

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 043**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/025** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2001 E 09162225 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2112157**

54 Título: **Péptidos largos de 22-45 residuos de aminoácidos que inducen y/o mejoran las respuestas inmunológicas específicas para antígenos**

30 Prioridad:

**08.12.2000 EP 00204398**

**31.08.2001 EP 01203298**

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

**06.11.2014**

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (100.0%)  
ALBINUSDREEF 2  
2333 ZA LEIDEN, NL**

72 Inventor/es:

**MELIEF, CORNELIS JOHANNES MARIA;  
VAN DER BURG, SJOERD HENRICUS;  
OTTENHOF, TOM HENRICUS MARIA;  
GELUK, ANNEMIEKE;  
SCHOENMAEKERS-WELTERS, MARIA JOHANNA  
PHILOMENA;  
OFFRINGA, RIENK;  
TOES, RENE EVERARDUS MARIA y  
DE JONG, ANNEMIEKE M.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 519 043 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

Péptidos largos de 22-45 residuos de aminoácidos que inducen y/o mejoran las respuestas inmunológicas específicas para antígenos

5

[0001] La presente invención se refiere en general al campo de la medicina, y más específicamente a la inducción y/o mejora de una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno, usando péptidos que comprenden epítomos específicos para dicho antígeno.

10

[0002] La invención es ejemplificada usando inmunidad dirigida al VPH como modelo.

15

[0003] La Infección de VPH es altamente predominante entre individuos jóvenes, masculinos y femeninos sexualmente activos. Grandes estudios prospectivos mostraron que la adquisición de VPH de compañeros masculinos es común, ocurriendo en el 40-60% de los sujetos durante un periodo de seguimiento de 3 años (Koutsky et al., 1997, Ho et al., 1998, Marrazzo et al., 2000). Por lo tanto, el VPH es probablemente la enfermedad de transmisión sexual más común. Los virus del papiloma de los tipos de alto riesgo (p. ej. VPH 16, 18, 31, 33 y 45) son responsables del cáncer cervical (Bosch et al., 1995, Zur Hausen, 1996). Después de la infección de las células epiteliales basales, los genes tempranos inmediatos E1, E2, E5, E6 y E7 del VPH son expresados. Los genes E1 y E2 regulan la replicación vírica. Además, la proteína E2 controla la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. La proteína E6 de los tipos de alto riesgo del VPH se enlaza específicamente con la p53 y toma como objetivo su rápida degradación a través de la ruta de ubiquitina. La p53 está implicada en la iniciación de la apoptosis, y la pérdida de esta proteína supone la prevención de la apoptosis (Scheffner et al., 1990). La proteína E7 de los tipos de alto riesgo se enlaza con la pRB, que normalmente impide a las células entrar en el ciclo celular inactivando la E2F, una proteína necesaria para la entrada en el ciclo celular (Dyson et al. 1989). La expresión de E7 da lugar a que las células infectadas no puedan retirarse del ciclo celular y diferenciarse. La prolongada y elevada expresión de las oncoproteínas E6 y E7 está estrechamente asociada a la displasia inducida por el VPH y la transformación en carcinoma cervical. El papel protector del sistema inmunológico en la defensa contra las enfermedades relacionadas con el VPH y el cáncer inducido por el VPH en seres humanos es sugerido por el hecho de que en comparación con controles normales, pacientes de trasplante renal inmunosuprimidos y pacientes infectados con VIH muestran una incidencia 17 veces superior de infección genital de VPH (Ho et al., 1994, Matorras et al. 1991, Halpert et al. 1986). La capacidad disminuida de individuos inmunosuprimidos para solucionar la infección del VPH apunta indirectamente hacia un papel protector del sistema inmunológico en los primeros momentos de la infección. La evidencia de protección contra el VPH a través de inmunidad contra los antígenos tempranos E2, E6 y E7 viene del modelo del virus del papiloma del conejo de cola de algodón que es el modelo animal principal para virus del papiloma asociados con el cáncer. La vacunación con las proteínas no estructurales E1 y E2 induce la regresión de papilomas inducidos por virus mientras que el crecimiento del tumor vírico es suprimido.

35

Además, los conejos vacunados con la combinación de los genes E1, E2, E6, y E7 fueron completamente protegidos contra la provocación vírica (Han et al. 1999, Selvakumar et al. 1995). Estos datos indican que la inmunidad contra E2, E6, y E7 puede ser eficaz como inmunoprolifaxis de la infección del virus del papiloma así como terapéuticamente para lesiones y cáncer inducidos por VPH. Existe un interés considerable en la identificación de epítomos implicados en la respuesta inmune al VPH16, dada la posibilidad de incorporar éstos como subunidades en una vacuna o usar estos epítomos para monitorizar la inmunidad inducida por vacuna in vivo. Ya que la mayoría de las células epiteliales expresan el CMH clase I pero no clase II, la atención se ha centrado hasta el momento en la inducción de linfocitos T citotóxicos CD8+ tumorocidas, específicos de VPH (Melief et al., 2000; Rensing et al., 1995; Rensing et al., 2000; Rensing et al., 1996). La reactividad de células T CD8+ específicas para VPH ha sido encontrada en la sangre periférica de pacientes diagnosticadas con lesiones de neoplasia intraepitelial cervical de grado III (NIC III) o carcinoma cervical (Nimako et al., 1997; Rensing et al., 1996) y en las poblaciones de células T infiltradas en tumores aisladas de pacientes con cáncer cervical (Evans et al., 1997).

40

45

La inmunidad auxiliar T ("Th") CD4+ específica de tumor es ahora también considerada crucial para la erradicación eficaz de tumores sólidos, a pesar del hecho de que la mayor parte de estos tumores no expresan el CMH clase II (reseñado en Melief et al., 2000; Pardoll y Topalian, 1998; Toes et al., 1999). La evidencia reciente indica que las células T CD4+ específicas de tumor son requeridas no solo para la inducción óptima de LTC específicos de tumor CD8+ sino también para el óptimo ejercicio de la función celular de efector local mediante estos LTC (Ossendorp et al., 1998, Toes et al., 1999). Para inducir inmunidad específica de tumor restringida por el CMH clase I, la presentación cruzada de antígenos que han sido capturados por células profesionales presentadoras de antígenos parece jugar un papel dominante. Para inducción apropiada de LTC específicos de tumor mediante cebado cruzado se requiere ayuda de células T CD4+ específicas de tumor (Toes et al., 1999, Schoenberger et al., 1998).

55

60

Un papel positivo para la inmunidad Th específica de VPH fue sugerido por el predominio de células T CD4+ en las verrugas genitales en regresión (Coleman et al., 1994) así como por la detección de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado para E7 del VPH16 en la mayoría de sujetos con regresión espontánea de lesiones de NIC (Hopfl et al., 2000). Además, se han detectado células T CD4+ específicas del VPH 16 en la sangre de pacientes con infecciones persistentes de VPH, lesiones de NIC de alto grado o cáncer cervical (de Gruijl et al., 1998). Para los tipos oncogénicos menos predominantes VPH59 y VPH68, se aislaron células Th restringidas por HLA-DR4 fueron aisladas de las células T que se infiltraron en una lesión de cáncer cervical (Hohn et al., 1999). En cambio, a pesar de la presencia de VPH16 en la mayoría de lesiones de NIC progresivas y cánceres cervicales, no hay información en profundidad disponible en lo que se refiere a la restricción por HLA y especificidad de epítomo de respuestas de las auxiliares T específicas del VPH 16.

65

[0004] Para una estrategia clínicamente pertinente de inmunización de sujetos, por ejemplo, contra células infectadas de forma (mico)bacteriana o vírica, o células tumorales, y VPH en particular, se prefiere que tanto las células T auxiliares específicas como los LTC sean inducidos. Hemos mostrado ya que la inmunización con epítomos de LTC mínimos produce protección contra los tumores en algunos modelos (Feltkamp et al. 1993, Kast et al. 1991) mientras que en otros modelos, esto puede llevar a tolerancia o eliminación funcional de virus y LTC específicos de tumor que cuando se inducen de otra manera son protectores (Toes et al. 1996ab). La incidencia de tolerancia o eliminación funcional reduce los efectos de vacunación significativamente. No obstante, hasta la presente invención no hubo ninguna solución para este fenómeno. Los epítomos implicados en este efecto, por lo tanto, no eran adecuados para fines de inmunización. El procesamiento de antígenos exógenos para la presentación por moléculas del CMH clase I mediante cebado cruzado así como por otros mecanismos, es ahora una vía secundaria ampliamente reconocida de procesamiento para la presentación por CMH clase I, junto con la bien conocida vía endógena (Jondal et al. 1996, Reimann et al. 1997). El resultado normal del procesamiento de antígeno a través de esta ruta es la tolerancia a LTC, a menos que tenga lugar la activación de CPA por células T CD4+ (Kurts et al., 1997). Además, en diferentes estudios con infecciones de virus murino, se detectó una correlación positiva entre la frecuencia de precursores de LTC y la inmunidad protectora (Sedlik et al. 2000, Fu et al., 1999). Para una inducción óptima de LTC, la presentación de epítomos de LTC tiene lugar preferiblemente en la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales (CPA) tales como las células dendríticas (Mellman et al. 1998, Rodríguez et al. 1999). Mientras que los epítomos mínimos de LTC y de Th pueden, sin la necesidad de procesamiento mediante células presentadoras de antígeno profesionales, ser presentados a células T, las proteínas necesitan ser absorbidas y procesadas para una presentación óptima de LTC y pueden darse epítomos de Th en el CMH clase I y CMH clase II, respectivamente (Manca et al. 1994).

[0005] La presente invención se refiere a medios y métodos para mejorar las respuestas inmunológicas específicas para antígenos. Con este fin, se describe un método para inducir y/o mejorar una respuesta de las células T específica de antígeno que comprende proporcionar un sistema capaz de exhibir dicha respuesta con un péptido que comprende un epítomo de células T específico para dicho antígeno, comprendiendo dicho péptido 22-45 residuos de aminoácidos. Estos péptidos se pueden sintetizar eficazmente a la vez que también permiten la absorción eficaz por células capaces de procesar dicho péptido y presentan epítomos procesados en el contexto del CMH-I o CMH-II. Preferiblemente, dicho péptido es procesado por una célula presentadora de antígenos profesional.

La presente invención contempla el uso de un péptido para la producción de un medicamento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11. La presente invención proporciona además un medicamento que comprende un péptido y opcionalmente un adyuvante tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; dicho péptido es referido en este documento como el péptido según la invención. Las células presentadoras de antígeno y particularmente las células presentadoras de antígeno profesionales, tales como las células dendríticas, son muy eficaces para procesar y presentar epítomos, mientras que además comprenden funciones adicionales que permiten la comunicación eficaz con células T que en última instancia conduce a la inducción mejorada y/o potenciación de dicha respuesta de las células T específica de antígeno.

Así en una realización preferida se describe un método donde dicho péptido comprende una secuencia capaz de activar una célula presentadora de antígeno. Por secuencia capaz de activar una célula presentadora de antígeno se entiende una secuencia que es capaz de activar al menos parcialmente una célula presentadora de antígeno, preferiblemente una célula presentadora de antígeno profesional. Dicha activación lleva preferiblemente a la presentación de al menos un epítomo de dicho péptido en la superficie de dicha CPA. En una realización particularmente preferida dicho péptido comprende al menos dos epítomos de células T para dicho antígeno. La presencia de dos epítomos de células T para dicho antígeno permite una inducción y/o mejora incluso más eficaz de dicha respuesta de las células T específica de antígeno. Preferiblemente, al menos uno de dichos epítomos comprende un epítomo de células T auxiliares para dicho antígeno o un epítomo de linfocitos T citotóxicos (LTC) para dicho antígeno. Tener al menos uno u otro epítomo presente en el péptido es favorable. Se consigue inducción y/o mejora eficaz cuando dicho péptido comprende una secuencia activadora de auxiliares T. Por una secuencia activadora de auxiliares T se entiende aquí una secuencia capaz de activar al menos parcialmente una célula T auxiliar. Dicha activación preferiblemente lleva a inducción mejorada y/o potenciación de dicha respuesta de las células T específica de antígeno. En una realización, dicho péptido comprende al menos un epítomo de células T auxiliares para dicho antígeno y al menos un epítomo de linfocitos T citotóxicos (LTC) para dicho antígeno. Sorprendentemente, se ha observado que con tales péptidos el problema de inducción de tolerancia (parcial) contra los epítomos en dicho péptido no ocurre, o lo hace en menor medida, mientras que la inducción y/o mejora de una respuesta de las células T específica para dicho antígeno es muy eficaz. Así en una realización descrita particularmente preferida, dicho péptido comprende al menos un epítomo de células T auxiliares para dicho antígeno y al menos un epítomo de linfocitos T citotóxicos (LTC) para dicho antígeno.

[0006] Un epítomo para un antígeno es capaz de interacción con un receptor de células T específico para dicho antígeno, siendo dicho receptor de células T específico para una molécula del CMH I o CMH II que presenta un péptido derivado o derivable de antígeno que comprende dicho epítomo. Aunque dicho receptor de células T debe ser capaz de interacción con un péptido derivado o derivable de dicho antígeno, dicho epítomo puede estar presente en una amplia variedad de diferentes compuestos. Generalmente un epítomo para antígeno está presente en una parte inmunogénica de dicho antígeno, siendo dicha parte de al menos 9 aminoácidos de longitud y capaz de ser presentada por una molécula del CMH-I o CMH-II. Con la tecnología actual, no obstante, es posible proporcionar epítomos que se generan en una vía completamente diferente o que comprenden material diferente. Por ejemplo, una vez que se sabe que un fragmento de dicho antígeno comprende un epítomo, se pueden generar péptidos que son diferentes en una o más

posiciones de aminoácidos. Posteriormente la presencia o ausencia de dicho epítipo puede fácilmente verificarse mediante, por ejemplo, un ensayo ELISPOT que utiliza una célula T específica para dicho epítipo. Los epítipos para un antígeno pueden estar presentes en una variedad de diferentes moléculas tales como, pero no limitadas a, péptidos, péptidos modificados, peptidomiméticos.

5

[0007] Un péptido descrito puede comprender un epítipo para cualquier antígeno particular.

No obstante, preferiblemente dicho antígeno comprende una proteína (mico)bacteriana y/o vírica o una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de la misma. En un aspecto descrito, dicho antígeno comprende una proteína de Mycobacterium o una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de la misma. En una realización preferida dicho antígeno comprende hsp65 369-412 (Ottenhof et al., 1991; Charo et al., 2001). Hsp65 369-412 comprende un epítipo de HLA-A\*0201 en la posición 369-377, reconocido por células T citotóxicas, y un epítipo DR5 en la posición 390-412, reconocido por células T auxiliares. En otra realización preferida, dicho antígeno comprende una proteína del virus del papiloma humano (VPH) o una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de la misma. Una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de una proteína comprende la misma capacidad inmunogénica en tipo, no necesariamente en cantidad, que la propia proteína. Un derivado de tal proteína puede ser obtenido mediante sustitución de aminoácidos preferiblemente conservadora.

10

15

[0008] Más preferiblemente, dicha proteína comprende E2, E6 y/o E7. Se identificaron regiones en la secuencia E2, E6 y E7 que fueron mayoritariamente inmunogénicas. Además, una variedad de epítipos de Th naturalmente procesados fueron identificados mapeando esta región. Los métodos incluían cultivos de PBMC a corto y a largo plazo respectivamente, derivados de donantes de sangre sanos. Los cultivos de PBMC fueron estimulados con péptidos de 22-35 residuos de aminoácidos de longitud. En paralelo, la inmunidad específica de E2, E6 y E7 inducida in vivo, según se detecta mediante ensayos IFN $\gamma$  ELISPOT, fue analizada en sujetos sanos así como en sujetos diagnosticados con lesiones de VPH16+.

20

25

Se encontró que la inmunidad auxiliar T específica de patógeno y de tumor juega un papel central en la defensa inmunológica natural y la inducida por vacuna contra las infecciones víricas y tumores. La respuesta de las Th contra las proteínas E2, E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH 16) fue investigada en detalle. Por medio de cultivos de PBMC a corto y largo plazo de donantes sanos tipificados por su HLA, identificamos tres regiones separadas de la proteína E2 (E2<sub>31-120</sub>; E2<sub>151-195</sub>; E2<sub>271-365</sub>), la parte C-terminal de E6 del VPH16 (E6<sub>81-158</sub>) y la parte central de E7 del VPH16 (E7<sub>31-77</sub>) como la mayor región inmunogénica entre estos antígenos. Además, mapeamos diez epítipos de Th distintos entre estas proteínas (DR1/E2<sub>351-365</sub>, DR2/E2<sub>316-330</sub>, DR2/E2<sub>346-355</sub>, DR4/E2<sub>51-70</sub>, E2<sub>61-76</sub>, DQ6/E2<sub>311-325</sub>, DR15/E7<sub>50-62</sub>, DR3/E7<sub>43-77</sub>, DQ2/E7<sub>35-50</sub>, DR1/E6<sub>127-142</sub>). Empleando el análisis IFN $\gamma$  ELISPOT, detectamos inmunidad Th en el subconjunto de células T de memoria CD45RO+ contra el E2 del VPH16 y el E6 del VPH16 en individuos sanos, sugiriendo inmunidad protectora dirigida a E2 y E6 contra una infección de VPH previa. Además, se detectó inmunidad Th hacia E7 del VPH16 en sujetos con lesiones VPH16+. Varias de estas respuestas coincidieron con los tres epítipos de Th derivados de E7 definidos en este estudio. Varios sujetos VPH16+ no mostraron ninguna inmunidad de células T productora de citoquina tipo 1 específica de E7, lo que indica fallo de la respuesta inmune. Hemos demostrado que péptidos largos que contienen epítipos tanto de LTC como de Th no sólo inducen células Th específicas de antígeno sino que pueden inducir también LTC específicos de antígeno. Tales péptidos pueden mejorar también las respuestas de los LTC específicas de antígeno. En contraste con la inmunización de ratones C57/B16 con el epítipo de LTC mínimo derivado de E1A (SGPSNTPPEI) que da lugar al crecimiento aumentado del tumor, la inmunización con la HPLC purificado péptidos de 32 aminoácidos de longitud que contenían este epítipo LTC mínimo de proteína E1A de adenovirus (RECNSSTDSCSGPSNTPPEIVPHVRLCPIIKP) dio lugar a protección contra una provocación con células tumorales transformadas de adenovirus E1A +RAS.

30

35

40

45

Además, se indujeron LTC restringidos por H-2Db específicos del VPH16 tras inmunización con péptidos de 35 residuos de aminoácidos de longitud, que contenían el epítipo LTC mínimo de 9 aminoácidos de longitud RAHYNIVTF, como se muestra mediante la presencia de células T CD8+ positivo de tetrámero H-2Db-RAHYNIVTF en un análisis FACS de células de bazo.

50

Particularmente, en una comparación directa, las respuestas de los LTC inducidas por el péptido 35-mer fueron mucho más fuertes que las respuestas de los LTC inducidas por el epítipo de LTC mínimo y esta diferencia fue incluso más pronunciada después de la activación específica de células presentadoras de antígeno profesionales que pueden absorber, procesar y presentar epítipos en el péptido largo de manera óptima.

55

Además, la presente invención muestra que la estimulación de LTC por el péptido según la invención, en presencia de agentes activadores de células presentadoras de antígeno, produce la erradicación completa de nódulos tumorales pequeños. En cambio, dicho epítipo de LTC mínimo no es capaz de inducir la erradicación completa de tumores en todos ratones. Así, la vacunación con el péptido largo de la invención evita la inducción de tolerancia que puede ocurrir cuando se usan péptidos del epítipo de LTC mínimo. El péptido largo de la invención conduce a una cantidad más alta de LTC, generalmente asociada a una mejor protección. Sin estar obligado por la teoría, al menos uno de dos mecanismos independientes es responsable de esto. Un mecanismo es la unión física de epítipos de auxiliares T y epítipos de LTC en un péptido. Otro mecanismo es la presentación preferencial de al menos un epítipo de LTC y/o de auxiliares T presente en el péptido largo de la invención mediante células presentadoras de antígeno profesionales. Debido a su tamaño, que excluye la unión directa del péptido de la invención al CMH clase I, dicho péptido necesita ser absorbido por CPA profesionales (por ejemplo, células dendríticas) que son capaces de procesar antígenos exógenamente derivados y presentar péptidos en el CMH clase I. Otras células son mucho menos capaces de procesar y, en consecuencia, presentar epítipos. Así se evita, al menos en parte, la presentación de base por las CPA no profesionales. El efecto de selección de diana preferencial del péptido de la invención hacia las CPA aumenta cuando el

60

65

péptido largo de la invención se usa junto con un agente activador de célula dendrítica, lo cual es una realización preferida. En otra realización descrita dicho antígeno comprende un auto-antígeno, preferiblemente un auto-antígeno específico de célula tumoral o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo. El término "auto-antígeno" se refiere a un antígeno que es codificado por la especie animal a la que las células T pertenecen. También se refiere a un antígeno que surge o es expresado como resultado de las aberrantes expresión, modificación, plegado de proteínas de dicho animal y/o mutación de secuencias en el ADN o ARN de una célula que codifica una proteína de dicho animal. En una realización descrita dicho auto-antígeno comprende un antígeno MAGE, CTA o PSA. En una realización descrita particularmente dicho péptido comprende un epítipo de células T específico de antígeno que induce tolerancia y/o eliminación funcional de LTC y/o células T auxiliares específicos de antígeno en dicho sistema.

[0009] Es bien conocido en la técnica que las respuestas inmunológicas específicas de antígeno se pueden reforzar proporcionando un adyuvante a sistemas capaces de exhibir dichas respuestas. Los adyuvantes son también útiles en la presente invención. En una realización preferida dicho adyuvante comprende un exosoma, una célula dendrítica, MPL (monofosforil lípido A), poli I: C, Ampligen (poli I: poli C<sup>12</sup>U) y/o ácido nucleico CpG.

[0010] Según la presente invención, la ventaja del enlace de epítipos está en el incremento de la probabilidad de presentación simultánea de los epítipos restringidos tanto por el CMH clase I como clase II en la superficie de una única CPA, facilitando así la entrega de ayuda cognada de célula T al cebado de LTC. Se prefiere la presentación mediante células presentadoras de antígeno profesionales, porque dichas células pueden absorber antígenos más eficazmente en comparación con células presentadoras de antígeno no profesionales. Por otra parte, sólo las células presentadoras de antígeno profesionales son capaces, en respuesta a la absorción de antígenos, de activar células T auxiliares.

Dicha activación es importante para una respuesta inmune óptima. El nivel de la respuesta de los LTC depende de la activación de células dendríticas como se muestra en esta invención. Uno de los mecanismos que dan lugar a la alta eficacia de nuestra vacuna contra E7 del VPH16 de péptido largo, es el hecho de que la secuencia natural E7 del VPH16 contiene un epítipo de auxiliares T y de LTC que están físicamente enlazados entre sí. Para obtener péptidos largos que contienen epítipos de Th y epítipos de LTC que son preferiblemente presentados por células presentadoras de antígeno profesionales, se puede unir dos o más epítipos de auxiliares T y de LTC que no son secuencias de origen natural pero que dan lugar a un péptido de tamaño considerable. Estos epítipos de auxiliares T y de LTC pueden ser derivados de dos antígenos diferentes, son preferiblemente de la misma célula tumoral o el mismo patógeno pero pueden no estar relacionados. Según la divulgación, una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno específico puede también ser inducida o mejorada con un péptido largo que comprende un epítipo de Th que no tiene relación con dicho antígeno. Las CPA pueden generalmente ser activados por dicho epítipo de Th no relacionado. No obstante, dicho epítipo de Th se refiere preferiblemente a dicho antígeno.

[0011] Hay muchos sistemas disponibles donde las respuestas inmunológicas específicas de antígeno se pueden inducir y/o mejorar proporcionando a dicho sistema un péptido que incluye un epítipo específico para dicho antígeno. Por ejemplo, cultivos in vitro de células mononucleares sanguíneas periféricas. Muchos otros sistemas están disponibles. No obstante, en una realización preferida de la invención dicho sistema comprende un animal. Más preferiblemente, dicho animal es un humano.

[0012] Un método de la invención es muy adecuado para proporcionar a un animal inmunidad contra dicho antígeno y/o para mejorar dicha inmunidad. Los métodos de la invención son adecuados para cualquier fin para el que se usen otras estrategias de inmunización. Las antiguas inmunizaciones se usan para fines de vacunación, es decir para la prevención de la enfermedad. No obstante, los métodos de la invención no son sólo adecuados para evitar enfermedad. Los métodos también pueden usarse para tratar la enfermedad existente, por supuesto con las limitaciones por las que la enfermedad es tratable, induciendo y/o mejorando la inmunidad de células T específica de antígeno. Esta característica puede utilizarse para tratar, por ejemplo, enfermedades asociadas a infecciones víricas, tales como algunos cánceres. En principio, cualquier enfermedad curable de una manera relacionada con la inmunología puede beneficiarse de métodos descritos en este documento. En una realización preferida dicho animal sufre o tiene riesgo de sufrir una enfermedad que es al menos en parte tratable o prevenible, induciendo y/o mejorar dicha respuesta inmune. Preferiblemente dicha enfermedad comprende una enfermedad vírica y/o cáncer. En otra realización preferida dicha enfermedad comprende una infección (mico)bacteriana.

[0013] En otro aspecto, se describe un péptido que comprende 22-45 residuos de aminoácidos, que comprende un epítipo de células T específico para un antígeno. Preferiblemente, dicho péptido comprende al menos dos epítipos de células T específicos para dicho antígeno. Preferiblemente dicho péptido comprende un epítipo de LTC para dicho antígeno o un epítipo de células T auxiliares para dicho antígeno. En una realización particularmente preferida dicho péptido comprende un epítipo de LTC para dicho antígeno y un epítipo de células T auxiliares para dicho antígeno. Preferiblemente dicho epítipo de LTC y/o de auxiliares T para dicho antígeno conduce a tolerancia o eliminación funcional de LTC y/o células T auxiliares, respectivamente, específicas para dicho epítipo, cuando están presentes en un péptido que comprende 21 residuos de aminoácidos o menos. En una realización preferida dicho péptido comprende entre 22 y 35 residuos de aminoácidos. Más preferiblemente, dicho péptido comprende entre 32 y 35 aminoácidos.

[0014] Además se describe el uso del péptido de la invención para inducir y/o mejorar una respuesta inmune específica para dicho antígeno. Se describe también el uso del péptido para la preparación de una vacuna. Preferiblemente, para

la preparación de una vacuna para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad relacionada con el VPH y/o cáncer. Además se describe un uso para la preparación de un medicamento. Preferiblemente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un individuo que sufre o tiene riesgo de sufrir una enfermedad vírica y/o cáncer. En otra realización preferida dicho individuo sufre o está en riesgo de sufrir una enfermedad (mico)bacteriana.

[0015] En aún otro aspecto, la divulgación proporciona un método de la invención que comprende además obtener una célula T específica de antígeno de dicho sistema. Así también se proporciona una célula T aislada obtenible por un método descrito. Dicha célula T puede, por supuesto, ser también usada para preparar un medicamento. Se proporciona también una vacuna que comprende el péptido de la invención. Se proporciona también un medicamento que comprende el péptido de la invención.

[0016] El péptido de la invención también puede usarse para determinar si una colección de células comprende una célula T específica de antígeno, incluyendo dicho péptido un epítipo para dicho antígeno. Por ejemplo, para determinar si un individuo comprende inmunidad para dicho antígeno. La presencia de dicha célula T es, preferiblemente, determinada mediante ELISA, ELISPOT, respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado, tinción de citoquina intracelular y/o tinción de citoquina extracelular.

[0017] En otro aspecto, se describe un péptido que comprende un epítipo inmunogénico seleccionado de una región inmunogénica de las proteínas E2, E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16. Preferiblemente, dichas regiones inmunogénicas comprenden tres regiones separadas en la proteína E2 (E2<sub>31-120</sub>; E2<sub>151-195</sub>; E2<sub>271-365</sub>) abarcando los aminoácidos 31-120, 151-195 y 271-365 de la proteína E2 del virus del papiloma humano 16; la región C-terminal de E6 del VPH16 (E6<sub>81-158</sub>) abarcando la región de aminoácidos 81-158 en la proteína E6 del VPH 16; y la parte central de E7 del VPH16 (E7<sub>31-77</sub>) abarcando la región de aminoácidos de 31-77 de una proteína E7 del virus del papiloma humano 16.

Más preferiblemente, dichas regiones inmunogénicas comprenden en dicha proteína E2 una región que abarca los aminoácidos 46-75, una región que abarca los aminoácidos 51-70, una región que abarca los aminoácidos 61-76, una región que abarca los aminoácidos 316-330, una región que abarca los aminoácidos 311-325, una región que abarca los aminoácidos 346-355 y una región que abarca los aminoácidos 351-365.

Además, dichas regiones inmunogénicas comprenden en dicha proteína E6 una región que abarca los aminoácidos 81-158. Más preferiblemente dichas regiones inmunogénicas comprenden en dicha proteína E6 una región que abarca los aminoácidos 121-142 y una región que abarca los aminoácidos 127-140.

Además dichas regiones inmunogénicas comprenden en dicha proteína E7 una región que abarca los aminoácidos 35-50, una región que abarca los aminoácidos 50-62 y/o una región que abarca los aminoácidos 43-77. Una respuesta de las células T auxiliares puede muy bien ser suscitada y/o mejorada, usando cualquiera de las regiones inmunogénicas mencionadas antes. Particularmente, estas regiones inmunogénicas son capaces de suscitar/mejorar respuestas de las auxiliares T restringidas por diferentes moléculas del HLA clase II.

