0060] En otra forma de realización, la invención pertenece al uso de los ácidos nucleicos que codifican el péptido y/o epítipo que consiste en la SEC ID N°: 12, receptores de célula T que reconocen los epítipos de la invención, ácidos nucleicos que codifican tales receptores de célula T, células T (clones) que expresan tales ácidos nucleicos como un medicamento. Preferiblemente, el medicamento se usa en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada al HPV. Tal medicamento según la invención se puede utilizar para tratar pacientes que sufren o están en riesgo de desarrollar la siguiente lista no extensiva de neoplasia intraepitelial cervical 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.

[0061] 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 artículos que van después de la palabra están incluidos, pero los artículos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", de este modo, normalmente significa "al menos uno".

[0062] Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo para su uso ilustrativo, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención de manera alguna.

Descripción de las figuras

[0063]

Figura 1

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

Figura 2

Análisis del tipo de célula T que responde al antígeno de HPV según se midió por tinción de citocina intracelular para IFN γ . Para péptido y proteína positivos, el péptido 41-62 de HPV16E6 y la proteína HPV16E6 se usaron para C265, 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. Péptidos y proteínas de los homólogos de HPV fueron usados como controles negativos. El cultivo de TIL de C265 mostró una respuesta de célula T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ que ambas respondieron al péptido 41-62 de HPV16E6.

Figura 3

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

Figura 4

Análisis de reactividad de célula T presente en el ganglio linfático de drenaje del tumor de C427. A) Reactividad de los cultivos de célula 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: modelo de reconocimiento del cultivo de células T tras estimulación con B-LCL autólogas pulsadas con péptidos de 22 meros únicos. Paneles inferiores: gráficos del epitopo mínimo reconocido por clones de células T que se derivaron de este cultivo inicial de LNMC. El clon de célula T CD4 C427.47 fue estimulado y evaluado en un ensayo de proliferación de 3 días (panel izquierdo). El clon de célula T CD8 C427.78 fue evaluado en un ensayo de ELISPOT para IFN γ (panel derecho). C) El tipo de célula T que respondió fue determinado por tinción de citocina intracelular. Péptido 11-32 de HPV16E6 (panel superior) y péptido 137-158 (panel inferior) se usaron como péptidos positivos. Péptido y proteína de HPV18E7 fueron usados 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), lo que indica que la respuesta de célula T CD4 $^{+}$ fue restringida por HLA-DP14 y las células T CD8 $^{+}$ por HLA-B14.

Figura 5

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 los 8 grupos de péptidos, se indica el primer y el último aminoácido de la proteína del grupo de péptidos usado. La disposición impresa en negrita indica al menos una reacción positiva dentro de este plazo; un cuadrado relleno representa una reacción cutánea de nuevo desarrollo, positiva para el grupo de péptidos indicado.

10 Figura 6

La detección de células T específicas de HPV16 por ELISPOT para IFN γ en la muestra de sangre antes de la inoculación de donantes sanos está significativamente correlacionada con la aparición de una reacción cutánea positiva temprana (<13 días) para el grupo de péptidos reconocido ($p=0,0003$, prueba exacta de Fisher de 2 colas). Las respuestas específicas se calcularon mediante la sustracción del número medio de puntos + 2xSD del control de medio a partir del número medio de puntos de los pocillos experimentales. El número de puntos específicos por 100.000 PBMC se da. Las respuestas se consideraron positivas si la célula T específica del grupo de péptidos fue ≥ 5 en 100.000 PBMCs.

20 Figura 7

A) Asociación entre la aparición de una reacción cutánea positiva y la detección simultánea (ELISPOT para IFN γ) de células T específicas de HPV16 circulantes en la muestra de sangre post inoculación de donantes sanos ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher de 2 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.

30 Figura 8

A) Respuestas de células T específicas de HPV16 detectadas por ELISPOT para IFN γ en la muestra de sangre de post inoculación de donantes sanos que muestran una reacción cutánea positiva. El número medio de puntos por 100.000 PBMCs está representado. La mezcla de respuesta de memoria (MRM) se usó como control positivo. La barra rellena indica el sitio de reacción cutánea positiva del cual se tomó una biopsia por punción y se puso en cultivo. B) Los linfocitos T que se exfiltran de las biopsias por punción se evaluaron, 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 inyectó en la prueba de piel, o con proteína (20 $\mu\text{g/ml}$). Fitohemaglutinina (PHA) sirvió como control positivo. La proliferación se midió por incorporación de [^3H]timidina y una respuesta proliferativa se definió específica como el índice de estimulación (SI) ≥ 3 . El donante sano 17 (HD 17) es un ejemplo de un sitio de reacción cutánea positiva que consiste en células T no específicas. C) Los sobrenadantes de las respuestas proliferativas en B se analizaron para la presencia de IFN γ , interleucina 4 (IL4), IL5 y factor α de necrosis tumoral, IL2, IL10 (no mostrado) por matriz citométrica de microesferas. 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 las citocinas restantes). La producción de citocina específica del antígeno fue definida como un nivel de corte por encima de la concentración de citocina y $>2x$ la concentración del control de medio. El donante sano 15 (HD15) muestra un nivel elevado de IL5, pero aumenta $>2x$ después de la estimulación con antígeno.

50 Figura 9

El cultivo de célula T de la biopsia de piel del grupo 4 (E6₄₁₋₆₅, E6₅₅₋₈₀, E6₇₁₋₉₅) del donante sano 15 (HD15) consiste tanto en células T CD4 $^+$ como CD8 $^+$ específicas de HPV16. La especificidad del cultivo se evaluó en una tinción de citocina intracelular (ICS) contra la proteína (20 $\mu\text{g/ml}$) y los péptidos (10 $\mu\text{g/ml}$) correspondientes a la prueba de piel inyectada. Notablemente, en 3 de cada 4 biopsias células T CD8 $^+$ específicas de HPV 16 fueron detectadas.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: identificación y caracterización de epítomos de HPV nuevos

60 1. Métodos

1.1 Sujetos

[0064] Mujeres que presentan neoplasia cervical histológicamente probada en el departamento de ginecología del centro médico de la universidad de Leiden y del hospital de Leyenburg, La Haya, se inscribieron en el estudio CIRCLE, que investiga la inmunidad celular contra las lesiones cervicales positivas de HPV 16 después de proporcionar su

consentimiento informado. El diseño del estudio fue aprobado por los comités éticos médicos de ambos hospitales. Los sujetos fueron evaluados para estado del HPV utilizando cebadores específicos de HPV16 y de HPV18 en ADN aislado de muestras de resección quirúrgica (Claas *et al.* 1989). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para el análisis de restricción de HLA de donantes de sangre sanos anónimos tipificados de HLA después de consentimiento informado.

1.2 Antígenos

[0065] Un conjunto de péptidos solapantes que abarcan las proteínas E6 y E7 de HPV16 y HPV18 se usaron para ensayos de estimulación de célula T. E6 y E7 de HPV16 y HPV18 consistieron en 22 meros solapando 12 residuos. Los péptidos fueron sintetizados y disueltos como se ha descrito anteriormente (van der Burg *et al.* 2001, Welters *et al.* 2006). Las proteínas E6 y E7 de HPV recombinantes fueron producidas en *E. coli* recombinante como se ha descrito anteriormente (van der Burg *et al.* 2001). Por otra parte, un conjunto de 10 meros solapantes (solapando 9 aminoácidos) de ambas E6 y E7 de HPV16 se produjo para identificar el epítipo de péptido mínimo reconocido por las células T específicas de HPV 16.

1.3 Células presentadoras de antígenos

[0066] Las líneas celulares B (B-LCL) transformadas por el virus de Epstein-Barr de los pacientes se mantuvieron en el IMDM que contenía 10% de FCS. Se generaron monocitos a partir de linfocitos de sangre periférica como se ha descrito anteriormente (de Jong *et al.* 2002).

1.4 Aislamiento y cultivo de células T

[0067] Biopsias de tumores cervicales se obtuvieron después de histerectomía radical, tejido de neoplasia cervical se obtuvo de pacientes con CIN III después de la biopsia. Tejido cervical fresco se desmenuzó en pedazos de aproximadamente 1 mm³ y se cultivó en IMDM (BioWhittaker, Verviers, Bélgica), suplementado con 10% de suero AB humano (Sigma, St. Louis MO, EEUU), 10% de factor de crecimiento de célula T (Zeptomatrix, Buffalo NY, EEUU) y 5 ng/ml de IL-15 (Peprotech, Rocky Hill NJ, EEUU). Durante el primer día, 5 ng/ml de IL-7 (Peprotech) se añadió a los cultivos para asegurar el crecimiento de célula T. Después de 2 a 3 semanas, la especificidad de los cultivos de célula T (TIL, CIL) se evaluó y los cultivos positivos se expandieron utilizando una mezcla de B-LCL autólogas irradiadas y 5 µg/ml de péptido cognado.

