

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 108**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/08** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2011 E 11007685 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2573105**

54 Título: **Péptidos derivados de p<sup>16INK4a</sup> para la profilaxis y el tratamiento de tumores asociados a VPH y otros tumores que expresan p<sup>16INK4a</sup>**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.02.2016**

73 Titular/es:

**RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG  
(100.0%)  
Grabengasse 1  
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**KLOOR, MATTHIAS;  
REUSCHENBACH, MIRIAM y  
KNEBEL-DOEBERITZ, MAGNUS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 560 108 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 derivados de p16<sup>INK4a</sup> para la profilaxis y el tratamiento de tumores asociados a VPH y otros tumores que expresan p16<sup>INK4a</sup>

5 La presente invención se refiere a un fragmento particular del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p16<sup>INK4a</sup> y al uso de dicho fragmento para inmunizar a un individuo contra tumores que expresan p16<sup>INK4a</sup>.

10 Varios millones de personas se enferman y mueren de carcinomas en todo el mundo cada año. Estas tasas de mortalidad han permanecido sin cambios durante muchos años a pesar de la investigación intensiva de tratamientos. Hasta ahora, los pacientes que sufren de carcinomas a menudo tienen que someterse a cirugía para extirpar el carcinoma o quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, esto es acompañado por efectos secundarios muy masivos que luego contribuyen a las tasas de mortalidad de los pacientes que sufren de carcinomas. Curiosamente, los virus del papiloma humano (VPH) se asocian al desarrollo de más del 5% de todos los cánceres (Parkin y Bray, 2006). La vacunación profiláctica contra el VPH ya está disponible pero no muestra ningún efecto terapéutico en personas ya infectadas (Hildesheim et al., 2007). Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas opciones de tratamiento.

15 Es, por lo tanto, el objetivo de la presente invención proporcionar un medio para el tratamiento y la profilaxis de tumores asociados al VPH y otros tumores que expresan p16<sup>INK4a</sup>.

20 Según la invención, esto se logra mediante los temas definidos en las reivindicaciones. Los estudios conducentes a la presente invención emanaron de la observación de que la proteína celular p16<sup>INK4</sup> se expresa en las células infectadas por VPH cuando las células logran un fenotipo transformado y posiblemente maligno debido a la interrupción de un circuito de retroalimentación negativo por el producto del oncogén de VPH E7 (Sano et al., 1998; Klaes et al., 2001). Por lo tanto, p16<sup>INK4a</sup> se expresa fuertemente en casi todos los carcinomas inducidos por VPH y preneoplasias de alto grado, que incluyen tumores de cuello uterino, vulvar, vaginal, peniano, anal y de cabeza y cuello (Ishikawa et al., 2006; Samama et al., 2006; Missaoui et al., 2006; Santos et al., 2006; Roma et al., 2008; Hafkamp et al., 2003). En condiciones fisiológicas p16<sup>INK4</sup> sólo se expresa en células que sufren senescencia subsiguiente y, por lo tanto, apenas se encuentra expresado en los tejidos normales (Beauséjour et al., 2007).  
25 Además de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> dirigida por el oncogén de VPH en los tumores asociados a VPH, p16<sup>INK4a</sup> también se encuentra sobreexpresada en diversos tumores no asociados a una infección por VPH o en tumores en los que se ha encontrado VPH pero no se ha probado una carcinogénesis viral, inclusive una fracción de cánceres de piel melanomas y no melanomas (Nindl et al., 2004; Busch et al., 2010), cánceres de pulmón (Leversha et al., 2003; Esposito et al., 2004), cánceres esofágico, gástrico y colorrectal (Ding et al., 2010; Kim et al., 2005) y cánceres de riñón, vejiga, ovario, endometrio y de mama (Ikuerowo et al. 2007; Buza et al., 2010; Giordano et al., 2008; Giordano et al., 2007; di Vinci et al., 2005). Se sabe que las mutaciones del gen supresor del tumor de retinoblastoma resulta en el aumento de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> (Okamoto et al., 1994). Sin embargo, los mecanismos subyacentes para la fuerte expresión de p16<sup>INK4a</sup> en estos casos son probablemente más heterogéneos y no totalmente comprendidos.

35 Se ha informado que los linfocitos T aislados de tejido de cáncer de cuello uterino son reactivos contra p16<sup>INK4a</sup> y que las CMSP (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos pueden ser activadas por péptidos de p16<sup>INK4a</sup> presentados por células positivas para HLA-A2 para lisar líneas celulares de cáncer de cuello uterino (Wentzensen et al.; 2005). Además, se observó reactividad de anticuerpos contra p16<sup>INK4a</sup> en pacientes con cánceres asociados a VPH a niveles muy bajos, independiente de los antecedentes de la enfermedad  
40 ((Reuschenbach et al.; 2008).

La sobreexpresión de productos génicos endógenos en células cancerosas ha sido reconocido desde hace mucho tiempo como una valiosa fuente de antígenos asociados a tumores. Se han observado respuestas inmunitarias contra dichos antígenos en varios pacientes con cáncer y se han incrementado en ensayos clínicos inmunoterapéuticos (Jäger et al., 2003; Finn, 2008; Rescigno et al., 2007).

45 Durante los experimentos conducentes a la presente invención se pudo demostrar que linfocitos T aislados de muestras de sangre periférica de individuos sanos pueden ser especialmente estimulados *in vitro* con péptidos derivados de p16<sup>INK4a</sup> y que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de pacientes con cáncer de cuello uterino muestran reactividad espontánea contra el mismo péptido de p16<sup>INK4a</sup> y dan lugar a líneas de linfocitos T citotóxicos que son capaces de atacar y matar las células cargadas con p16<sup>INK4a</sup> HLA-compatibles cultivadas conjuntamente y a líneas celulares de cáncer de cuello uterino. En otras palabras, los fragmentos de p16<sup>INK4</sup> son muy inmunógenos al inducir una respuesta inmunitaria muy fuerte contra p16<sup>INK4</sup>. Además, se ha demostrado que también son detectables  
50 respuestas inmunitarias humorales contra p16<sup>INK4a</sup>.

