

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 687**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)  
**C07K 14/025** (2006.01)  
**C07K 14/78** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2010 PCT/ES2010/070590**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11029980**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2010 E 10768504 (2)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2476440**

54 Título: **Composiciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades causadas por HPV**

30 Prioridad:

**11.09.2009 ES 200901847**

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

**21.02.2018**

73 Titular/es:

**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.**  
**(100.0%)**  
**Avda. Pío XII, 22 Oficina 1**  
**31008 Pamplona - Navarra, ES**

72 Inventor/es:

**BERRAONDO LÓPEZ, PEDRO;**  
**LASARTE SAGASTIBELZA, JUAN JOSÉ;**  
**MANSILLA PUERTA, CRISTINA;**  
**PRIETO VALTUEÑA, JESÚS MARÍA y**  
**SAROBÉ UGARRIZA, PABLO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

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

ES 2 655 687 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

Composiciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades causadas por HPV

### Campo técnico de la invención

5 La invención se relaciona con composiciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades causadas por el virus del papiloma humano (HPV) y más concretamente con composiciones que comprenden al menos un péptido antigénico derivado de HPV E7.

### Estado de la técnica

10 El carcinoma del cuello uterino es uno de los cánceres más comunes en mujeres en todo el mundo, y el quinto cáncer más frecuente en general, con una prevalencia estimada de 1,4 millones de casos. Hay evidencias consistentes de que la infección crónica del tracto genital por diversos tipos de papilomavirus humanos mucosatrópicos causa cáncer del cuello uterino.

15 La vacuna contra el cáncer uterino usada en la actualidad del laboratorio estadounidense Merck, denominada Gardasil, puede proteger en un 95 por ciento contra las cepas de tipo 16 y 18 del virus, que están en el origen del aproximadamente 70 por ciento de todos los casos de cáncer uterino. También protege contra las cepas de tipo 6 y 11, causantes de las verrugas en órganos genitales.

La expresión de las proteínas oncogénicas de HPV E6 y E7 es necesaria para el inicio y el mantenimiento de la transformación maligna y la inmunidad celular a E7 que se han asociado a la resolución clínica y citológica de lesiones inducidas por HPV.

20 El virus del papiloma es un virus de ADN que infecta una gran variedad de especies. Algunos de estos virus están asociados con el desarrollo de enfermedades en su hospedador natural. Más de 60 tipos de papilomavirus (HPV) humanos han sido identificados.

Estos virus infectan al organismo humano en múltiples regiones del cuerpo, y son responsables de verrugas comunes de la piel, papiloma laríngeo, etc.

25 Las infecciones genitales de HPV son relativamente frecuentes y los tipos HPV que con más frecuencia infectan el tracto genital de hombres y mujeres son el tipo 6, 11, 16 y 18.

En mujeres, el HPV infecta diferentes porciones del tracto genital incluyendo el cérvix. Los HPV genitales son un problema clínico ya que la infección de la región ano-genital es considerada como la más frecuente de las enfermedades sexuales transmisibles. Los HPV causan infección genital que se manifiesta de las siguientes maneras:

- 30 i) infección clínica, en donde las verrugas genitales son manifiestas;
- ii) infección subclínica, en donde las lesiones no son obvias, pero las lesiones virales pueden ser detectadas usando técnicas especiales, como las citologías de Papanicolaou; y
- iii) latencia, en donde el único signo de infección es la presencia del DNA de HPV.

35 Por otro lado, las infecciones subclínicas son relativamente comunes puesto que está estimado que el 2 al 4% de las citologías de Papanicolaou muestran evidencia de HPV. Las infecciones latentes son más frecuentes y se estima que la mayoría de los adultos posee uno o más tipos de HPV.

40 El carcinoma del cérvix-uterino es un cáncer común en mujeres. Dentro de este cáncer se distinguen el carcinoma de las células escamosas, que es el más comúnmente encontrado (cerca del 90% de los casos observados) y el adenocarcinoma, que es un cáncer de las células secretoras. El cáncer de cérvix presenta varios estadios. El estadio precanceroso es denominado neoplasia intraepitelial (CIN) que puede evolucionar a formas invasivas (carcinomas). El cáncer cervical tanto en su forma pre-cancerosa como en su forma invasiva es uno de los pocos cánceres que puede ser diagnosticado usando una técnica relativamente fiable y barata: el test de Papanicolaou.

45 Evidencias recogidas en los últimos años, sugieren que algunos de los tipos de HPV están asociados con el desarrollo de cáncer de cérvix, siendo algunos de estos tipos factores etiológicos responsables del desarrollo de cáncer.

50 Se ha postulado que HPV actúa como un iniciador de la carcinogénesis cervical y que la transformación maligna depende de la interacción con otros factores. La naturaleza del HPV-16 en particular y de los papilomavirus en general ha sido estudiada en los últimos años. HPV-16 contiene un genoma de doble cadena de ADN de 7904 pb (Seedorf, K. et al., 1985, Virology 145:181-185). La cápsida es de 50 nm de diámetro y contiene 72 capsómeros (Klug, A. J., 1965, Mol. Biol. 11:403-423). La patente US 4,777,239 enseña una serie de 17 péptidos sintéticos capaces de generar anticuerpos contra HPV-16 siendo por tanto útiles para propósitos diagnósticos.