[0068] Los ganglios linfáticos estaban derivados de la región pelviana y contenían células tumorales, indicativo de cáncer metastásico. Los ganglios linfáticos se cortaron en trozos 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 de ganglio linfático se pasaron por un depurador celular (BD, Erebodemgem, Bélgica) para obtener una única suspensión celular. Cultivos de LMNC separados se estimularon con grupos de péptidos de E6 o E7 de HPV16 o 18 y se cultivaron durante 2 a 3 semanas.

[0069] Clones de células T se aislaron utilizando 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 célula T fueron evaluados para su especificidad y se mantuvieron en IMDM que contenía 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 utilizando una mezcla de medio de cultivo, PBMC irradiadas de 3 donantes diferentes, B-LCL y 0,5 µg/ml de PHA.

1.5 Análisis de especificidad de célula T

[0070] Cultivos de célula T (25.000-50.000 células/pocillo) se evaluaron sobre monocitos autólogos pulsados o EBVs autólogos irradiados para el reconocimiento de péptidos (5 µg/ml) y proteína (10 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 almacenó a -20°C para análisis de citocina. Durante las últimas 16 horas de cultivo 0,5 µCi/pocillo [³H]timidina se añadió 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).

[0071] Se llevaron a cabo experimentos de bloqueo de MHC de clase II como se ha descrito antes 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). APC pulsadas con péptido se incubaron con anticuerpos anti-MHC de clase II durante 2 horas antes de la adición de células T.

[0072] La enumeración de células T productoras de IFNγ medida por tinción de citocina intracelular se realizó como se ha descrito anteriormente (de Jong *et al.* 2005). En resumen, APC fueron cargadas con péptido cognado o proteína recombinante e incubadas con cultivos de células T. Después de 1 hora de incubación, 10 µg/ml de Brefeldin A (Sigma) se añadió y se incubó durante toda la noche. Desde ese momento, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído

(Sigma) y 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.

[0073] El péptido mínimo reconocido por las células T CD8 se analizó por ELISPOT para IFN γ (van der Burg *et al.* 2001, Welters *et al.* 2006, de Jong *et al.* 2002). Las líneas celulares T CD8 se sembraron en pocillos triplicados en una densidad de 2 x 10⁴ en una placa de 96 pocillos MultiScreen (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) recubierta 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 llevó a cabo análisis de restricción de HLA de células T CD8 usando 5 μ g/ml de PBMC pulsadas con péptido de 10 meros o B-LCL cocultivadas con igual número de células T. Los puntos específicos de IFN γ se mancharon siguiendo 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 Células T específicas de HPV están presentes en los linfocitos infiltrantes de neoplasia cervical

[0074] En el actual estudio analizamos la presencia, el tipo y la especificidad de células T específicas de HPV16 y HPV 18 en lesiones neoplásicas cervicales, que es el sitio 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 adicionales con CIN III. Pedazos desmenuzados de tejido se cultivaron durante 2 a 3 semanas en presencia de una mezcla de citocinas que contenía IL-15 y TCGF. Para evitar un sesgo potencial en el crecimiento de células T específicas del tumor no se proporcionó ningún antígeno de HPV exógeno a estos cultivos. Dentro de los 14 a 21 días de cultivo, las células T expandidas por citocina fueron cosechadas y analizadas por FACS. El porcentaje medio de células T CD3⁺ presentes 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 célula T, como indicaba 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 células T CD4⁺ o CD8⁺ (no mostrada). Para analizar la presencia de células T específicas de HPV, los cultivos fueron estimulados con monocitos autólogos pulsados con depósitos diferentes de péptidos solapantes que abarcaban las proteínas E6 y E7 de HPV16 y HPV18, al igual que las proteínas recombinantes respectivas. En 19 de los 51 pacientes positivos de HPV16 o HPV18, pudimos detectar células T específicas de HPV por proliferación (Tabla 1, Figura 1a). Estos cultivos respondieron a monocitos cargados tanto de péptido como de proteína, indicando que las células T reconocieron el antígeno naturalmente procesado. En 8 cultivos, las células T específicas de E6 fueron detectadas, en 10 cultivos, las células T respondieron a E7 y en un cultivo de célula T una respuesta a ambas E6 y E7 fue detectada. De manera importante, no se detectó ninguna respuesta de célula T específica de HPV16 o 18 en los 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

[0075] Después de la evaluación de reactividad específica de HPV, las 19 líneas celulares T de respuesta fueron expandidas por estimulación con péptido cognado, mezcla de citocina y células alimentadoras. Quince de estos cultivos específicos de HPV pudieron expandirse suficientemente para más análisis. La especificidad fina de las células T específicas de HPV fue determinada 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 estimulación antigénica, los cultivos de célula T se estimularon con su péptido cognado y antígenos de proteína y la respuesta se analizó por tinción intracelular de IFN γ (Figura 2). La mayoría de los cultivos de TIL contenían linfocitos T infiltrantes de CD4⁺ específicos de HPV (n=13 pacientes, 13 péptidos diferentes reconocidos), mientras que los linfocitos infiltrantes de células T CD8⁺ específicos de HPV se encontraron en 6 cultivos. En 9 de las líneas celulares T específicas de HPV solo una respuesta de célula T CD4⁺ fue detectada, en 4 líneas celulares T ambas células T CD4⁺ y células T CD8⁺ reaccionaron y en 2 líneas celulares T solo una respuesta de células T CD8 fue detectada (Tabla 1, Figura 2).

2.3 Restricción de HLA de linfocitos infiltrantes de tumor

[0076] 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 están implicadas en la presentación de los antígenos de E6 y E7 de HPV16 y HPV18 (Tabla 2). El uso de anticuerpos de bloqueo contra HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP reveló que 3 de las respuestas detectadas fueron restringidas 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, APC de donantes sanos que eran compatibles solo con un alelo de HLA se usaron (Figura 3). En 6 casos no pudimos determinar exactamente el elemento de restricción.

[0077] En el caso del paciente C265, ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de HPV respondieron al mismo péptido (Figura 2). Para discriminar entre estas dos respuestas de célula T, se establecieron clones de célula T mediante la limitación de la dilución. Desafortunadamente, solo se obtuvieron clones de células T CD4⁺ y, como tales, sólo se pudo establecer el elemento de restricción de HLA de clase II. Por lo tanto, sólo fue posible determinar el péptido mínimo y la restricción en los otros 5 cultivos de células T CD8 específicas de HPV diferentes (Tabla 2). Como ejemplo, la Figura 3 muestra la determinación del péptido-epítipo mínimo y la restricción de la respuesta de célula T CD8 (Figura 3c) del cultivo de TIL obtenidos del paciente C334. Esta respuesta fue restringida por HLA-B27 ya que este cultivo de célula T CD8 respondió sólo tras estimulación con APC cargadas de péptido compatibles con HLA-B27 y no con otra APC parcialmente compatibles con 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).

2.4 Células T específicas de HPV en ganglios linfáticos drenantes del tumor

[0078] Los ganglios linfáticos drenantes del tumor son el sitio donde 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 drenantes del tumor de 6 pacientes con diferentes cánceres cervicales. Suspensiones de células únicas de células mononucleares de los ganglios linfáticos (LNMC) fueron aisladas de pacientes cervicales que mostraban metástasis en sus ganglios linfáticos. No pudimos detectar directamente respuestas específicas de HPV *ex vivo* en las LNMC aisladas recientes (datos no mostrados). Por lo tanto, LNMC fueron primero expandidas por una ronda de estimulación *in vitro* con grupos de péptidos de E6 y E7 de HPV16 o 18. En 4 casos, las LNMC respondieron a HPV16 y en 1 paciente se detectó una respuesta de HPV18 por proliferación y producción de IFN γ (Tabla 1, Figura 4A). De forma similar a los cultivos de TIL, los pacientes con tumores positivos de HPV16 reaccionaron sólo a HPV16 mientras que el paciente diagnosticado con 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 fueron estimuladas con péptidos de HPV16 y HPV18 *in vitro* (Tabla 1). Clones de célula T aislados de estos cultivos de LNMC fueron caracterizados con respecto a su fina especificidad y elemento de restricción de HLA. Reactividades de células T CD4⁺ fueron encontradas para 10 péptidos diferentes, 7 de los cuales no se detectaron en los cultivos de TIL. Tres de estos epítipos estuvieron restringidos por HLA-DQ y los otros 4 por HLA-DP. Además, un epítipo de célula T CD8⁺ restringido por HLA-A*0201 y uno restringido por HLA-B14 fueron identificados (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 específicamente respondieron a APC cargadas con grupos de péptidos de HPV16E6 o proteína recombinante (Figura 4A). El análisis de la reactividad contra los péptidos únicos mostró reconocimiento de un repertorio amplio de péptidos (Figura 4B) y los clones de célula T CD4⁺ y CD8⁺ aislados de este cultivo reconocieron su antígeno cognado cuando se procesó naturalmente a partir de proteína recombinante (Figura 4 C). La restricción se determinó además usando anticuerpos de bloqueo de HLA de clase II y APC de donantes parcialmente compatibles (Figura 4D).