55 El patrón de expresión descrito de p16<sup>INK4</sup> y el hallazgo de las respuestas inmunitarias espontáneas contra p16<sup>INK4</sup> que no están asociadas a enfermedades autoinmunitarias hacen de p16<sup>INK4</sup> un potencial fármaco prometedor para la inmunización de pacientes con cánceres que expresan p16<sup>INK4a</sup>. Una respuesta inmunitaria fuerte inducida activamente contra p16<sup>INK4</sup> podría destruir específicamente las células transformadas por VPH y otras células cancerosas que expresan p16<sup>INK4a</sup>. Se realizó la vacunación de linfocitos T de donantes con estos péptidos de p16<sup>INK4</sup> en experimentos de cultivo celular. Experimentos adicionales usando los péptidos de p16<sup>INK4</sup> revelaron

respuestas espontáneas de linfocitos T en pacientes con cáncer de cuello uterino lo que confirma que péptidos de p16<sup>INK4</sup> particulares son inmunógenos también *in vivo*. Así, la profilaxis o el tratamiento del cáncer basado en la vacunación con estos péptidos debe tener varios beneficios para un paciente. p16<sup>INK4</sup> se expresa fuertemente en todos los cánceres asociados a VPH independientemente del tipo de VPH y en otros varios tipos de cáncer. No se esperan efectos secundarios graves por la inmunización con p16<sup>INK4</sup>, porque p16<sup>INK4</sup> apenas se expresa en los tejidos normales y no se han observado fenómenos autoinmunitarios en individuos con respuestas inmunitarias espontáneas contra p16<sup>INK4</sup>. Por último, la evasión inmunitaria debida a la pérdida de antígenos es muy improbable, porque la expresión de p16<sup>INK4</sup> está estrechamente vinculada al fenotipo maligno de las células tumorales.

**Breve descripción de las figuras**

10 Figura 1: Resultados de ELISpot (interferón gamma) antes (A) y después (B) de la estimulación de linfocitos T de donantes con los péptidos de p16<sup>INK4a</sup>

15 El recuento de manchas se normaliza restando la detección de manchas de fondo en los pocillos sin péptidos. En B el mayor recuento de células estimuladas con los péptidos p16<sup>INK4a</sup>\_37-63, p16<sup>INK4a</sup>\_51-80 y p16<sup>INK4a</sup>\_73-104 en comparación con el día 0 se torna evidente. CEF = CMV, EBV, control positivo de la mezcla de péptidos de gripe (influenza, flu).

Figura 2: Resultados de ELISpot (interferón gamma) en 23 pacientes (Tx y Fx) y 15 controles sanos (BCx) contra la mezcla de virus de control positivo (CEF) y contra los siete péptidos de p16<sup>INK4a</sup> de 30 mer (Tabla 1)

20 Los resultados son el fondo ajustado y sólo se consideran las manchas por encima del límite de corte (2 veces las manchas en el pocillo de control negativo + 2 desviaciones estándar de la reactividad contra el péptido de p16<sup>INK4a</sup> respectivo). Dos individuos tuvieron respuestas CD4<sup>+</sup>, el resto tuvo respuestas CD8<sup>+</sup>. Na = no se analizó.

Figura 3: Ensayo de liberación de cromo

25 Los linfocitos T CD8 de una paciente con cáncer de cuello uterino (HLA A2 A3 B7 B15 Cw3 Cw7) inducen la lisis de los linfocitos B HLA-compatibles cargados con p16<sup>INK4a</sup>\_37-63 (cuadrados negros) pero no de los mismos linfocitos B sin el péptido de p16<sup>INK4a</sup> (triángulos abiertos). Se lisan líneas celulares de cáncer de cuello uterino (p16<sup>INK4a+</sup>, HLA A68, B15, B95, Cw7 Cw12) y Caski (p16<sup>INK4a+</sup>, HLA A2, A3, B7, B37, Cw5, Cw7) en tanto no se detecta lisis de ME180 y K562.

Figura 4: Proliferación de células mononucleares de sangre periférica de mujeres con displasias de cuello uterino después de la estimulación con los siete péptidos de p16<sup>INK4a</sup> (Tabla 1)

30 Se muestran las densidades ópticas del ensayo de proliferación de BrdU después de la incubación de las CMSP con los péptidos de p16<sup>INK4a</sup>, los controles positivos (mitógeno PHA y toxoide tetánico) y los controles negativos (sin antígeno). Las líneas punteadas indican el límite de corte para la respuesta positiva. Los asteriscos indican proliferación que induce los péptidos de p16<sup>INK4a</sup>. Se muestran los resultados de tres pacientes que reaccionan y una paciente negativa.

Figura 5: Reactividad serológica de p16<sup>INK4a</sup> en inmunotransferencia tipo Western

35 (a) (1) Tinción con plata de p16<sup>INK4a</sup> marcado con His purificada. (2) Inmunotransferencia tipo Western de p16<sup>INK4a</sup> marcada con His con el anticuerpo monoclonal E6H4 anti-p16<sup>INK4a</sup>.

(b) Se muestran 6 sueros positivos representativos. El tamaño de la proteína corresponde a la reacción del anticuerpo monoclonal (E6H4) contra la proteína recombinante.

(c) Ejemplos de sueros negativos (1 y 2).

40 (d) Reactividad del suero de p16<sup>INK4a</sup> antes (1) y después (2) de la preincubación del suero con p16<sup>INK4a</sup> recombinante. (3) Detección de la proteína p16<sup>INK4a</sup> precipitada por el suero obtenido de una paciente con cáncer de cuello uterino y detectada mediante un anticuerpo monoclonal anti-p16<sup>INK4a</sup> directamente marcado con HRP (de (Reuschenbach et al., 2008).

45 La presente invención, por lo tanto, se refiere a un fragmento particular del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p16<sup>INK4</sup> capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra p16<sup>INK4a</sup>. Una respuesta inmunitaria se define como un estado que cumple al menos uno de los criterios siguientes: 1. La inducción de linfocitos T CD8-positivos, detectables por ensayos de citotoxicidad o secreción de IFN-gamma o expresión de perforina o expresión de granzima B u otras citocinas que pueden ser producidas por los linfocitos T CD8-positivos, medibles como el fondo mencionado antes por ELISpot o tinción intracelular de citocinas o ELISA de citocinas o métodos equivalentes. 2. La inducción de linfocitos T CD4-positivos, detectables mediante la secreción de citocinas medible como el fondo mencionado antes por ELISpot o tinción intracelular de citocinas o ELISA de citocinas o métodos equivalentes. Las citocinas pueden comprender IFN-alfa, IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF-alfa, TGF-beta u otras citocinas que pueden ser producidas por los linfocitos T CD4-positivos. 3. La inducción de anticuerpos, detectable por inmunotransferencia tipo Western, ELISA y métodos equivalentes o relacionados. 4. La inducción de