[0018] En otro aspecto, se describe un método para inducir y/o mejorar una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno, que comprende poner en contacto una célula T con un péptido, que tiene un tamaño de aproximadamente 22-45 residuos de aminoácidos, que comprende un epítipo de células T mínimo de dicho antígeno. Preferiblemente, dicho péptido tiene un tamaño de aproximadamente 22-40 residuos de aminoácidos. Dicho epítipo de células T mínimo es preferiblemente presentado en forma de un péptido con un tamaño de aproximadamente 22-40 residuos de aminoácidos, ya que encontramos que el problema de tolerancia o eliminación funcional de LTC por inmunización con epítopos mínimos se puede evitar mediante el uso de péptidos largos (22-45; preferiblemente 22-40 residuos de aminoácidos) que son capaces de cebar células LTC y/o auxiliares T. Dichos péptidos largos, que comprenden al menos un epítipo de células T mínimo, son capaces de inducir y/o mejorar una respuesta de las células T.

La inmunización con dicho péptido largo, que comprende un epítipo de células T mínimo, produce protección incluso cuando dicho epítipo mínimo conduce a tolerancia o eliminación funcional de LTC específicos de virus y de tumor cuando se administra en una forma desnuda a dichos LTC. Dicho epítipo de células T mínimo se puede derivar de una región inmunogénica descrita en este documento. Así, en un aspecto, se describe un método donde dicho epítipo mínimo conduce a tolerancia o eliminación funcional de LTC específicos de virus y de tumor cuando se administran en una forma desnuda a dichos LTC. En otro aspecto, se describe un método para inducir y/o mejorar una respuesta de célula T dirigida hacia un antígeno, que comprende poner en contacto dicha célula T con un péptido, que tiene un tamaño de aproximadamente 22-45 residuos de aminoácidos, que comprende un epítipo de células T mínimo de dicho antígeno. Dicho epítipo de células T mínimo se presenta en forma de un péptido con un tamaño de aproximadamente 22-45, preferiblemente de aproximadamente 22-40, residuos de aminoácidos porque encontramos que la inducción de LTC (específicos de virus y de tumor) es más eficaz con dichos péptidos largos y produce números más altos de LTC específicos de antígeno. El uso de dichos péptidos largos produce una presentación más eficaz de los epítopos de LTC y/o de Th comprendidos. Sin estar obligado por la teoría se piensa que los péptidos largos necesitan ser procesados y presentados por células presentadoras de antígeno profesionales. La evidencia que apoya esta teoría viene de una inducción más eficaz de inmunidad LTC después de la vacunación con dichos péptidos largos y agentes activadores de células presentadoras de antígeno profesionales.

[0019] Poner en contacto una célula T con un péptido, en términos de la invención, se realiza preferiblemente por medio de una molécula del CMH clase I o del CMH clase II. Dicha molécula del CMH puede presentar dicho péptido, después de procesar el péptido, a dicha célula T. Un antígeno de la invención puede ser un antígeno derivado de un virus, una

bacteria o asociado a células tumorales. Preferiblemente un antígeno comprende una proteína del virus del papiloma humano (VPH). Más preferiblemente, dicho VPH comprende VPH 16. En un aspecto mayoritariamente preferido, dicha proteína comprende E2, E6 y/o E7 del VPH 16. Dichos péptidos largos son capaces de cebar LTC y/o células T auxiliares.

5 Por inducir una respuesta de las células T se entiende en este documento que se suscita una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno determinado. Antes de dicha inducción, dicha respuesta de las células T no estaba presente, o estaba por debajo de niveles detectables o era no funcional. Por mejorar una respuesta de las células T se entiende en este documento que la acción total de las células T dirigida hacia un antígeno determinado se vuelve mayor y/o más eficaz en comparación con la acción total de dichas células T antes de dicha mejora. Por ejemplo, después de dicha mejora se pueden generar más células T dirigidas hacia dicho antígeno. Como resultado, la acción de las células T adicionalmente generadas incrementa la acción total contra dicho antígeno. Alternativamente, dicha mejora puede comprender el incremento de la acción de células T dirigidas hacia dicho antígeno. Dichas células T pueden, por ejemplo, reaccionar más fuerte y/o más rápidamente con dicho antígeno. Por supuesto, el resultado de dicha mejora puede ser la generación de células T adicionales junto con el incremento de la acción de dichas células T.

10

15 Alternativamente, dicha mejora puede comprender sólo la generación de células T adicionales, o sólo el incremento de la acción de las células T. Un epítipo de células T mínimo es definido en este documento como un péptido derivado de un antígeno, capaz de inducir una respuesta de las células T contra dicho antígeno. Dicho epítipo de células T mínimo es adecuado para ser enlazado por una molécula de mayor histocompatibilidad clase I o II.

20 [0020] Típicamente, un epítipo de LTC mínimo consiste en 8-11 aminoácidos. Un epítipo de células T mínimo que va a ser enlazado por una molécula CMH clase II consiste preferiblemente en al menos 11 aminoácidos. En términos de la invención, administrar un epítipo mínimo en una forma desnuda significa que dicho epítipo se administra como un péptido que tiene el tamaño de dicho epítipo o como un péptido que comprende dicho epítipo flanqueado en uno o ambos lados con secuencias adicionales, siendo el tamaño de dicho péptido menor de 22 residuos de aminoácidos. Por ejemplo, dicho epítipo puede estar flanqueado por sitios de procesamiento.

25

[0021] Con las enseñanzas de la presente invención es posible inducir y/o mejorar una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno que usa el péptido de la invención. Por supuesto, ejemplos de dicho péptido se proporcionan también en este documento. Así, una realización descrita proporciona un péptido, que tiene un tamaño de aproximadamente 22-45, preferiblemente de aproximadamente 22-40 residuos de aminoácidos, que comprende al menos un epítipo de células T mínimo. Dicho péptido comprende un epítipo de LTC mínimo y/o un epítipo de células T auxiliares mínimo. Preferiblemente dicho péptido comprende un epítipo inmunogénico de la invención.

30

[0022] El péptido de la invención es más adecuado para ser usado con fines de vacunación que un epítipo mínimo en una forma desnuda, si la inmunización con dicho epítipo mínimo conduce a tolerancia o eliminación funcional de LTC. Así, en un aspecto, la invención proporciona el péptido según la invención, donde dicho epítipo de LTC mínimo conduce a tolerancia o eliminación funcional de LTC específicos de virus y de tumor cuando se administra en una forma desnuda a dichos LTC. Un péptido descrito tiene preferiblemente un tamaño de aproximadamente 22-45 residuos de aminoácidos. Preferiblemente, un péptido descrito tiene un tamaño de 22-35 residuos de aminoácidos. Más preferiblemente, un péptido descrito comprende 32 residuos de aminoácidos. En otro aspecto un péptido descrito comprende un tamaño de 35 residuos de aminoácidos.

35

40

[0023] El péptido de la invención es más adecuado para ser usado con fines de vacunación que un epítipo mínimo en una forma desnuda, si la inmunización con el péptido de la invención conduce a números más altos de LTC. Esto se puede conseguir asegurando que la presentación predominantemente tiene lugar mediante células presentadoras de antígeno profesionales. Así, en un aspecto, la invención proporciona el péptido según la invención donde dicho péptido conduce a números más altos de LTC específicos de virus y/o de tumor que cuando se administran epitopos de LTC mínimos. En otro aspecto el péptido de la invención conduce a una fuerte respuesta de los LTC capaz de erradicar (pequeños) nódulos tumorales.

45

La técnica conoce actualmente muchas maneras de generar un péptido. Los péptidos descritos no están limitados a ninguna forma de péptido generado siempre y cuando el péptido generado comprenda un epítipo de células T mínimo. A modo de ejemplo, el péptido de la invención puede ser obtenido de la proteína E7, sintetizado in vitro o por una célula, por ejemplo, a través de un ácido nucleico codificante. Un péptido puede estar presente como un único péptido o incorporado en una proteína de fusión. En una realización, dicho péptido está flanqueado por sitios de procesamiento permitiendo el procesamiento de dicho péptido dentro de una célula de tal manera que permita el transporte y/o incorporación a una molécula CMH en la superficie de dicha célula. En una realización preferida, el péptido de la invención es capaz, después del procesado, de complejación con una molécula CMH clase II. La inmunidad de las células T restringida por el CMH clase II es actualmente considerada importante en la erradicación de, por ejemplo células tumorales, aunque dichas células tumorales frecuentemente no expresan moléculas CMH de clase II. El péptido de la invención es particularmente adecuado para suscitar, inducir y/o estimular células T dependientes tanto del CMH clase I como del CMH clase II.

50

55

60

Así, en un aspecto, la invención proporciona un uso del péptido de la invención para inducir y/o mejorar una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno. Un método para suscitar y/o mejorar una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo el péptido de la invención, se proporciona también en este documento. En otro aspecto, la invención proporciona un uso del péptido de la invención para la preparación de una vacuna; dicha vacuna comprende una vacuna para, al menos en parte, profilaxis de una enfermedad relacionada con el VPH. Por

65

ejemplo, se han encontrado células T reactivas con proteínas E2 y E6 del VPH en individuos sanos indicando que las regiones inmunogénicas identificadas en las proteínas E2 y E6 del VPH16 comprenden epítomos relevantes para tratamientos profilácticos anti cáncer basados en estrategias de vacunación y/o de inmunoterapia adoptiva. Adicionalmente, se han encontrado células T reactivas a proteínas E7 y E6 del VPH en sujetos que comprenden lesiones de NIC III y en sujetos con cáncer cervical. Esto indica que las regiones inmunogénicas identificadas de las proteínas E7 y E6 del VPH 16 comprenden epítomos relevantes para tratamientos anti cáncer basados en estrategias de vacunación y/o de inmunoterapia adoptiva.

El péptido de la invención es adecuado para la generación y/o inducción de células T específicas del VPH. En un aspecto se ha descrito un método para generar una célula T específica del virus del papiloma humano 16 que comprende poner en contacto una colección de células T naive con el péptido de la invención y cultivar al menos parte de dicha colección de células T. En otro aspecto se ha descrito un método para inducir producción de citoquina (como, por ejemplo, IL-2 o IFN $\gamma$ ) específica de antígeno mediante una célula T de memoria específica del virus del papiloma humano 16, que comprende poner en contacto una colección de células T de un sujeto infectado con el virus del papiloma humano 16 con el péptido de la invención y cultivar al menos parte de dicha colección de células T. En una realización preferida de estos aspectos, dicha célula T específica del virus del papiloma humano 16 es aislada.

En aún otro aspecto, un método descrito comprende además obtener una célula T dirigida hacia un antígeno, que comprende inducir y/o mejorar una célula T con un método descrito y recolectar células T formadas dirigidas hacia dicho antígeno. Por supuesto, una célula T aislada obtenible por un método descrito también se proporciona en este documento. Dicha célula T se puede usar de muchas maneras, por ejemplo, para la detección de un epítomo de la invención, por ejemplo, en un ensayo de diagnóstico. No obstante, preferiblemente dicha célula T se usa en estrategias de inmunoterapia. Tales estrategias incorporan, pero no están limitadas a, estrategias donde tales células T se infunden en un sujeto que sufre un cáncer o una lesión cervical inducidos por el VPH-16. Así, en un aspecto se ha descrito un uso de una célula T tal y como se define en este documento para el tratamiento, al menos en parte, de una enfermedad relacionada con el VPH. En tales estrategias se prefiere que dicha célula T y dicho sujeto sean histocompatibles.

Aunque esto puede no ser siempre cierto. En algunos casos las los errores de coincidencia para histocompatibilidad incluso mejoran la funcionalidad de dicha célula T en dicho sujeto. El riesgo de desarrollar una enfermedad de injerto contra huésped puede frecuentemente limitarse asegurando que las células T no restringidas a un epítomo de la invención no están presentes en un injerto dado a dicho sujeto. Por supuesto, puede haber respuestas de injerto contra huésped dando como resultado la eliminación de células T infundidas tal y como se define en este documento. Para limitar tales respuestas se prefiere histocompatibilidad. No obstante, en el caso en el que la erradicación de células tumorales es muy rápida, la eliminación de células injertadas mediada por el huésped puede ser una ventaja como elemento de seguridad adicional de inmunoterapia. Se describe, por lo tanto, un método para suscitar y/o mejorar una respuesta inmune específica de la proteína E7 del VPH 16 en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo el péptido de la invención o una célula T tal y como se define en este documento. El péptido de la invención es particularmente adecuado para suscitar respuestas inmunológicas específicas del VPH 16 en un individuo. Estas respuestas inmunológicas pueden ser suficientemente altas como para proporcionar protección a un sujeto contra la infección por VPH-16. No obstante, el péptido de la invención o una célula T descrita también pueden usarse para ayudar a combatir una infección ya presente en un sujeto. Así, otra realización de la invención proporciona un uso del péptido de la invención para la preparación de un medicamento; dicho medicamento comprende un medicamento para una enfermedad relacionada con el VPH. Por supuesto, una vacuna y/o un medicamento que comprenden el péptido de la invención son también proporcionados con éste. Dicha vacuna es especialmente adecuada para profilaxis de una enfermedad relacionada con el VPH. Por lo tanto la invención también proporciona un método para la profilaxis, al menos en parte, de una enfermedad relacionada con el VPH, que comprende administrar a un individuo una vacuna de la invención. Un medicamento de la invención es, por supuesto, especialmente adecuado para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el VPH. Así, un método para el tratamiento, al menos en parte, de una enfermedad relacionada con el VPH, que comprende administrar a un individuo un medicamento de la invención es también proporcionado con éste. En otro aspecto se ha descrito un método para determinar si una colección de células T comprende una célula T de memoria específica para un epítomo, que comprende proporcionar a dicha colección de células T el péptido de la invención que comprende dicho epítomo, cultivar dicha colección de células T en presencia de un anticuerpo específicamente dirigido hacia una citoquina específica de antígeno (como, por ejemplo, IL-2 o IFN $\gamma$ ) y detectar cualquier citoquina específica del antígeno enlazada. En una realización, dicho anticuerpo se enlaza a una fase sólida, preferiblemente una superficie sólida. Dicho método es muy útil para determinar si un individuo tiene una respuesta de las células T dirigida hacia un antígeno determinado, por ejemplo hacia una proteína del VPH. Dicho método se puede usar para el diagnóstico de una infección del VPH. Alternativamente, dicho método es adecuado para determinar si una respuesta de las células T es suscitada después de la vacunación de un individuo. Preferiblemente, a dicho individuo se le proporciona una vacuna de la invención. Así, una realización descrita proporciona un uso del péptido de la invención para determinar la presencia de una célula T dirigida hacia un antígeno. En una realización, dicha presencia de dicha célula T se determina en una muestra. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de sangre de un individuo. Después de eso, se puede determinar la presencia de una célula T dirigida hacia un antígeno específico utilizando el péptido de la invención, en un ensayo inmunológico. Por ejemplo, se puede usar el método anteriormente mencionado. En este método, la detección de citoquina específica del antígeno enlazada (como, por ejemplo, IL-2 o IFN $\gamma$ ) indica la presencia de dicha célula T. Por supuesto, un experto en la técnica puede concebir muchas más técnicas para la detección de una célula T dirigida hacia un antígeno determinado usando el péptido de la invención. Por ejemplo, ELISA, ELISPOT, respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR), tinción de citoquina intracelular y tinción de citoquina extracelular o el uso de moléculas tetraméricas del CMH clase II que comprenden dichos péptidos son técnicas importantes, conocidas por los expertos.

[0024] Aspectos preferidos y realizaciones descritas

Aspecto 1

- 5 (1) El aspecto 1 se refiere a un método para inducir y/o mejorar una respuesta de las células T específica de antígeno que comprende proporcionar a un sistema capaz de exhibir dicha respuesta un péptido que comprende un epítipo de células T específico para dicho antígeno, comprendiendo dicho péptido 22-45 residuos de aminoácido.
- 10 (2) En una realización preferida del método (1) dicho péptido comprende 22-40 residuos de aminoácido.
- (3) En una realización preferida del método (1) o (2), dicho péptido comprende una secuencia capaz de activar una célula presentadora de antígeno.
- (4) En una realización preferida del método (1), (2) o (3), dicho péptido comprende una secuencia activadora de auxiliares T.
- 15 (5) En una realización preferida del método (1), (2), (3) o (4), tras proporcionar dicho péptido, dicho péptido es rocesado por una célula presentadora de antígeno.
- (6) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4) o (5), dicho péptido comprende al menos dos epítopos de células T para dicho antígeno.
- (7) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5) o (6), al menos uno de dichos epítopos comprende un epítipo de células T auxiliares para dicho antígeno o un epítipo de linfocitos T citotóxicos (LTC) para dicho antígeno.
- 20 (8) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6) o (7), donde dicho péptido comprende al menos un epítipo de células T auxiliares para dicho antígeno y al menos un epítipo de linfocitos T citotóxicos (LTC) para dicho antígeno.
- (9) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) o (8), donde dicho antígeno comprende una proteína vírica o una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de la misma.
- 25 (10) En una realización preferida del método (9), dicho antígeno comprende una proteína del virus del papiloma humano (VPH) o una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de la misma.
- (11) En una realización preferida del método (9) o (10), dicha proteína comprende E2, E6 y/o E7.
- (12) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) o (8), donde dicho antígeno comprende un auto-antígeno, preferiblemente un auto-antígeno específico de célula tumoral o una parte funcional, derivada y/o
- 30 análoga de la misma.
- (13) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) o (8), dicho antígeno comprende un antígeno vírico o (mico)bacteriano.
- (14) En una realización preferida del método (13), dicho antígeno comprende Mycobacterium tuberculosis y Mycobacterium leprae hsp65 369-412.
- 35 (15) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13) o (14), dicho método comprende inmunización con un péptido que comprende 21 aminoácidos o menos induce tolerancia y/o eliminación funcional de LTC específicos de antígeno en dicho sistema.
- (16) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14) o (15), dicho método comprende además proporcionar un adyuvante a dicho sistema.
- 40 (17) En una realización preferida del método (16), dicho adyuvante comprende un exosoma, una célula dendrítica, monofosforil lípido A y/o ácido nucleico CpG.
- (18) En una realización preferida del método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16) o (17), dicho sistema comprende un animal.
- (19) En una realización preferida del método (18), dicho sistema comprende un humano.
- 45 (20) En una realización preferida del método (18) o (19), dicho animal sufre o está en riesgo de sufrir una enfermedad que es al menos en parte tratable o prevenible induciendo y/o mejorando dicha respuesta inmune.
- (21) En una realización preferida del método (20), dicha enfermedad comprende una enfermedad (mico)bacteriana, una enfermedad vírica y/o cáncer.

50 Aspecto 2

- (22) El aspecto 2 proporciona un péptido que comprende 22-45 residuos de aminoácidos, que comprenden un epítipo de células T específico para un antígeno.
- (23) En una realización preferida, el péptido (22) comprende 22-40 residuos de aminoácidos.
- 55 (24) En una realización preferida, el péptido (22) o (23) comprende al menos dos epítopos de células T específicos para dicho antígeno.
- (25) En una realización preferida, el péptido (22), (23) o (24) comprende un epítipo de LTC.
- (26) En una realización preferida, el péptido (22), (23), (24) o (26) comprende un epítipo de células T auxiliares.
- (27) En una realización preferida, el péptido (26) es tal que dicho epítipo de LTC conduce a tolerancia o eliminación funcional de LTC específicos para dicho epítipo, cuando está presente en un péptido que comprende menos de 22
- 60 residuos de aminoácidos.
- (28) En una realización preferida, el péptido (22), (23), (24), (25), (26) o (27) comprende entre 22 y 35 residuos de aminoácidos.
- (29) En una realización preferida, el péptido (28) comprende 32, 33, 34 ó 35 residuos de aminoácidos.
- 65

Aspecto 3

(30) El aspecto 3 proporciona un uso del péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29) para inducir y/o mejorar una respuesta inmune específica para dicho antígeno.

5

Aspecto 4

El aspecto 4 proporciona un uso del péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29), para la preparación de una vacuna.

10

Aspecto 5

(32) El aspecto 5 proporciona un uso del péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29), para la preparación de una vacuna para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad relacionada con el VPH.

15

Aspecto 6

(33) El aspecto 6 proporciona un uso del péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29), para la preparación de un medicamento.

20

Aspecto 7

(34) El aspecto 7 proporciona un uso del péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29), para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un individuo que sufre o está en riesgo de sufrir una enfermedad (mico)bacteriana, una enfermedad vírica y/o cáncer.

25

Aspecto 8

(35) El aspecto 8 proporciona un método para obtener una célula T específica de antígeno, que comprende inducir y/o mejorar una respuesta de las células T específica para dicho antígeno con el método (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20) o (21), y recolectar dicha célula T específica de antígeno de dicho sistema.

30

Aspecto 9

(36) El aspecto 9 proporciona una célula T aislada obtenible por el método (35).

35

Aspecto 10

(37) El aspecto 10 proporciona un uso de la célula T (36), para preparar un medicamento.

40

Aspecto 11

(38) El aspecto 11 proporciona una vacuna que comprende el péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29).

45

Aspecto 12

(39) El aspecto 12 proporciona un medicamento que comprende el péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29) y/o la célula T (36).

50

Aspecto 13

(40) El aspecto 13 proporciona un uso del péptido (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28) o (29), para determinar si una colección de células comprende una célula T específica de antígeno, comprendiendo dicho péptido un epítipo para dicho antígeno.

55

(41) En una realización preferida, el uso (40) es para determinar si un individuo comprende inmunidad para dicho antígeno.

(42) En una realización preferida, el uso (40) o (41), es tal que la presencia de dicha célula T se determina mediante ELISA, ELISPOT, respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado, tinción de citoquina intracelular y/o tinción de citoquina extracelular.

60

34. Aspecto 14

(43) El aspecto 14 proporciona un epítipo inmunogénico seleccionado de la parte central de una proteína E7 del virus del papiloma humano 16.

65

(44) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (43), es aquel en el que dicha parte central comprende una

## ES 2 519 043 T3

región que abarca los aminoácidos 35-77 de una proteína E7 del virus del papiloma humano 16.

(45) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (43), es aquel en el que dicha parte central comprende una región que abarca los aminoácidos 35-50 en dicha proteína E7.

5 (46) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (43), es aquel en el que dicha parte central comprende una región que abarca los aminoácidos 50-62 en dicha proteína E7.

(47) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (43), es aquel en el que dicha parte central comprende una región que abarca los aminoácidos 43-77 en dicha proteína E7.

### Aspecto 15

10

(48) El aspecto 15 proporciona un epítipo inmunogénico seleccionado de la parte del C- terminal de una proteína E6 del virus del papiloma humano 16.

(49) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (48), es aquel en el que dicha parte C-terminal comprende una región que abarca los aminoácidos 81-158 de una proteína E6 del virus del papiloma humano 16.

15 (50) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (48), es aquel en el que dicha parte C-terminal comprende una región que abarca los aminoácidos 127-140 de una proteína E6 del virus del papiloma humano 16.

(51) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (48), es aquel en el que dicha parte C-terminal comprende una región que abarca los aminoácidos 121-142 de una proteína E6 del virus del papiloma humano 16.

### 20 Aspecto 16

(52) El aspecto 16 proporciona un epítipo inmunogénico seleccionado de una región que abarca los aminoácidos 31-120, 151-195 ó 271-365 de una proteína E2 del virus del papiloma humano 16.

25 (53) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 46- 75 en dicha proteína E2.

(54) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 51- 70 en dicha proteína E2.

(55) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 61- 76 en dicha proteína E2.

30 (56) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 311- 325 en dicha proteína E2.

(57) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 316- 330 en dicha proteína E2.

35 (58) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 346- 355 en dicha proteína E2.

(59) En una realización preferida, el epítipo inmunogénico (52), es aquel en el que dicha región abarca los aminoácidos 351- 365 en dicha proteína E2.

### 40 Aspecto 17

40

(60) El aspecto 17 proporciona un péptido que comprende el epítipo inmunogénico (43), (44), (45), (46), (47), (48), (49), (50), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57), (58) o (59).

(61) En una realización preferida, el péptido (60) es capaz de complejación con una molécula del CMH clase II.

45 (62) En una realización preferida, el péptido (60) es ensayado por su capacidad de suscitar la producción de IFN $\gamma$  mediante PBMC derivadas de un individuo diagnosticado con NIC III y/o carcinoma cervical.

### Aspecto 18

50

(63) El aspecto 18 proporciona un método para generar una célula T específica del virus del papiloma humano 16 que comprende poner en contacto una colección de células T naive con el péptido (60), (61) o (62)

y cultivar al menos parte de dicha colección de células T.

### Aspecto 19

55

(64) El aspecto 19 proporciona un método para inducir la producción de IFN $\gamma$  mediante una célula T de memoria específica de virus del papiloma humano 16 que comprende poner en contacto una colección de células T de un sujeto infectado con el virus del papiloma humano 16 con el péptido (60), (61) o (62) y cultivar al menos parte de dicha colección de células T.

60 (65) En una realización preferida, el método (63) o (64) comprende además aislar dicha célula T específica del virus del papiloma humano 16.

### Aspecto 20

65

(66) El aspecto 20 proporciona una célula T aislada obtenible por el método (65).

41. Aspecto 21

5 (67) El aspecto 21 proporciona un método para suscitar y/o mejorar una respuesta inmune específica de la proteína E7 del VPH16, y/o específica de la proteína E6 del VPH16, y/o específica de la proteína E2 del VPH16 en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo el péptido (60), (61) o (62) y/o la célula T (66).

Aspecto 22

10 (68) El aspecto 22 proporciona una vacuna que comprende el péptido (60), (61) o (62) y un portador adecuado.

Aspecto 23

15 (69) El aspecto 23 proporciona un uso de la célula T (66) para inmunoterapia.

Aspecto 24

20 (70) El aspecto 24 proporciona un uso de la vacuna (68) o T (66) para el tratamiento de un sujeto que comprende una lesión de VPH16.

Aspecto 25

25 (71) El aspecto 25 proporciona un método para determinar si una colección de células T comprende una célula T de memoria específica para un epítipo, que comprende - proporcionar a dicha colección de células T un péptido que comprende dicho epítipo - cultivar dicha colección de células T en presencia de un anticuerpo IFN $\gamma$  y detectar cualquier IFN $\gamma$  enlazado.

[0025] La invención es adicionalmente explicada mediante el uso de los siguientes ejemplos ilustrativos.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

35 Material y métodos

Sujetos y controles.

[0026] Muestras de células mononucleares de sangre de cordón umbilical (CBC) fueron usadas como controles inmunológicamente naive para respuestas específicas de matriz de gripe. PBMC tipificadas por su HLA de donantes de banco de sangre sanos anónimos (D) obtenida después del consentimiento informado, sirvieron como control PBMC para E7 del VPH16 y respuestas específicas de matriz de gripe. Ya que estos donantes son anónimos, no hay datos adicionales disponibles. No obstante, los donantes con una historia reciente conocida de infecciones, incluyendo prueba de Papanicolau anormal, fueron, como parte de las regulaciones normales, disuadidos de donar sangre. El estudio de sujetos (S; tabla I) con NIC o carcinoma cervical en este artículo fue incluido en el "estudio CIRCLE" que investiga la inmunidad celular contra lesiones cervicales infectadas por el VPH16. Las mujeres que presentaban NIC III o carcinoma cervical histológicamente probado en el departamento de ginecología del Leiden University Medical Center (LUMC) fueron, después del consentimiento informado, inscritas en este estudio. El diseño del estudio fue aprobado por el comité de ética del LUMC. La sangre fue extraída el día del tratamiento. Sujetos con NIC III fueron tratados por LEEP o conización con bisturí. En caso de estadio IB-IIA se realizó una histerectomía radical. Todos los individuos para quienes había suficiente PBMC disponibles fueron tipificados por su HLA del CMH clase II (Naipal et al., 1984). Los sujetos fueron tipificados por su VPH 16 usando cebadores específicos del VPH16 en ADN aislado de secciones embebidas en parafina de biopsias o muestras de resección quirúrgica (Claas et al., 1989). Ya que se esperaba encontrar la respuesta de las auxiliares T específicas del VPH en sujetos con enfermedad progresiva (de Gruijl et al., 1998), elegimos analizar tres sujetos que presentaban NIC III, 4 sujetos con cáncer cervical en estadio IB y 4 sujetos con cáncer cervical recurrente.

Antígenos

60 [0027] Los péptidos usados que abarcan la proteína E7 consistían en nueve péptidos 22-mer superpuestos y están indicados por su primer y último aminoácido en la proteína (1-22, 11-32, 21-42, 31-52, 41-62, 51-72, 61-82, 71-92 y 77-98) o 4 péptidos largos definidos por los aminoácidos 1-35, 22-56, 43-77 y 64-98. Los péptidos que abarcan la proteína de la matriz 1 de la gripe A/PR/8/43 que fueron usados como péptidos de control en el ensayo de ELISPOT consistían en dieciséis péptidos 30-mer superpuestos en 15 aminoácidos. Los péptidos fueron sintetizados y disueltos como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999). Proteína E7 del VPH16, proteína E6 del VPH16 y proteína RT del VIH-1 recombinantes (las últimas dos proteínas sirvieron como proteínas de control en los ensayos de proliferación) fueron producidas en E. coli recombinante, transformadas con transcriptasa inversa (RT) de Pet-19b de E7 del VPH16, Pet-19b

de E6 del VPH16 (De Bruijn et al., 1998) o Pet-19b del HIV-1 y purificadas como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999).

Mezcla de respuesta de memoria (MRM): una mezcla de toxoide tetánico (1 LF/ml; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Países Bajos) y sonicado de Mycobacterium tuberculosis (2,5 µg/ml; generosamente donado por el Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, Países Bajos) fue usada para controlar la capacidad de las PBMC para proliferar en respuesta a antígenos de recuerdo típicos.

Ensayo de enlace HLA-DR-péptido.