[0079] Tomado en conjunto, el análisis de TIL y de las células del ganglio linfático drenante del tumor mostró que en 23 de los 54 diferentes pacientes positivos de HPV16 o HPV18 se puede detectar una respuesta de célula T específica para en total 25 péptidos diferentes derivados de E6 o E7. En particular, 13 péptido-epítipos 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).

3. Discusión

[0080] Las oncoproteínas E6 y E7 codificadas por HPV16 pueden servir como antígenos de rechazo tumoral en modelos animales (Zwaveling *et al.* 2002, Peng *et al.* 2005), lo que sugiere que también pueden servir como antígenos objetivo para los linfocitos infiltrantes del tumor en el cáncer cervical, pero esto no se ha analizado nunca sistemáticamente en un grupo grande de pacientes. Pudimos establecer un número alto de cultivos de TIL y linfocitos infiltrantes 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 de las células T CD4 y CD8 sin una preferencia abierta para la expansión de cualquiera de los tipos de célula T. A lo largo 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 reaccionaron a la estimulación con los antígenos de 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 específicas de HPV observadas en los TIL y CIL de pacientes positivos de HPV 16 o de HPV 18 no son el resultado de respuestas de células T inducidas *in vitro*, sino un reflejo de la respuesta antitumoral *in vivo*. Recientemente, mostramos que este protocolo tuvo también éxito en la expansión de cultivos de TIL de un pequeño grupo de pacientes con cáncer ovárico (Lambeck *et al.* 2007).

[0081] Números Similares de cultivos de TIL respondieron a E6 y E7 (Tabla 1). La identificación de los epítipos de péptido cognado y elementos de restricción de HLA de las respuestas inmunes específicas de HPV reveló que la inmunidad específica de HPV no estaba restringida a una región inmunodominante específica, sino que estaba dirigida en todos los dominios de las oncoproteínas E6 y E7 (Tabla 2), lo que sugiere que ambas células T específicas de E6 y E7 de HPV contribuirán a la respuesta antitumoral. Sorprendentemente, nuestro análisis reveló que la mayoría de las

respuestas de célula T CD4⁺ específicas de HPV estaban 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 se presentan 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 un papel más prominente para las células T restringidas por HLA-DQ y por HLA-DP, arguyendo esas estrategias, la incorporación de algoritmos informáticos para identificar respuestas de célula T funcionales contra el HPV no debería focalizarse en HLA-DR únicamente (Warrino *et al.* 2004, Facchinetti *et al.* 2005). En 7 pacientes se detectó una respuesta de célula T CD8⁺. Además de la identificación de 3 nuevos epítomos de células T CD8 restringidas por HLA-B7, HLA-B14 y HLA-B27, confirmamos la presencia de células T CD8⁺ infiltrantes del tumor restringidas por HLA-A*0201 que reconocen el epítomo HPV16 E7.11-20 (Evans *et al.* 1997, Oerke *et al.* 2005), sin embargo, esa reactividad más fuerte se observó contra la secuencia peptídica 11-19. Además, se detectaron células T CD8⁺ reactivas al epítomo HPV16E6.52-61 restringido por HLA-B57. Basándonos en 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 la eliminación de la infección por HPV 16 (Nakagawa *et al.* 2004, Nakagawa *et al.* 2007). No obstante, la detección de CTL que responden a este epítomo en los pacientes con cáncer hace que esto sea menos probable. Nuestro estudio muestra que en al menos 23 de los 54 diferentes pacientes positivos de HPV16 o HPV18, 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 para restablecer una respuesta antitumoral eficaz en aquellos pacientes con una respuesta inmune preexistente. De manera importante, los epítomos de células T reconocidos por las células T de este estudio constituyen objetivos fisiológicos en la respuesta inmune para los tumores positivos de HPV16 y HPV18. Como tales serán de gran valor 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 controlar la inmunoterapia. La presencia frecuente 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

30 Materiales y métodos

Diseño del estudio

[0082] Se llevó a cabo un estudio piloto transversal para analizar respuestas de células T específicas de E2, E6 y E7 de HPV16 según se midieron por inyección intradérmica de grupos de péptidos de HPV16 de grado clínico en el brazo superior en pacientes con trastornos del cérvix relacionados con el HPV y en individuos sanos. Dado que una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado representa una respuesta de células T de memoria, no hubo ningún prerrequisito para positividad de HPV16 en el momento del análisis.

40 Sujetos

[0083] Un grupo de diecinueve individuos sanos (HD) participaron en este estudio después de proporcionar consentimiento informado. El grupo de individuos sanos tenía una edad media de 31 años (rango 20- 51 años) y estaba compuesto de 80 % de mujeres y 20 % de hombres. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de todos los sujetos inmediatamente antes de la administración de la prueba de piel. La aparición tardía de pruebas cutáneas positivas en individuos sanos provocó 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 centro médico de la Universidad de Leiden.

50 Prueba cutánea DTH

[0084] Pruebas cutáneas, basadas en las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), se puede usar como un método simple y sensible para medir *in vivo* respuestas inmunes celulares específicas de HPV (Hopfl, 2000; Hopfl, 1991). Las preparaciones de la prueba cutánea consistieron en 8 grupos de péptidos sintéticos de grado clínico que abarcaban la proteína completa E6 y E7 de HPV 16 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 interdivisional del LUMC. Cada grupo de la prueba cutánea consistió en 2 o 3 péptidos sintéticos, denominados por el primer y el último aminoácido de la región de la proteína cubierta por los péptidos. Grupo 1: E2₃₁₋₆₀, E2₄₆₋₇₅, grupo 2: E2₃₀₁₋₃₃₀, E2₃₁₆₋₃₄₅, grupo 3: E6₁₋₃₁, E6₁₉₋₅₀, grupo 4: E6₄₁₋₆₅, E6₅₅₈₀, E6₇₁₋₉₅, grupo 5: E6₈₅₋₁₀₉, E6₉₁₋₁₂₂, grupo 6: E6₁₀₉₋₁₄₀, E6₁₂₇₋₁₅₈, grupo 7: E7₁₋₃₅, E7₂₂₋₅₆, grupo 8: E7₄₃₋₇₇, E7₆₄₋₉₈. Grupo 3 comprende SEC ID 5, 22 y 23. Grupo 4 comprende SEC ID 7-9. Grupo 5 comprende SEC ID 11 y 12. Grupo 6 comprende SEC ID 13, 14, 24 y 25. Grupo 7 comprende SEC ID 15 y 26. Grupo 8 comprende SEC IDs 16 y 17. Por grupo 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 grupos de péptidos y un control negativo (disolvente sólo) fueron inyectados separadamente en los sitios de prueba cutánea individuales del brazo superior. Los sitios de prueba cutánea fueron inspeccionados al menos tres veces, 72 horas y 7 días después de la inyección (Hopfl) de los péptidos y 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 en no menos de 2 días después de la inyección. De los sitios de reacción cutánea positiva (4 mm) se obtuvieron biopsias por punción, se cortaron en pequeños pedazos y se cultivaron en IMDM que contenía 10% de suero AB humano, 10 % de TCGF y 5 ng/ml de IL7 y IL15 para permitir la emigración de los linfocitos fuera del tejido cutáneo. Después de 2 a 4 semanas de cultivo, las células T expandidas se cosecharon y se evaluaron para sus reactividad específica de HPV.

Antígeno para ensayos inmunes *in vitro*

[0085] Un conjunto de péptidos, similares a los péptidos usados en la prueba cutánea, se usó para ensayos de estimulación de células T y ensayos de ELISPOT para IFN γ . Los cuatro péptidos de E2 de HPV 16 consistieron en péptidos de 30 meros solapando 15 residuos, E6 de HPV 16 consistieron en 32 meros y E7 de HPV 16 en 35 meros, ambos solapando 14 residuos. Los péptidos se sintetizaron y se disolvieron tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg, 1999). En particular, en el ensayos de ELISPOT para IFN γ el grupo de péptidos 4 y 5 ligeramente difirieron de los grupos de péptidos usados en la prueba cutánea, el grupo 4 contenía los péptidos E6₃₇₋₆₈, E6₅₅₋₈₆, E6₇₃₋₁₀₄ y el grupo 5 comprendía los péptidos E6₇₃₋₁₀₄, E6₉₁₋₁₂₂. La mezcla de respuesta de memoria (MRM 50x), que consistía en una mezcla de toxoide tétanico (0,75 de *Limus flocculentus*/ml; *National Institute of Public Health and Environment*, Bilthoven, Países Bajos), *Mycobacterium tuberculosis* sometido a ultrasonido (5 μ g/ml; generosamente donado por el 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. Las proteínas recombinantes E2, E6 y E7 de HPV 16 se produjeron en *Escherichia coli* recombinante como se ha descrito previamente (van der Burg, 2001).