cualquier tipo de respuesta inmunitaria celular no mediada por linfocitos T CD8-positivos o CD4-positivos como se describe en 1 y 2. El fragmento de p16<sup>INK4a</sup> consiste en LPNAPNSYGRRIQVMMMSARVAELL.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica el fragmento de la invención o un vector que contiene dicho ácido nucleico. La inyección directa de material genético en un huésped vivo hace que una pequeña cantidad de sus células produzca los productos del gen introducido. Esta expresión génica inadecuada dentro del huésped tiene importantes consecuencias inmunológicas, que resultan en la activación inmunitaria específica del huésped contra el antígeno liberado por el gen. La inyección directa del ADN plasmídico desnudo induce respuestas inmunitarias fuertes al antígeno codificado por la vacuna génica. Una vez que se inyecta el constructo del ADN plasmídico las células huésped toman el ADN extraño, expresando el gen viral y produciendo p16<sup>INK4a</sup> dentro de la célula. Esta forma de presentación y procesamiento del antígeno induce respuestas inmunitarias celulares y humorales restringidas por MHC tanto clase I como clase II. Las vacunas de ADN se componen de vectores que contienen normalmente dos unidades: la unidad de expresión del antígeno compuesta por secuencias de promotor/potenciador, seguidas de las secuencias que codifican el antígeno (FSP) y de poliadenilación, y la unidad de producción compuesta por las secuencias necesarias para la amplificación y la selección del vector. La construcción de vectores con insertos de vacuna se realiza mediante tecnología de recombinación del ADN y el experto en la materia conoce vectores que se pueden utilizar para este método. La eficacia de la inmunización con ADN se puede mejorar estabilizando el ADN contra la degradación y aumentando la eficacia de la administración de ADN en células presentadoras de antígeno. Esto ha sido demostrado mediante recubrimiento de micropartículas catiónicas biodegradables (como las poli(láctido-co-glicólido) formuladas con bromuro de cetiltrimetilamonio) con ADN. Estas micropartículas recubiertas de ADN pueden ser tan eficaces para elevar los LTC (linfocitos T citotóxicos) como los virus vaccinia recombinantes, especialmente cuando se mezcla con alumbre. Las partículas de 300 nm de diámetro parecen ser las más eficaces para la absorción por las células presentadoras de antígeno.

Diversos vectores de expresión, por ejemplo, vectores plasmídicos o virales, se pueden utilizar para contener y expresar secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen un fragmento de la presente invención.

Un vector viral preferido es un poxvirus, un adenovirus, un retrovirus, un herpesvirus o un virus adeno-asociado (VAA). Los poxvirus particularmente preferidos son: virus vaccinia, NYVAC, virus avipox, virus canarypox, ALVAC, ALVAC(2), virus de la viruela aviar o TROVAC.

Los vectores recombinantes basados en alfavirus también se han utilizado para mejorar la eficacia de la vacunación con ADN. Se inserta el gen que codifica el fragmento de la invención en el replicón del alfavirus, reemplazando genes estructurales pero dejando intactos los genes de la replicasa no estructurales. Los virus Sindbis y Semliki Forest se han utilizado para construir replicones recombinantes de alfavirus. A diferencia de las vacunaciones de ADN convencionales, sin embargo, los vectores de alfavirus se expresan sólo transitoriamente. Los replicones de alfavirus desarrollan una respuesta inmunitaria debido a los altos niveles de proteína expresada por este vector, respuestas de citocinas inducidas por replicón, o apoptosis inducida por replicón que conducen a una mayor absorción de antígenos por las células dendríticas.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene el fragmento, la secuencia de ácido nucleico o el vector de la presente invención en una cantidad adecuada para la inmunización de un individuo y, preferentemente, de uno o más agentes auxiliares comunes. Dicho fragmento, la secuencia de ácido nucleico o el vector pueden estar presentes como tales o en combinación con portadores. Es favorable que los portadores no sean inmunógenos para el individuo. Dichos portadores pueden ser las propias proteínas del individuo o proteínas extrañas o fragmentos de éstas. Se prefieren los portadores como seroalbúmina, fibrinógeno o transferrina o un fragmento de éstos. Los fragmentos contienen epítopos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, por ej. los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o los linfocitos T CD4, y pueden inducir una respuesta inmunitaria. Dichos epítopos de proteínas reguladoras del ciclo celular pueden ser determinados por métodos familiares para los expertos en el área. También puede ser ventajoso que estén presentes simultáneamente diversos fragmentos. Para la producción recombinante de los fragmentos mencionados antes, se hace referencia, por ej., a Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y. (1989).

La presente divulgación también se refiere al uso del fragmento, la secuencia del ácido nucleico o el vector de la presente invención para la producción de una vacuna destinada a prevenir o tratar una preneoplasia, una neoplasia o un carcinoma (inclusive un carcinoma avanzado) que expresen p16<sup>INK4a</sup>.

Por ejemplo, éstos pueden ser carcinomas anogenitales que expresen p16<sup>INK4a</sup> inducidos por VPH, en particular carcinoma de cuello uterino, o cáncer de cabeza y cuello y tumores que expresen p16<sup>INK4a</sup> no inducidos por VPH. Asimismo también se cuentan entre ellos las modificaciones benignas como papilomas, adenomas, hiperplasias o proliferaciones similares de proliferaciones epiteliales, mesenquimáticas o hematopoyéticas.

El término empleado "individuo" abarca un individuo de cualquier tipo que sea capaz de presentar un carcinoma. Los ejemplos de dichos individuos son seres humanos y animales así como sus células.

La expresión empleada "cantidad adecuada para la inmunización de un individuo" abarca cualquier cantidad del fragmento de la invención, a la cual aplican correspondientemente las explicaciones anteriores y con la cual se puede inmunizar un individuo. Por ejemplo, la cantidad depende de si la inmunización está destinada al tratamiento profiláctico o terapéutico. Además, la edad del individuo, el género y el peso juegan un papel para determinar la cantidad. Es favorable administrar al individuo de 100 µg a 1 g del fragmento p16 mediante una inyección. La inyección se puede aplicar en diversos sitios del individuo por vía intramuscular, subcutánea, intradérmica o en cualquier otra forma de aplicación. También puede ser favorable realizar una o más "inyecciones de refuerzo" que tengan aproximadamente la misma cantidad.

La expresión empleada "agentes auxiliares comunes" abarca cualquier agente auxiliar adecuado para una composición farmacéutica destinada a inmunizar un individuo. Dichos agentes auxiliares son, por ej., adyuvantes de inmunización, como GM-CSF o adyuvante de Freund, diluciones salinas comunes tamponadas, agua, emulsiones, como emulsiones aceite/agua, humectantes, soluciones estériles, etc.