[0028] El enlace de péptidos fue medido como se ha referido previamente (van der Burg et al., 1999).

[0029] Resumiendo, como fuente de moléculas de HLA-DR se usaron líneas celulares linfoblásticas-b homocigóticas para HLA-DR: LG2.1 (DRB\*0101; DR1), IWB (DRB1\*0201; DR2), HAR (DRB\*0301; DR3), BSM (DRB\*0401; DR4) y Pitout (DRB1\*0701; DR7). Las moléculas DR fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad y la pureza confirmada mediante SDS-PAGE. El análisis de enlace del péptido con moléculas de HLA-DR purificadas fue realizado utilizando péptidos estándar marcados N-terminalmente por fluorescencia. Como péptidos fluorescentes estándar en los ensayos de enlace se usaron HA 308-319 (PKYVKQNTLKLAT, DR1 y DR2), hsp65 3-13 (KTIAYDEEARR; DR3), HA 308-319 Y → F (PKFVKQNTLKLAT; DR4) o li 80-103 (LPKPPKPVSKMRMATPLLMQA LPM, DR7).

Ensayo de inmunogenicidad.

[0030] El péptido derivado de E7 del VPH16 indujo proliferación de PBMC aislado de la sangre obtenida de donantes sanos fue medido como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999).

[0031] Resumiendo, se sembraron PBMC con una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, MA) en 200 µl de medio ISCOVE (Gibco) enriquecido con un 10% de suero autólogo, en presencia o ausencia de 10 µg/ml del péptido E7 22-mer indicado. Como control positivo, se cultivaron PBMC en presencia de una mezcla de respuesta de memoria. La proliferación específica de péptido fue medida el día 6 mediante incorporación de tritiotimidina. Los péptidos fueron marcados como inmunogénicos, es decir, capaces de estimular células T, cuando la proliferación de > 25% de los 8 pocillos de prueba excedía la proliferación media + 2 veces la desviación típica de los pocillos de control del medio.

Ensayos de proliferación

[0032] Los cultivos fueron pulsados con 0,5µCi de [3H] timidina (5Ci/mM, Amersham, UK) por pocillo durante 18 horas. Las placas fueron cosechadas con un Micro cell Harvester (Skatron, Noruega). Los filtros fueron envasados en bolsas de plástico que contenían 10 ml de fluido de centelleo y posteriormente contados en un contador 1205 Betaplate (Wallac, Turku, Finlandia). Se efectuaron experimentos de bloqueo del CMH clase II como se ha descrito anteriormente usando anticuerpos monoclonales murinos contra el HLA-DQ (SPV.L3), contra el HLA-DR (B8.11.2) y contra el HLA-DP (B7/21) (van der Burg et al., 1999). Se agregaron anticuerpos a las CPA 1 hora antes de la incubación proteína-CPA.

Aislamiento y expansión de células T auxiliares específicas de E7 del VPH16.

[0033] Los cultivos en masa de células T específicas de péptido fueron generados como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999) usando los péptidos de E7 22-mer o de E7 35-mer. La proliferación específica fue medida incubando 50.000 respondedores con una misma cantidad de CPA (PBMC autólogas a menos que se indique otra cosa) y péptido o proteína irradiados (30Gy) como se indica. Se clonaron células T en masa específicas de péptido y proteína E7 mediante dilución limitante como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999).

Ensayos de citoquina

[0034] Para determinar la excreción específica de citoquinas, los clones de células T fueron estimulados mediante la incubación de 50.000 células T con una cantidad igual de CPA (30Gy) junto con 10 µg/ml de péptido, péptido de control, proteína E7 o proteína de control como se indica. Después de 24 horas de incubación, el sobrenadante fue cosechado y los pocillos replicados fueron agrupados. La producción de citoquina se midió mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999).

Análisis de células T específicas de antígeno mediante ELISPOT

[0035] Se sembraron PBMC o glóbulos rojos de cordón umbilical (CBC) con una densidad de  $2 \times 10^6$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 1ml de medio ISCOVE (Gibco) enriquecido con un 10% de FCS, en presencia o ausencia de 5 µg/ml del péptido 22-mer derivado de E7 indicado. Como control positivo se cultivaron PBMC en presencia de conjuntos indicados de péptidos derivados de la proteína M1 de la gripe A/PR/8/34 que consistían en 4 péptidos de 30 aminoácidos de longitud superpuestos en cada conjunto. Basándonos en nuestras

observaciones, usamos una estimulación de 4 días antes de que las PBMC fueran transferidas a las placas de ELISPOT. Esto dio lugar a una producción pronunciada de IFN $\gamma$  hacia péptidos derivados de gripe M1 en el subconjunto CD45RO+ (memoria) de las células T pero no en células T naive obtenidas de PBMC adultas (observaciones no publicadas).

Después de 4 días de incubación a 37°C, las PBMC fueron cosechadas, lavadas y sembradas en seis pocillos replicados con una densidad de 10<sup>5</sup> células/pocillo en una placa de 96 pocillos Multiscreen (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) recubierta con un anticuerpo atrapador de IFN $\gamma$  (Mabtech, aB Nacha, Suecia). El ELISPOT fue además realizado según las instrucciones del fabricante (Mabtech). El número de puntos fue analizado con un sistema de análisis de imágenes de vídeo asistido por ordenador completamente automatizado (Carl Zeiss Vision).

[0036] Los puntos específicos fueron calculados sustrayendo el número medio de puntos + 2xDT del control de sólo medio al número medio de puntos de los pocillos experimentales. Se consideró que las frecuencias de células T específicas de antígeno se incrementaron en comparación con las no respondedoras cuando las frecuencias de células T eran > 1/10.000 PBMC.

**Resultados**

Identificación de las secuencias inmunogénicas dentro del E7 del VPH16.

[0037] Nos propusimos identificar las secuencias en la proteína E7 del VPH16 que funcionan como determinantes inmunogénicos principales en el contexto del CMH clase II. Un conjunto de péptidos superpuestos derivados de E7 del VPH16 fue examinado para enlace con HLA-DR 1, 2, 3, 4 y 7 en un ensayo de enlace péptido/CMH cuantitativo (Geluk et al., 1995). Juntas, estas moléculas de HLA-DR cubren al menos el 50-60% de las poblaciones caucásicas orientales y negroides (Baur et al., 1984). Cuatro péptidos, E7<sub>1-22</sub>, E7<sub>41-62</sub>, E7<sub>51-72</sub> y E7<sub>77-98</sub>, enlazados a tres o más moléculas diferentes de HLA-DR (tabla II): el péptido E7<sub>1-22</sub> enlazado a HLA DR2, 3, 4 y 7, el péptido E7<sub>41-62</sub> enlazado a DR1, 2, 3 y 4 mientras que el péptido E7<sub>51-72</sub> enlazado a DR1, 3 y 7 y el péptido E7<sub>77-98</sub> enlazado a DR1, 2 y DR7. Esto está de acuerdo con el hecho de que se encontró que las restricciones de enlace del péptido para moléculas del CMH clase II eran menos estrictas que aquellas para CMH clase I (Rammensee et al., 1995). Como nota, estos péptidos no pudieron enlazarse a una o dos de las otras moléculas DR examinadas indicando que su enlace, aunque de carácter bastante ubicuo, era específico.

Nuestros experimentos posteriores se han centrado en los cuatro péptidos que se enlazan con múltiples moléculas de HLA-DR, ya que estos son los que más probablemente comprenden epítopos de auxiliares-T (Th) presentados naturalmente (Geluk et al., 1998). Analizamos si los péptidos podían estimular células T para proliferar, añadiendo estos a PBMC de 13 donantes de sangre sanos tipificados por su HLA. Este ensayo no discrimina entre la reactividad de células T de memoria y células T naive cebadas in vitro, pero puede ser fácilmente empleado para identificar péptidos inmunogénicos (van der Burg et al., 1999). Los cuatro péptidos fueron capaces de estimular respuestas proliferativas en PBMC de donantes múltiples (tabla II). La mayoría de cultivos de PBMC reaccionaron a los péptidos E7<sub>41-62</sub> y E7<sub>51-72</sub> indicando que la región central de la proteína E7 alberga las secuencias más inmunogénicas y es probable que sea elegida como blanco por el sistema inmunológico en los individuos infectados con el VPH 16.

**Tabla I características del sujeto**

Número de Paciente	Edad	Tipo de VPH	Tipo de CMH clase II	Estadío de la Enfermedad
1	38	16	HLA DR4, 11(5); DQ3	NIC III
2	41	16	HLA DR15(2), 3; DQ6(1), 2	NIC III
3	32	16	HLA DR15(2), 4; DQ3, 6	NIC III
4	67	16	HLA DR15(2), 4; DQ6(1), 8(3)	FIGO IB
5	59	16	HLA DR11(5); DQ3	FIGO IB
6	36	16	No disponible	FIGO IB
7	28	16	HLA DR1, 7; DQ5(1), 2	FIGO IB
8	48	16	HLA DR15(2), 7; DQ6(1)	Carcinoma cervical recurrente
9	46	16	HLA DR15(2), 7; DQ6(1), 2	Carcinoma cervical recurrente
10	47	16	HLA DR6, 7; DQ1, 2	Carcinoma cervical recurrente
11	46	16	HLA DR3, DQ2	Carcinoma cervical recurrente

Tabla II Capacidad enlazante e inmunogenicidad de péptidos derivados de E7 del VPH16

E7 aa	Enlace							Inmunogenicidad												
	DR1	DR2	DR3	DR4	DR7	D#1 DR1,3 DQ1,2	D#2 DR1,4 DQ5,8	D#3 DR2,4 DQ6,8	D#4 DR3,6 DQ6,2	D#5 DR2,3 DQ1,2	D#6 DR2,3 DQ6,2	D#7 DR1,3 DQ5,2	D#8 DR2,13 DQ6	D#9 DR4,7 DQ3	D#10 DR1,3 DQ5,2	D#11 DR7 DQ2	D#12 DR3,13 DQ6,2	D#13 DR7,13 DQ6,3		
1-22 <sup>a</sup>	>70 <sup>b</sup>	10	0.8	30	7	- <sup>c</sup>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+		
11-32	>70	>70	50	>70	>70															
21-42	>70	12	>70	>70	>70															
31-52	>70	>70	>70	>70	NT															
41-62	7.4	50	55	38	>70	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
51-72	70	>70	50	>70	11	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+		
61-82	>70	15	65	>70	>70															
71-92	12	2	>70	>70	>70	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+		
77-98	46	22	>70	>70	0.9															
<b>Mezcla de Respuesta de Memoria</b>																				
+																				

<sup>a</sup> Primer y último número de aminoácidos de péptidos 22-mer superpuestos derivados de la proteína E7 del VPH16  
<sup>b</sup> La capacidad enlazante de cada péptido se expresa como el valor IC50; esta es la concentración (mM) de péptido de prueba a cuyo 50% de enlace máximo del péptido marcado por fluorescencia estándar es inhibido. >70, indica enlace no detectable.  
<sup>c</sup> PMBC frescas derivadas de donantes (D) de sangre sanos de tipo HLA-DR y -DG fueron estimuladas con péptidos que se enlazaron a >3 moléculas DR purificadas de HLA diferentes. Se consideró que los donantes reaccionaban específicamente a un péptido cuando >25% de todos los pocillos ensayados mostraba una proliferación que excedía la media +2x la desviación típica del control de sólo medio. Más del 65% de todos los pocillos estimulados con la mezcla de respuesta de memoria fueron encontrados positivos.

Tabla III Evaluación de las respuestas de las células T específicas de E7 del VPH16 mediante IFN $\gamma$  ELISPOT

	CBC#1	CBC#2	CBC#3	D#20	D#21	D#22	D#23	D#24	D#25	D#26	S#1	S#2	S#3	S#4	S#5	S#6	S#7	S#8	S#9	S#10	S#11
HLA DR	NA	NA	NA	3 <sup>b</sup> 13(6)	15(2) 13(6)	1 4	2 8	4 8	1 7	11(5) 7	4 11(5)	15(2) 3	15(2) 4	15(2) 4	11(5) NA	NA	1 7	15(2) 13(6)	15(2) 7	6 7	3 7
HLA-DQ	NA	NA	NA	1,2	6(1)	3,5	1	4,8	5	NA	3	6(1),2	6(1),3	6(1),8(3)	3	NA	5(1),2	6(1)	6(1),2	1,2	2
E7																					
1-22a	<1			1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1	<1	<1	<1	<1	<1
11-32	<1			1	<1	15	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	8
21-42	<1			<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	1	<1	<1	<1	2
31-52	<1			<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	8	<1	<1	<1	<1	23	<1	<1	<1	14
41-62	<1			2	2	<1	<1	<1	<1	1	<1	14	<1	<1	<1	<1	19	<1	<1	<1	5
51-72	<1			<1	<1	4	<1	<1	<1	1	32	76	<1	<1	98	<1	19	<1	<1	<1	<1
61-82	<1			<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	13
71-92	<1			<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
77-98	<1			<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	12	<1	6	<1	<1	<1	6
M1																					
conjunto 1	<1 <sup>c</sup>	<1	<1	8	9	46	<1	7	5	13	<1	<1	27	<1	<1	1	113	<1	<1	<1	15
conjunto 2	<1	<1	<1	12	36	41	<1	28	<1	65	8	<1	29	47	2	8	66	11	<1	<1	19
conjunto 3	<1	<1	<1	<1	47	42	<1	<1	9	17	92	6	<1	59	100	<1	41	39	<1	<1	20
conjunto 4	<1	<1	<1	<1	47	38	27	<1	15	2	<1	22	15	<1	10	<1	34	17	<1	<1	28

<sup>a</sup>Primer y último número de aminoácido de péptidos de 22 aminoácidos de longitud derivados de la proteína E7 del VPH16 que se usaron para estimular células T de células sanguíneas de cordón umbilical (CBC), PMBC de donantes (D) o PMBC de sujetos (S) de VPH16+. Para la proteína de la gripe M1 sólo se indica el número de conjunto. Cada conjunto consiste en cuatro péptidos de 30 aminoácidos de longitud que se superponen en 15.

<sup>b</sup>Tipificación HLA clase II de cada individuo. ND, no disponible

<sup>c</sup>El número de células específicas de antígeno por cada 100.000 células sanguíneas de cordón umbilical o PBMC. Las frecuencias  $\geq 1/10.000$  se muestran en negrita. Se subrayan las respuestas que corresponden en especificidad a la de los clones-Th descritos en las figuras 1, 2, 3.

Mapeo de epítomos de auxiliares T en E7 del VPH16 procesados naturalmente.

[0038] Como siguiente paso en la identificación de epítomos de Th en E7 del VPH16, se generaron cultivos en masa de células T específicos de péptido a partir de PBMC de donantes de sangre sanos tipificados por su HLA mediante estimulación repetida con varios péptidos largos que cubrían la región central de E7. Las células T que respondieron fueron posteriormente ensayadas para el reconocimiento de células presentadoras de antígeno (CPA) pulsadas tanto con péptido como con proteína E7 completa. En este último caso, la presentación de los péptidos epítomos pertinentes requiere la absorción y el procesamiento de antígeno.

[0039] Aproximadamente el 30% de los cultivos de células Th generados respondieron específicamente a los péptidos contra los cuales fueron cultivados. De estos, tres cultivos mostraron también actividad modesta pero específica contra CPA pulsadas por proteína E7, indicando la presencia de células Th con capacidad para responder contra el antígeno procesado naturalmente (figuras 1a, 2a y 3a).

[0040] La FIG. 1b muestra la reactividad de un clon Th que fue aislado a partir de PBMC positivas de HLA-DR15, 4 y DQ6, 7 cultivadas contra el péptido E7<sub>41-62</sub>. Estas células Th responden específicamente a CPA pulsadas con el péptido E7<sub>41-62</sub>, péptido E7<sub>43-77</sub> o proteína E7. La especificidad de la respuesta de este clon Th excedió la del cultivo policlonal del cual este clon Th fue aislado (comparar con FIG. 1a), ilustrándolo mediante dilución limitante hemos tenido éxito en el aislamiento de las células T de interés. Estudios adicionales que usan anticuerpos de bloqueo del CMH clase II contra HLA-DR,-DQ o -DP (FIG. 1b) y CPA parcialmente emparejadas CMH clase II revelaron que el clon Th fue restringido por HLA-DR15 (FIG. 1e). El mapeo preciso del epítomo mostró que la secuencia central reconocida era E7<sub>50-62</sub>.

[0041] Además, este clon Th produjo la citoquina Th tipo 1 IFN $\gamma$  (FIG. 1d). De forma similar un clon Th específico de E7 del VPH16 se obtuvo a partir de PBMC positivas de HLA-DR3, DQ2 estimuladas con el péptido E7<sub>22-56</sub> (FIG. 2a). También este clon Th segregó IFN $\gamma$  tras la activación mediante el péptido E7<sub>22-56</sub> y las CPA pulsadas por proteína E7 (FIG. 2bc). Análisis adicionales mostraron que este clon Th reconoció la secuencia central E7<sub>35-50</sub>, como indica el hecho de que ambos péptidos E7<sub>30-50</sub> y E7<sub>35-55</sub> reconocieron, de una forma restringida por HLA-DQ2 (FIG. 2c). Un tercer clon Th productor de citoquina tipo 1 con distinta especificidad fue derivado de un cultivo de PBMC positivo de HLA-DR1, 3 y DQ2 estimulado con el péptido E7<sub>43-77</sub> (FIG. 3ab). Este clon fue restringido por HLA-DR3 (FIG. 3cd) y produjo IFN $\gamma$  tras el reconocimiento de CPA pulsadas tanto por péptido como por proteína (FIG. 3e). Mientras que el péptido E7<sub>43-77</sub> fue reconocido, el péptido menor E7<sub>41-62</sub> no lo fue, indicando que la parte C-terminal del péptido E7<sub>43-77</sub> alberga el epítomo central. En conclusión, usando clones Th establecidos mapeamos tres epítomos procesados naturalmente en E7 del VPH16. Es concebible que los individuos VPH16+ que expresan las moléculas del CMH clase II relevantes muestren inmunidad Th inducida in vivo contra estos péptidos.

Respuestas auxiliares T de memoria en sujetos con lesiones de NICIII de VPH16+ o carcinoma cervical.

[0042] En una estrategia paralela al mapeo de los epítomos de Th usando cultivos PBMC de individuos sanos, se analizó la respuesta contra el E7 del VPH16 en sujetos con lesiones VPH16+ (ver Tabla I para las características de los sujetos). La estimulación principal, in vitro, de células T naive de recién nacidos o adultos puede dar lugar a la producción de IL-2 y la proliferación de células T. No obstante, en este estadio tales células T no pudieron segregar IFN $\gamma$ . La producción de IFN $\gamma$  se da cuando el antígeno se encuentra de nuevo (Early y Reen, 1999; Pittet et al., 1999; Sallusto et al., 1999). Este detalle nos permitió discriminar entre respuestas de células T cebadas in vitro y de memoria mediante ELISPOT. Las respuestas Th contra la proteína de la matriz (M1) de gripe A, que son fácilmente detectables en PBMC de la mayoría de donantes de diversos tipos de HLA (tabla III y nuestras observaciones no publicadas), fueron medidas en paralelo como control positivo para la detección de la inmunidad de células T de memoria en el ensayo. La estimulación con péptidos M1 de células T CD45RA+ (naive) y células T CD45RO+ (memoria) separadas por MACS ha dado lugar a la producción de IFN $\gamma$  sólo en el subconjunto CD45RO+, confirmando que nuestro montaje de ELISPOT detecta específicamente respuestas de memoria (FIG. 4). Además, las células de sangre de cordón umbilical (CBC), según su fenotipo naive, no reaccionaron secretando IFN $\gamma$  cuando fueron estimuladas in vitro con péptidos derivados de gripe M1. Además de las PBMC de todos donantes sanos, 9/11 de los sujetos VPH 16+ reaccionaron a uno o más conjuntos de péptidos M1 (tabla III).

[0043] El análisis de inmunidad contra E7 del VPH16 reveló respuestas contra uno o más péptidos en 2/3 de los sujetos diagnosticados con NIC III y en 3/8 de los sujetos con carcinoma cervical. Además, uno de los siete donantes examinados mostró inmunidad contra un péptido. La región central de E7 del VPH16 que está cubierta por los péptidos E7<sub>31-52</sub>, E7<sub>41-62</sub> y E7<sub>51-72</sub> fue escogida como blanco por el sistema inmunológico de los cinco individuos VPH16+ (tabla III), no solo confirmando que esta región es altamente inmunogénica (tabla II) sino también demostrando que esta región alberga epítomos que son escogidos como blanco por respuestas inmunológicas naturales contra el VPH16. Resulta interesante que la especificidad de las respuestas de IFN $\gamma$  detectadas en tres sujetos VPH16+, en combinación con su tipo HLA coincidió con la de los clones Th establecidos para los que examinamos la especificidad y la restricción por HLA en detalle (figuras 1-3).

[0044] En particular (tabla III, frecuencias subrayadas), el sujeto 2 exhibió inmunidad significativamente incrementada que se correspondía con la especificidad de los dos clones restringidos por HLA-DR así como inmunidad débil que se correspondía con el clon HLA- DQ2/E7<sub>35-50</sub>. El sujeto 8 mostró una respuesta que se correspondía con el clon

DR15/E7<sub>50-62</sub>, mientras que el sujeto 11 mostró reactividad que se correspondía el clon HLA-DQ2/E7<sub>35-50</sub>. Debe notarse que en otros sujetos que expresan las moléculas del CMH clase II relevantes tales respuestas no pudieron ser detectadas (sujetos 3, 4, 7 y 10).

5 Ejemplo 2

Materiales y métodos

Linfocitos

10

[0045] Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y suero de donantes de sangre sanos anónimos tipificados por su HLA fueron obtenidas tras el consentimiento informado. Debido a que estos donantes son anónimos, ninguno de los datos en la historia médica están disponibles. Es importante destacar que los donantes con una historia reciente conocida de infecciones, incluyendo prueba de Papanicolau anormal, fueron, como parte de las regulaciones normales, disuadidos de donar sangre.

15

Antígenos

20

[0046] Se usó un conjunto de péptidos que abarcan la proteína E2 completa del VPH16 que consiste en 23 péptidos superpuestos, 22 de los cuales tienen una longitud de 30 aminoácidos y uno de los cuales (E2<sub>331-365</sub>) tiene una longitud de 35 aminoácidos. Estos péptidos comparten un solapamiento de 15 aminoácidos.

25

[0047] Para el mapeo preciso del epítipo y la determinación de la reactividad cruzada de los clones Th específicos de E2 del VPH16, se usaron péptidos con una longitud de 15 y 20 aminoácidos. Los péptidos que abarcan la proteína de la matriz 1 de la gripe A/PR/8/34, que fueron usados como péptidos de control en los ensayos de ELISPOT, consistieron en 16 péptidos 30-mer solapados en 15 aminoácidos. Los péptidos fueron sintetizados mediante la técnica de fase sólida en un sintetizador de péptidos múltiple automatizado (Abimed AMS 422, Langenfeld, Alemania), y analizado por HPLC en fase inversa. Los péptidos liofilizados fueron disueltos en 50 µl de DMSO, diluidos en PBS con una concentración final de 2,5 mg/ml. La proteína C-terminal E2 (E2<sub>280-365</sub>) del VPH16 y la proteína E7 del VPH16 fueron producidas según procedimientos previamente descritos (Franken et al., 2000). Una mezcla de respuesta de memoria (MRM), que consistía en una mezcla de toxoide tetánico (concentración final 0,75 LF/ml; National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Países Bajos), sonicado de Mycobacterium tuberculosis (2,5 µg/ml; generosamente donado por el Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, Amsterdam, Países Bajos) y Candida albicans (0,005%, HAL Allergen Lab, Haarlem, Países Bajos), fue usada para confirmar la capacidad de las PBMC para proliferar en respuesta a antígenos de recuerdo típicos.

35

Ensayo de enlace HLA-DR-péptido

40

[0048] El enlace de péptidos a HLA-DR fue medido tal y como se ha referido previamente (van der Burg et al., 1999). Resumiendo, como fuente de moléculas DR se usó B-LCL homocigótica para DR: LG2.1 (DRB\*0101; DR1), IWB (DRB1\*0201; DR2), HAR (DRB\*0301; DR3) y BSM (DRB\*0401, DR4). Las moléculas DR fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad y la pureza confirmada mediante SDS-PAGE. El análisis de enlace del péptido con moléculas DR purificadas fue realizado utilizando péptidos estándar marcados N-terminalmente por fluorescencia. Como péptido estándar en los ensayos de enlace se usó HA<sub>308-319</sub> (PKYVKQNTLKLAT, DR1 y DR2), hsp65 3-13 (KTIAYDEEARR; DR3) o HA<sub>308-319</sub> Y→F (PKFVKQNTLKLAT).

45

Ensayo de proliferación de célula T a corto plazo

50

[0049] La inmunogenicidad de los péptidos E2 del VPH16 individuales fue determinada mediante ensayos de proliferación a corto plazo de donantes sanos de PBMC con péptidos E2 del VPH16, según procedimientos previamente descritos (van der Burg et al. 1999). Resumiendo, se sembraron PBMC recientemente aisladas con una densidad de 1,5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en U (Costar, Cambridge, MA) en 200 µl de IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove, Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10% de suero autólogo (10% de FCS fue usado para cultivos de CBC). Se añadieron péptidos E2 del VPH16 con una concentración de 10 µg/ml.

55

[0050] El medio solo fue tomado como control negativo; fitohemaglutinina (PHA, 0,5 µg/ml) sirvió como control positivo. Por cada péptido se iniciaron 8 micro-cultivos paralelos; cada donante fue ensayado dos veces. La proliferación específica de péptido fue medida el día 6 mediante incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Los péptidos fueron marcados positivo, cuando - en ambos ensayos - la proliferación de > 50% de los pocillos de test excedió la proliferación media + 3 x DT de los pocillos de control, y el índice de estimulación (IE) de todos los pocillos de test sobre los pocillos de control de medio era superior a 3.

60

Generación y análisis de cultivos Th específicos de E2 del VPH16 a largo plazo

65

[0051] Se establecieron cultivos de células T y clones Th específicos de E2 del VPH16 a largo plazo según procedimientos previamente descritos (van der Burg et al. 1999). Resumiendo, las PBMC de donantes tipificados de HLA sanos fueron estimuladas in vitro con los siguientes péptidos E2 del VPH16 (E2<sub>271-300</sub> +E2<sub>286-315</sub>; E2<sub>301-330</sub> +E2<sub>316-</sub>

345; E2<sub>331-365</sub>). 15 x 10<sup>6</sup> PBMC fueron sembradas en matraces de cultivo de 25cm<sup>2</sup> (Nalge Nunc, EE.UU) en 6 ml de IMDM suplementado con un 10% de suero autólogo. Los péptidos fueron añadidos con una concentración de 5 µg/ml. El día 7, se añadieron 15 x 10<sup>6</sup> PBMC, junto con medio y péptidos frescos. El día 14 y 21 células T viables fueron cosechadas de los cultivos, contadas y estimuladas de nuevo con una cantidad igual de PBMC irradiadas autólogas y péptido (5 µg/ml). El factor de crecimiento de las células T (Biotest, Dreieich, Alemania) fue añadido 2 días después de la segunda estimulación con una concentración final del 10%. Los cultivos de células T fueron ensayados para reconocimiento de péptidos mediante ensayo de proliferación el día 28. Los cultivos de células T específicos de péptido fueron clonados por dilución limitante y los clones de las células T fueron posteriormente ensayados para el reconocimiento de péptido E2 y CPA pulsadas por proteínas E2.

[0052] La especificidad de los clones Th fue analizada como se ha descrito previamente (van der Burg et al. 1999). Particularmente, en los ensayos de proliferación donde los clones Th fueron ensayados para reconocimiento de proteínas, se usaron monocitos autólogos como CPA. Para medir la proliferación, los cultivos fueron pulsados con 0,5 Ci de [<sup>3</sup>H] timidina (5 µCi/mM, Amersham, UK) por pocillo durante 18 horas. Las placas fueron cosechadas con un Micro cell Harvester (Skatron, Noruega). Los filtros fueron empaquetados en fundas de plástico que contenían 10 ml de fluido de centelleo y posteriormente contados en un contador 1205 Betaplate (Wallac, Turku, Finlandia). Los experimentos de bloqueo de HLA clase II fueron realizados utilizando anticuerpos monoclonales murinos: anti-DQ SPV. L3, Anti-DR B8.11.2, y anti-DP B7/21. Los sobrenadantes de los ensayos de proliferación fueron cosechados 24 horas después de la incubación y analizados para presencia de IFN $\gamma$  mediante ELISA (van der Burg et al., 1999).

#### Detección de células Th de memoria por ELISPOT

[0053] Las células de memoria (CD45RO+) fueron aisladas frescas de capas leucocitarias mediante MACS tras la incubación con microesferas CD45RO (cat. nº 460-01, Miltenyi Biotec, Alemania). La pureza de la fracción de CD45RO<sup>+</sup> obtenida fue > 95% tal y como se determina mediante citometría de flujo después de la tinción superficial para CD45RO y CD45RA (CD45RA-FITC, cat. nº 347723, CD45RO- PE, cat. nº 347967, Becton Dickinson Biosciences, EE.UU). Las células CD45RO+ fueron sembradas con una densidad de 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 24 pocillos (Costar) en 1ml de IMDM suplementado con un 10% de FCS. Se añadieron 10<sup>6</sup> células autólogas irradiadas a cada pocillo como CPA. Las células respondedoras fueron incubadas con medio solo, conjuntos de péptidos E2 del VPH16 a 5 µg/ml/péptido, MRM dilución 1:50 o conjuntos de péptidos de matriz de gripe (controles positivos) y cultivadas durante 11 días para mejorar la detección de células específicas de antígeno (Mc Cutcheon et al. 1997). Las células fueron luego cosechadas, lavadas y sembradas en 4 pocillos replicados con una densidad de 5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa Multiscreen de 96 pocillos (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) recubierta con un anticuerpo atrapador de IFN $\gamma$ .