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

[0086] La presencia de células Th específicas de HPV 16 se analizó por ELISPOT como se ha descrito previamente (van der Burg, 2001). En resumen, PBMCs frescas se sembraron en 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 AB humano, en presencia o ausencia de los grupos de péptidos indicados de E2, E6 y E7 de HPV 16. Los péptidos se usaron en una concentración de 5 μ g/ml/péptido. Después de 4 días de incubación a 37°C, las PBMCs se cosecharon, lavaron y sembraron en cuatro pocillos duplicados en una densidad de 10^5 células por pocillo en 100 μ l de IMDM enriquecido con 10% de FCS en una placa de 96 pocillos Multiscreen (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) recubierta con un anticuerpo de captura de IFN γ (Mabtech AB, Nacha, Suecia). Más incubaciones de anticuerpos y el desarrollo del ELISPOT se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante (Mabtech). Se contaron los puntos con un sistema de análisis de formación imágenes de vídeo asistida por ordenador completamente automatizado (Bio Sys). Se calcularon puntos específicos mediante la sustracción del número medio de puntos + 2xSD del control medio del número medio de puntos en los pocillos experimentales (van der Burg, 2001).

Ensayo de proliferación de células T

[0087] Cultivos de células T de las biopsias de piel se evaluaron para el reconocimiento de la proteína y los péptidos específicos en un ensayo de proliferación de 3 días (van der Burg, 2001). En resumen, se aislaron monocitos autólogos de las PBMCs por adherencia a una placa de fondo plano de 96 pocillos durante 2 h en el medio X-vivo 15 (Cambrex) a 37°C. Los monocitos se usaron como APCc, se cargaron durante toda la noche con 10 μ g/ml de péptido y 2,0 μ g/ml de proteína. Los linfocitos infiltrantes de la prueba cutánea se sembraron en una densidad de $2-5 \times 10^4$ células/depósito en IMDM suplementado con 10% de suero AB. El medio solo se tomó como control negativo, fitohemaglutinina (0,5 μ g/ml) sirvió como control positivo. La proliferación se midió por incorporación de [³H]timidina (5 μ Ci/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 la producción de citocina específica del antígeno.

Análisis de citocinas asociadas a respuestas proliferativas específicas de HPV 16

[0088] La detección simultánea de seis citocinas Th1 y Th2 diferentes: IFN γ , factor α de necrosis tumoral, interleucina 2 (IL2), IL4, IL5 e IL10 se llevó a cabo utilizando la matriz citométrica de microesferas (Becton Dickinson) según las instrucciones del fabricante. Los valores de corte estaban basados en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 pg/ml de IFN γ y 20 pg/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 (de Jong, 2004).

Tinción de citocina intracelular (ICS)

[0089] La especificidad y el carácter de los cultivos de células T derivados de los sitios de reacción cutánea positiva se evaluó por ICS como se ha informado previamente (de Jong, 2005). En resumen, los linfocitos infiltrantes de la prueba cutánea se cosecharon, lavaron y suspendieron en IMDM + 10% de suero AB y $2-5 \times 10^4$ células se añadieron a los monocitos autólogos que fueron pulsados 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 tomó como control negativo, fitohemaglutinina (0,5 μ g/ml) sirvió como control positivo.

Las muestras se mancharon simultáneamente con IFN γ ratón-antihumano marcado con FITC (0,5 g/ml, BD PharMingen), IL5 ratón-antihumana marcada 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, fijaron con 1% de paraformaldehído y analizaron por citometría de flujo (FACSscan, BD Biosciences).

5

Análisis estadístico

[0090] La prueba exacta de FISHER (2-colas) se usó para analizar la relación entre la detección de células T específicas de HPV productoras de IFN γ en las PBMC, la presencia de una reacción de prueba cutánea 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 utilizando Graphpad InStat Software (versión 3.0) y Graphpad Prism 4.

10

Resultados

15

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

[0091] Estudiamos las reacciones cutáneas en sujetos sanos después de la inyección intracutánea con péptidos de 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 de 2 a 25 días después de la inyección. Una reacción cutánea positiva se detectó en 46 de las 152 pruebas cutáneas de los voluntarios sanos. Sobre todo, cada grupo de péptidos de la prueba cutánea pudo dar lugar a una reacción cutánea positiva. De forma más frecuente se observaron reacciones contra E2₃₁₋₇₅ (10 de cada 19 sujetos), E6₃₇₋₁₀₄ (9/16) y E7₄₃₋₉₈ (7/19) en el grupo de control. Este modelo de reacción se asemeja al que observamos previamente en las PBMC (de Jong, 2002; Welters, 2003) (Figura 5). Estas reacciones cutáneas correspondieron a la presencia de una respuesta de célula T específica del péptido según se detectó en las PBMC de estos individuos (datos no mostrados). Las reacciones cutáneas en donantes sanos están asociadas a más altas frecuencias de células T específicas de HPV 16 en la sangre periférica.

20

25

[0092] Para comparar los resultados de la prueba cutánea con la presencia de células T de tipo 1 específicas de HPV 16 circulantes, se realizó un ensayo de ELISPOT para IFN γ con PBMC recogidas antes de que se diera la inoculación intradérmica del péptido. En 5 de cada 19 voluntarios sanos pudimos detectar una respuesta inmune específica de HPV 16 por ELISPOT para IFN γ . La detección de ≥ 5 células T específicas de HPV 16 circulantes por 100.000 PBMC en la muestra de sangre antes de la inoculación de individuos sanos se asoció a una reacción cutánea positiva temprana (≤ 13 días) para la misma secuencia peptídica ($p= 0,0003$, prueba exacta de Fisher de dos colas; Figura 6). Ninguna célula T circulante específica de HPV 16 se detectó en la muestra de sangre pre inoculación de los donantes sanos para péptidos que indujeron una reacción cutánea positiva tardía (14 a 25 días). Esto sugiere que la frecuencia de células específicas del antígeno circulantes determina el tiempo que tardan las reacciones cutáneas en aparecer.

30

35

[0093] Para valorar la frecuencia de células T específicas de HPV en el momento en el que apareció una reacción cutánea tardía, se tomaron muestras de sangre adicionales de 11 voluntarios sanos. En estos individuos 39 de las 88 pruebas cutáneas 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 fueron detectadas por 100.000 PBMC. En este punto, se encontró una correlación significativa entre la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV circulantes en la muestra de sangre tras la inoculación 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 una inoculación intradérmica con péptido de HPV16 e indica que la inyección intracutánea de los antígenos de péptido mejora el número de células T específicas de HPV 16 en la sangre de voluntarios sanos.

40

45

Las biopsias de sitios de reacción cutánea positiva consisten tanto en células T CD4⁺ como CD8⁺ Th1/Th2 específicas de HPV 16.

50

[0094] Aproximadamente 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.

55

[0095] Para caracterizar las células en un sitio de reacción cutánea positiva, se tomaron biopsias por punción. 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 la excrecencia de células T *in vitro* sin estimulantes antigénicos. En 7 de cada 8 casos, las células T exfiltraron el tejido y se expandieron dentro de 3 a 4 semanas. Las células T expandidas fueron evaluadas 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 estimulación con monocitos autólogos pulsados con el grupo de péptidos, también inyectados en este sitio durante la prueba cutánea (HD2, HD10, HD15) al igual que a 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 naturalmente procesado y presentado. El análisis de los sobrenadantes de estos cultivos de células T proliferativos reveló un perfil de citocina Th1/Th2 mezclada en el que las células T

60

65

específicas de HPV 16 producían IFN γ , IL-4 e IL-5 (Figura 8C). En cada caso en el que se detectaron células T específicas de HPV en el cultivo de la biopsia (4 de cada 8) esto coincidió con la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 circulantes en la muestra de sangre post inoculación por ELISPOT (compárense las figuras 8A y B). En 3 de cada 4 biopsias de reacción cutánea positiva (HD2, HD17, HD18) las células T no respondieron a los péptidos de HPV16 (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 circulantes específicas de HPV 16 en la muestra de sangre post inoculación. La cotinción de las células T de la biopsia por marcadores de superficie de célula CD4 y CD8 mostraron que no sólo las células T CD4⁺ específicas de HPV 16, sino también las células T CD8⁺ específicas de HPV 16 infiltraron la piel tras la inoculación intradérmica con el péptido de HPV16 (Figura 9). En general, en 3 de cada 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 (grupo 6) de HD2 respondieron a ambos péptidos solapantes de la prueba cutánea inyectada: E6₁₀₉₋₁₄₀ y E6₁₂₇₋₁₅₈ de HPV16 (datos no mostrados), mientras que las células T CD8⁺ de ambos sujetos HD15 y HD16 respondieron a E6₃₇₋₆₈ de HPV16 (véase el ejemplo para HD15, Fig. 5). Tomado en conjunto, la población de células inmunes que migran en la piel tras una inoculación intradérmica con péptidos de HPV16 comprende células T CD4⁺ y CD8⁺ Th1, Th2 citotóxicas específicas de HPV 16. Esta infiltración es paralela a la aparición de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 circulantes en la sangre.