Por medio de la presente invención es posible inmunizar individuos en particular seres humanos y animales. La inmunización tiene lugar tanto por la inducción de anticuerpos como por la estimulación de los linfocitos T. Por lo tanto, es posible tomar pasos profilácticos y terapéuticos contra las preneoplasias, las neoplasias y los carcinomas.

La invención se explica mediante los ejemplos siguientes.

### Ejemplo 1

#### Reactividad de los linfocitos T contra péptidos de p16<sup>INK4a</sup> en pacientes con neoplasia asociada a VPH

Para evaluar cuándo y en qué medida los pacientes con tumores asociados a VPH desarrollan respuestas de linfocitos T contra p16<sup>INK4a</sup> fuertemente expresada, se aplicaron diferentes métodos que permiten una caracterización detallada de las respuestas inmunitarias contra el antígeno p16<sup>INK4a</sup>. El hallazgo de respuestas inmunitarias espontáneas contra p16<sup>INK4a</sup> en pacientes con cáncer de cuello uterino demuestra la inmunogenia del antígeno en general y de los fragmentos de p16<sup>INK4a</sup> particulares y proporciona la base para inmunizar a los pacientes con tumores que expresan p16<sup>INK4a</sup> con los fragmentos de p16<sup>INK4a</sup>.

Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 13 mujeres con displasia de cuello uterino de alto grado (CIN2/3) que expresaba p16<sup>INK4a</sup> con péptidos de p16<sup>INK4a</sup> (Tabla 1) para determinar la capacidad proliferativa de las células inmunitarias mediante aplicación de un ensayo de BrdU como una medida global del potencial linfoproliferativo después de la provocación con los péptidos de p16<sup>INK4a</sup>. El ensayo de BrdU es un inmunoensayo colorimétrico que se aplica para la cuantificación de la proliferación celular basado en la medición de la incorporación del análogo de timidina 5-bromo-2'-desoxiuridina durante la síntesis del ADN. Se sembraron CMSP en medio IMDM complementado con 10% de suero humano en una placa de microtitulación de 96 pocillos (fondo plano) a una densidad de 150 000 células/50 µl/pocillo. En cada uno de 4 pocillos se incubaron por triplicado células en presencia de los siete péptidos de p16<sup>INK4a</sup> (Tabla 1), toxoide tetánico (20 ng/ml, Calbiochem, La Jolla, CA) y mitógeno PHA-L (5 µg/ml, Roche, Mannheim, Alemania) como controles positivos y sin antígeno como control negativo, durante 6 días a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. El día 6, se agregaron 10 µl/pocillo de solución de marcado de BrdU (todos los reactivos del ensayo BrdU se usaron de Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) de Roche, Mannheim, Alemania) diluida 1:100 en medio IMDM + 10% de suero humano a cada pocillo y se incubaron por un período adicional de 18 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. El día 7, la placa se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min y se extrajeron 50 µl del sobrenadante que se transfirieron a una nueva placa de fondo en V para ser finalmente almacenada a -80 °C para el análisis de citocinas. Las células restantes se secaron empleando un secador de cabello durante aproximadamente 15 minutos y se agregaron 150 µl/pocillo de solución FixDenat a las células y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de eliminar la FixDenat apartándola con un golpecito y golpeteando con cuidado. Se agregaron 100 µl/pocillo de solución de trabajo anti-BrdU-POD y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente, después se extrajo y se reemplazó con 100 µl de sustrato TMB, que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo agregando 25 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y se midió de la densidad óptica (DO) a 450 nm (longitud de onda de referencia 620 nm). El límite de corte para las reacciones positivas se fijó como 3 veces la desviación estándar de las DO en los pocillos de control negativos sin antígeno. Las CMSP de 3 de las 13 mujeres analizadas mostraron proliferación en respuesta a los péptidos de p16<sup>INK4a</sup>, lo que indica que la incubación con los péptidos había activado las respuestas proliferativas de los linfocitos T de memoria. En general el patrón de respuesta de inducción de péptidos fue heterogéneo, lo que indica diferentes epítomos de linfocitos T en el antígeno p16. Una paciente mostró respuesta a los péptidos p16<sup>INK4a</sup><sub>18-44</sub>, p16<sup>INK4a</sup><sub>37-63</sub>, p16<sup>INK4a</sup><sub>73-107</sub> y p16<sup>INK4a</sup><sub>123-156</sub>, una paciente a los péptidos p16<sup>INK4a</sup><sub>51-80</sub> y p16<sup>INK4a</sup><sub>98-128</sub>, y una paciente a los péptidos p16<sup>INK4a</sup><sub>1-25</sub> y p16<sup>INK4a</sup><sub>37-63</sub> (Figura 4).

Para probar que fragmentos de p16 particulares eran capaces de inducir la secreción de interferón gamma como un signo de una respuesta Th1, se probaron linfocitos T de 23 pacientes con cáncer invasivo de cuello uterino y lesiones precancerosas de alto grado (CIN2/3) con fuerte sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup> contra los siete péptidos de p16<sup>INK4a</sup> (Tabla 1), en ensayos ELISpot de interferón gamma. Se separaron los linfocitos T de la sangre heparinizada mediante centrifugación de Ficoll, adherencia al plástico y perlas magnéticas acopladas a anticuerpo (CD11, CD16,

5 CD19, CD36, CD56, kit de aislamiento de linfocitos T Pan, Milteny, Bergisch Gladbach, Alemania). Se generaron células dendríticas cultivando células adherentes al plástico durante 7 días con IL4 y GM-SCF (1000 U/ml de cada uno) y se usaron como células presentadoras de antígeno en el ensayo ELISpot. Se probaron  $10^5$  linfocitos T de cada paciente después de una corta presensibilización (2 a 5 días) *in vitro* con el péptido respectivo presentado por  $2 \times 10^4$  células dendríticas.

Al restar el fondo (2 veces las manchas en el pocillo de control negativo + 2 desviaciones estándar de la reactividad contra el péptido de  $p16^{INK4a}$  respectivo) se pudieron identificar linfocitos T en 7 pacientes con cáncer de cuello uterino (CD4 o CD8) reaccionando contra el péptido  $p16^{INK4a}$ \_37-63 (Figura 2).