[0054] Se añadieron 10<sup>5</sup> PBMC autólogas irradiadas como CPA por pocillo junto con 5 µg/ml de péptido. El análisis de ELISPOT se realizó además según las instrucciones del fabricante (Mabtech AB, Natcha, Suecia). El análisis del número de puntos se hizo con un sistema de análisis de imágenes de vídeo asistido por ordenador completamente automatizado (Carl Zeiss Vision).

#### Tinción de citoquina intracelular (ICS) de células T de memoria

[0055] Se aislaron monocitos autólogos a partir de PBMC mediante adherencia a una placa de 48 pocillos de fondo plano durante 2 horas en medio X-vivo 15 (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) a 37°C, y luego se usaron como CPA. Las células CD45RO+ fueron estimuladas durante 11 días con péptido, luego cosechadas, lavadas y suspendidas en IMDM + 0,1 % de BSA con una concentración de 1,5 x 10<sup>6</sup> células/ml. 200 µl de suspensión celular fue añadida a los Monocitos + 200 µl de 10 µg/ml de péptido E2 del VPH16 (estimulado) o 200 µl de medio (control no estimulado). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se añadieron 800µl de IMDM + 10% de FCS + 12,5 µg/ml de Brefeldin A (Sigma) y las células fueron incubadas durante otras 5 horas. Las células fueron luego cosechadas, transferidas a una placa de 96 pocillos de fondo en V, lavadas dos veces con PBS enfriado en hielo y fijadas con 50g de paraformaldehído del 4% durante 4 minutos en hielo. Después de la fijación, las células fueron lavadas una vez con PBS fría y una vez con PBS/NaAz 0,2%/BSA 0,5%/Saponina 0,1%.

[0056] Esto fue seguido de una incubación en 50µl PBS/NaAz 0,2%/BSA 0,5%/Saponina 0,1%/FCS 10% durante 10 minutos en hielo. Las células fueron lavadas dos veces con PBS/NaAz 0,2%/BSA 0,5%/Saponina 0,1% y el sobrenadante fue retirado antes de añadir 25 µl de PBS/NaAz 0,2%/BSA 0,5%/Saponina 0,1% que contenían 1µl de IFN $\gamma$  antihumano de ratón marcado con FITC (0,5 g/ml, BD Pharmingen, cat. nº 554551), 2µl de anti-CD4 marcado con PE (BD Bioscience, cat. nº 345769) y 2µl de anti-CD8 marcado con PerCP (BD Bioscience, cat. nº 347314). Después de 30 minutos de incubación a 4°C, las células fueron lavadas, suspendidas en 100 µl de paraformaldehído y analizadas por citometría de flujo.

#### Búsqueda de homología en la base de datos de proteínas

[0057] La búsqueda de homología de secuencias de los péptidos E2 del VPH 16 superpuestos en una base de datos de proteínas (SWISSPROT) se realizó utilizando Basic Local Alignment Tool (BLAST: [www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi)) estándar. El umbral de significación estadística (EXPECT) fue 10 (Altschul et al., 1997). Se incluyeron las coincidencias referidas con homología > 60% de los aminoácidos con los péptidos de E2 del VPH16.

Resultados

Reactividad alta de PBMC de donante sano contra los péptidos derivados de E2 del VPH16.

5 [0058] Examinamos las respuestas proliferativas de PBMC de donante sano contra la proteína E2 del VPH16 usando una colección de péptidos 30-mer superpuestos cubriendo toda la secuencia E2. La incubación de PBMC recientemente aisladas de 8 donantes tipificados por su HLA con cada uno de los 23 péptidos 30-mer derivados de E2 mostró que 4 de los 8 donantes reaccionaron a 2 o más de los péptidos. Las respuestas proliferativas específicas del péptido E2 observadas fueron notablemente fuertes (tabla IV). En todos los casos más del 75% de los microcultivos paralelos reaccionaron contra el péptido estimulador. Por ejemplo, en dos experimentos independientes encontramos que la proliferación específica de péptido del donante # 8 contra los péptidos E2<sub>31-60</sub>, E2<sub>46-75</sub>, E2<sub>91-120</sub>, E2<sub>151-180</sub>, E2<sub>271-300</sub> y E2<sub>286-315</sub> excedía la proliferación de base en el 75-94% de los ocho micro cultivos paralelos ensayados. Esto apunta a la presencia de una frecuencia muy alta de células T específicas de E2 en los aislados de PBMC. En particular, las PBMC de los donantes # 3, 5 y 8 mostraron fuertes respuestas con una amplia especificidad. Nótese que los péptidos 30-mer tienen un solapamiento de 15 aminoácidos con sus péptidos vecinos. Por consiguiente, las respuestas contra los péptidos adyacentes (p. Ej. donante # 3; E2<sub>31-60</sub> y E2<sub>46-75</sub>) muy probablemente impliquen al mismo epítipo, mientras que las respuestas contra los péptidos no adyacentes están dirigidas contra epítopos distintos.

20 [0059] No solo la frecuencia de cultivos que responden sino también la magnitud de las respuestas proliferativas fue notablemente alta. La proliferación específica de péptido de diferentes cultivos de los donantes # 3, 5 y 8 excedió la base con índices de estimulación medios que varían de 9,2 a 16,5 y, como tales, son comparables a respuestas encontradas contra el antígeno de toxoide tetánico en varios de los donantes (# 3, 4, 5 y 7; IE que varía de 13,3 a 25; ver tabla IV). Estos índices de estimulación claramente exceden el umbral (IE ≥ 3) que se usa comúnmente para la detección de respuestas de células T de memoria (Bermas et al., 1997).

30 [0060] Nótese que las respuestas contra el toxoide tetánico son considerablemente superiores en alguno de los otros donantes (IE ≥ 100 en los donantes # 3 y 6), pero que estos fuertes valores muy probablemente representan respuestas muy amplias contra los múltiples epítopos comprendidos por un antígeno entero, antes que contra un único péptido E2 30-mer. Reunidos, nuestros datos indican que el repertorio de células T de donantes sanos puede contener frecuencias particularmente altas de células T específicas para el antígeno de E2 del VPH16 dando como resultado fuertes respuestas proliferativas, y sugieren que estas respuestas pueden reflejar células T de memoria.

35 [0061] Tabla IV inmunogenicidad de péptidos derivados de E2 del VPH 16. EMI32.1

Tabla IV inmunogenicidad de péptidos derivados de E2 del VPH 16.

	D1 <sup>1</sup>	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
E2 <sub>1-30</sub> <sup>2</sup>								
E2 <sub>16-45</sub>								
E2 <sub>31-60</sub>			81% (8,8) <sup>3</sup>					88% (8,6)
E2 <sub>46-75</sub>			88% (5,5)		81% (6,8)			94% (6,6)
E2 <sub>61-90</sub>								
E2 <sub>76-105</sub>								
E2 <sub>91-120</sub>					94%(4,8)			75% (4,0)
E2 <sub>106-135</sub>								
E2 <sub>121-150</sub>								
E2 <sub>136-165</sub>								
E2 <sub>151-180</sub>			81% (6,4)					81% (4,1)
E2 <sub>166-195</sub>			94% (16,5)		81% (10,6)			

ES 2 519 043 T3

E2 <sub>181-210</sub>								
E2 <sub>196-225</sub>								
E2 <sub>211-240</sub>								
E2 <sub>226-255</sub>								
E2 <sub>241-270</sub>								
E2 <sub>256-285</sub>								
E2 <sub>271-500</sub>								88% (4,8)
E2 <sub>286-315</sub>			88% (16,2)					94% (9,2)
E2 <sub>301-330</sub>								
E2 <sub>316-345</sub>							94% (4,7)	
E2 <sub>331-365</sub>			100% (11,4)				75% (4,1)	
TT	100% (29,1)	100% (56,5)	100% (25)	100% (16,4)	100% (23,5)	100% (139)	100% (13,3)	100% (59)

<sup>1</sup> D: Donante, Ocho diferentes donantes de sangre sanos fueron ensayados.  
<sup>2</sup> Los péptidos E2 de HIV16 son indicados por el primer y último aminoácido. TT es el antígeno de recuerdo típico de toxoide tetánico.  
<sup>3</sup> Los péptidos fueron marcados positivo, cuando - en ambos ensayos - la proliferación de > 50% de los pocillos de prueba excedió la proliferación media +3 \* DT de los pocillos de control, y el índice de estimulación (IE) de los pocillos de prueba positivos sobre los pocillos de control de medio fue superior a 3. Sólo las puntuaciones positivas se representan como el porcentaje medio de pocillos que exceden el medio de control + 3 \* DT de los porcentajes encontrados en ambos ensayos. Entre paréntesis el índice de estimulación medio de todos pocillos de prueba de ambos ensayos.

Cultivos Th específicos de E2 de VPH16 reconocen epítomos procesados naturalmente

5 [0062] Los datos de proliferación apuntaron la existencia de múltiples epítomos de Th inmunogénicos dentro de E2 del VPH16. Realizamos un análisis más detallado de la naturaleza y especificidad de tales respuestas, centrándonos de este modo en las regiones N-terminal y C-terminal que nuestros datos (tabla IV) revelaron que comprendían diferentes péptidos altamente inmunogénicos. Los péptidos solapados comprendidos en esta región C-terminal (E2<sub>271-300</sub>; E2<sub>286-315</sub>; E2<sub>301-330</sub>; E2<sub>316-345</sub>; E2<sub>331-365</sub>) fueron ensayados para su capacidad de enlazarse a moléculas de HLA-DR. Cada uno de los cinco péptidos mostró enlace de intermedio a fuerte con dos o más de las moléculas de HLA-DR comunes evaluadas (tabla V), lo que respalda la noción de que estos péptidos pueden, de hecho, representar epítomos de Th restringidos por el CMH clase II.

Tabla V. afinidad de enlace de péptidos derivados de E2 de VPH16 para diferentes tipos de HLA-DR

Secuencia de aminoácidos	VPH16-E2	DR1	DR2	DR3	DR4
FNSSHKGRINCNSNTTPIVHLKGDANTLKC	271-300	22	65	37	>70
TPIVHLKGDANTLKLRYRFKHLTCYTAV	286-315	8	68	20	>70
LRYRFKHLTCYTAVSSTWHWTGHNVKHKS	301-330	6	8	>70	10
SSTWHWTGHNVKHKS AIVTLTYDSEWQRDQ	316-345	6	55	30	>70
AIVTLTYDSEWQRDQFLSQVKIPKTITVSTGFMSI	331-365	8	20	10	15

La afinidad de enlace de cada péptido se expresa como el valor IC<sub>50</sub>: esta es la concentración de péptido (µM) a la cual el enlace del péptido marcado por fluorescencia estándar se reduce al 50% de su valor máximo. >70 representa enlace no detectable

15 [0063] Posteriormente, cultivos Th a largo plazo específicos de E2 fueron generados a través de la estimulación de PBMC de donantes de sangre sanos tipificados por su HLA, a intervalos semanales, o bien con los péptidos E2<sub>271-300</sub> y

E2<sub>286-315</sub>, o bien con los péptidos E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub>, o bien con el péptido E2<sub>331-365</sub> o con el péptido E2<sub>46-75</sub>. Las PBMC de 2 donantes mostraron fuertes respuestas proliferativas específicas de péptido contra uno o más de los péptidos estimuladores (datos no mostrados). A través de clonación vía dilución limitante de estos cultivos, tuvimos éxito en el aislamiento de clones de célula T estable, que mostraban uniformemente un fenotipo CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, contra seis péptidos epítomos diferentes. Dos de estos clones Th fueron establecidos de HLA-DR15 (2)-, -DQ6 (1)-PBMC estimulados con E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub>. Aunque ambos clones Th reconocieron E2<sub>301-830</sub>, el análisis en profundidad de la especificidad de estos clones Th reveló que reconocían secuencias distintas, aunque superpuestas, restringidas por diferentes moléculas del HLA clase II. Uno de los clones reconoció el péptido E2<sub>316-330</sub> en el contexto de HLA-DR15 (2), mientras que el otro clon era específico para el péptido E2<sub>311-325</sub> en el contexto de HLA-DQ6 (1) (figuras 5,6). Los otros dos clones Th estaban relacionados de forma similar, en cuanto a que uno reconoció el péptido E2<sub>346-355</sub> en el contexto de DR15 (2), mientras que el otro reaccionó contra E2<sub>351-365</sub> de manera restringida por DR1 (figuras 7,8). Particularmente, estos datos están en correspondencia con los datos de enlace de péptidos de la tabla V, en cuanto a que se encontró de hecho que variantes más largas de estos epítomos restringidos por DR15(2) y DR1 se enlazaban con las moléculas restrictivas del HLA (ensayo de enlace no disponible para HLA-DQ6). Además, se encontró que dos clones reaccionaban al péptido E2<sub>46-75</sub>, uno reaccionó contra el péptido E2<sub>51-70</sub> de manera restringida por HLA-DR4 y el otro clon reaccionó contra el péptido E2<sub>61-75</sub> (figura 15). Evidencia adicional de que los cuatro péptidos E2 identificados representan epítomos de Th fisiológicamente relevantes es proporcionada por el hecho de que los clones Th específicos de E2 no solo respondieron contra las CPA cargadas con péptidos, sino que también respondieron específicamente contra las CPA que fueron pulsadas con la proteína E2 (figuras 5-8). Ya que en este último caso la presentación de los péptidos epítomos depende de la absorción y procesamiento del antígeno E2, y no meramente de la carga exógena de moléculas de clase II en la superficie celular de las CPA, estos datos proporcionan la prueba definitiva de que los cuatro péptidos E2 reconocidos por nuestros clones Th corresponden a epítomos procesados naturalmente. Finalmente, los cuatro clones Th produjeron IFN $\gamma$  tras estimulación antigénica, que es indicativo de un perfil de citoquina de Th tipo 1. Reunidos, nuestros datos muestran que el repertorio de células T de individuos sanos alberga células Th CD4<sup>+</sup> específicas de E2 secretoras de IFN $\gamma$  (figuras 5-8).

#### Detección de células Th de memoria específicas de E2 del VPH16 en individuos sanos

[0064] La sorprendentemente frecuente detección de inmunidad Th específica contra E2 del VPH16 en individuos sanos, como se describe en el primer párrafo, nos incitó a analizar si el repertorio de células T subyacente representaría memoria inmunológica como resultado de un encuentro previo con antígenos, o si consistiría principalmente en precursores de células T naive particularmente abundantes específicas para este antígeno. En vista de la alta incidencia de infecciones de VPH genitales, generalmente transitorias, en individuos jóvenes sexualmente activos (Karlsson et al., 1995; Koutsky et al., 1997; Ho et al., 1998), así como la expresión prominente de E2 durante la infección de VPH, parece concebible que la memoria de células T contra E2 sea encontrada en sujetos sanos. Examinamos la naturaleza de la inmunidad específica contra E2 del VPH 16 que detectamos a través del análisis de la reactividad específica de E2 de la fracción CD45RO<sup>+</sup> de PBMC de donante sano, que contiene células T experimentadas de antígeno pero está desprovista de sus equivalentes naive (Young et al., 1997). Debido a que encontramos que el repertorio de células T de donantes sanos contenía células Th que producen IFN $\gamma$  (figuras 5-8), medimos las respuestas de las células T específicas de antígeno a través de IFN $\gamma$  ELISPOT. Primero analizamos la reactividad de las células T CD45RO<sup>+</sup> de dos donantes sanos mientras centramos nuestra atención en una selección de péptidos E2 que, basándonos en nuestros experimentos precedentes (tabla IV), parecen estar localizados en las regiones más inmunogénicas de E2 del VPH16.

[0065] Resultó interesante encontrar que estas PBMC CD45RO<sup>+</sup> respondían contra múltiples péptidos E2 (figura 9a, b), respaldando la noción de que los sujetos sanos pueden mostrar memoria de célula T específica de E2 del VPH16. Confirmamos que las células respondedoras que producen IFN $\gamma$  pertenecían al subconjunto de células Th CD4<sup>+</sup> empleando tinción de citoquina intracelular de IFN $\gamma$  en vez de ELISPOT como lectura (no mostrado). Una inspección más amplia de la reactividad específica de E2 contra la colección completa de péptidos, usando PBMC CD45RO<sup>+</sup> de 8 donantes sanos adicionales, reveló que 4 de estos aislados de PBMC respondieron contra uno o más de los péptidos E2 del VPH16 (figura 9c-f y no mostrado). Reunidos, nuestros datos revelan la presencia de células Th secretoras de IFN $\gamma$  de tipo memoria CD45RO<sup>+</sup> reactivas contra los péptidos E2 del VPH16 en aproximadamente la mitad de los donantes sanos ensayados. Particularmente, la incidencia por la que estas respuestas son detectadas es muy similar a la del subconjunto más fuerte de respuestas proliferativas encontrado en las PBMC totales (tabla IV), implicando que también estas respuestas probablemente representan reactividad por células T de memoria antes que por células T naive cebadas in vitro.

#### Reactividad cruzada de clones Th específicos de E2 del VPH16 con secuencias peptídicas de otros tipos de VPH

[0066] Debido a la naturaleza común de las infecciones del VPH, es probable que una mayoría de la población humana se encuentre con múltiples tipos de VPH (Thomas et al. 2000; Koutsky et al. 1997). Además, las secuencias proteínicas de los productos genéticos víricos son conservadas en un grado considerable entre tipos de VPH. Es, por lo tanto, posible que al menos una fracción del repertorio de células T inducida por un encuentro previo con un tipo dado de VPH pudiera reaccionar en forma cruzada, y por lo tanto proteger en forma cruzada, durante la infección posterior con otros tipos de VPH. El alineamiento de la secuencia de la proteína E2 del VPH16 con la de varios otros tipos de VPH reveló que es más prominentemente conservada con las de otros tipos de alto riesgo. Aunque esta conservación es algo menos conspicua cuando la secuencia E2 del VPH es comparada con la de tipos de bajo

riesgo o comunes, es evidente que en todos los casos la conservación máxima está confinada a ciertas regiones en la secuencia E2. En particular, tres áreas de E2 del VPH16 comparten homología con E2 de otros tipos de VPH: las porciones E2<sub>31-120</sub> y E2<sub>151-195</sub> del N-terminal así como la porción E2<sub>271-365</sub> del C-terminal. Estas regiones están co-localizadas con los dominios funcionales principales de E2, en cuanto a que el dominio N-terminal alberga las funciones de activación transcripcional de esta proteína mientras que la porción del C-terminal media en sus propiedades de enlace de ADN específicas de secuencia. Las secuencias participantes que varían de los residuos 210 a 270 constituyen la llamada región bisagra que conecta dos dominios funcionales clave, que están pobremente conservados entre tipos de VPH. Es importante notar que nuestros análisis de respuestas específicas de E2 en los ensayos de proliferación a corto plazo han revelado que los péptidos más inmunogénicos se acumulan en los dos dominios conservados de la secuencia E2 del VPH16 (ver tabla IV). En vista de estas consideraciones, evaluamos si nuestros clones Th establecidos, cultivados contra epítomos derivados de la parte del C-terminal de la secuencia E2 del VPH16 (figura 5-8), serían capaz de reaccionar de manera cruzada con péptidos E2 de varios otros tipos de VPH que compartían homología máxima con el VPH16 con respecto a esta secuencia E2 particular. De hecho, el clon Th específico de E2<sub>311-325</sub> restringido por DQ6 mostró un firme reconocimiento de los péptidos correspondientes de los tipos 26, 31, 35 y 45 (no mostrado) del VPH. La homología de aminoácidos dentro de este epítomo varía del 73 al 87% (idénticos o aminoácidos con propiedades físico-químicas similares). Nuestros otros clones Th no revelaron reactividad cruzada considerable para péptidos E2 altamente homólogos de otros tipos de VPH (no mostrado).

[0067] Estos datos indican que parte de la memoria Th reactiva con E2 del VPH16 detectada en nuestros ensayos puede tener relación con encontrar tipos de VPH diferentes del VPH16, pero también sugiere que la mayoría de este repertorio inmunológico fue muy probablemente establecida a través del encuentro con el propio VPH 16.

### Ejemplo 3

#### Material y métodos

#### Sujetos y controles

[0068] Se obtuvieron PBMC de donantes de banco de sangre sanos anónimos (D). Debido a que estos donantes son anónimos, no hay datos adicionales disponibles. No obstante, los donantes con una historia reciente conocida de infecciones, incluyendo prueba de Papanicolau anormal, fueron, como parte de las regulaciones normales, disuadidos de donar sangre.

[0069] El estudio de sujetos (S; tabla II) con NIC o carcinoma cervical en este artículo fue incluido en el "estudio CIRCLE" que investiga la inmunidad celular contra lesiones cervicales infectadas por el VPH16. Las mujeres que presentaban NIC III o carcinoma cervical histológicamente probado en el departamento de ginecología del Leiden University Medical Center (LUMC) fueron, después del consentimiento informado, inscritas en este estudio. El diseño del estudio fue aprobado por el comité de ética del LUMC. La sangre fue extraída el día del tratamiento. Sujetos con NIC III fueron tratados por LEEP o conización con bisturí. En caso de estadio IB-IIA se realizó una histerectomía radical. Los sujetos fueron tipificados por VPH 16 usando cebadores específicos del VPH16 en ADN aislado de secciones embebidas en parafina de biopsias o muestras de resección quirúrgica (Claas et al., 1989). Ya que se esperaba encontrar la respuesta auxiliar T específica del VPH en sujetos con enfermedad progresiva (de Gruijl et al., 1998), elegimos analizar tres sujetos que presentaban NIC III, 4 sujetos con cáncer cervical en estadio IB y 4 sujetos con cáncer cervical recurrente.

#### Antígenos.

[0070] Los péptidos usados que abarcan la proteína E6 consistían en 15 péptidos 22-mer superpuestos y están indicados por su primer y último aminoácido en la proteína (1-22, 11-32, 21-42, 31-52, 41-62, 51-72, 61-82, 71-92 y así sucesivamente, el último péptido consiste en el aminoácido 137-158). Los péptidos fueron sintetizados y disueltos como se ha descrito previamente (van der Burg et al., 1999).

[0071] Mezcla de respuesta de memoria (MRM): una mezcla de toxoide tetánico (1 LF/ml; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Países Bajos) y sonicado de Mycobacterium tuberculosis (2,5 µg/ml; generosamente donado por el Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, Países Bajos) fue usada para controlar la capacidad de las PBMC para proliferar en respuesta a antígenos de recuerdo típicos.

#### Análisis de células T específicas de antígeno mediante ELISPOT.

[0072] Las PBMC fueron sembradas con una densidad de  $2 \times 10^6$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 1ml de medio de ISCOVE (Gibco) enriquecido con un 10% de FCS, en presencia o ausencia de 5 µg/ml del péptido 22-mer derivado de E6 de indicado. Como control positivo las PBMC fueron cultivadas en presencia de conjuntos indicados de péptidos derivados de proteína M1 de la gripe A/PR/8/34, que consistían en 4 péptidos superpuestos de 30 aminoácidos de longitud en cada grupo.

[0073] En el caso en que se usaron células CD45RO+, las células CD45RO+ fueron sembradas con una densidad de  $10^6$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos (Costar) en 1 ml de IMDM suplementado con un 10% de FCS junto con

un péptido o conjunto de péptidos indicados con una concentración de 10µg/ml/péptido.

5 [0074] Después de 4 días de incubación a 37°C, las PBMC fueron cosechadas, lavadas y sembradas en 4-6 pocillos replicados con una densidad de 10<sup>5</sup> células/pocillo en una placa Multiscreen de 96 pocillos (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) recubiertos con un anticuerpo atrapador de IFNγ (Mabtech, aB Nacha, Suecia). El ELISPOT fue además realizado según las instrucciones del fabricante (Mabtech). El número de puntos fue analizado con un sistema de análisis de imágenes de vídeo asistido por ordenador completamente automatizado (Carl Zeiss Vision).

10 [0075] Los puntos específicos fueron calculados sustrayendo el número medio de puntos + 2xDT del control de sólo medio al número medio de puntos de los pocillos experimentales. Se consideró que las frecuencias de células T específicas de antígeno se incrementaron en comparación con las no respondedoras cuando las frecuencias de células T eran = 1/10.000 PBMC.

15 Aislamiento de la fracción de memoria CD45RO+ de las PBMC

20 [0076] Las células de memoria (CD45RO+) fueron aisladas frescas de capas leucocitarias mediante MACS tras la incubación con microesferas CD45RO (cat. nº 460-01, Miltenyi Biotec, Alemania). La pureza de la fracción de CD45RO<sup>+</sup> obtenida fue > 95% tal y como se determina mediante citometría de flujo después de la tinción superficial para CD45RO y CD45RA (CD45RA-FITC, cat. nº 347723, CD45RO- PE, cat. nº 347967, Becton Dickinson Biosciences, EE.UU).

Resultados

25 [0077] En vista de la alta incidencia de infecciones de VPH genitales, generalmente transitorias, en individuos jóvenes sexualmente activos (Karlsson et al., 1995; Koutsky et al., 1997; Ho et al., 1998), así como la expresión prominente de la inmunidad específica contra E2 del VPH16 (véase ejemplo 2) en aproximadamente la mitad de los sujetos sanos ensayados, estudiamos la respuesta natural específica de E6 del VPH16 inducida in vivo, en la población humana por medio del ensayo IFNγ ELISPOT de 4 días. Este ensayo detecta sólo células T auxiliares de memoria, que tras estimulación segregarán IFNγ mientras que sus equivalentes naive no lo harán (véase ejemplo 1 y 2, y referencias en ellos). Una inspección de la reactividad específica de E6 contra la colección completa de péptidos presente en PBMC de 30 18 donantes de sangre sanos, reveló que 11 de estos 18 (> 60%) aislados de PBMC respondió contra uno o más de los péptidos E6 del VPH 16 (tabla VIa).

35 [0078] La mayoría de las respuestas se encontraron en el extremo C-terminal de E6 (E6<sub>81-158</sub>). Además, todos los donantes sanos reaccionaron contra la proteína de la matriz 1 de la gripe del antígeno de recuerdo típico. Las frecuencias tanto de la gripe M1 como de las células T auxiliares específicas de E6 del VPH 16 eran de magnitud comparable. Resulta interesante que, un estudio similar en pacientes VPH16+ reveló que solo 3/12 (25%) reaccionaron contra los péptidos E6 del VPH16 indicando que la respuesta E6 encontrada en sujetos sanos es protectora contra la enfermedad.

Tabla VI. Detección de la reactividad de auxiliares T específicas de E6 del VPH16 en PBMC de donante sano

Donante <sup>1</sup>	1-22 <sup>2</sup>	11-32	21-42	31-52	41-62 <sup>3</sup>	51-72	81-82	71-92	81-102	191-112	101-122	111-132	121-142	131-152	137-158	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4
1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	16	<1	<1
2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	2	26	12	7
3	<1	4	<1	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	8	18	4	30	7	19	<1
4	<1	<1	<1	10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	22	15	14	10
5	<1	5	1	1	2	9	5	7	6	10	2	8	5	8	1	7	10	12	37
6	3	34	<1	9	<1	<1	2	<1	11	14	6	12	10	<1	6	<1	33	41	5
7	<1	2	1	<1	<1	<1	<1	<1	2	14	<1	<1	1	3	14	6	21	57	28
8	4	4	<1	<1	9	<1	<1	<1	12	14	3	6	7	3	<1	27	38	34	16
9	2	<1	7	3	<1	<1	4	<1	<1	3	<1	<1	3	<1	<1	22	10	14	4
10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	7	<1	<1	13	23	19	11
11	2	<1	<1	2	<1	<1	<1	7	3	4	2	15	10	27	17	33	28	24	52
12	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	14	15	<1	5	10	12	<1
13	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	1	21
14	5	5	<1	10	5	<1	2	20	12	5	28	18	37	40	2	12	42	28	45
15	18	16	4	15	2	1	<1	3	12	21	8	11	8	<1	<1	52	68	64	5
16	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	39	66	49	48
17	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	3	<1	66
18	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1	<1	2	<1	<1	11	1	1	<1	<1	1	10	<1

<sup>1</sup>18 donantes sanos diferentes fueron ensayados

<sup>2</sup> Se indica el primer y último número de aminoácido de los péptidos derivados de E6 del VPH16. M1P1=M1P4 son los cuatro conjuntos diferentes de 4 péptic longitud, superpuestos en 15 residuos, derivados de un proteina de la matriz T de la gripe A (Inf A/PR/8/34).

<sup>3</sup> Se indica el número de puntos específicos por cada 100.000 PBMC. Los puntos en negrita indican frecuencias de células T > 1/10.000. medio de puntos después de la estimulación con el péptido. Los números en negrita indican frecuencias de células T > 1/10.000.

Tabla VIIb. Detección de la reactividad de auxiliares T específica de E6 del VPH16 en pacientes de VPH16+

paciente	1-22	11-32	21-42	31-52	41-62	51-72	61-82	71-92	81-102	91-112	101-122	111-132	121-142	131-152	137-158	M1P1	M1P2	M1P3	M1P4	
C40	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3
C41	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	10	<1	<1
C43	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	4	<1	<1
C47	<1	<1	<1	28	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	13	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C57	<1	<1	<1		<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	<1	<1	22	<1	<1	2	62	30	<1
C58	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C63	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1
C66	<1	<1	<1	<1	<1	11	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	31	<1	13	<1	<1
C73	<1	<1	<1	<1	2	1	<1	3	4	5	<1	6	7	7	9	5	2	4	2	2
C75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	15	<1	<1
C80	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	1	2	<1	1	1	<1	2	<1	7	2	7	1	1
C91	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	3	2	<1	<1	<1

[0079] Para confirmar nuestra observación de que las células T de memoria específicas del VPH 16 estaban presentes en una gran fracción de la población humana, aislamos la fracción de memoria específica CD45RO<sup>+</sup> de las PBMC antes de que fueran sometidas a estimulación con péptidos E6 del VPH16. Después de una estimulación de 4 días se pudo detectar una respuesta para E6 del VPH16. Reunidos, nuestros datos revelan la presencia de células T auxiliares secretoras de IFN $\gamma$  tipo memoria CD45RO<sup>+</sup>, reactivas contra ambos péptidos E6 del VPH16 en aproximadamente la mitad de los donantes sanos ensayados.