Discusión

[0096] Las pruebas cutáneas se usan comúnmente como un simple ensayo para la medición *in vivo* de inmunidad mediada por célula. Hemos validado el uso del ensayo de prueba cutánea para la medición de respuesta inmune celular específica de HPV16 contra los antígenos tempranos de E2, E6 y E7 *in vivo* mediante la comparación de los resultados con los de mediciones paralelas de reactividad de células T mediante ensayos *in vitro*.

[0097] En el grupo de voluntarios sanos, las reacciones cutáneas tempranas aparecieron de 4 a 12 días después de la inoculación intradérmica del antígeno. En estos individuos, conocidos por mostrar respuestas de célula T de tipo 1 específica de HPV16 *in vitro* (de Jong, 2002; Welters, 2003), la aparición de una reacción cutánea temprana (dentro de 13 primeros días) estuvo significativamente asociada a la detección de células T específicas de HPV 16 productoras de IFN γ en 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 para IFN γ son recomendados por Jeffries *et al.* (Jeffries, 2006), que utilizaron 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 algo retardadas en comparación con las pruebas DTH tradicionales. Las células T tienen que ser impulsadas o reactivadas y empezar a dividirse antes de que se produzcan suficientes células para causar una reacción inflamatoria local: la prueba cutánea positiva. De hecho, al mismo tiempo que aparece una reacción cutánea positiva, una mayor frecuencia de respuestas de Th1 específicas de HPV 16 se puede detectar en la sangre periférica (Figura 7).

[0098] Históricamente se ha postulado que la célula Th1 induce respuestas DTH, no obstante, diferentes estudios han mostrado ahora que también lo hacen las células Th2 que infiltran los sitios de prueba cutánea (Wang, 1999; Woodfolk, 2001). De forma similar, este estudio muestra que los sitios de prueba cutánea positiva de voluntarios sanos contienen tanto células T de tipo Th1 como 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 hizo evidente a partir de dos estudios en profundidad de sitios de prueba cutánea positiva usados para analizar la respuesta inmune específica después de la vacunación de pacientes con cáncer de células renales o melanoma (Bleumer, 2007). También este estudio mostró que un número de sitios de prueba cutánea positiva de sujetos sanos eran infiltrados con células T que no respondían a los antígenos de HPV16 inyectados. Hasta el momento, el motivo de unas reacciones cutáneas positivas específicas aún no está claro. De forma imprevista, observamos que la mayoría de las reacciones cutáneas en individuos sanos aparecen de 2 a 3 semanas después de la inyección intradérmica del antígeno. Mientras, estas reacciones cutáneas positivas tardías no estaban correlacionadas con la detección de células T CD4⁺ de memoria específicas de HPV circulantes en la sangre pre inoculación (Figura 6), la constitución inmunológica de estos sitios de prueba cutánea es similar a la de las pruebas DTH clásicas (Platt, 1983; Poulter, 1982) y está compuesto por 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 de células T. Esto se ha observado también en 29% de los pacientes que fueron sometidos a un protocolo de prueba de piel de tuberculina de 2 pasos y que fueron solo positivos en la segunda ronda de prueba (Akçay, 2003). En general, las respuestas de células T inducidas por la vacuna tienen su valor máximo de 10 a 14 días después de la vacunación y no a las tres semanas. No obstante, se debe tener presente que en tal protocolo se inyecta una dosis de antígeno más alta al igual que adyuvantes fuertes. Por lo tanto, es razonable asumir que las respuestas de células T inducidas por inoculación intradérmica se desarrollan más lentamente y alcanzan el valor máximo en un periodo más tardío. Dado que la inoculación del péptido intradérmica en los voluntarios sanos produce la inducción de ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de HPV 16, por lo tanto, debería considerarse una vacunación de dosis baja única.

[0099] El objetivo principal de este estudio piloto fue convalidar el uso de la prueba cutánea específica de HPV16 para detectar respuestas inmunes de tipo 1 *in vivo*. En los voluntarios sanos, una reacción cutánea positiva en los 13 primeros días está, de hecho, relacionada con la presencia de células T de memoria productoras de IFN γ circulantes según se detectó por ELISPOT para IFN γ *in vitro*. De manera importante, también observamos discrepancias entre los

resultados obtenidos por la prueba cutánea y el ELISPOT. En un número de casos, células T productoras de IFN γ circulantes específicas de HPV 16 se detectaron en las muestras de sangre post inoculación, pero sin una reacción cutánea concomitante y viceversa (Figura 7), y esto se puede considerar resultado de falso negativo o falso positivo. Para entender completamente el impacto de esto en la interpretación de la detección de la inmunidad de tipo 1 contra el HPV, hemos iniciado una prueba de campo en un amplio grupo de pacientes positivos de HPV y voluntarios sanos en Indonesia.

Lista de referencias

[0100]

Akcay, 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., Stern, 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 squamous 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.

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.

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.

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

- 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.
- 5 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.
- 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Hopfl, R., Sandbichler, M., Sepp, N., Heim, K., Muller-Holzner, E., Wartusch, B., Dapunt, O., Jochmus-Kudielka, I., ter Meulen, J., Gissntann, L., and Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 337: 373-374, 1991.
- 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.
- 35 Kessler *et al.*, *Hum Immunol*. 64:245, 2003.
- Lanzavecchia, *Nature* 393:413, 1998
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65

- 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.
- 5 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.
- 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 HPV16 E7 epitope recognized by T cells from patients with cervical cancer. *Int J Cancer*, 114: 766-778, 2005.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 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.
- 25 Remington; *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia.
- Ressing, 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.
- 30 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.
- 35 Schumacher *et al.*, *Nat Rev Immunol*. 2(7):512-9, Jul 2002.
- Strang *et al.*, *J Gen Virol*. 71:423-31, 1990
- 40 Toes *et al.*, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:7855, 1996
- Toes *et al.*, *J. Immunol*. 156:3911, 1996
- 45 van den Burg *et al.*, *Hum Immunol*. 44:189-198, 1995
- 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.
- 50 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.
- 55 van der Burg, S. H., Ressing, 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.
- 60 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.
- 65

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.

25 Tabla 1: respuestas específicas de HPV16 y 18 detectadas en linfocitos infiltrantes.

Estado HPV	Origen Paciente	Edad	Tipo de célula	Estado de la enfermedad	Reactividad SI*	Número de péptidos reconocidos	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 2B				
	363	45	escamosa	FIGO 1B				

ES 2 496 916 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	adenoescamosa	FIGO 2A				
	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				

ES 2 496 916 T3

	287	61	carcinosarcom FIGO 2B a	
	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
	414	64	escamosa	FIGO 2A
CIL				
	348	35	escamosa	CIN3
	354	39	escamosa	CIN3
LN				
	426	40	escamosa	FIGO 1B
* SI= Índice de estimulación de células T respondedoras				

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

5 Epítomo de tipo de célula T ha reconocido SEC ID de paciente de origen de restricción

Tipo de célula T	Epítomo reconocido	Restricción	Origen	Paciente	SEC 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 or 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

ES 2 496 916 T3

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

- 5 [0101]
- <110> Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC
 <120> Epítomos de HPV previstos por células T que infiltran tumores malignos cervicales para su uso en vacunas
- 10 <130> P6015052EP1
- <160> 26
- <170> Versión de patentIn 3.3
- 15 <210> 1
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16
- 20 <400> 1

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

ES 2 496 916 T3

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

5 <212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 18

<400> 3

ES 2 496 916 T3

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
 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

10 <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

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<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

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

<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
<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