## Ejemplo 2

### 10 Sensibilización *in vitro* de linfocitos T de donantes sanos con péptidos de $p16^{INK4a}$

Se probaron siete péptidos de 25-35 mer de longitud que cubrían toda la secuencia de aminoácidos de  $p16^{INK4a}$ , cada uno con una superposición de 7-13 aminoácidos, para definir los fragmentos de  $p16^{INK4a}$  que eran capaces de inducir linfocitos T secretores de interferón gamma procedentes de donantes sanos *in vitro*. (Tabla 1)

Tabla 1

Siete péptidos de $p16^{INK4a}$ que se superponen utilizados en experimentos <i>in vitro</i>		
Nº	péptido	Secuencia de aminoácidos
1	$p16^{INK4a}$ _1-25	MEPAAGSSMEPSADWLATAAARGRV
2	$p16^{INK4a}$ _18-44	TAAARGRVEEVRALLEAGALPNAPNSY
3	$p16^{INK4a}$ _37-63	LPNAPNSYGRRPIQVMMMG SARVAELL
4	$p16^{INK4a}$ _51-80	VMMMG SARVAELLLLHGAEPNCADPATLTR
5	$p16^{INK4a}$ _73-104	ADPATLTRPVHDAAREGFLDTLVVLRHAGARL
6	$p16^{INK4a}$ _98-128	HRAGARLDVRDAWGRLPVDLAEELGHRDVAR
7	$p16^{INK4a}$ _123-156	GHRDVARYLRAAAGGTRGSNHARIDAAEGPSDIPD

15 Para demostrar que los fragmentos de  $p16^{INK4a}$  pueden estimular los linfocitos T de donantes sanos *in vitro* para que secreten interferón gamma y para identificar los epítomos derivados de  $p16^{INK4a}$  más inmunógenos, se investigó si los linfocitos T aislados de sangre periférica de donantes sanos pueden ser estimulados *in vitro* con estos péptidos de  $p16^{INK4a}$ . Si los péptidos de  $p16^{INK4a}$  son capaces de inducir una respuesta específica de los linfocitos T en experimentos de cultivo celular, los linfocitos T secretan citocinas cuando son provocados con el péptido de  $p16^{INK4a}$  respectivo en los experimentos denominados ELISpot. En los ensayos ELISpot las citocinas (interferón gamma) pueden ser detectadas por anticuerpos específicos con una reacción colorimétrica posterior.

25 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sangre heparinizada (100 ml) de un donante sano mediante una centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll Paque. Se separaron  $5$  a  $10 \times 10^7$  CMSP en monocitos y linfocitos T mediante adherencia al plástico y perlas magnéticas acopladas a anticuerpos (CD11, CD16, CD19, CD36, CD56, kit de aislamiento de linfocitos T Pan, Milteny, Bergisch Gladbach, Alemania). Los monocitos se cultivaron durante 7 días con GM-CSF e IL-4 (1000 U/ml de cada uno) para generar células dendríticas presentadoras de antígeno.

30 Se incubaron  $2 \times 10^7$  linfocitos T con  $2 \times 10^6$  células dendríticas que fueron pulsadas previamente con los péptidos de  $p16^{INK4a}$  (10 µg/ml) durante 4 horas para lograr la presentación de los antígenos. Para cada uno de los 7 péptidos de  $p16^{INK4a}$  se procesó un método de estimulación aparte.

Se volvieron a estimular los linfocitos T con células dendríticas pulsadas con péptido de  $p16^{INK4a}$  y se trataron con IL-2 e IL-7 (10 U/ml) cada 7 días durante un período de 5 semanas.

35 La respuesta específica de linfocitos T al péptido de  $p16^{INK4a}$  se midió en ensayos ELISpot de interferón gamma antes de las estimulaciones (día 0) y después de la última estimulación (día 35). Para los ensayos ELISpot, se

recubrieron placas de nitrocelulosa de 96 pocillos (MAHA N4550 Millipore) con anticuerpo anti-interferón gamma 1-D1K (Mabtech, Nacka Strand, Suecia) a una concentración de 0.75 µg/pocillo. Se probaron 10<sup>5</sup> linfocitos T de cada paciente con el péptido respectivo presentado por 2 x 10<sup>4</sup> células dendríticas. Después de 12 horas de incubación a 37 °C, se logró la detección del interferón gamma secretado mediante detección con un anticuerpo secundario biotinilado anti-interferón gamma 7BG-1 (Mabtech), conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina y solución de sustrato BCIP/NBT (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.).

Si bien no se detectó reactividad el día 0 contra ninguno de los siete péptidos de p16<sup>INK4a</sup> sino sólo contra una mezcla de péptidos de virus (CEF = CMV & EBV & flu) utilizada como control positivo, el día 35 los linfocitos T estimulados con los péptidos p16<sup>INK4a</sup>\_37-63, p16<sup>INK4a</sup>\_51-80 y p16<sup>INK4a</sup>\_73-104 mostraron una mayor secreción de interferón gamma en los ensayos ELISpot cuando se los probó contra células diana pulsadas con los péptidos de p16<sup>INK4a</sup> respectivos, pero no cuando se los probó contra células pulsadas con los péptidos de p16<sup>INK4a</sup> restantes (Figura 1).

### Ejemplo 3

#### Lisis de líneas celulares de cáncer de cuello uterino por linfocitos T reactivos a p16<sup>INK4a</sup>

Se analizó la capacidad de los linfocitos T activados para lisar células de cáncer de cuello uterino que expresan p16<sup>INK4a</sup> mediante ensayos de liberación de cromo empleando diferentes líneas celulares de cáncer de cuello uterino así como linfocitos B HLA compatibles cargadas con péptidos de p16<sup>INK4a</sup> como dianas. Se incubaron 10 x 6 células diana (linfocitos B HLA-compatibles cargados con péptido, linfocitos B sin péptido) durante 1 hora con <sup>51</sup>Cr (100 µCi) y luego con diferentes proporciones de linfocitos T de una paciente con cáncer de cuello uterino representativa que reaccionaron contra las células diana cargadas con el péptido p16<sup>INK4a</sup>\_37-63 en ensayos ELISpot. La lisis específica de las células diana por los linfocitos T se puede medir mediante detección de la radiactividad liberada.