[0080] Además, PBMC de dos donantes de sangre diferentes positivos de HLA-DRI fueron estimuladas con un conjunto de dos péptidos 35-mer largos que cubrían juntos E6<sub>109-158</sub>. Las PBMC de estos donantes proliferaron específicamente contra el péptido E6<sub>121-142</sub> y el péptido E6<sub>127-158</sub> así como contra la proteína E6. Un clon auxiliar T CD4<sup>+</sup> derivado de una de estas masas fue adicionalmente analizado, proliferó específicamente y produjo IFN $\gamma$  cuando se estimuló con péptido E6 del VPH 16 y proteína E6 del VPH 16 en una manera restringida por HLA-DRI (figura 16).  
Conclusiones

[0081] A través del análisis de las respuestas IFN $\gamma$  en cultivos de PBMC de sujetos sanos contra el antígeno E6 del VPH 16 hemos demostrado que esta proteína contiene secuencias peptídicas altamente inmunogénicas para las que se detecta fuerte reactividad de células T en aproximadamente la mitad de estos donantes. Exámenes posteriores de la fracción de memoria CD45RO<sup>+</sup> de PBMC de donante sano revelaron que estas células T CD4<sup>+</sup> secretoras de IFN $\gamma$  específicas de E6 del VPH16 estaban presentes en la fracción de memoria de las células T de las PBMC y de este modo han sido cebadas in vivo tras el encuentro con el VPH. Un estudio similar demostró que las células T secretoras de IFN $\gamma$  específicas de E6 del VPH 16 estaban casi ausentes en los pacientes del VPH 16+. Reunidos, nuestros datos demuestran que el repertorio de células T de una mayoría de los sujetos sanos contiene frecuencias particularmente altas de células auxiliares T productoras de citoquina tipo 1 de memoria reactivas contra el antígeno E6 del VPH 16 e indica que son protectoras contra la enfermedad.

[0082] Es importante notar que no hemos encontrado ningún informe precedente que concierna a la presencia de respuestas de células T de memoria contra E2 y E6 o cualquiera de las otras proteínas no estructurales del VPH 16 en individuos sanos. De hecho, individuos sanos han servido en muchos casos como control negativo para las condiciones de cultivo usadas. Hemos mostrado ahora, en dos estudios independientes (ejemplo 2 y ejemplo 3), que las PBMC derivadas de donante sano contienen células T auxiliares específicas del VPH 16. La mayoría de las respuestas auxiliares T se dirigen contra las regiones específicas en E2 y E6. La presencia de estas células T auxiliares de tipo memoria muestra que estos individuos han encontrado una infección de VPH16, respondido a ésta a través de las células T del brazo celular del sistema inmunológico y eliminando la infección. Este implica que la respuesta de las células T a estos antígenos es una parte de la respuesta de protección para la infección del VPH.

[0083] La inducción o estimulación de este tipo de respuestas puede por lo tanto ser una herramienta potente en la protección contra las enfermedades inducidas por VPH.

#### Ejemplo 4

##### Material & métodos

[0084] Se vacunó a ratones C57/B16 macho (n=8 por grupo) con, o bien 10  $\mu$ g del epítipo de LTC derivado de E1A exacto (SGPSNTPPEI), o bien con 30  $\mu$ g del péptido purificado con HPLC de 32 aminoácidos de largo RECNSSTDSCDSGPSNTPPEMPVVRLCPIYP que contiene este epítipo de LTC. Los péptidos fueron disueltos en PBS y mezclados en una proporción 1:1 con IFA. Los ratones fueron vacunados subcutáneamente con péptido en un volumen de 200  $\mu$ l el día 1. Catorce días más tarde los ratones fueron provocados con 0,5x10<sup>6</sup> células tumorales AR5 (células de embrión de ratón transformadas E1A + Ras). La supervivencia de los ratones fue monitorizada durante un periodo de seguimiento de 100 días.

##### Resultados

[0085] La vacunación con péptidos sintéticos que representan epítipos de linfocitos T citotóxicos (LTC) puede conducir a una inmunidad protectora mediada por LTC contra tumores o virus. Las células tumorales B6 transformadas por la región 1 temprana de adenovirus humano (Ad5E1) presentan al sistema inmunológico un epítipo de LTC codificado por Ad5E1A y Ad5E1B. Los clones de LTC dirigidos contra cualquiera de estos epítipos son capaces de erradicar tumores establecidos inducidos por Ad5E1, mostrando que estos epítipos de LTC son las dianas de LTC que pueden mediar la regresión tumoral. La inmunidad protectora contra células tumorales que expresan Ad5E1 se puede establecer mediante inmunización con células transformadas por Ad5E1 y con un vector de adenovirus que contiene la región Ad5E1. La inmunidad protectora, en ambos casos, está asociada con memoria de LTC específica. No obstante, cuando los ratones fueron vacunados, o bien con la secuencia de péptido-epítipo mínima del epítipo de LTC derivado de E1A, o bien con la secuencia de péptido-epítipo mínima del epítipo de LTC derivado de E1B, la protección contra tumores que expresan Ad5A1 se perdió.

[0086] La vacunación con un epítipo de LTC derivado de la región E1A del adenovirus humano tipo 5 (Ad5E1A234-243), aumenta en vez de inhibir el crecimiento de los tumores que expresan Ad5E1A. A diferencia de la vacunación con

péptido, la inmunización con adenovirus, que expresa Ad5E1A, indujo inmunidad específica contra Ad5E1A y evitó el brote de tumores que expresan Ad5E1A. Estos resultados muestran que la inmunización con péptidos sintéticos puede conducir a la eliminación de respuestas antitumorales de los LTC (Toes et al., 1996a). Además, los ratones vacunados s.c. con una dosis baja del péptido Ad5E1B también mostraron esta reacción adversa. El péptido Ad5E1B fue elegido porque la respuesta de los LTC contra el epítipo de LTC codificado por Ad5E1B contribuye mayoritariamente a la respuesta antitumoral en ratones B6 después de la vacunación con células transformadas con Ad5E1.

Los ratones vacunados con péptido Ad5E1B no fueron protegidos contra el brote de células tumorales que expresan Ad5E1, en su lugar ya no fueron capaces de rechazar un inóculo tumoral que fue rechazado por ratones no vacunados.

[0087] Además, la protección inducida por vacunación de célula tumoral contra tumores que expresan Ad5E1B desapareció cuando el epítipo de LTC codificado por Ad5E1B fue inyectado unos días antes de la provocación del tumor. Esto está asociado a la tolerancia inducida por péptido de la actividad de LTC específica de Ad5E1B (Toes et al. 1996b).

[0088] En conclusión, la inmunización con péptidos sintéticos de la longitud exacta del epítipo de LTC, puede también conducir a tolerancia de LTC asociada a la incapacidad para rechazar tumores. La cuestión de la tolerancia o la eliminación funcional de LTC mediante inmunización con epítopos mínimos se evita mediante el uso de péptidos largos (22-35 residuos de aminoácidos). Para probar esta afirmación vacunamos a ratones C57/B16 con un péptido derivado de E1A de 32 aminoácidos de longitud que contiene el epítipo de LTC derivado de E1A de 10 aminoácidos de longitud, el cual, cuando es dado como el péptido-epítipo exacto, está implicado en la pérdida de protección contra el tumor. Como se muestra en FIG. 10, los ratones de control (n=8) que han sido vacunados con el péptido-epítipo exacto SGPSNTPPEI, mueren todos 50 días después de la provocación del tumor. En cambio, el grupo de ratones vacunado con el péptido de 32 aminoácidos de longitud estaban todos vivos a los 50 días y solo un ratón se perdió durante el periodo de seguimiento de 100 días.

#### Conclusión

[0089] Para un método clínicamente relevante de inmunizar sujetos contra células infectadas de forma vírica o células tumorales, se deberían inducir tanto células T auxiliares específicas como LTC. Hemos mostrado ya que la inmunización con epítopos de LTC mínimos produce protección contra los tumores en algunos modelos (Kast et al. 1991, Feltkamp et al. 1993), mientras que puede también conducir a tolerancia o eliminación funcional de LTC específicos de virus y de tumor, que cuando se inducen de otra manera son protectores (Toes et al. 1996ab). El procesamiento de antígenos exógenos para presentación por moléculas del CMH clase I mediante cebado cruzado así como por otros mecanismos es ahora una segunda vía ampliamente reconocida de procesamiento para la presentación por CMH clase I, junto a la bien conocida vía endógena (Jondal et al., 1996, Reimann et al. 1997). Hemos mostrado ahora que en contraste con la vacunación de ratones con el péptido-epítipo exacto, la vacunación con secuencias peptídicas largas que contienen epítopos de LTC no supone la pérdida de LTC que estén implicados en la protección de ratones contra los tumores, sino que en cambio supone una respuesta inmune mediada por LTC que protege a los ratones contra una provocación de tumor posterior.

#### Ejemplo 5

[0090] Ratones y líneas celulares. Se obtuvieron ratones C57BL/6 (B6; H-2<sup>b</sup>) de IFFA Credo (París, Francia). Se compraron ratones B6 del CMH Clase II<sup>-/-</sup> en Taconic (EE.UU) y se obtuvieron ratones B6 de CD40<sup>-/-</sup> de The Jackson Laboratory (Maine, EE.UU). La línea celular tumoral TC-1 fue generada mediante transfección de células embrionarias de ratón (MEC) de origen C57BL/6 por E6/E7 del VPH 16 y oncogenes c-H-ras. La línea celular tumoral 13.2 fue derivada de MEC (B6) transformada con proteína E1 derivada de adenovirus tipo 5, en la cual el epítipo E1A de H-2Db fue sustituido con el epítipo de LTC de E7<sub>49-57</sub> del VPH 16. Las células D1 son células dendríticas (DC) esplénicas inmaduras dependientes del factor de crecimiento a largo plazo derivadas de ratones C57BL/6.

[0091] Péptidos. Los péptidos E7<sub>49-57</sub>: RAHYNIVTF y E7<sub>43-77</sub>: GQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTVDIR derivados de E7 del VPH16 fueron sintetizados mediante estrategias de fase sólida en un sintetizador de péptidos múltiple automatizado (Abimed AMS 422, Langenfeld, Alemania). Los péptidos fueron analizados por HPLC en fase inversa para contaminantes y almacenados a -20 °C.

[0092] Tetrámeros y anticuerpos. Tetrámeros que contenían E7<sub>49-57</sub> (RAHYNIVTF) epítipo H-2Db marcados por PE fueron construidos y usados para el análisis de inmunidad LTC específica de péptido. Anti-CD8b.2 Ab (Ly-3.2) (clon 53-5.8) marcado por FITC, anti CD4 Ab (L3T4) (clon RM4-5) marcado por CPA y Ab anti-IFN $\gamma$  marcado por PE (clon XMG1.2) (BD PharMingen, San Diego, EE.UU) fueron usados en los diferentes procedimientos FACS.

[0093] Adyuvancia. Se obtuvo IFA (adyuvante incompleto de Freund) de Difco Laboratories (Michigan, USA). Se compró Montanide ISA 51 a Seppic (París, Francia). Los oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) 1826 fueron amablemente proporcionados por el Dr. G. B. Lipford, Universidad Técnica de Múnich (Múnich, Alemania). Se obtuvo GM-CSF de Peprotech (Rocky Hill, EE.UU). Las células de hibridoma FGK-45 que producen anti-CD40 Ab estimulador fueron proporcionadas por A. Rolink. El MPL fue gentilmente proporcionado por el Dr. M. Johnson, Rib Immunochem. Research (Hamilton, EE.UU).

[0094] Estrategias de inmunización. Se inyectó subcutáneamente a ratones C57BL/6, o bien con 50 µg de péptido E7<sub>49-57</sub>, o bien con 150 µg de E7<sub>43-77</sub> 35-mer disueltos en PBS para conseguir niveles molares similares del epítipo de LTC E7<sub>49-57</sub> en ambos casos. Se evaluaron combinaciones con varias adyuvancias. En el caso del IFA y el Montanide, los péptidos disueltos fueron emulsionados en el 50% de estas respectivas sustancias. Se disolvieron ODN-CpG (50 µg/ratón), MPL (10 µg /ratón) y GM-CSF (4 µg /ratón) en PBS y se mezclaron con los péptidos antes de la vacunación subcutánea. El volumen total inyectado fue de 200 µl/ratón.

[0095] El Anti-CD40 Ab fue disuelto en PBS e inyectado por separado de los péptidos por vía intravenosa los días 0, 1 y 2 en una cantidad de 100 µg por inyección (volumen total 200 µl/ratón). Los bazo fueron cosechados después de 10 días, o bien, cuando era indicado, los ratones fueron estimulados con vacunas idénticas 50 días después del cebado y los bazo fueron cosechados 10 días después de la inmunización estimuladora. En el caso del E7<sub>43-77</sub> 35-mer, la última estrategia puede permitir la formación de células auxiliares T y LTC de memoria después de la primera vacunación y activación de DC mediante células auxiliares T específicas de E7<sub>43-77</sub> del VPH16 cuando se dio la inmunización estimuladora. En los experimentos antitumorales terapéuticos, los ratones con tumores fueron vacunados dos veces: en el momento en el que los tumores fueron palpables en todos los ratones y 14 días más tarde.

[0096] Cultivos de células T. Las células T fueron obtenidas de ratones inmunizados, cultivando células de bazo ( $5 \times 10^6$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos) en el medio completo en presencia de  $0,5 \times 10^6$  células que expresan E7<sub>49-57</sub> (línea celular tumoral 13.2) o, cuando era indicado, en presencia de células D1.

[0097] Antes del uso, las células D1 fueron incubadas durante 16 horas con el E7<sub>43-77</sub> 35-mer y posteriormente activadas añadiendo LPS (10 µg/ml) durante 6 horas y luego lavadas concienzudamente. El medio completo consiste en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; BioWhittaker, Walkersville, MD, EE.UU) suplementado con 8% de FCS, 100 IU/ml de penicilina, 2mM de glutamina (ICN, Aurora, Ohio, EE.UU) y 30 µM de 2-ME (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cultivos se mantuvieron a 37° C en aire humedecido que contenía un 5% de CO<sub>2</sub>. No se añadió IL-2 exógeno. El día seis, las células muertas fueron retiradas del cultivo mediante centrifugado sobre un gradiente de densidad de Ficoll y las células restantes fueron sembradas en placas de 24 pocillos a  $1 \times 10^6$  células/pocillo. En el día siete se realizó la tinción de tetrámeros o la tinción de la citoquina intracelular.

[0098] Tinción de tetrámeros. Cultivos de bazo, estimulados con la línea celular tumoral 13.2 durante siete días, fueron transferidos en una cantidad de  $40 \times 10^4$  por pocillo a una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en V y lavados dos veces con PBS/BSA del 0,5%. Posteriormente, se añadió tetrámeros marcados con PE que contenían E7<sub>49-57</sub>. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, las células fueron lavadas dos veces con PBS/BSA del 0,5% e incubadas con anti CD8b Ab marcado con FITC durante 30 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en PBS/BSA del 0,5%, suspendidas en PBS/BSA del 0,5% que contenía yoduro de propidio (PI) (0,5)µg/ml) y transferidas a tubos. Las muestras celulares fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EE.UU) usando software CellQuest. Se analizó un total de  $20 \times 10^4$  eventos para intensidad de fluorescencia. Los residuos fueron suprimidos utilizando la tinción de PI y posteriormente la fracción de CD8<sup>+</sup> fue encerrada. La tinción media de base de los tetrámeros de células cultivadas y teñidas de manera similar de ratones de control no inmunizados resultó estar por debajo del 1 por ciento de las células CD8<sup>+</sup> (0,94%, desviación típica 0,36%). Se usó el clon 9.5 de LTC específico de E7 del VPH16 como control positivo.

[0099] Tinción de citoquina intracelular. Los cultivos de bazo fueron estimulados con células D1 pulsadas con E7<sub>43-77</sub> 35-mer durante siete días. Posteriormente, el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> que producen IFN $\gamma$  fue medido como se ha descrito anteriormente (van der Burg et al., 2001). Particularmente, se usaron células D1 no pulsadas activadas por LPS o células D1 pulsadas con E7<sub>49-57</sub> o E7<sub>43-77</sub> 35-mer (5 µg/ml) como células estimuladoras.

## Resultados

Las vacunaciones de estímulo primario con el péptido que contiene epítipos de auxiliares T y de LTC de E7 del VPH16 de 35 aminoácidos de largo E7<sub>43-77</sub> dan lugar a una fuerte respuesta de LTC.

[0100] Se vacunaron ratones (B6) una vez con el epítipo de LTC mínimo E7<sub>49-57</sub> del VPH16 o el péptido E7<sub>43-77</sub> del VPH16 de 35 residuos de longitud, mezclados con IFA. Diez días después de la vacunación los bazo fueron cosechados y estimulados in vitro durante 1 semana. Posteriormente, el porcentaje de LTC específicos de péptido de E7<sub>49-57</sub> fue determinado mediante tinción del tetrámero E7<sub>49-57</sub> (RAHYNIVTF) de H2-Db (van der Burg et al., 2001). En ambos grupos 3 de cada 9 ratones respondieron a la vacuna mientras que generalmente el 5 por ciento de las células T CD8<sup>+</sup> se tiñeron con tetrámeros (figura 11A-B), sugiriendo que las vacunas actúan igualmente bien cuando se inyectan una vez.

[0101] Para obtener una respuesta fuerte de los LTC específica de E7<sub>49-57</sub>, ambas vacunas fueron usadas en un régimen de estímulo primario, que permitía a las células T cebadas formar células T de memoria antes de que la respuesta fuese estimulada por una segunda vacunación 50 días más tarde. Los ratones que recibieron dos veces el epítipo mínimo de LTC, mostraron respuestas de célula T CD8<sup>+</sup> que eran comparables a la de después de una vacunación (figura 11 C). En cambio, los ratones cebados y estimulados con el péptido largo mostraron una fuerte

respuesta de los LTC específica de E7<sub>49-57</sub> en 9/11 de los ratones, con altos números de células T CD8<sup>+</sup> específicas de E7<sub>49-57</sub> (media 19%, rango 5-40%) (Figura 11D). Estos experimentos demuestran que la vacunación con el péptido largo en un régimen de estímulo primario homólogo es superior a la vacunación con el epítipo mínimo de LTC y esto indica que la formación de células auxiliares T, por el epítipo intrínseco auxiliar T presente en el péptido largo, contribuye considerablemente al nivel de las respuestas de los LTC.

La fuerte respuesta de los LTC específica de E7<sub>49-57</sub> es dependiente de las células auxiliares restringidas por CMH clase II y las interacciones CD40-CD40L.

[0102] Para demostrar que las impresionantes respuestas de los LTC, detectadas después de las vacunaciones de estímulo primario con el péptido largo E7<sub>43-77</sub>, fueron de hecho mejoradas por células auxiliares T específicas de E7 restringidas por el CMH clase II, los ratones CMH clase II<sup>-/-</sup> sufrieron un estímulo primario con la vacuna de péptido largo. El número de LTC específicos de E7<sub>49-57</sub> detectadas en ratones CMH clase II<sup>-/-</sup> fue muy inferior al encontrado en ratones B6 después dos vacunaciones, y comparable al encontrado después una vacunación (figura 11E). Para confirmar que las células auxiliares T CD4<sup>+</sup> son inducidas ya después del cebado, los ratones fueron vacunados una vez con el péptido largo en IFA.

[0103] Posteriormente el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> que producen IFN $\gamma$  específicas de E7<sub>43-77</sub> fue medido por tinción de citoquina intracelular. Mientras que no se observó ninguna respuesta sobre el fondo en ratones naive (datos no mostrados), el 5 por ciento o más de las células T CD4<sup>+</sup> de ratones vacunados respondieron específicamente tras estimulación con el péptido largo E7<sub>43-77</sub> (figura 12A). Estos datos no solo indican que las respuestas auxiliares T tipo 1 CD4<sup>+</sup> restringidas por el CMH clase II son inducidas después una vacunación sino también que estas células T auxiliares específicas de péptido E7<sub>43-77</sub> son requeridas para inducir respuestas fuertes de LTC. CPA profesionales, que procesan y presentan el péptido largo tras la inmunización estimuladora, se activan a través de interacciones CD40-CD40L mediante células auxiliares T específicas de péptido E7<sub>43-77</sub>. Esto posteriormente conducirá a la activación mejorada de LTC.

Las vacunaciones únicas con el péptido E7<sub>43-77</sub> y agentes activadores de DC suponen fuertes respuestas de auxiliares T y de LTC hacia E7 del VPH16.

[0104] Si la activación de CPA profesionales mediada por auxiliares T es importante para la fuerte respuesta de los LTC observada, la activación directa de DC debería evitar una falta de ayuda de células T y una única vacunación debería ser suficiente para incrementar las respuestas adecuadas de los LTC. Para abordar esta cuestión, los ratones B6 fueron vacunados una vez con el péptido largo o el péptido mínimo E7<sub>49-57</sub> en combinación con varios agentes activadores de DC. Se usaron IFA y Montanide –un IFA de calidad equivalente a los inyectables en humanos- como controles. Como con IFA (figura 11A-B) no se observaron respuestas cuando el adyuvante Montanide fue administrado (datos no mostrados).

[0105] Además, los ratones vacunados tanto con el epítipo mínimo de LTC como con el péptido largo combinado con el anticuerpo anti-CD40 o con GM-CSF no mostraron respuesta o mostraron una respuesta mínima de LTC (figura 13A-B). No obstante, una combinación de GM-CSF e IFA dio lugar a respuestas de los LTC moderadas específicas de E7<sub>49-57</sub> cuando se administró el péptido largo (figura 13C).

[0106] Los ratones que recibieron el péptido mínimo mezclado con MPL o ODN-CpG mostraron respuestas de los LTC bien perfiladas en diferentes ratones (figura 13D-E) aunque el número de respondedores no había aumentado (4/9 y 4/12 ratones respectivamente) en comparación con los ratones vacunados con IFA (figura 11A). En cambio, la vacunación con el péptido largo dio lugar a respuestas de los LTC específicas de E7<sub>49-57</sub> en todos los ratones. Por otra parte, el nivel de la respuesta de los LTC detectado fue alto (hasta un 40% de células T CD8<sup>+</sup>) en la mayoría de animales. Además, una única vacunación con el péptido largo y ODN-CpG dio lugar a números incluso más altos de células T CD4<sup>+</sup> que producen IFN $\gamma$  específicas de E7<sub>43-77</sub> (15 a 20% de las células T CD4<sup>+</sup>) cuando se compara con el uso de IFA como adyuvante (figura 12B). Para demostrar que las respuestas inducidas fueron de hecho independientes de las células T auxiliares, se vacunó a ratones CMH clase II<sup>-/-</sup> con el péptido largo y ODN-CpG. Como se muestra en la figura 13F, se detectaron respuestas robustas de LTC después de una vacunación. La observación de que en una situación independiente de auxiliares T, la vacunación con el péptido largo y agentes activadores de DC es superior a una vacunación con el epítipo mínimo de LTC, muestra que, en comparación con el epítipo mínimo de LTC que puede enlazar con moléculas del CMH clase I presentes en todas las células nucleadas, el péptido largo es preferentemente procesado y presentado por células presentadoras de antígeno profesionales (CPA).

La vacunación con el 35-mer y el adyuvante activador de DC ODN-CpG puede erradicar eficazmente tumores que expresan el VPH16.

[0107] Para probar la eficacia de la vacuna de péptido largo, los ratones que sufren tumores fueron inmunizados con el péptido E7<sub>49-57</sub> o el péptido largo E7<sub>43-77</sub> mezclado con ODN-CpG.

[0108] Particularmente, la vacunación se dio en el momento en que los tumores eran palpables (día 10-14) en todos los ratones. Una segunda vacunación fue administrada 14 días más tarde para mantener la inmunidad auxiliar T y LTC

específica contra E7. Los ratones tratados sólo con ODN-CpG no mostraron actividad antitumoral (figura 14A). La mayoría de los animales tuvieron que ser sacrificados debido al extenso crecimiento del tumor a los 14 días después del tratamiento. En ambos grupos tratados con péptido y ODN-CpG se vio inhibición del crecimiento del tumor 8-12 días después del tratamiento.

[0109] Aunque se observó erradicación completa en 3 de los 9 ratones tratados con el péptido E7<sub>49-57</sub> y ODN- CpG (30% de los animales), otros sólo fueron capaces de estabilizar el crecimiento del tumor temporalmente y luego murieron de su tumor. En cambio, 8 de los 10 ratones tratados con el péptido largo y ODN-CpG erradicaron sus tumores, alguno de ellos midiendo de 200 a 500 mm<sup>3</sup>.

Conclusión

[0110] Mostramos que la respuesta de los LTC específica de E7 del VPH 16 es mucho más fuerte después de la vacunación con un péptido de 35 residuos de longitud derivado de E7 del VPH16 que después de la vacunación con el epítipo mínimo de LTC. Nuestros datos demuestran que al menos uno de dos mecanismos independientes causa esto. En primer lugar, el péptido de 35 residuos de longitud usado en este ejemplo contiene tanto un epítipo de LTC como un epítipo de auxiliares T. La vacunación de ratones CMH clase II<sup>-/-</sup> demostró que la interacción entre CPA y células T auxiliares específicas de E7 contribuía considerablemente al nivel de la respuesta de los LTC. Además, la administración de dicho péptido largo mezclado con potentes agentes activadores de DC fue capaz de sortear el requisito para la ayuda de células T. En segundo lugar, una comparación directa de la respuesta de los LTC inducida por el epítipo mínimo de LTC (9 residuos) de este ejemplo o dicha vacuna de péptido largo combinada con agentes activadores de DC en ratones tanto de tipo salvaje como del CMH clase II<sup>-/-</sup> mostró que la vacunación con el péptido largo daba lugar a una respuesta de los LTC mucho mayor, mostrando que en contraste con el epítipo mínimo de LTC, el péptido largo es preferiblemente presentado por CPA profesionales. Por otra parte, mostramos que la vacunación con el péptido largo y potentes agentes activadores de DC dan lugar a la erradicación completa de tumores establecidos. Estos datos proporcionan una base científica para el uso de péptidos largos superpuestos, solos o en combinación con potentes agentes activadores de DC en futuros ensayos humanos.

[0111] La alta eficacia de nuestra vacuna de péptido largo es, entre otras, cosas debida al hecho de que los epítipos de auxiliares T y de LTC están físicamente enlazados entre sí. La ventaja potencial del enlace de epítipos está en la mayor probabilidad de presentación simultánea de los epítipos restringidos tanto por el CMH clase I como clase II en la superficie de una única CPA, facilitando así la entrega de ayuda cognada de célula T al cebado de LTC. Una comparación directa de vacunas que usaban una mezcla de epítipos de LTC y Th con vacunas que usaban epítipos de LTC y Th físicamente enlazados, pero idénticos, demostró que estos últimos dieron lugar a respuestas de los LTC más fuertes (Shirai, 1994; Hiranuma, 1999; Bristol, 2000).

[0112] Nuestras vacunaciones de ratones B6 normales y CMH clase II<sup>-/-</sup> confirman que el uso de un epítipo de auxiliares T físicamente enlazado es ventajoso para el desarrollo de una fuerte respuesta de los LTC. Además, estos experimentos demostraron que la interacción entre células Th y CPA específicas de E7 es la responsable de este estímulo de la respuesta de los LTC.

[0113] La comparación de la respuesta de los LTC inducida por el epítipo mínimo de LTC y el péptido largo en ratones normales y CMH clase II<sup>-/-</sup> reveló otra propiedad interesante de nuestra vacuna de péptido largo. En estos experimentos la contribución de las células Th específicas de E7 fue eliminada y probablemente sólo las diferencias en propiedades físicas o cinética de los péptidos jueguen un papel. Debido a su tamaño, que excluía enlace directo del péptido con el CMH clase I, dicho péptido largo necesitó ser absorbido por CPA profesionales que son capaces de procesar antígenos derivados exógenamente y presentar péptidos en el CMH clase I. Demostramos que la activación de DC afectó sólo marginalmente a los resultados de la respuesta de los LTC específica de E7 cuando el péptido mínimo fue usado, mientras que la activación DC fue un prerrequisito para inducir una respuesta superior de los LTC específica de E7 mediante la vacuna de péptido largo. Juntos, estos datos muestran que los epítipos de LTC y Th presentes en dicho péptido largo son preferiblemente presentados en la superficie de CPA profesionales.

[0114] La vacunación con el epítipo mínimo de LTC derivado del VPH16 produce una respuesta de los LTC detectable que no mejora cuando los agentes activadores de DC son co-inyectados. Esto indica que dicho péptido no es solo presentado en la superficie de las CPA profesionales activadas sino también en las moléculas del CMH clase I de otras células nucleadas. Esto no es sorprendente porque dicho péptido puede enlazar directamente con el CMH clase I en la superficie celular (Feltkamp et al., 1993).