<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

5 **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

10 <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

15 <210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

20 <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

<210> 11

<211> 22

25 <212> PRT

<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

30 <210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

35 <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

40 <211> 22

<212> PRT

<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

5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 14

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

15

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

20

<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

25

<210> 16

<211> 22

<212> PRT

<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

30

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

35

<400> 17

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

40

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 18

<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

5 <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

10 <210> 20
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 18

15 <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

20 <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

25 <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

35 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano tipo 16

40 <400> 23
Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
1 5 10

45 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 24

Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met Ser Cys
1 5 10

5

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

10

<400> 25

Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
1 5 10

15

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano tipo 16

<400> 26

Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn
1 5

20

REIVINDICACIONES

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

Fig 1a

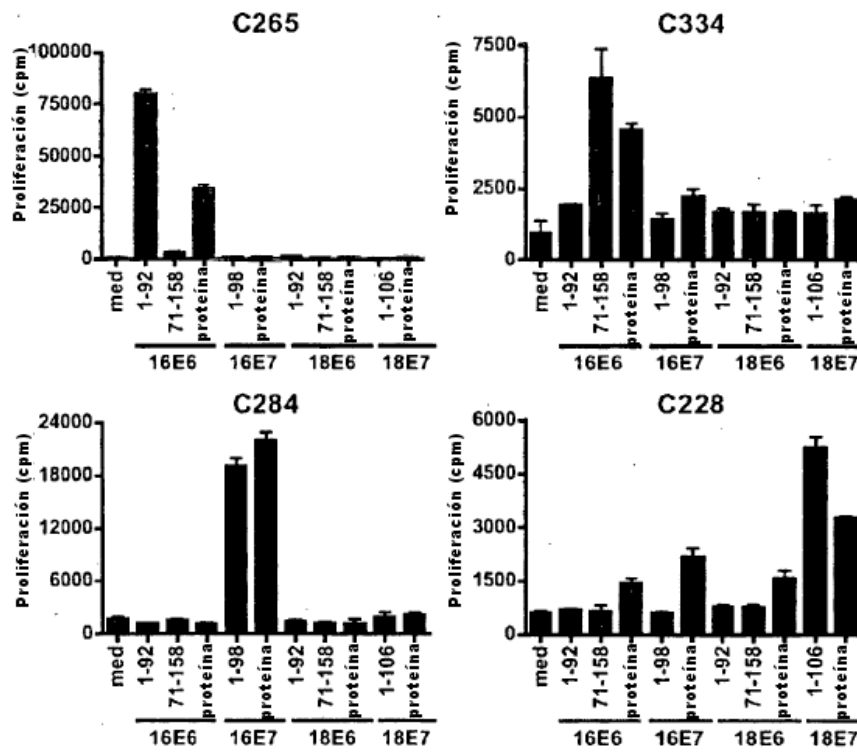


Fig 1b

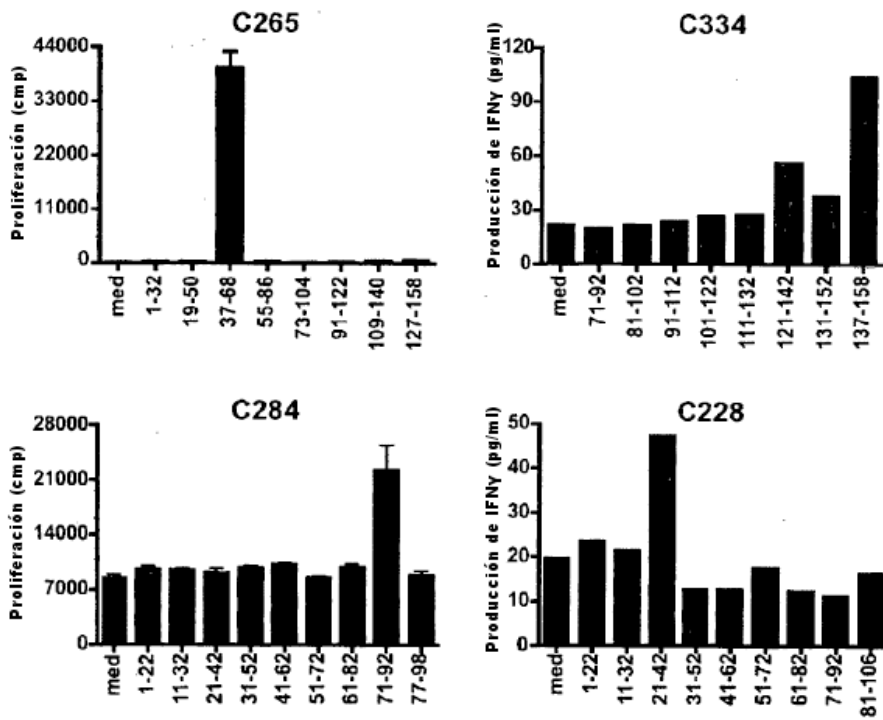


Fig 2

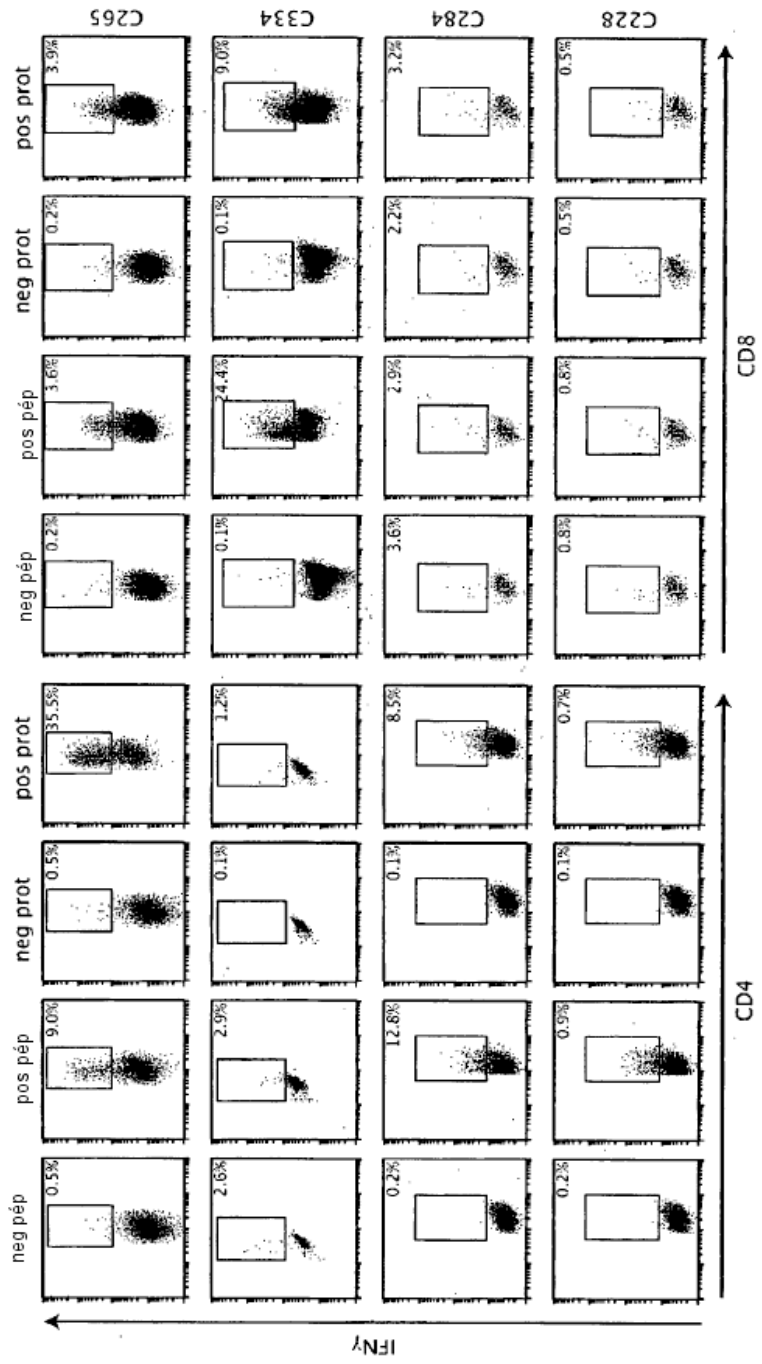


Fig 3a

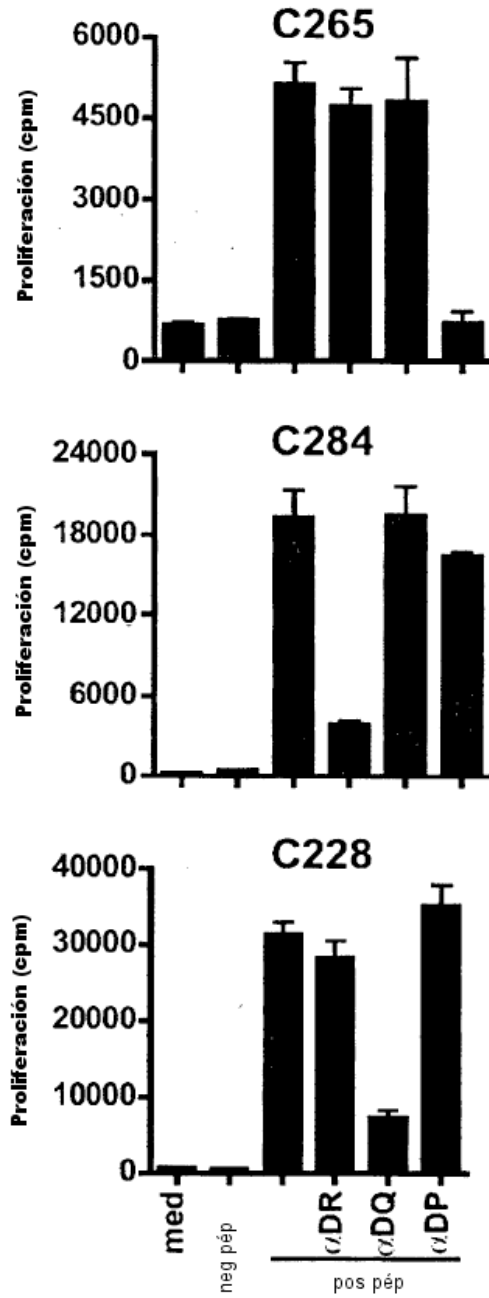


Fig 3b

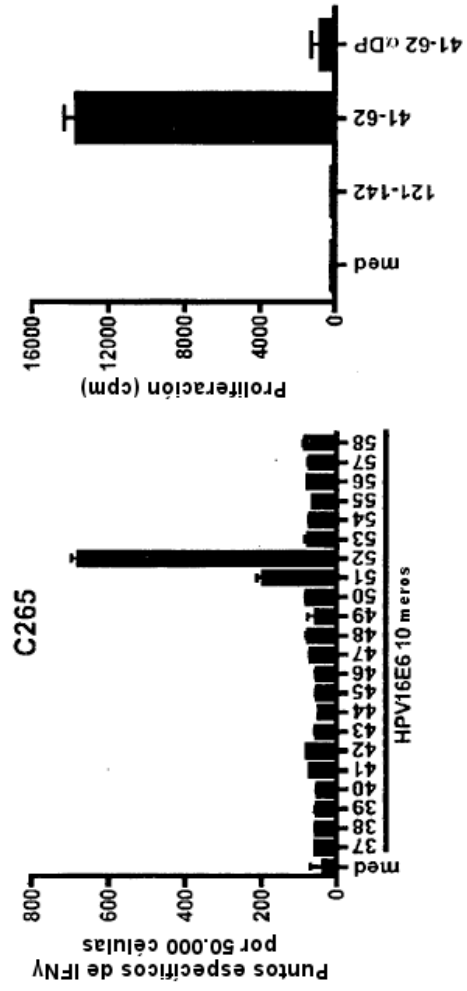


Fig 3c

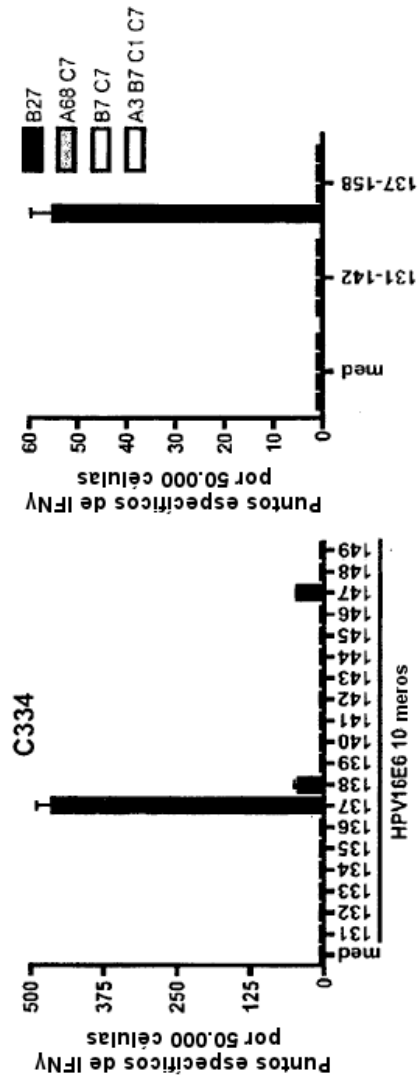


Fig 4a

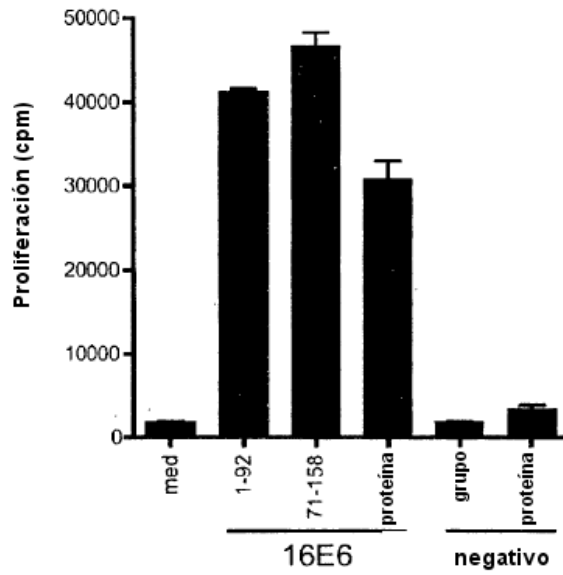


Fig 4b

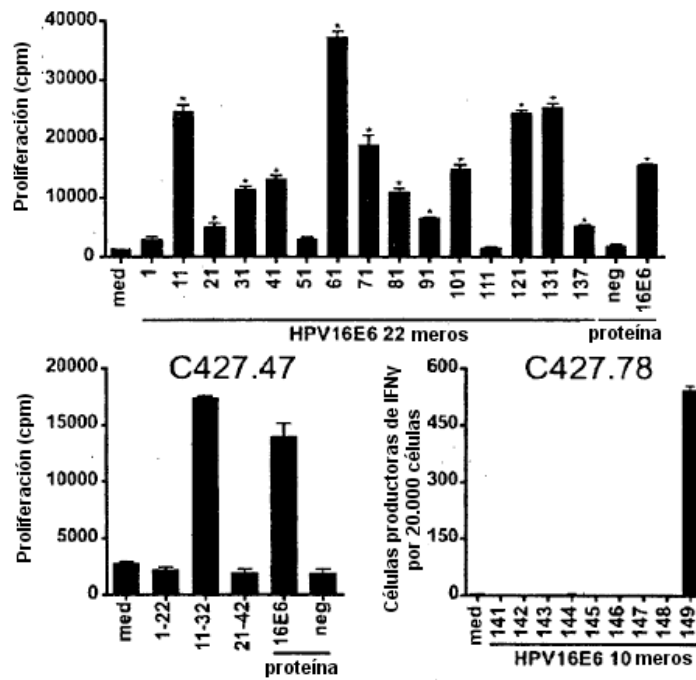


Fig 4c

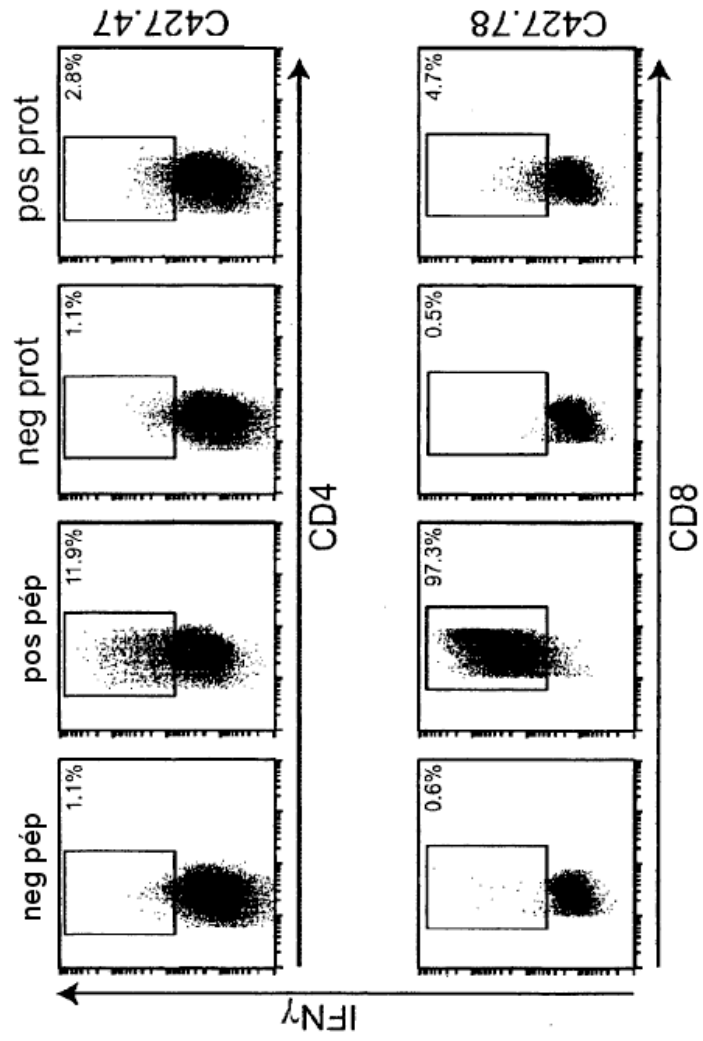


Fig 4d

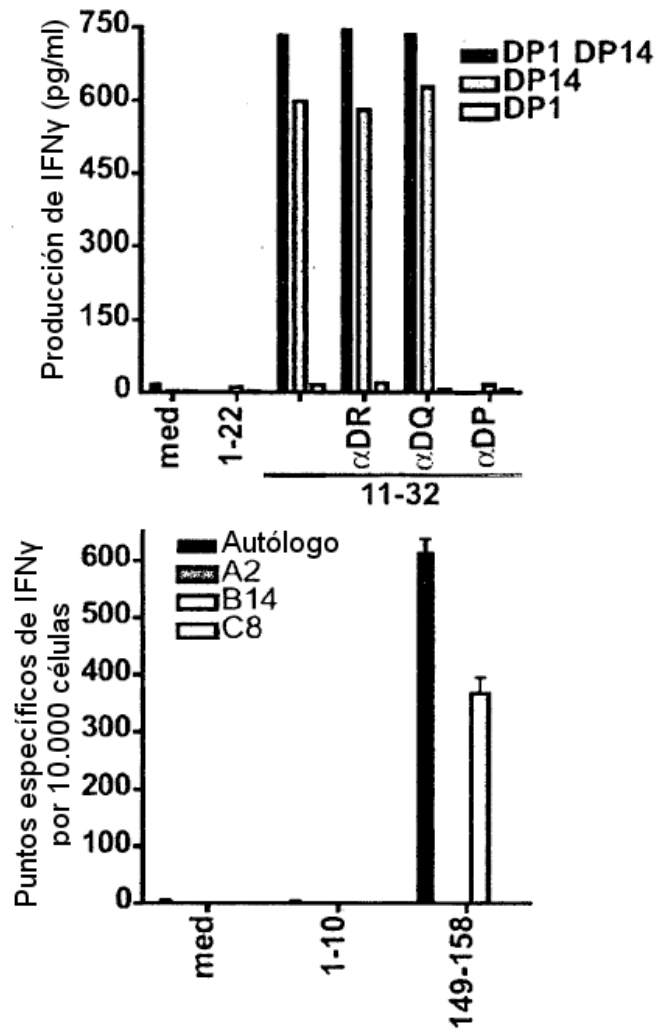


Fig 5

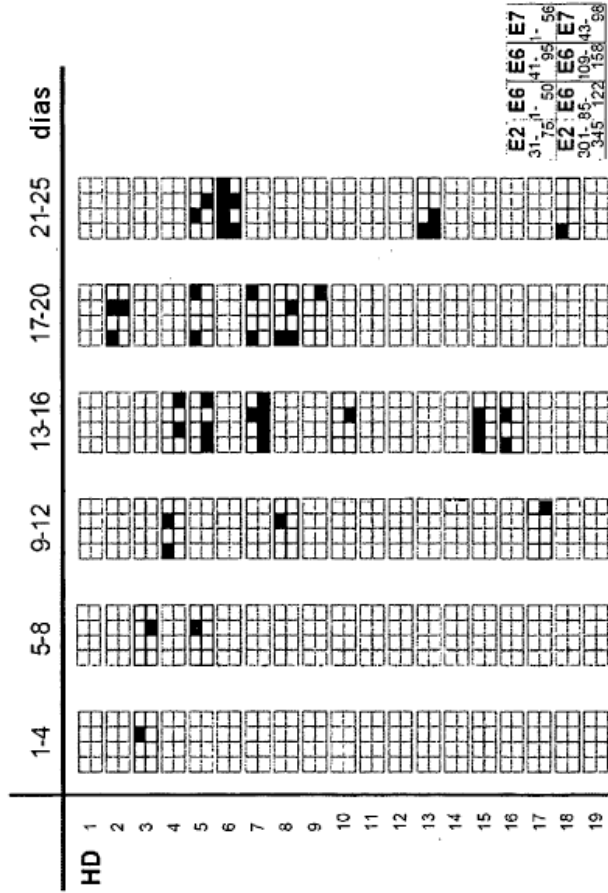


Fig 6

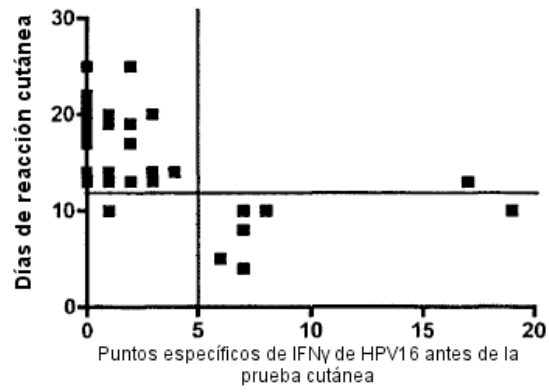


Fig 7

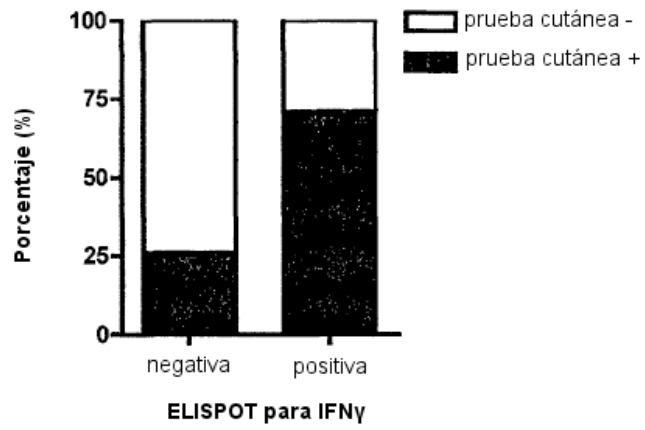


Fig 8

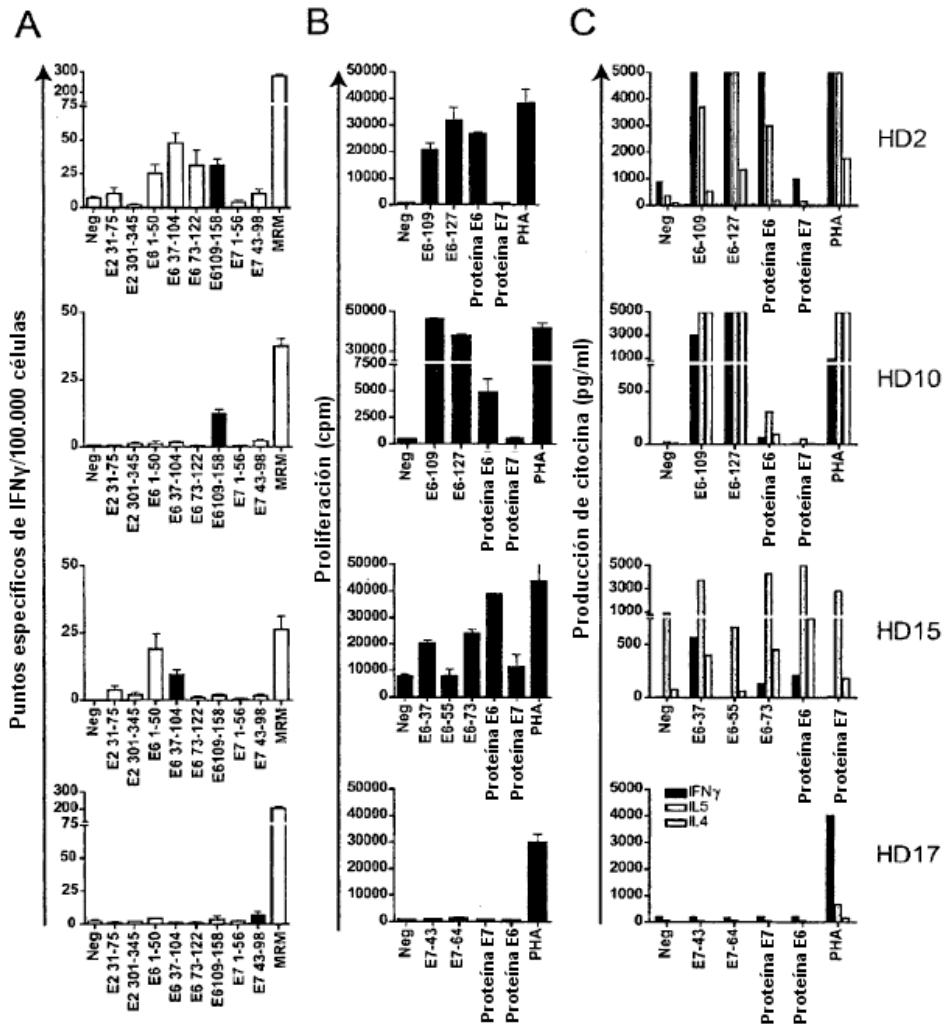


Fig 9