Se pudo demostrar que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de una paciente con cáncer de cuello uterino que reaccionaron contra las células diana cargadas con el péptido p16<sup>INK4a</sup>\_37-63 en los ensayos ELISpot fueron capaces de lisar linfocitos B HLA-compatibles y cargados con el péptido p16<sup>INK4a</sup>\_37-63 así como las líneas celulares de cáncer de cuello uterino HeLa y Caski (tanto VPH como p16<sup>INK4a</sup> positivas), mientras no se pudo detectar lisis con los mismos linfocitos B HLA-compatibles sin el péptido p16<sup>INK4a</sup>\_37-63 ni otras líneas celulares negativas para VPH y p16<sup>INK4a</sup> (Figura 3). Estos resultados demuestran la actividad citotóxica de los linfocitos T específicos para el péptido de p16<sup>INK4a</sup> y demuestran que los epítomos de p16<sup>INK4a</sup> son presentados en células de cáncer de cuello uterino y son reconocidos por los clones de los linfocitos T reactivos a p16<sup>INK4a</sup> de la paciente.

### Ejemplo 4

#### Respuesta inmunitaria humoral contra p16<sup>INK4a</sup>

El análisis de más de 900 sueros demostrará además que una fracción de los individuos desarrolla anticuerpos que se unen específicamente a epítomos derivados de p16<sup>INK4a</sup> (Figura 4) (Reuschenbach et al., 2008), lo cual demuestra la capacidad de p16<sup>INK4a</sup> para inducir respuestas inmunitarias humorales.

Además se demostró, que también contra el péptido p16<sup>INK4a</sup>\_37-63 que pareció inducir la mayor secreción de interferón gamma por los linfocitos T *in vitro*, pueden ser detectados anticuerpos en los sueros. Un total de 374 sueros de pacientes con cáncer de cuello uterino, cáncer pulmonar microcítico, cáncer de cabeza y cuello e individuos sanos fueron probados en ensayos ELISA de péptidos. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) con el péptido (20 µg/ml) durante toda la noche a 4 °C, se bloquearon los sitios de unión no específicos con 0.5% de caseína y los sueros se probaron 1:100 para determinar la presencia de anticuerpos contra el péptido. Se detectaron los anticuerpos del suero unidos mediante anticuerpo anti-IgG humana conjugado a HRP (Jackson Immuno, West Grove, EE.UU.) y sustrato TMB (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.). A un corte de una densidad óptica de fondo normalizada de 0.03, 15% (56/374) de los sueros probados tenían anticuerpos contra p16<sup>INK4a</sup>\_37-63.

Consideradas en conjunto, estas observaciones demuestran que los pacientes que sufren de displasia o neoplasia inducida por VPH-AR son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria anti-p16<sup>INK4a</sup>. Si esta respuesta inmunitaria fuera capaz de eliminar células transformadas por VPH-AR, el antígeno p16<sup>INK4a</sup> podría representar un fármaco potencial muy atractivo para las próximas vacunas destinadas a prevenir y/o tratar las (pre)-neoplasias que expresan p16<sup>INK4a</sup>, particularmente tumores inducidos por VPH-AR.

### Lista de referencias

Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22, 4212.

Cunningham and Wells, *Science* 244 (1989), 1081-1085.

Finn, O.J. (2008). *Cancer immunology*. *N. Engl. J. Med.* 358, 2704-2715.

- Hildesheim,A., Herrero,R., Wacholder,S., Rodriguez,A.C., Solomon,D., Bratti,M.C., Schiller,J.T., Gonzalez,P., Dubin,G., Porras,C., Jimenez,S.E., and Lowy,D.R. (2007). Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* 298, 743-753.
- 5 Jäger, E., Jäger, D., and Knuth,A. (2003). Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer* 106, 817-20.
- Klaes,R., Friedrich,T., Spitkovsky,D., Ridder,R., Rudy,W., Petry,U., Dallenbach-Hellweg,G., Schmidt,D., and Knebel Doeberitz,M. (2001). Overexpression of p16<sup>(INK4A)</sup> as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 92, 276.
- Parkin,D.M. and Bray,F. (2006). Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3, S11-S25.
- 10 Rescigno,M., Avogadri,F., and Curigliano,G. (2007). Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1776, 108-123.
- Reuschenbach,M., Waterboer,T., Wallin,K.L., Einenkel,J., Dillner,J., Hamsikova,E., Eschenbach,D., Zimmer,H., Heilig,B., Kopitz,J., Pawlita,M., Doeberitz,M.K., and Wentzensen,N. (2008). Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *Int. J. Cancer* 123, 2626-2631.
- 15 Sano,T., Oyama,T., Kashiwabara,K., Fukuda,T., and Nakajima,T. (1998). Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am. J. Pathol.* 153, 1741-1748.
- Schadlich,L., Senger,T., Gerlach,B., Mucke,N., Klein,C., Bravo,I.G., Muller,M., and Gissmann,L. (2009). Analysis of modified human papillomavirus type 16 L1 capsomeres: the ability to assemble into larger particles correlates with higher immunogenicity. *J. Virol.* 83, 7690-7705.
- 20 Ishikawa M, Fujii T, Saito M, Nindl I, Ono A, Kubushiro K et al. Overexpression of p16<sup>INK4a</sup> as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(1):347-353.
- Samama B, Lipsker D, Boehm N. p16 expression in relation to human papillomavirus in anogenital lesions. *Hum Pathol* 2006; 37(5):513-519.
- 25 Missaoui N, Hmissa S, Frappart L, Trabelsi A, Ben Abdelkader A, Traore C et al. p16<sup>INK4A</sup> overexpression and HPV infection in uterine cervix adenocarcinoma. *Virchows Arch* 2006; 448(5):597-603.
- Santos M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J, Suarez H et al. p16 overexpression identifies HPV-positive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(11):1347-1356.
- 30 Roma AA, Goldblum JR, Fazio V, Yang B. Expression of 14-3-3sigma, p16 and p53 proteins in anal squamous intraepithelial neoplasm and squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2008; 1(5):419-425.
- Hafkamp HC, Speel EJM, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WNM, Ramaekers FCS et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16<sup>INK4A</sup> and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003; 107(3):394.
- 35 Nindl I, Meyer T, Schmook T, Ulrich C, Ridder R, Audring H et al. Human papillomavirus and overexpression of P16<sup>INK4a</sup> in nonmelanoma skin cancer. *Dermatol Surg* 2004; 30(3):409-414.
- Busch C, Geisler J, Knappskog S, Lillehaug JR, Lønning PE. Alterations in the p53 pathway and p16<sup>INK4a</sup> expression predict overall survival in metastatic melanoma patients treated with dacarbazine. *J Invest Dermatol.* 2010 Oct;130(10):2514-6.
- 40 Giordano G, Azzoni C, D'Adda T, Rocco A, Gnetti L, Froio E et al. Human papilloma virus (HPV) status, p16<sup>INK4a</sup>, and p53 overexpression in epithelial malignant and borderline ovarian neoplasms. *Pathol Res Pract* 2008; 204(3):163-174.
- Giordano G, Azzoni C, D'Adda T, Merisio C. P16<sup>(INK4a)</sup> overexpression independent of Human Papilloma Virus (HPV) infection in rare subtypes of endometrial carcinomas. *Pathol Res Pract.* 2007;203(7):533-8.
- 45 Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, Allemanni G, Margallo E, Gatteschi B, Romani M. p16<sup>(INK4a)</sup> promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. *Int J Cancer.* 2005 Apr 10;114(3):414-21.
- Buza N, Cohen PJ, Pei Hui, Parkash V. Inverse p16 and p63 expression in small cell carcinoma and high-grade urothelial cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Surg Pathol.* 2010 Apr;18(2):94-102.