[0115] La presentación de dicho péptido de LTC por células que no pueden producir coestimulación (p. ej. células no inmunes) produce una amortiguación de las respuestas de los LTC y la presentación de dicho epítipo de LTC de E7 por estas CPA no profesionales es, por lo tanto, nociva para la inducción de LTC específicos de E7. Particularmente, hemos mostrado previamente que la vacunación con el epítipo mínimo de LTC derivado de E1A dio lugar a la tolerancia de los LTC específicos de E1A que, de otro modo, eran protectores contra tumores inducidos por E1A (Toes 1996). Aunque, la posible presentación del epítipo de LTC derivado de E7 del VPH 16 en la superficie de CPA no profesionales no obstaculiza la inducción de LTC específicos de E7 como se ha visto en el modelo de tumor de adenovirus, la eficacia antitumoral de estas respuestas es dificultada.

[0116] El tratamiento de tumores establecidos mediante vacunación terapéutica con el epítipo mínimo de LTC y el agente activador de DC CpG es mucho menos eficaz cuando se compara con la vacuna de péptido largo mezclada con agentes activadores de DC.

[0117] Estos resultados proporcionan una base científica para la evaluación de esta vacuna en ensayos humanos tanto para intervención terapéutica como profiláctica contra enfermedades inducidas por el VPH16.

Breve descripción de las figuras

[0118]

FIG. 1 representa la respuesta de las células T inducida por el péptido E7<sub>41-62</sub> que reconoce el antígeno procesado naturalmente (Ag). PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR15,4 y DQ6,7 fueron estimuladas cuatro veces con péptido E7<sub>41-62</sub>. Las células T que respondían fueron evaluadas en un ensayo de proliferación de 3 días (a, b, c) o estimuladas durante 1 día para medir la producción de IFN $\gamma$  mediante ELISA (d). Las células respondedoras (R) y células presentadoras de antígeno emparejadas CMH clase II o autólogas (A) fueron incubadas con los Ags indicados: proteína E6 del VPH16 recombinante (E6), proteína E7 del VPH16 recombinante (E7), proteína RT del VIH recombinante (RT) o péptidos derivados de E6 (por ejemplo, E6<sub>81-102</sub>, péptido E6<sub>81-102</sub>) o derivados de E7. Proliferación del cultivo en masa de células T (a), proliferación del clon auxiliar T, derivado del cultivo en masa de células T y el bloqueo de la respuesta específica de la proteína E7 añadiendo un anticuerpo contra el HLA-DR (b), la proliferación del clon auxiliar T cuando se estimula con células presentadoras de antígeno parcialmente emparejadas CMH clase II (c), y mapeo preciso del epítipo mínimo por el clon auxiliar T midiendo la producción de IFN $\gamma$  por cada 24 h (d).

FIG. 2 representa una respuesta de las células T inducida por el péptido E7<sub>22-56</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR3 y DQ2 fueron estimuladas cuatro veces con el péptido E7<sub>22-56</sub>. Proliferación del cultivo en masa de células T (a), proliferación específica del clon auxiliar T, derivado del cultivo en masa de células T, cuando se estimulan con E7<sub>22-56</sub>, E7<sub>31-52</sub> y proteína E7 (b), y mapeo preciso del epítipo mínimo midiendo la producción de IFN $\gamma$  por cada 24 h mediante el clon auxiliar T (c). (ver también FIG. 1 y descripción asociada).

FIG. 3 representa una respuesta de las células T inducida por el péptido E7<sub>43-77</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR1,3 y DQ2 fueron estimuladas cuatro veces con el péptido E7<sub>43-77</sub>. Proliferación del cultivo en masa de células T (a), proliferación específica del clon auxiliar T, derivado del cultivo en masa de células T, cuando se estimulan con E7<sub>22-56</sub>, E7<sub>31-52</sub> y proteína E7 (b), reconocimiento de células presentadoras de antígeno ("CPA") pulsadas por péptidos parcialmente emparejadas (DR3; DQ2) (c) el anticuerpo anti HLA-DR bloquea la proliferación específica de E7 del clon de célula T auxiliar revelando a HLA-DR3 como elemento de restricción (d), y producción específica de IFN $\gamma$  mediante el clon de célula T auxiliar cuando se estimula con péptido E7<sub>43-77</sub> o proteína E7 (e). (ver también FIG. 1 y descripción asociada).

FIG. 4 representa la estimulación con los péptidos-(M1) de la matriz 1 de la gripe de células T (izquierda) CD45RA+ (naive) y células T (derecha) CD45RO+ (memoria) separadas por MACS da lugar a la producción de IFN $\gamma$  sólo en el subconjunto CD45RO+. La proteína M1 fue dividida en 16 péptidos superpuestos. Cada conjunto consiste en cuatro péptidos de 30 aminoácidos de longitud que se solapan en 15 aminoácidos.  
Tet. tox.: toxoide tetánico.

FIG. 5 representa una respuesta de las células T inducida por los péptidos E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR2 fueron estimuladas cuatro veces con los péptidos E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub>. Proliferación específica del clon de célula T auxiliar contra el péptido E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub> y E2 proteína (a), producción específica de IFN $\gamma$  por el clon de célula T auxiliar cuando se estimula con los péptidos E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub> (b), mapeo preciso del epítipo mínimo E2<sub>316-330</sub> (c) y el anticuerpo anti HLA-DR bloquea la producción de IFN $\gamma$  específica de E2 del clon de célula T auxiliar revelando a HLA-DR2 como elemento de restricción (d), (ver también, FIG. 1 y descripción asociada).

FIG. 6 representa una respuesta de las células T inducida por los péptidos E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR2, DQ6 (1) fueron estimuladas cuatro veces con los péptidos E2<sub>301-330</sub> y E2<sub>316-345</sub>. Proliferación específica del clon de célula T auxiliar contra el péptido E2<sub>301-330</sub> y la proteína E2 (a), producción específica de IFN $\gamma$  mediante el clon de célula T auxiliar cuando se estimula con E2<sub>301-330</sub> (b), mapeo preciso del epítipo mínimo E2<sub>311-325</sub> (c), y el anticuerpo anti HLA-DQ bloquea la producción de IFN $\gamma$  específica de E2 del clon de célula T auxiliar revelando a HLA-DQ6 (1) como elemento de restricción (d), (ver también, FIG. 1 y descripción asociada).

FIG. 7 representa una respuesta de las células T inducida por el péptido E2<sub>331-365</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR2 fueron estimuladas cuatro veces con el péptido E2<sub>331-365</sub>. Proliferación específica del clon de célula T auxiliar contra el péptido E2<sub>331-365</sub> y la proteína E2 (a), producción específica de IFN $\gamma$  mediante el clon de célula T auxiliar cuando se estimula con el péptido E2<sub>331-365</sub> (b),

mapeo preciso del epítipo mínimo E2<sub>346-365</sub> (c) y el anticuerpo anti HLA-DR bloquea la producción de IFN $\gamma$  específica de E2 del clon de célula T auxiliar revelando a HLA-DR2 como elemento de restricción (d), (ver también FIG. 1 y descripción asociada).

5 FIG. 8 representa una respuesta de las células T inducida por el péptido E2<sub>331-365</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante sano de sangre positivo de HLA-DR1 fueron estimuladas cuatro veces con el péptido E2<sub>331-365</sub>. Proliferación específica del clon de célula T auxiliar contra el péptido E2<sub>331-365</sub> y la proteína E2 (a), mapeo preciso del epítipo mínimo E2<sub>351-365</sub> (b), y el anticuerpo anti HLA-DR bloquea la producción de IFN $\gamma$  específica de E2 del clon de célula T auxiliar revelando a HLA-DR1 como elemento de restricción (c), (ver también FIG. 1 y descripción asociada).

10 FIG. 9 representa producción de IFN $\gamma$  específica del péptido E2 de células T presentes en la fracción CD45RO<sup>+</sup> (memoria) de las PBMC. La fracción de memoria CD45RO<sup>+</sup> de las PBMC fue aislada utilizando tecnología MACS. Después de la separación, estas células T de memoria fueron estimuladas con los péptidos indicados. Después de 10 días de incubación las células fueron cosechadas, lavadas y luego estimuladas con los péptidos indicados en una placa de 96 pocillos de ELISPOT a 50.000 PBMC por pocillo. El número de células T productoras de IFN $\gamma$  por cada 50.000 PBMC se indica en el eje Y de cada una de las FIG 9, A, B, C, D, E, F. PBMC CD45RO<sup>+</sup> derivadas de donante de sangre sano contienen células T de memoria específicas de E2 del VPH16 como se muestra por la reacción a varios conjuntos de: dos péptidos E2 de 30 aminoácidos de longitud (el primer aminoácido del primer péptido y el último aminoácido del segundo péptido se indican en el eje X) que fueron seleccionados basándose en la inmunogenicidad de estos péptidos, la cual fue establecida en ensayos previos (a-b), o cuatro péptidos E2 de 30 aminoácidos de longitud (se indica la posición del primer y último aminoácido de la secuencia que cubren estos 4 péptidos en la proteína E2) (d-f). MRM: mezcla de respuesta de memoria que consiste en una mezcla de Mycobacterium tuberculosis, toxoide tetánico y antígenos de Candida albicans. (ver también FIG. 4 y descripción asociada). \*, respuesta estadísticamente significativa (p < 0,05).

15 FIG. 10 se titula La vacunación con el péptido 32-mer Ad531A en IFA induce inmunidad antitumoral protectora. Esta figura representa la supervivencia de ratones C57/B16 cuando son inmunizados una vez con 30 $\mu$ g del péptido de 32 aminoácidos de largo (RECNSSTDSCDSGPSNTPPEIVPHVRLCPIIKP) que contiene el epítipo mínimo de LTC. Los ratones fueron provocados 14 días más tarde con 0,5 millones de células tumorales AR5 en el flanco opuesto. En cambio, los ratones inmunizados con el epítipo de LTC mínimo de 10 aminoácidos de longitud (SGPSNTPPEI) no fueron protegidos.

20 FIG. 11A-E. Las células auxiliares T de CMH clase II mejoran las respuestas de los LTC específicas de E7<sub>49-57</sub> después de vacunaciones de estímulo primario con el E7<sub>43-77</sub> del VPH16 35-mer. Los ratones (B6) fueron, o bien cebados una vez con el péptido E7<sub>49-57</sub> (A) o el E7<sub>43-77</sub> 35-mer (B), o bien estimulados 50 días más tarde con los mismos péptidos: péptido E7<sub>49-57</sub> (C) o E7<sub>43-77</sub> 35-mer (D). Los ratones CMH clase II<sup>-/-</sup> fueron cebados y estimulados de forma similar con E7<sub>43-77</sub> 35-mer (E). Los péptidos fueron emulsionados en IFA. Diez días después de la vacunación final los bazos fueron cosechados y los cultivos fueron estimulados con la línea celular tumoral 13.2 que expresa E7<sub>49-57</sub>. Basándose en el patrón de difusión frontal y lateral de células de bazo aisladas en el FACS, las células de bazo colorantes de CD8 (FL4-H) y de tetrámeros H-2D<sup>b</sup>-RAHYNIVTF se someten al análisis de células T CD8<sup>+</sup> positivas de tetrámero H-2D<sup>b</sup>-RAHYNIVTF. En el eje Y se indica el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> que fueron positivas de tetrámero H-2D<sup>b</sup>-RAHYNIVTF. Cada columna en el eje X representa un ratón individual. La línea horizontal indica respuestas de base más la desviación típica de ratones naive (1,31%).

25 FIG 12A-B. Se inducen células T auxiliares tipo 1 específicas de E7 después de la vacunación con el E7<sub>43-77</sub> 35-mer. Conjuntos de 5 ratones (B6) fueron inyectados subcutáneamente con E7<sub>43-77</sub> 35-mer mezclado con IFA (A) o CpG (B). Los bazos fueron cosechados después de 10 días y los cultivos de células de bazo fueron estimulados con células D1 pulsadas con el E7<sub>43-77</sub> 35-mer. Después 1 semana de estimulación in vitro la especificidad de la fracción CD4<sup>+</sup> de los cultivos fue evaluada midiendo la producción de IFN $\gamma$  de células T individuales. Las columnas blancas ilustran la producción IFN $\gamma$  de base por las células T auxiliares CD4<sup>+</sup> estimuladas con células D1 no pulsadas, mientras que las columnas negras representan la producción IFN $\gamma$  por células T auxiliares CD4<sup>+</sup> cuando se estimulan con células D1 pulsadas por el E7<sub>43-77</sub> 35-mer. Cada conjunto de dos columnas representa un ratón individual.

30 FIG13A-F. Una única vacunación del E7<sub>43-77</sub> 35-mer combinada con adyuvancia activante de DC produce respuestas altas de LTC. Los ratones (B6) fueron sólo cebados y no estimulados con el péptido E7<sub>49-57</sub> (representado a la izquierda) o el 35-mer (representado a la derecha). Anti CD40 Ab (A), GM-CSF (B), GM-CSF más IFA (C) MPL (D) y ODN-CpG (E) fueron usados como adyuvantes. De forma similar, los ratones CMH clase II<sup>-/-</sup> fueron sólo cebados y no estimulados con el E7<sub>43-77</sub> 35-mer y ODN-CpG (13F). Los bazos fueron cosechados después 10 días y los cultivos fueron estimulados in vitro durante 7 días con la línea celular tumoral 13.2 que expresa E7<sub>49-57</sub>. Posteriormente, el porcentaje de células CD8<sup>+</sup> positivas de tetrámero E7<sub>49-57</sub> fue determinado mediante análisis de FACS (eje Y). Cada columna en el eje X representa un ratón individual. La línea horizontal indica respuestas de base más desviación típica de ratones naive (1,31%).

35 FIG. 14 representa el brote de tumores positivos de E7 del VPH16 tanto en ratones provocados con tumor TC-1 que fueron, o bien vacunados con el epítipo mínimo de LTC E7<sub>49-57</sub> mezclado con un agente de activación de célula

dendrítica (CpG) (B; n=9 ratones), o bien vacunados con E7<sub>43-77</sub> del VPH16 mezclado con un adyuvante activador de célula dendrítica (CpG) (C; n=10 ratones), o bien no vacunados (A; n=10 ratones) el día en que todos ratones tenían pequeños tumores palpables (día 10). Los ratones fueron estimulados 14 días más tarde y el brote tumoral fue seguido durante 65 días después de la primera inmunización. Nótese que los volúmenes tumorales comenzaron a decrecer 7-10 días después de la inmunización y habían alcanzado volúmenes de 200-500 mm<sup>3</sup>. Además, los ratones no inmunizados murieron 2-3 días después de que tal volumen tumoral fuera alcanzado. 6/9 de los ratones vacunados con el epítipo mínimo murieron de su tumor, mientras que 8/10 de los ratones vacunados con el péptido largo erradicaron completamente su tumor.

FIG. 15. Esta figura representa la proliferación de clones auxiliares T CD4<sup>+</sup> de humano estimulados con el péptido E2<sub>46-75</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante de sangre sano positivo de HLA DR4 fueron estimuladas cuatro veces con péptidos E2<sub>46-75</sub>. Las figuras 15A y B se titulan: Reconocimiento del péptido y la proteína del clon 47 específico de E2<sub>51-70</sub> y restricción de HLA-DR. Se muestra la proliferación específica del clon 47 de célula T auxiliar contra el péptido E2<sub>46-75</sub> y la proteína E2 del N-terminal pero no de la mitad C-terminal de la proteína E2 (izquierda; A) y la restricción a través de HLA DR4 (derecha, B). La Figura 15C se titula: reconocimiento del péptido del clon 36 específico de E2<sub>61-75</sub>. La especificidad de péptido del clon 36 de auxiliar T que reconoce un péptido E2<sub>61-75</sub> diferente pero superpuesto, se muestra en la parte inferior (C). (ver también FIG. 1 y descripción asociada).

FIG. 16 representa una respuesta de las células T inducida por el péptido E6<sub>127-158</sub> que reconoce Ag procesados naturalmente. PBMC de un donante de sangre sano positivo de HLA-DR1 fueron estimuladas cuatro veces con péptido E6<sub>127-158</sub>. La Figura 16A y B se titula: HLA-DR1+ PBMC estimuladas por E6<sub>127-158</sub>. Se representa la proliferación en masa del cultivo de células T (parte superior, izquierda, A) y la producción de IFN $\gamma$  (parte superior, derecha, B). La Figura 16C y D se titula: Restricción por HLA-DR del clon 9 derivado de PBMC estimulado por E6<sub>127-158</sub> en la proliferación y producción de IFN $\gamma$ . Se representa la proliferación específica (parte inferior, izquierda, C) y la producción de IFN $\gamma$  (parte inferior, derecha, D) del clon auxiliar T, derivado del cultivo en masa de células T, y la restricción de HLA cuando se estimula con la proteína E6<sub>127-158</sub> o E6 es representada. (Ver también FIG. 1 y descripción asociada).

#### Referencias

[0119]

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25,3389-402 (1997).

BARRASSO, R., DE BRUX, J., CROISSANT, O. AND ORTH, G., High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N. Engl. J. Med.*, 317,916-23 (1987).

BAUR, M. P., NEUGEBAUER, M. AND DEPPE, H., Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In : E. D. Albert, M. P. Baur and W. R. Mayr (eds.), *Histocompatibility Testing*, pp. 333-341, Springer-Verlag, Berlin (1984).

Bermas, B. L. and Hill, J. A., Proliferative responses to recall antigens are associated with pregnancy outcome in woman with a history of recurrent spontaneous abortion. *J Clin Invest*, 100,1330-4. (1997).

Borysiewicz, L. K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G. W. G., Westmoreland, D., Evans, A. S., Adams, M., Stacey, S. N., Bournsnel, M. E. G., Rutherford, E., Hickling, E. and Inglis, S. C., A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet*, 347,1523-1527 (1996).

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).

BRISTOL, J. A., C. ORSINI, P. LINDINGER, J. THALHAMER, AND S. 1. ABRAMS. 2000. Identification of a ras oncogene peptide that contains both CD4 (+) and CD8 (+) T cell epitopes in a nested configuration and elicits both T cell subset responses by peptide or DNA immunization. *Cell Immunol* 205 : 73 .

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*, 135,703-9 (1989).

- Clerici, M., Merola, M., Ferrario, E., Trabattoni, D., Villa, M. L., Stefanon, B., Venzon, D. J., Shearer, G. M., De Palo, G. and Clerici, E., Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89,245-250 (1997).
- 5 Coleman, N., Birley, H. D., Renton, A. M., Hanna, N. F., Ryait, B. K., Byrne, M., Taylor Robinson, D. and Stanley, M. A., Immunological events in regressing genital warts. *Am.J. Clin. Pathol.*, 102,768-74 (1994).
- DAS, S. N., KHANNA, N. N. AND KHANNA, S., A multiparametric observation of immune competence in breast cancer and its correlation with tumour load and prognosis. *Ann Acad Med Singapore*, 14,374-81 (1985).
- 10 DE BRUIJN, M. L., SCHUURHUIS, D. H., VIERBOOM, M. P., VERMEULEN, H., DE COCK, K. A., OOMS, M. E., RESSING, M. E., TOEBES, M., FRANKEN, K. L., DRIJFHOUT, J. W., OTTENHOFF, T. H., OFFRINGA, R. AND MELIEF, C. J., Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res.*, 58, 724-731 (1998).
- 15 DE GRUIJL, T., BONTKES, H. J., WALBOOMERS, J. M. M., STUKART, M. J., DOEKHIE, F. S., REMMINK, A. J., HELMERHORST, T. J. M., VERHEIJEN, R. H. M., DUGGAN-KEEN, M. F., STERN, P. L., MEIJER, C. J. L. M. AND SCHEPER, R. J., Differential T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: A longitudinal study. *Cancer Res.*, 58, 1700-1706 (1998).
- 20 DYSON N, HOWLEY PM, MUNGER K, HARLOW E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 (4893): 934, 1989 .
- 25 Ho GY, BURK RD, FLEMING I, KLEIN RS: Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56 (6): 788, 1994
- EARLY, E. AND REEN, D. J., Rapid conversion of naive to effector T cell function counteracts diminished primary human newborn T cell responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 116,527-33 (1999).
- 30 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).
- 35 FELTKAMP MC, SMITS HL, VIERBOOM MP, MINNAAR RP, DE JONGH BM, DRIJFHOUT JW, TER SCHEGGET J, MELIEF CJ, KAST WM: Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 23 (9): 2242,1993
- 40 Franken, K. L., Hiemstra, H. S., van Meijgaarden, K. E., Subronto, Y., den Hartigh, J., Ottenhoff, T. H. and Drijfhout, J. W., Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif*, 18,95-9 (2000).
- Fu TM, Guan L, Friedman A, Schofield TL, Ulmer JB, Liu MA, et al., Dose dependence of CTL precursor frequency induced by a DNA vaccine and correlation with protective immunity against influenza virus challenge. *J Immunol* 1999; 162 (7): 4163-4170 .
- 45 Geluk, A., Taneja, V., Van Meijgaarden, K. E., Zanelli, E., Abou-Zeid, C., Thole, J. E., de Vries, R. R., David, C. S. and Ottenhoff, T. H., Identification of HLA class II-restricted determinants of Mycobacterium tuberculosis-derived proteins by using HLA-transgenic, class II-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95,10797-10802 (1998).
- 50 GELUK, A., VAN MEIJGAARDEN, K. E., DRIJFHOUT, J. W. AND OTTENHOFF, T. H., Clip binds to HLA class II using methionine-based, allele-dependent motifs as well as allele-independent supermotifs. *Mol. Immunol.*, 32, 975-981 (1995).
- 55 GHOSH, P., KOMSCHLIES, K. L., CIPPITELLI, M., LONGO, D. L., SUBLESKI, J., YE, J., SICA, A., YOUNG, H. A., WILTROUT, R. H. AND OCHOA, A. C., Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst*, 87, 1478-83 (1995).
- 60 HALPERT R, FRUCHTER RG, SEDLIS A, BUTT K, BOYCE JG, SILLMAN FH : Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 68 (2): 251,1986

- HAN R, CLADEL NM, REED CA, PENG X, CHRISTENSEN ND : Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. *J Virol* 73 (8): 7039,1999 .
- 5 HIRANUMA, K., S. TAMAKI, Y. NISHIMURA, S. KUSUKI, M. ISOGAWA, G. Mm, M. KAITO, K. KURIBAYASHI, Y. ADACHI, AND Y. YASUTOMI. 1999. Helper T cell determinant peptide contributes to induction of cellular immune responses by peptide vaccines against hepatitis C virus. *J Gen Virol* 80 : 187 .
- 10 Ho GY, Bierman R, BEARDSLEY L, CHANG CJ, BURK RD : Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338 (7): 423, 1998 .
- 15 HOHN, H., PILCH, H., GUNZEL, S., NEUKIRCH, C., HILMES, C., KAUFMANN, A., SELIGER, B. AND MAURER, M. J., CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes in cervical cancer recognize HLA-DR-restricted peptides provided by human papillomavirus-E7. *J Immunol.*, 163,5715-22 (1999) .
- 20 HOPFL, R., WIDSCHWENDTER, A., CHRISTENSEN, N. D., WIELAND, U., ZUMBACH, K., SANDRA, H., PFISTER, H. J., PAWLITA, M. AND HEIM, K., Delayed-type hypersensitivity to HPV 16 E7 and humoral immunity to HPV 16/18 E6, E7 and HPV 6/11/16/18/31 LI-virus like particles in women with cervical neoplasia. In : X. Castellsague, F. X. Bosch, S. de Sanjose, V. Moreno and J. Ribes (eds.), 18th international papillomavirus conference, pp.299, Institut Catala d'Oncologia, Barcelona, Spain (2000) .
- JONDAL M, SCHIRMBECK R, REIMANN J : MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5 (4): 295,1996
- 25 Karlsson, R., Jonsson, M., Edlund, K., Evander, M., Gustavsson, A., Boden, E., Rylander, E. and Wadell, G., Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm Dis*, 22,119-27 (1995) .
- 30 KAST WM, ROUXL, CURRENJ, BLOMHJ, VOORDOUWAC, MELOENRH, KOLAEFOSKYD, MELIEF CJ: Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (6): 2283,1991
- KOUTSKY L: Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 102 (5A): 3,1997 .
- 35 KURTS C, CARBONE FR, BARNDENM, BLANAS E, ALLISON J, HEATH WR, MILLER JF : CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 186 (12): 2057,1997
- 40 Manca, F., Li Pira, G., Fenoglio, D., Fang, S. P., Habeshaw, A., Knight, S. C. and Dalgleish, A. G., Dendritic cells are potent antigen-presenting cells for in vitro induction of primary human CD4+T-cell lines specific for HIV gp 120. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 7,15-23 (1994) .
- 45 MARRAZZO JM, STINE K, KOUTSKY LA : Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women: a review. *Am J Obstet Gynecol* 183 (3): 770,2000
- MATORRAS R, ARICETA JM, REMENTERIA A, CORRAL J, GUTIERREZ DE TERAN G, DIEZ J, MONTOYA F, RODRIGUEZ-ESCUADERO FJ: Human immunodeficiency virus-induced immunosuppression: a risk factor for human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 164 (1 Pt 1): 42,1991
- 50 McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M, Doan, S., Hisao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T. V., Tate, K. M., Winkelhake, J. and Spack, E. G., A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods*, 210,149-66 (1997) .
- 55 MELIEF, C. J. M., TOES, R. E. M., MEDEMA, J. P., VAN DER BURG, S. H., OSSENDORP, F. AND OFFRINGA, R., Strategies for Immunotherapy of Cancer. *Adv. Immunol.*, 75,235-281 (2000) .
- Mellman, I., Turley, S. J. and Steinman, R. M., Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol*, 8, 231-7 (1998) .

- NAIPAL, A. M., D'AMARO, J., RUNING, J. W., VANLEEUEWEN, A. AND VAN ROOD, J. J., Automated reading of Propidium Iodide lymphocytotoxicity tests for HLA-DR, MB, MT typing. *Tissue Antigens*, 24,302-6 (1984 ).
- 5 NIMAKO, M., FINDER, A., WILKINSON, G. W. G., BORYSIEWICZ, L. K. AND MAN, S., Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res.*, 57,4855-4861 (1997 ).
- OSSENDORP F, MENGEDE E, CAMPS M, FILIUS R, MELIEF CJM: Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 187 (5): 1, 1998 .
- 10 PARDOLL, D. M. AND TOPALIAN, S. L., The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10,588-94 (1998 ).
- Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, P. R., Speiser, D. E., Lienard, D., Lejeune, F., Fleischhauer, K., Cerundolo, V., Cerottini, J. C. and Romero, P., High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8 (+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J. Exp. Med.*, 190,705-15 (1999 ).
- 15 RAMMENSEE, H. G., FRIEDE, T. AND STEVANOVIIC, S., MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41,178-228 (1995 ).
- 20 REIMANN J, KAUFMANN SH: Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr Opin Immunol* 9 (4): 462,1997
- RESSING, M. E., SETTE, A., BRANDT, R. M. P., RUPPERT, J., WENTWORTH, P. A., HARTMAN, M., OSEROFF, C., GREY, H. M., MELIEF, C. J. M. AND KAST, W. M., Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201 binding peptides. *J. Immunol.*, 154,59345943 (1995 ).
- 25 RESSING, M. E., VAN DRIEL, W. J., BRANDT, R. M., KENTER, G. G., DE JONG, J. H., BAUKNECHT, T., FLEUREN, G. J., HOOGERHOUT, P., OFFRINGA, R., SETTE, A., CELIS, E., GREY, H., TRIMBOS, B. J., KAST, W. M. AND MELIEF, C. J., Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J. Immunother.*, 23,25566 (2000 ).
- 30 RESSING, M. E., VANDRIEL, W. J., CELIS, E., SETTE, A., BRANDT, R. M. P., HARTMAN, M., ANHOLTS, J. D. H., SCHREUDER, G. M. T., TER HARMSEL, W. B., FLEURE, G. J., TRIMBOS, B. J., KAST, W. M. AND MELIEF, C. J. M., 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 ).
- 35 Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S., Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol*, 1, 362-8 (1999 ).
- SCHEFFNER M, WERNES BA, HUIBREGTSE JM, LEVINE AJ, HOWLEY PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (6): 1129,1990 .
- 45 SCHOENBERGER SP, TOES RE, VAN DER VOORT EI, OFFRINGA R, MELIEF CJ: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393 (6684): 480,1998 .
- Sedlik C, Dadaglio G, Saron MF, Deriaud E, Rojas M, Casal SI, et al., In vivo induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity. *J Virol* 2000; 74 (13) : 5769-5775 .
- 50 SELVAKUMAR R, BORENSTEIN LA, LIN YL, AHMED R, WETTSTEIN FO : Immunization with non-structural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol* 69 (1) : 602,1995 .
- SHIRAI, M., C. D. PENDLETON, J. AHLERS, T. TAKESHITA, M. NEWMAN, AND J. A. BERZOFSKY. 1994. Helper-cytotoxic T lymphocyte (CTL) determinant linkage required for priming of anti-HIV CD8+ CTL in vivo with peptide vaccine constructs. *J Immunol* 152 : 549 .
- 55 Thomas, K. K., Hughes, J. P., Kuypers, J. M., Kiviat, N. B., Lee, S. K., Adam, D. E. and Koutsky, L. A., Concurrent and sequential acquisition of different genital human papillomavirus types [In Process Citation]. *J Infect Dis*, 182,1097-102 (2000 ).
- 60

TOES RE, OFFRINGA R, BLOM RJ, MELIEF CJ, KAST WM: Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. Proc Natl Acad Sci U S A 93 (15): 7855, 1996a .

5 TOES RE, BLOM RJ, OFFRINGA R, KAST WM, MELIEF CJ: Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. J Immunol 156 (10): 3911,1996b

10 TOES, R. E. M., OSSENDORP, F., OFFRINGA, R. AND MELIEF, C. J. M., CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. J. Exp. Med., 189,753-756 (1999) .

15 VAN DER BURG, S. H., KWAPPENBERG, K. M., GELUK, A., VANDER KRUK, M., PONTESILLI, O., HOVENKAMP, E., FRANKEN, K. L., VANMEIJGAARDEN, 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., 162,152-60 (1999) .