- Esposito V, Baldi A, Tonini G, Vincenzi B, Santini M, Ambrogi V, Mineo TC, Persichetti P, Liuzzi G, Montesarchio V, Wolner E, Baldi F, Groeger AM. Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2004 Jan;57(1):58-63.
- 5 Ikuero SO, Kuczyk MA, von Wasielewski R, Shittu OB, Jonas U, Machtens S, Serth J. p16<sup>INK4a</sup> expression and clinicopathologic parameters in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2007 Mar;51(3):732-7; discussion 738. *Epub* 2006 Aug 23.
- Leversha MA, Fielding P, Watson S, Gosney JR, Field JK. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. *J Pathol.* 2003 Aug;200(5):610-9.
- 10 Ding GC, Ren JL, Chang FB, Li JL, Yuan L, Song X, Zhou SL, Guo T, Fan ZM, Zeng Y, Wang LD. Human papillomavirus DNA and P16<sup>INK4A</sup> expression in concurrent esophageal and gastric cardia cancers. *World J Gastroenterol.* 2010 Dec 14;16(46):5901-6.
- Kim BN, Yamamoto H, Ikeda K, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Fujie Y, Ogawa M, Hata T, Ikeda M, Ohue M, Sekimoto M, Monden T, Matsuura N, Monden M. Methylation and expression of p16<sup>INK4</sup> tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. *Int J Oncol.* 2005 May;26(5):1217-26.
- 15 Okamoto A, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennett WP, Forrester K, Gerwin B, Greenblatt MS, Serrano M. p16<sup>INK4</sup> mutations and altered expression in human tumors and cell lines. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:49-57.
- 20 Wentzensen NA, Kaufmann A, Reuschenbach M, Linnebacher M, von Knebel-Doeberitz M p16<sup>INK4a</sup> is a tumor autoantigen in HR-HPV induced cancers. *Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research. Proceedings.* Vol. 2005, page 1214

**REIVINDICACIONES**

1. Un fragmento del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p16<sup>INK4</sup> capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra p16<sup>INK4a</sup> y que consiste en la secuencia de aminoácidos LPNAPNSYGRRPIQVMMMGSARVAELL.
- 5 2. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el fragmento de la reivindicación 1 o un vector que contiene dicha secuencia de ácido nucleico .
3. El vector de la reivindicación 2, donde dicho vector es un vector plasmídico o viral.
4. El vector viral de la reivindicación 3, donde dicho vector viral es un poxvirus, un adenovirus, un retrovirus, un herpesvirus, un vector a base de alfavirus o un virus adeno-asociado (VAA).
- 10 5. El poxvirus de la reivindicación 4, donde dicho poxvirus es un virus vaccinia, NYVAC, virus avipox, virus canarypox, ALVAC, ALVAC(2), virus de la viruela aviar o TROVAC.
6. Una composición farmacéutica que contiene el fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, que contiene además un adyuvante de inmunización.
- 15 8. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar en un método de prevención o tratamiento de una preneoplasia, una neoplasia o un tumor que expresan p16.
9. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho tumor que expresa p16 es un carcinoma avanzado.
- 20 10. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho tumor que expresa p16 es un sarcoma avanzado.
11. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho tumor es un tumor anogenital o un tumor de cabeza y cuello.
- 25 12. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho tumor es un tumor del tubo esófago-gastrointestinal o de la vía hepato-pancreato-biliar, un tumor de piel o un tumor de las vías respiratorias.
- 30 13. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho tumor es un tumor de riñón y vías urinarias, de mama, de ovario, de endometrio o de próstata.
14. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho tumor es un tumor del sistema nervioso, incluidos los tumores cerebrales.
- 35 15. El fragmento de la reivindicación 1, el ácido nucleico de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizar de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho carcinoma anogenital es un carcinoma de cuello uterino.

Figura 1

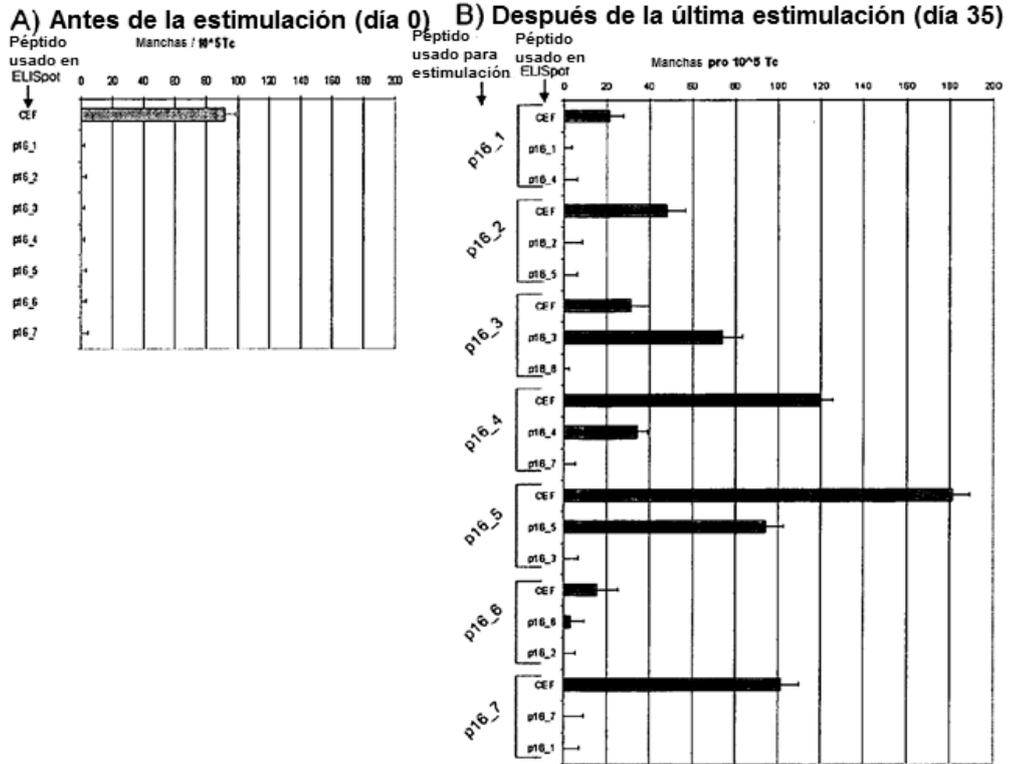


Figura 2

ID	Diagnóstico	CEF	p18 1	p18 2	p18 3	p18 4	p18 5	p18 6	p18 7	
BC004	control	■								negativo
BC003	control	■								1 a 5 manchas
BC002	control	■								6 a 20 manchas
BC007	control	■								21 a 50 manchas
BC001	control	■								51 a 100 manchas
BC006	control	■								> 100 manchas
BC005	control	■								
BC007	control		na	na		na	na	na		
BC008	control	■								
BC010	control	■		■	■					
BC011	control	■								
BC012	control	■								
BC013	control	■				na	na	na		
BC014	control		na				na	na		
BC009	control	■								
T005	CIN 2	■	na	na		na	na	na		
T004	CIN 2	■								
T011	CIN 3	■								
T013	CIN 3	■								
T012	CIN 3	■	na	na			na	na		
T009	CIN 3	■								
T006	CIN 3	■								
T007	CxCa	■	na	na				na		
T008	CxCa	■		■	■					
T014	CxCa	■								
T015	CxCa	■						na		
T019	CxCa	■		■						
T016	CxCa	■								
T010	CxCa	■		■	■					
T018	CxCa	■		■						
T003	CxCa	■								
F1	CxCa	na		■						
F2	CxCa	na		■						
F3	CxCa	na		■						
F4	CxCa	na		■						
F5	CxCa	na		■						
F6	CxCa	na		■						
F7	CxCa	na		■						

Figura 3

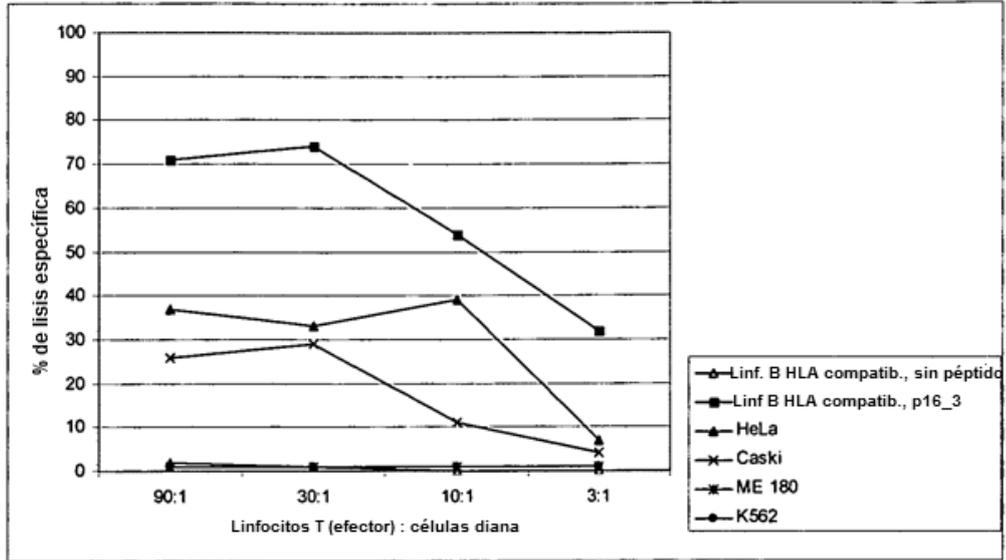
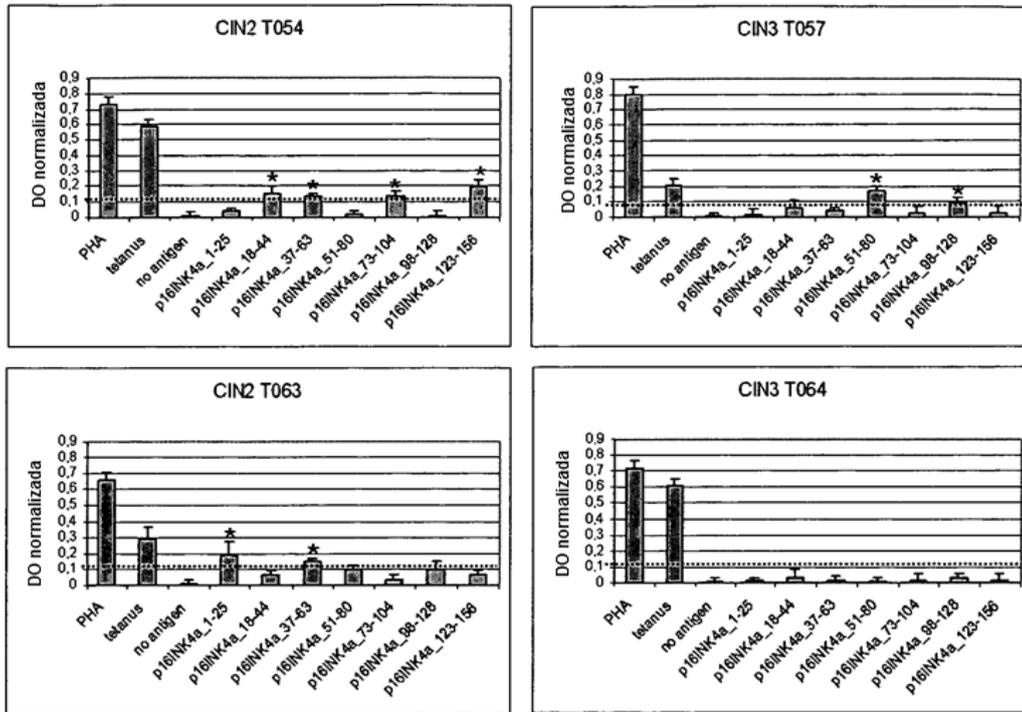


Figura 4



tetanus = tétanos      no antigen= sin antígeno

Figura 5