20 VAN DER BURG, S. H., K. M. C. KWAPPENBERG, T. O'NEILL, R. M. P. BRANDT, C. J. M. MELIEF, J. K. HICKLING, R. OFFRINGA (2001): Pre-clinical safety and efficacy of TA-CIN, a recombinant HPV16 L2E6E7 fusion protein vaccine, in homologous and heterologous prime-boost regimens. Vaccine, 19: 3652-3660

WANEBO, H. J., JUN, M. Y., STRONG, E. W. AND OETTGEN, H., T-cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg, 130,445-51 (1975) .

25 ZUR HAUSEN H: Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. Biochimica et Biophysica Acta 1288 : F55,1996 .

30 LISTA DE SECUENCIAS

**[0120]**

<110> Academisch Ziekenhuis Leiden  
 Van der Burg, sjoerd H.  
 35 Ottenhof, Tom H.M.  
 Geluk, Annemieke  
 schoenmaekers-welters,  
 Maria J.P. De Jong,  
 Annemieke M.  
 40 Offringa, Rienk  
 Melief, Cornelis J.M.  
 Toes, Rene E.M.

45 <120> Long peptides of 22-45 amino acid residues that induce and/or enhance antigen specific immune responses

<130> P208589EP1

<150> EP 00204398.2

<151> 2000-12-08

50

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

55

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> minimal E1A-derived CTL epitope

<400> 1

5

**Ser Gly Pro Ser Asn Thr Pro Pro Glu Ile**  
**1 5 10**

<210> 2  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

10

<220>  
 <223> minimal CTL epitope of adenovirus E1A proteina

15

<400> 2

**Arg Glu Cys Asn Ser Ser Thr Asp Ser Cys Asp Ser Gly Pro Ser Asn**  
**1 5 10 15**

**Thr Pro Pro Glu Ile His Pro Val Val Arg Leu Cys Pro Ile Ile Lys Pro**  
**20 25 30**

20

<210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

25

<220>  
 <223> minimal 9 amino acid long CTL epitope

<400> 3

**Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe**  
**1 5**

30

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

35

<220>  
 <223> HA 308-319

40

<400> 4

**Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr**  
**1 5 10**

45

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

50

<220>  
 <223> hsp65 3-13

<400> 5

Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg  
1 5 10

5 <210> 6  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

10 <220>  
<223> HA 308-319

<400> 6

15 Pro Lys Phe Val Lys Gln Asn Thr Lys Leu Ala Thr  
1 5 10

20 <210> 7  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> li 80-103  
<400> 7

25

Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro  
1 5 10 15

Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met

20

30 <210> 8  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

35 <220>  
<223> HPV16-E2 derived peptide

<400> 8

Phe Asn Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys

40 i 20 25 30

<210> 9  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

45 <220>

ES 2 519 043 T3

<223> HPV16-E2 derived peptide

<400> 9

Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu  
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val

5 20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> HPV16-E2 derived peptide

15 <400> 10

Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser  
1 5 10 15

ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser  
20 25 30

<210> 11

20 <211> 30

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

25 <223> HPV16-E2 derived peptide

<400> 11

ser ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala  
1 5 10 15

Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln

30 20 25 30

<210> 12

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial sequence

35 <220>

<223> HPV16-E2 derived peptide

<400> 12

40

Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe  
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe  
 20 25 30

Met Ser Ile  
 35

<210> 13  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> minimal CTL epitope of adenovirus E1A proteina

<400> 13

Arg Glu Cys Asn Ser Ser Thr Asp Ser Cys Asp Ser Gly Pro Ser Asn  
 1 5 10 15

Thr Pro Pro Glu Ile His Pro Val Val Arg Leu Cys Pro Ile Lys Pro  
 20 25 30

<210> 14<211> 34<212> PRT<213> Artificial Sequence<220><223> HPV16-E7  
 derived peptides

<400> 14

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys  
 1 5 10 15

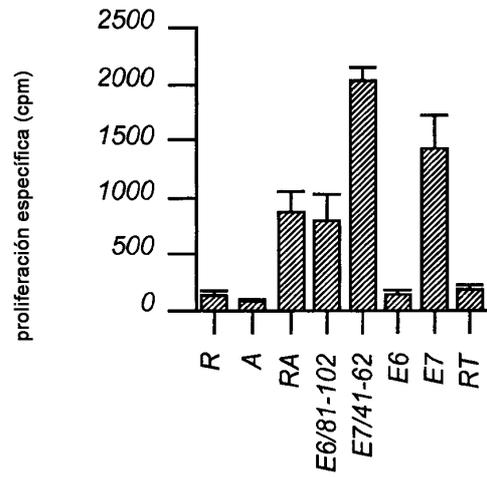
Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp  
 20 25 30

Ile Arg

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un péptido que consiste en las posiciones de aminoácido 43 - 77 de E7 del VPH, para la fabricación de un medicamento para inducir o mejorar una respuesta de las células T específica del VPH en un animal o un humano para la prevención o tratamiento de una enfermedad relacionada con el VPH.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, que comprende además el uso de un péptido E6 del VPH con una longitud de 22 - 45 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos tomada de una proteína E6 del VPH y/o de un péptido que consiste en las posiciones de aminoácido 1 - 35, 22-56, 35-77, 41-62, 41-72 o 64 - 98 de E7 del VPH para la fabricación del medicamento.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2, donde la secuencia de aminoácidos del péptido E6 del VPH es tomada de la parte del C-terminal de una proteína E6 del VPH tal y como se define mediante las posiciones de aminoácido 81 - 158.
4. Un uso según la reivindicación 3, donde el péptido E6 del VPH comprende una secuencia de aminoácidos que abarca una región de las posiciones de aminoácido 127 - 142 de la proteína E6 de VPH.
- 20 5. Uso según la reivindicación 2, donde el péptido E6 de VPH es seleccionado de un péptido que consiste en las posiciones de aminoácido 1 - 22, 11 - 32, 19 - 50, 21 - 42, 31 - 52, 41 - 62, 51 - 72, 61 - 82, 71 - 92, 81 - 102, 91 - 112, 101 - 122, 109 - 140, 109 - 143, 111-132, 121-142, 124-158, 127-158, 131-152, 141-162 y 137-158 de E6 del VPH.
- 25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el uso de un péptido E2 del VPH con una longitud de 22 - 45 aminoácidos y con una secuencia de aminoácidos tomada de una proteína E2 del VPH para la fabricación del medicamento.
7. Uso según la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos del péptido E2 de VPH es tomada de una región que se define por las posiciones de aminoácido 31 - 120, 151 - 195 o 271 - 365.
- 30 8. Uso según la reivindicación 6 ó 7, donde el péptido E2 de VPH comprende una secuencia de aminoácidos que abarca una región seleccionada entre las posiciones de aminoácido 51 - 70, 61 - 76, 311 - 325, 316 - 330, 346 - 355 y 351 - 365 de la proteína E2.
- 35 9. Uso según la reivindicación 8, donde la enfermedad relacionada con VPH es una infección del VPH, una lesión de NIC o cáncer cervical.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el VPH tiene un serotipo seleccionado de 16, 18, 31, 33, 45, 59 y 68.
- 40 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medicamento comprende además un adyuvante, preferiblemente donde el adyuvante comprende al menos uno entre: un exosoma, poli I: C, poli I: poli C<sub>12</sub> U, monofosforil lípido A, un CpG que contiene ácido nucleico, un ligando CD40 o anticuerpo anti-CD40.
- 45 12. Medicamento que comprende un péptido y opcionalmente un adyuvante según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

*Fig 1a*



*Fig 1b*

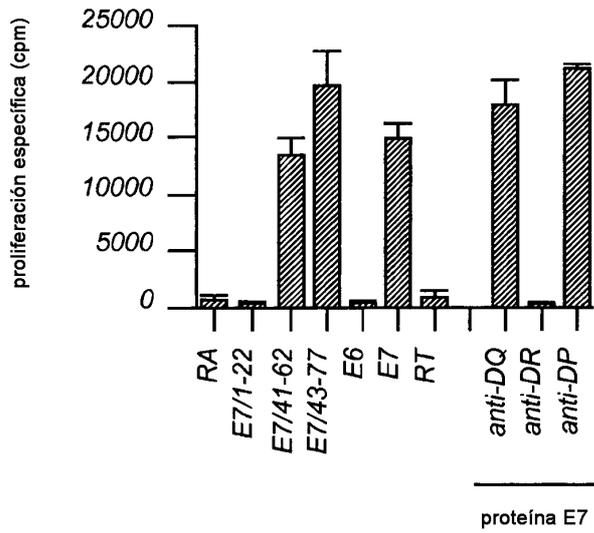


Fig 1c

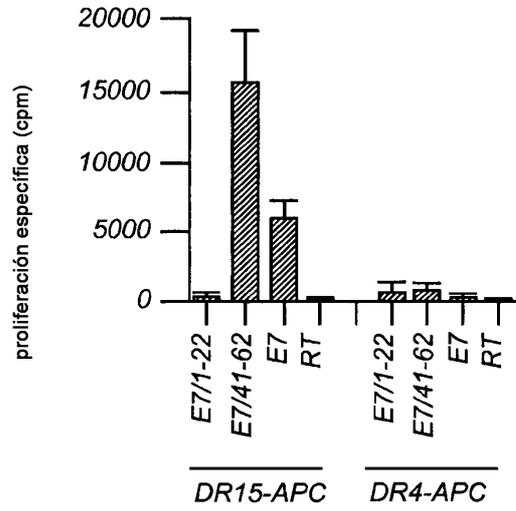


Fig 1d

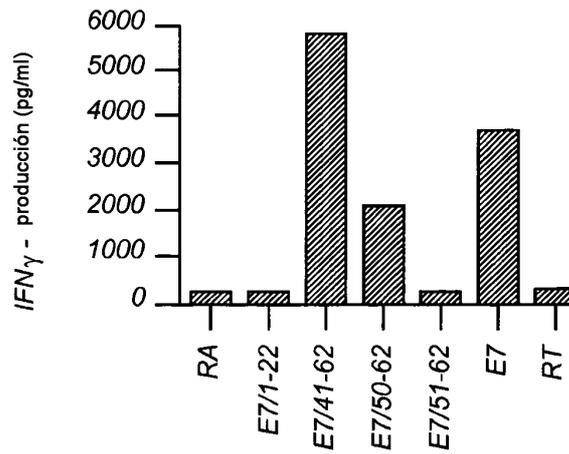


Fig 2a

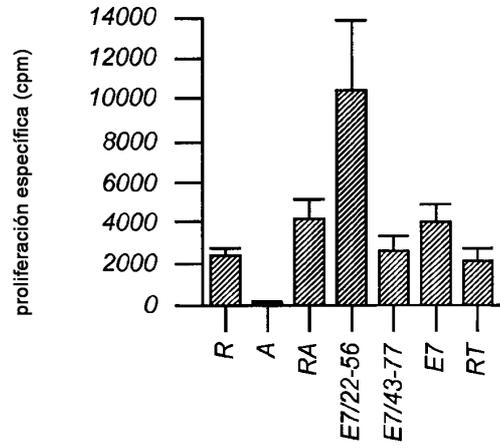


Fig 2b

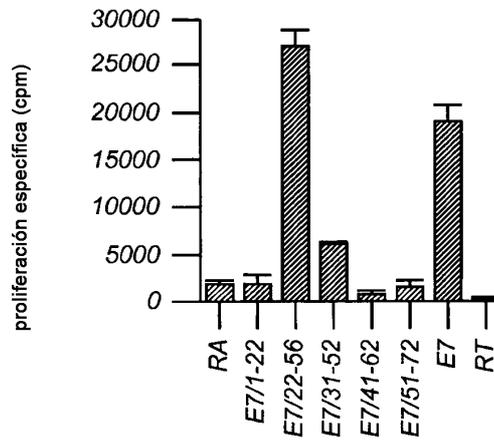
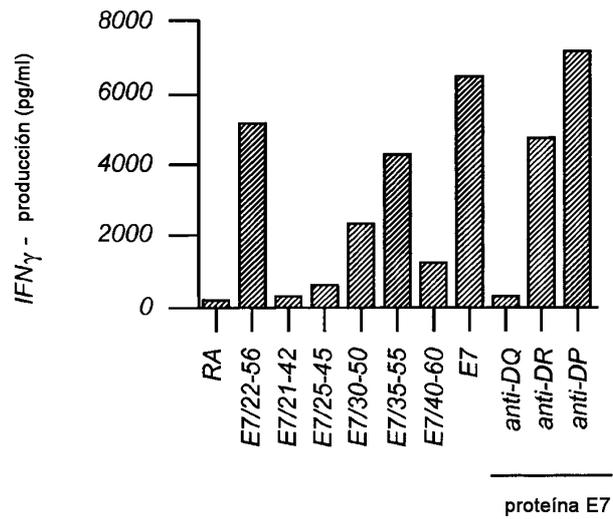


Fig 2c



proteína E7

Fig 3a

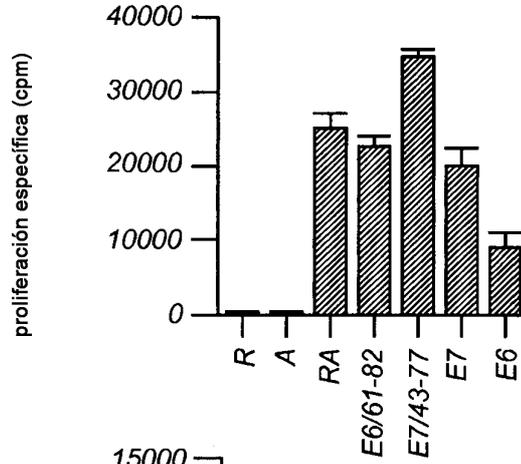


Fig 3b

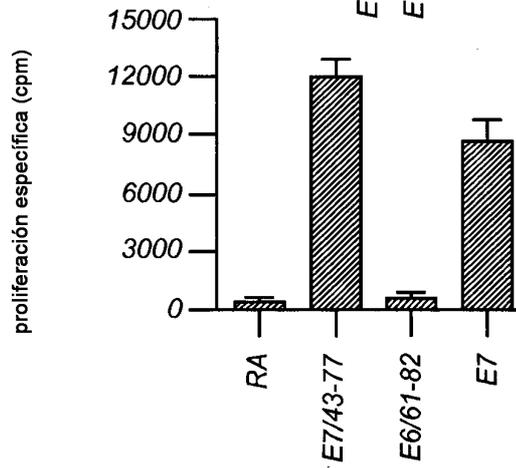


Fig 3c

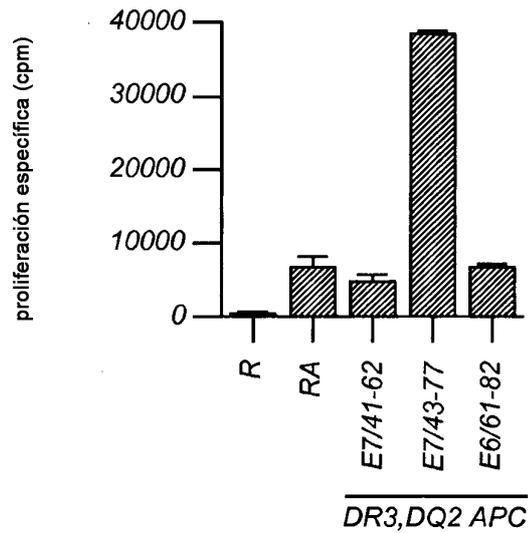


Fig 3d

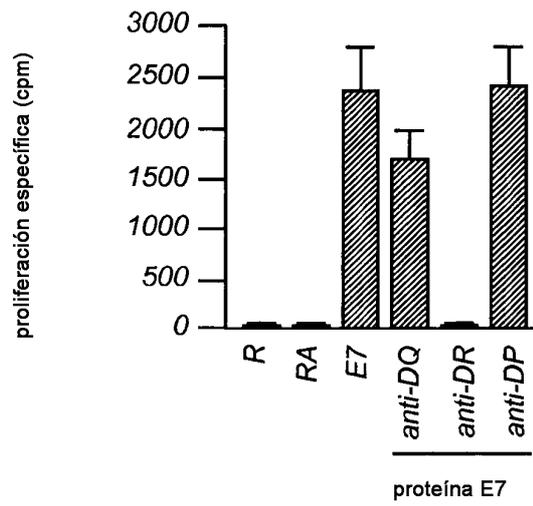
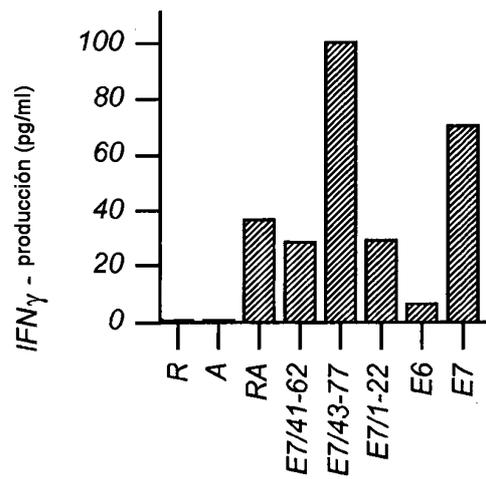
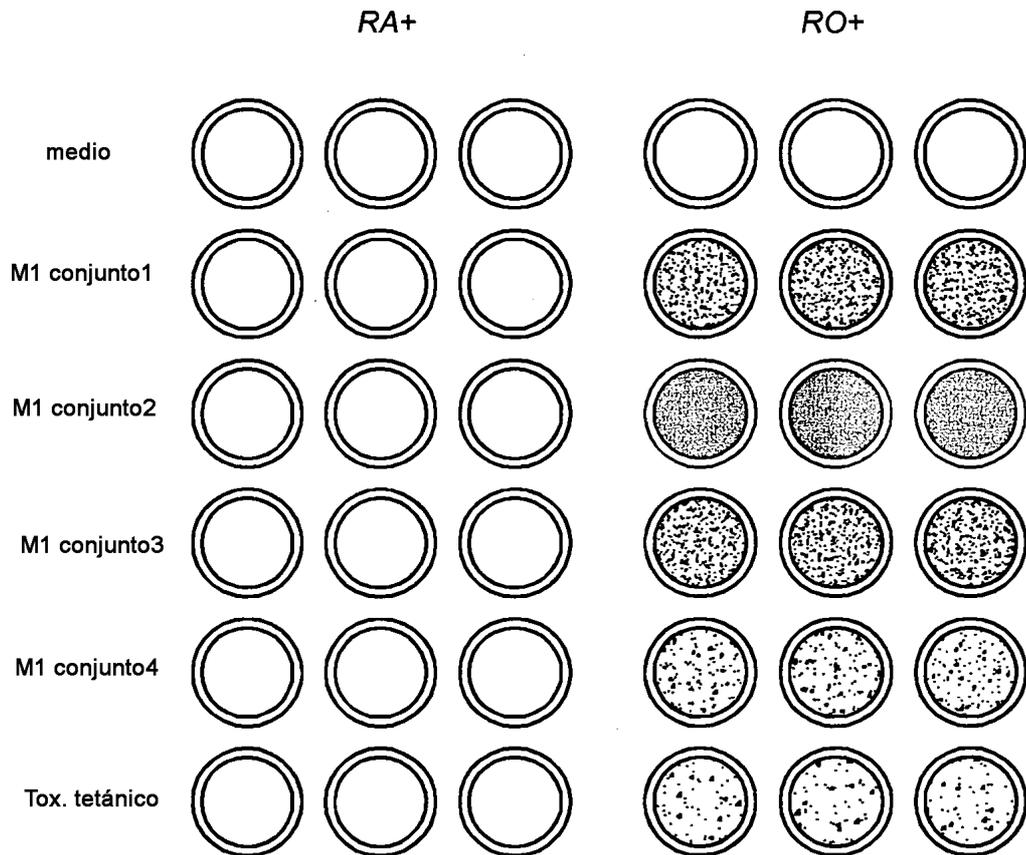


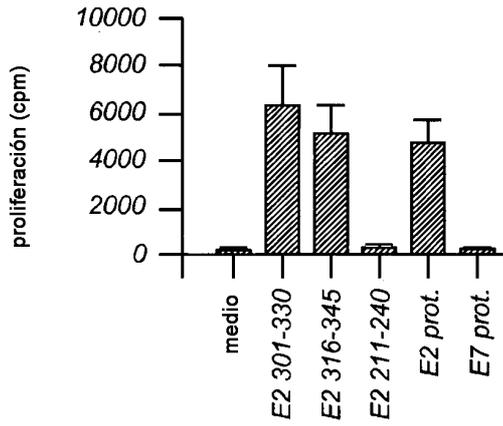
Fig 3e



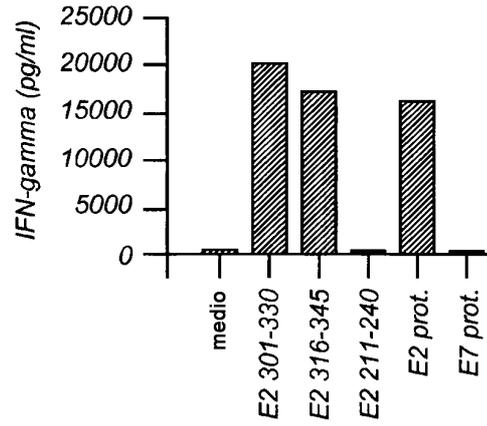
*Fig 4*



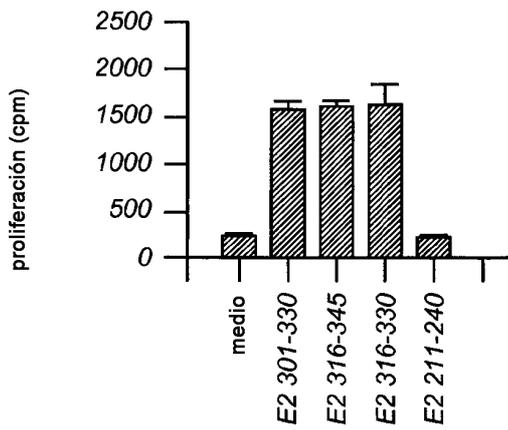
**Fig 5a**



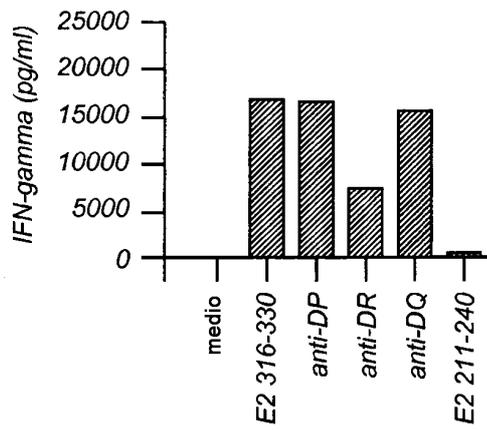
**Fig 5b**



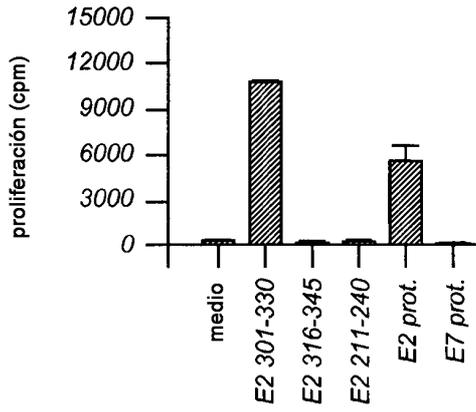
**Fig 5c**



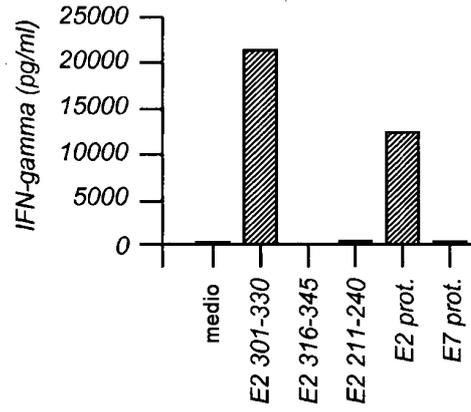
**Fig 5d**



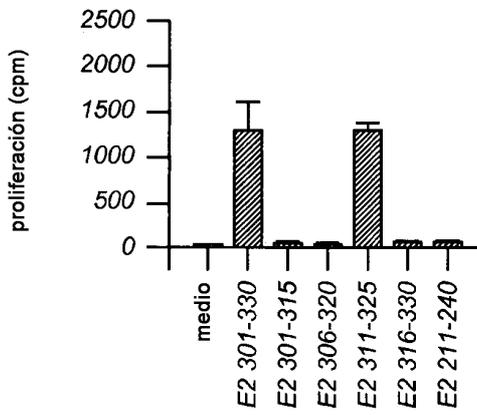
**Fig 6a**



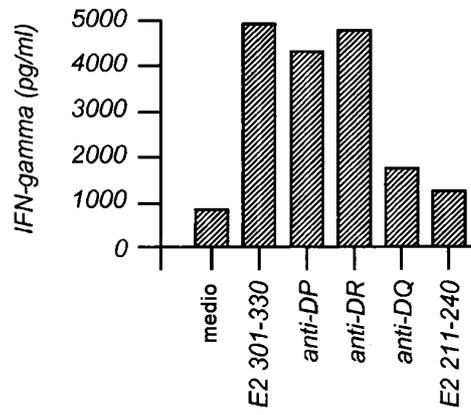
**Fig 6b**



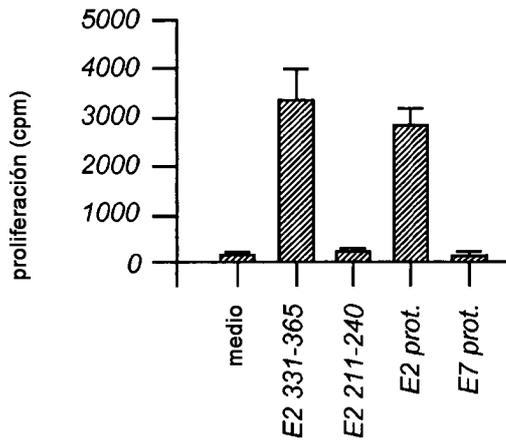
**Fig 6c**



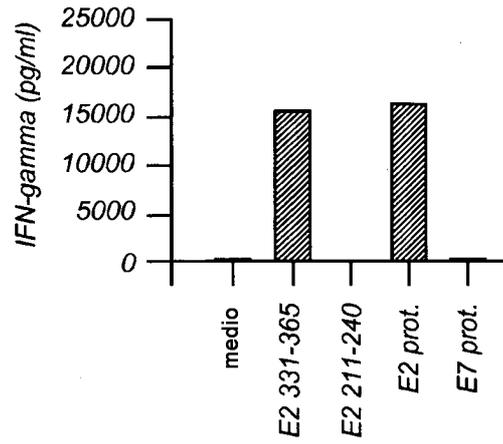
**Fig 6d**



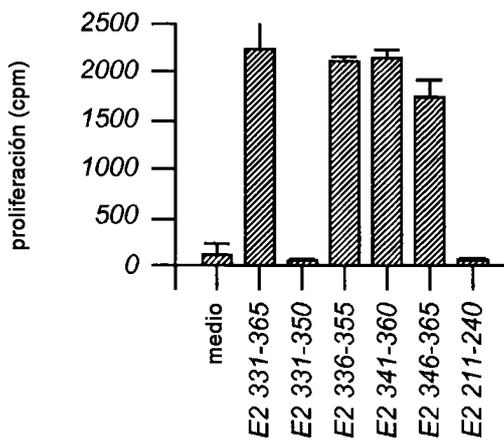
**Fig 7a**



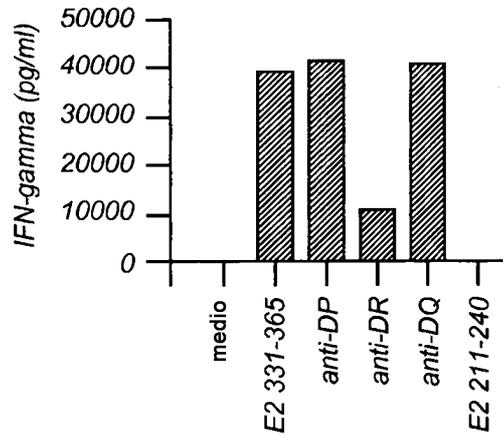
**Fig 7b**



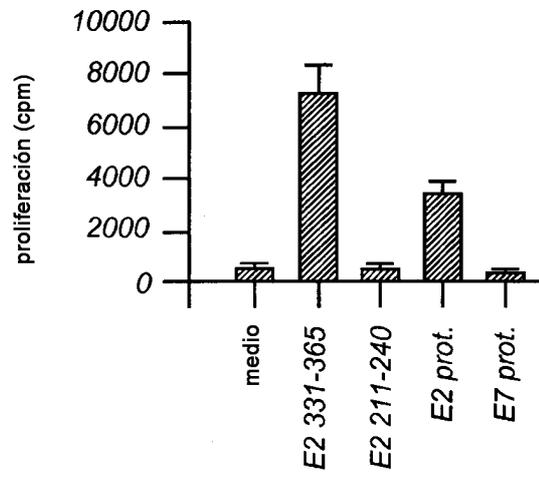
**Fig 7c**



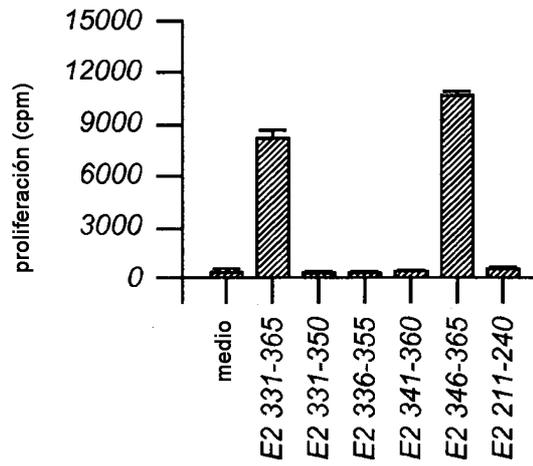
**Fig 7d**



*Fig 8a*



*Fig 8b*



*Fig 8c*

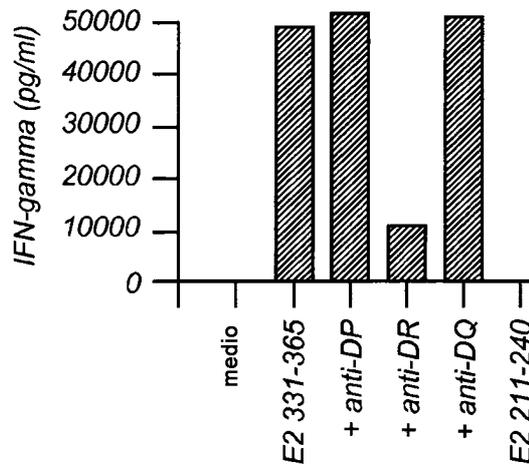


Fig 9a

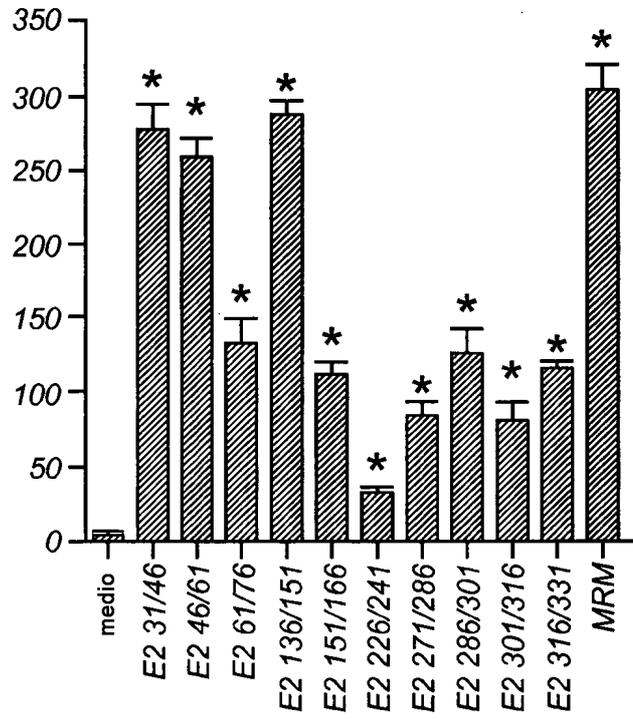


Fig 9b

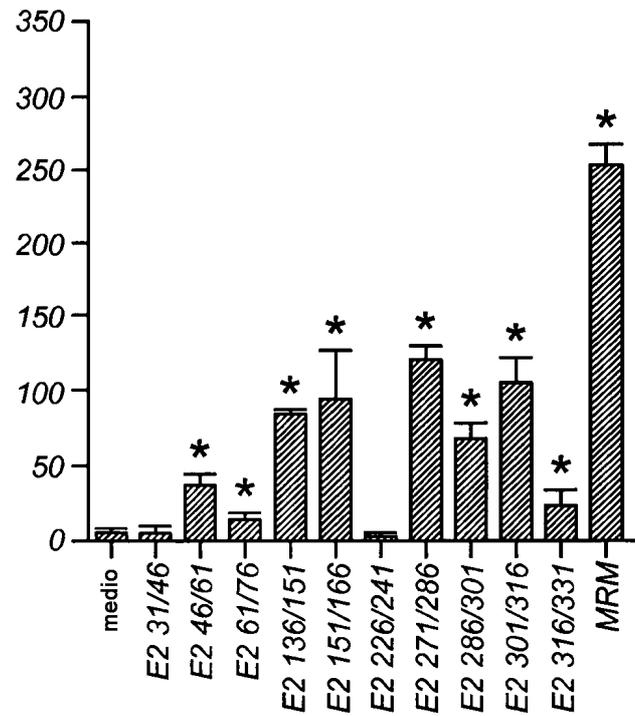


Fig 9c

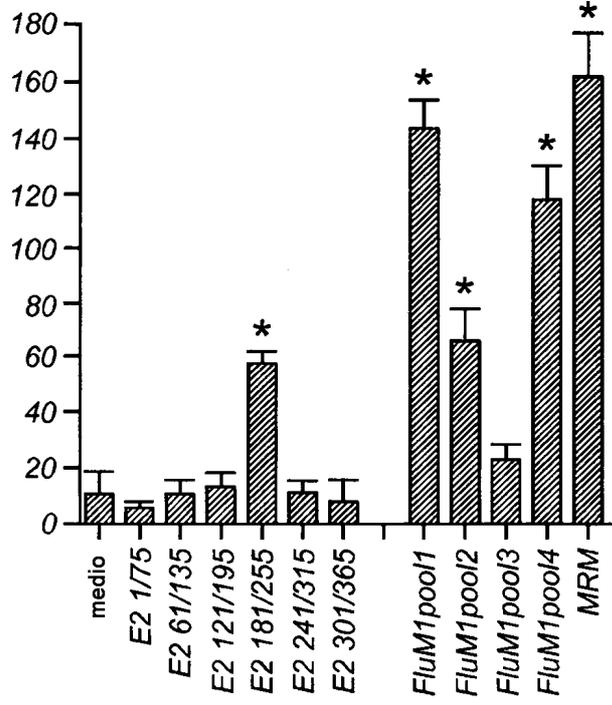


Fig 9d

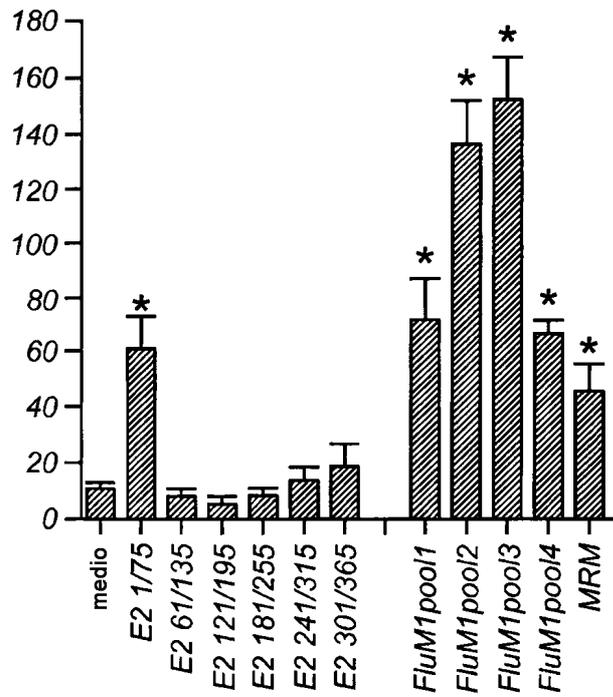


Fig 9e

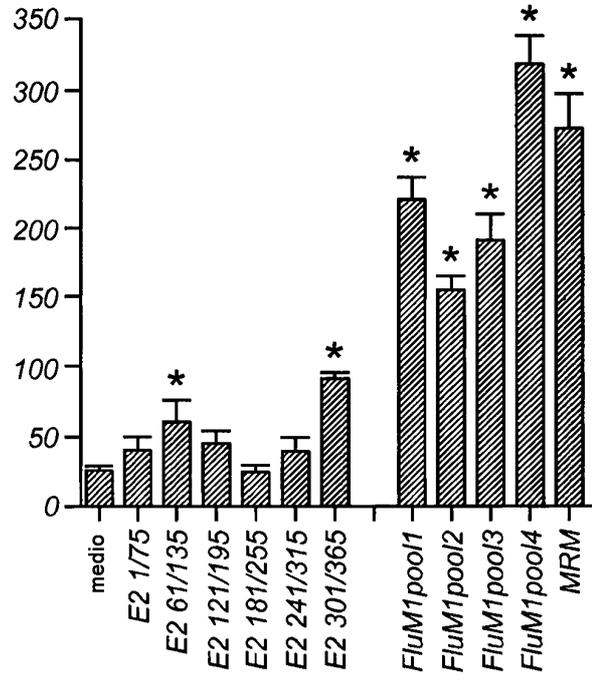
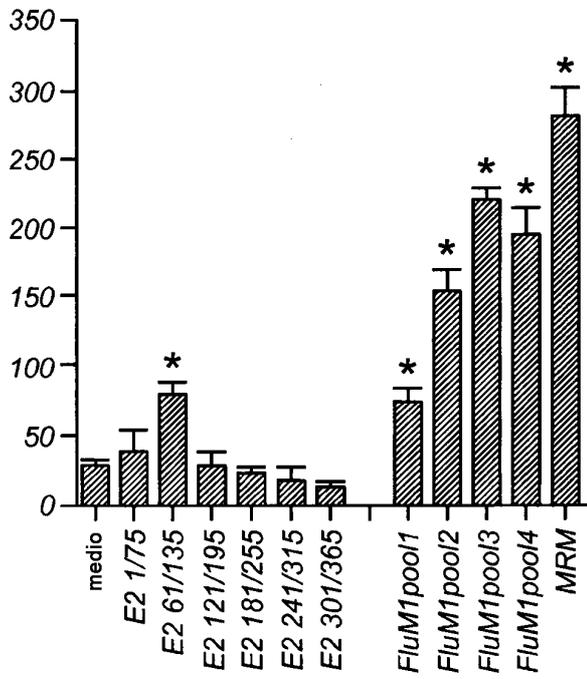
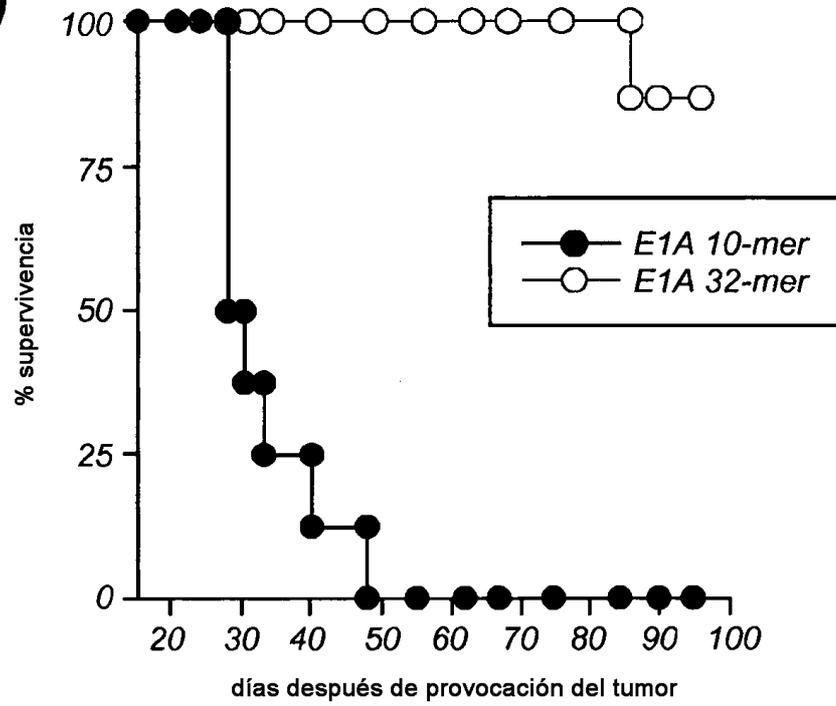


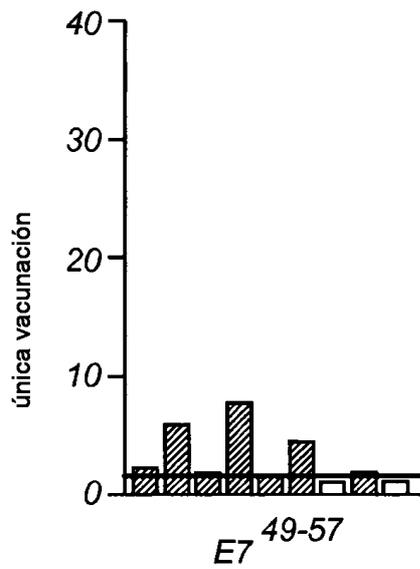
Fig 9f



**Fig 10**



**Fig 11a**



**Fig 11b**

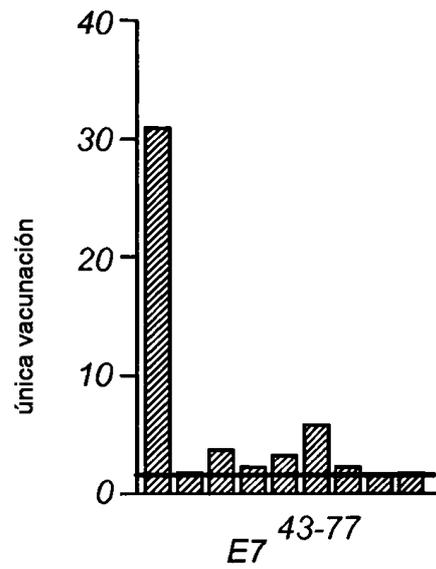


Fig 11c

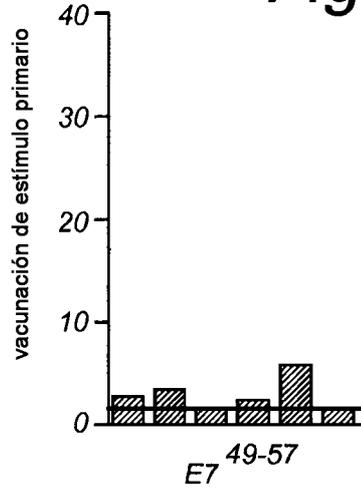


Fig 11d

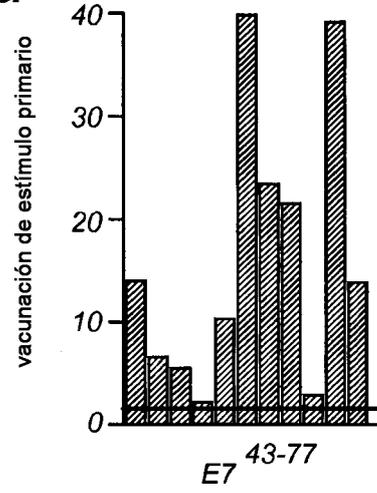


Fig 11e

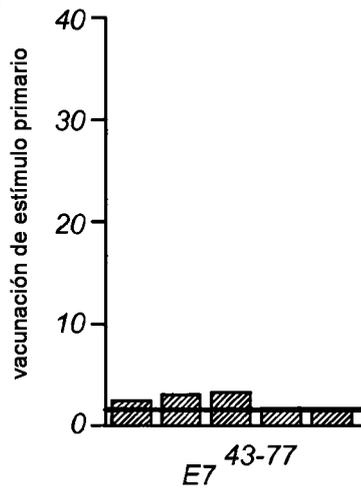


Fig 12a

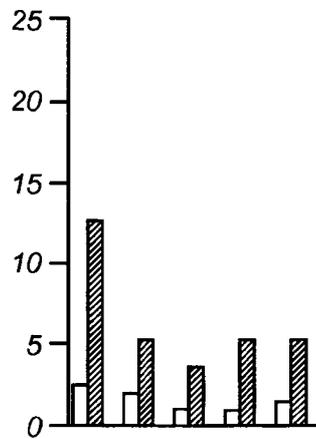
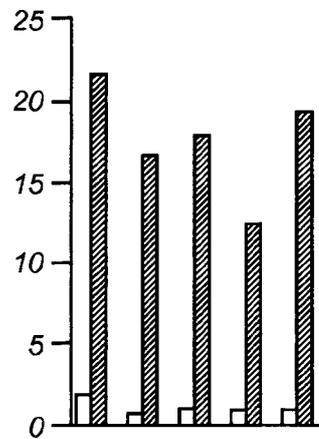
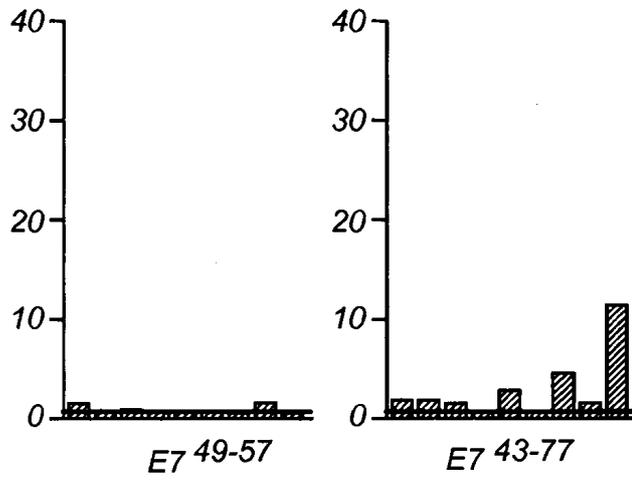


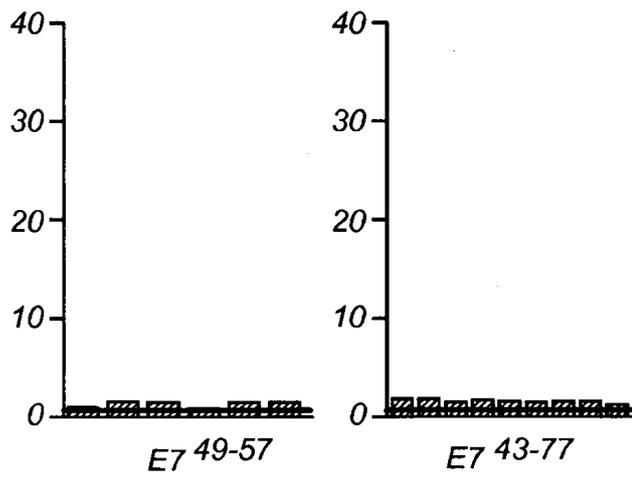
Fig 12b



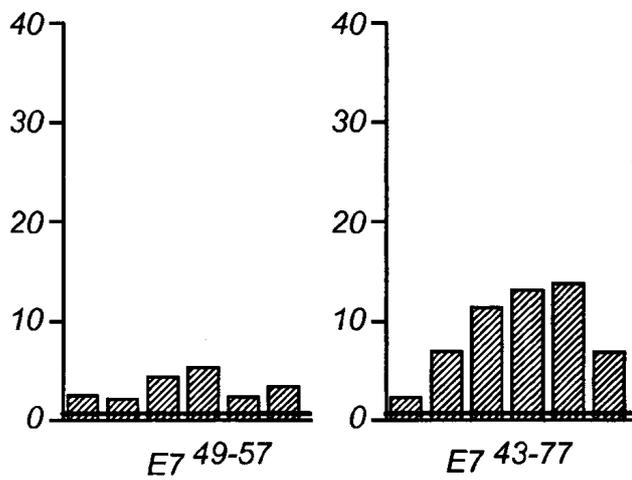
*Fig 13a*



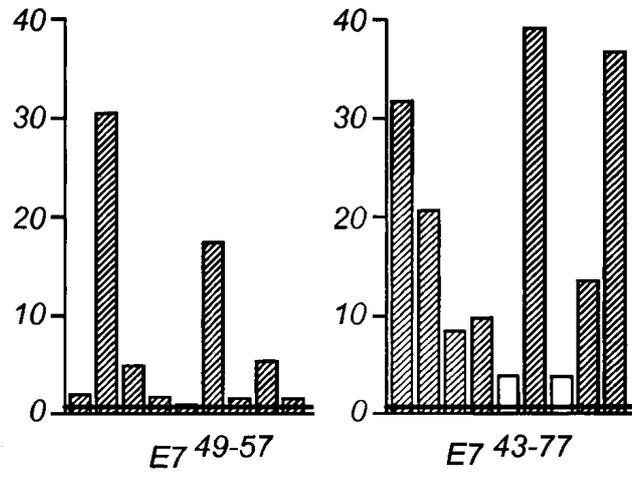
*Fig 13b*



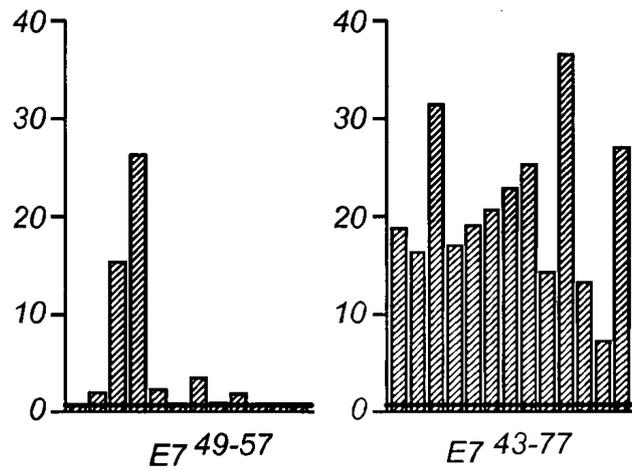
*Fig 13c*



*Fig 13d*



*Fig 13e*



*Fig 13f*

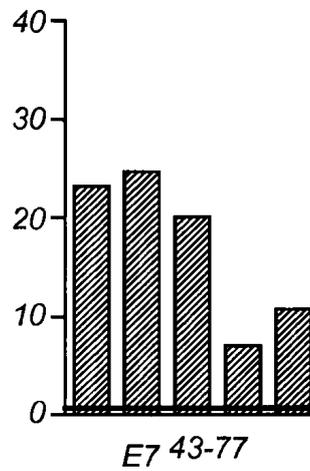


Fig 14a

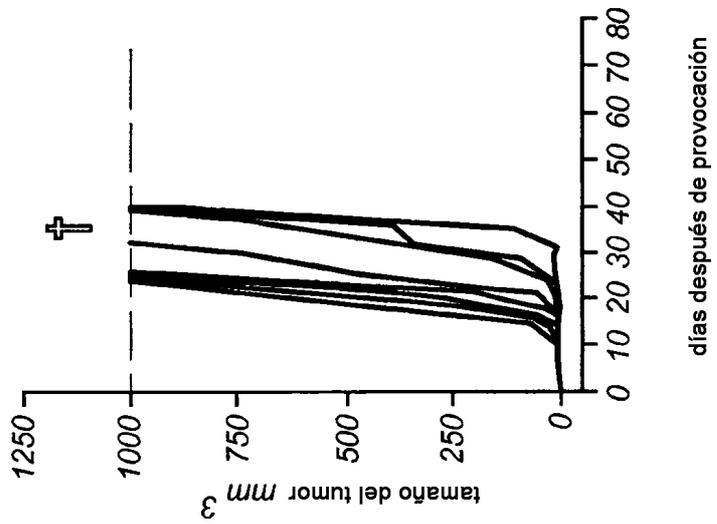


Fig 14b

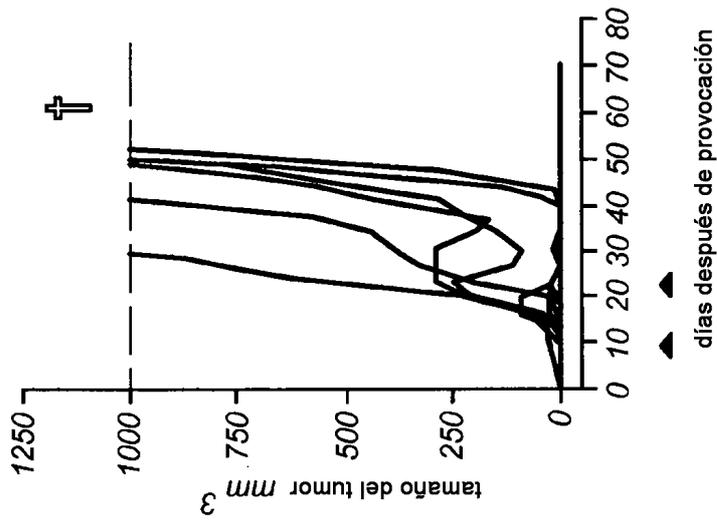
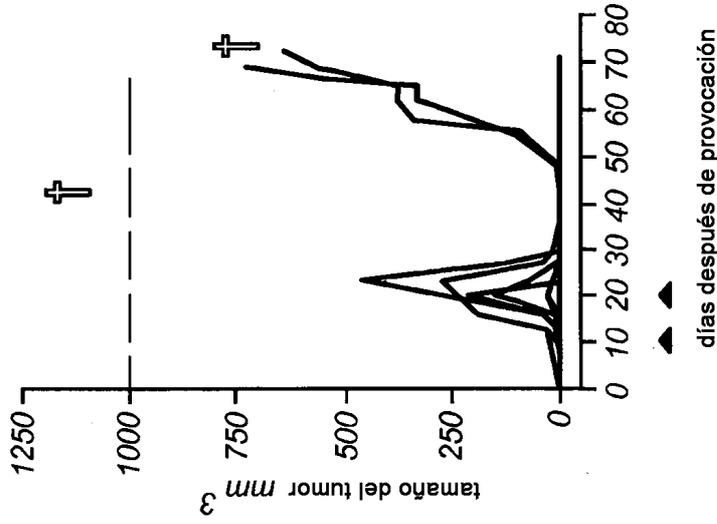
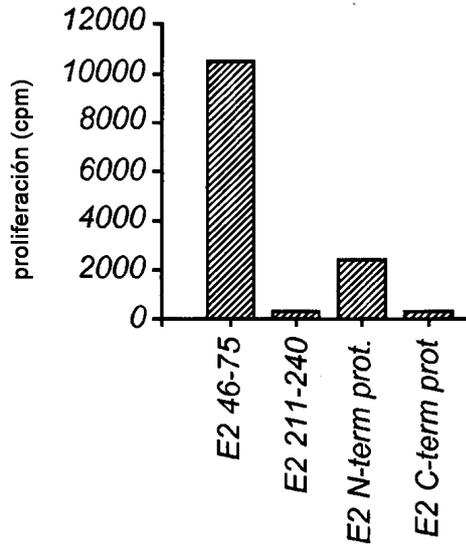


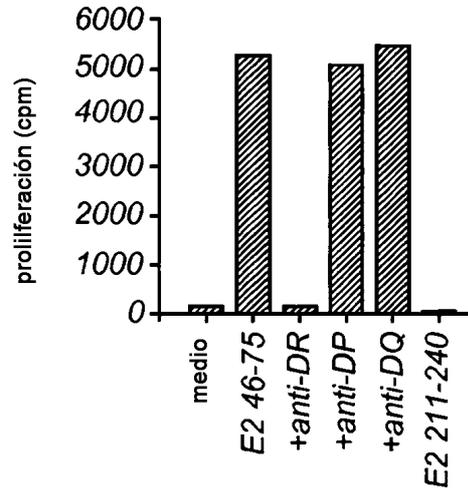
Fig 14c



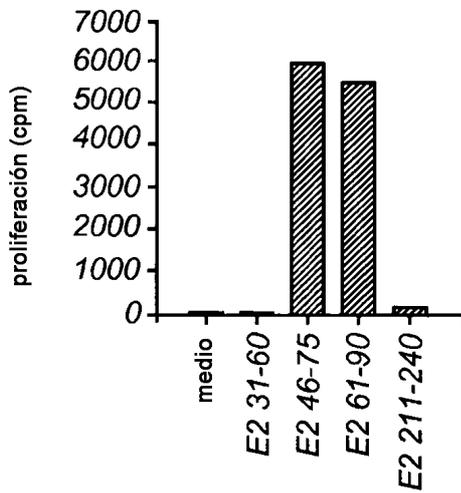
**Fig 15a**



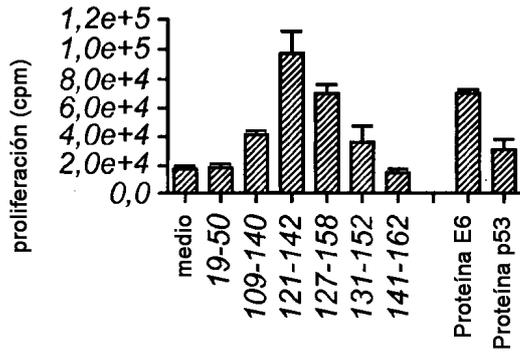
**Fig 15b**



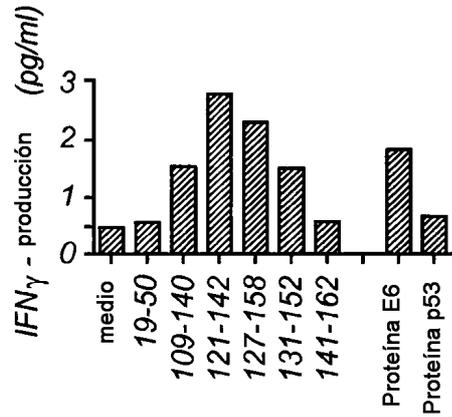
**Fig 15c**



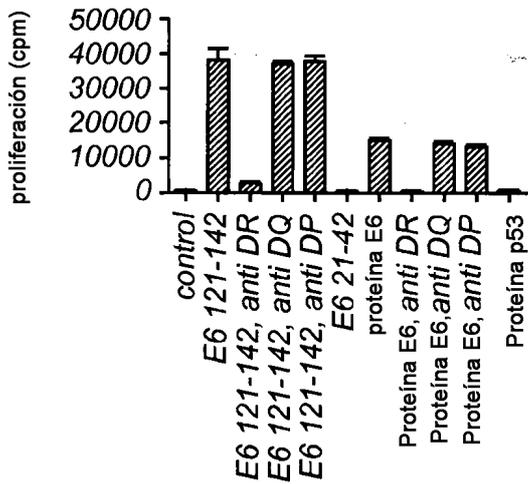
**Fig 16a**



**Fig 16b**



**Fig 16c**



**Fig 16d**