EL HPV codifica dos proteínas, la E6 y la E7, que parece que están implicadas en la patogénesis de la proliferación celular anormal inducida por HPV (véase Stoppler et al., 1994, Intervirology, 37:168-179). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas E6 y E7 de HPV-16 fueron definidas por Seedorf et al., (Virology, 1985, 145: 181 -185).

5 Se ha observado que los genes que codifican las proteínas E6 y E7 aparecen invariablemente expresados en células tumorales de cáncer de cérvix asociados con infección de HPV.

10 Se cree que las proteínas E6 y E7 son una diana inmunológica efectiva para la regresión tumoral. No obstante, la posibilidad de desarrollar vacunas basadas en ADN que codifica dichas proteínas puede resultar en la aparición de eventos de transformación celular irreversibles en las células del paciente. EP0796273 describe una composición capaz de generar una respuesta inmunológica en el paciente sin generar una transformación celular indeseada, usando proteínas de fusión con segmentos mutados y no mutados de las proteínas E6 y E7.

15 Prévile et al, (Cancer Res., 2005, 65:641-649) describe distintas proteínas de fusión que comprenden la adenilato ciclasa (CyaA) de *Bordetella pertussis* y la proteína E7 completa o distintas regiones de la misma. La adenilato ciclasa es capaz de unirse a células dendríticas CD11b+ por interacción con la integrina  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18), por lo que algunas de las proteínas de fusión son capaces de desencadenar una respuesta inmune específica (T helper y T citotóxica) frente a células tumorales que expresan HPV16 E7.

Berraondo P et al, (Cancer research, 2007, 67:8847:8855) han descrito composiciones formadas por una proteína recombinante que comprende CyaA y una forma truncada de HPV16 que carece de los aminoácidos 30 a 42 (CyaA-E7 $\Delta$ 30-42), CpG asociada a un lípido catiónico y ciclofosfamida. Esta composición es capaz de generar una respuesta inmune frente a tumores que expresan E7.

20 Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de composiciones inmunogénicas adicionales capaces de generar una respuesta inmunológica en el paciente contra células tumorales que expresen proteínas de HPV sin generar una transformación celular indeseada, así como de composiciones que comprenden dichas proteínas y componentes adicionales que actúen de forma sinérgica en la generación de la respuesta inmune de forma que se puedan reducir las dosis de dichas proteínas.

## 25 **Resumen de la invención**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un conjugado que comprende:

(i) la región EDA de fibronectina o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra un grado de identidad con respecto a la región EDA de la fibronectina mayor de al menos 70% y

(ii) al menos un péptido antigénico derivado de HPV E7 según las reivindicaciones,

30 en el que los componentes (i) e (ii) están acoplados covalentemente y en el que el conjugado promueve una respuesta citotóxica hacia el péptido o péptidos antigénicos.

35 En aspectos adicionales, la invención se relaciona con un polinucleótido o construcción génica que codifica un conjugado de la invención, con un vector que comprende un polinucleótido de la invención o una construcción génica de la invención y con una célula que contiene un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención o un vector de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una primera composición que comprende, en conjunto o por separado:

(i) un conjugado de la invención, un polinucleótido o construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula hospedadora según la invención y

40 (ii) un ligando de TLR.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una segunda composición que comprende, en conjunto o por separado:

(i) un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 7, un vector según la reivindicación 8, una célula hospedadora según la reivindicación 9,

45 (ii) un ligando de TLR y

(iii) un agente quimioterapéutico.

50 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica o composición farmacéutica de la invención que comprende un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición primera o segunda de la invención y al menos un adyuvante farmacológicamente aceptado.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición primera o segunda de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición primera o segunda de la invención o una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de una vacuna.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición primera o segunda de la invención o una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* o método de la invención, para obtener células dendríticas maduras que presenten al menos un antígeno de HPV E7 que comprende:

15 (i) poner en contacto células dendríticas con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición primera o segunda de la invención, en condiciones adecuadas para que tenga lugar la maduración de las células dendríticas y

(ii) recuperar las células dendríticas maduras.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con células que se obtienen por un método de la invención, o segundas células de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con unas segundas células de la invención para su uso en medicina.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de unas segundas células de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de la proteína de fusión recombinante EDA-HPVE7. Los 29 primeros aminoácidos de la proteína E7 se dispusieron en el extremo N de EDA, mientras que los aminoácidos 43-98 de E7 se insertaron en el extremo C de EDA. Se muestra la secuencia de la proteína de fusión usando el código de una letra para aminoácidos. Se muestran en gris los aminoácidos de la proteína E7, mientras que los aminoácidos de EDA se escriben en negro. Análisis PAGE-SDS de la proteína recombinante EDA-HPVE7. Se separaron 5 µg de las proteínas purificadas en un gel de SDS-poliacrilamida al 15% y se tiñeron con azul de Coomassie.

35 Figura 2: Activación de la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea por la proteína de fusión EDA-HPVE7. Se incubaron células dendríticas derivadas de médula ósea durante 48 horas con EDA-HPVE7 (500 nM), péptido E7(49-57) (500 nM), LPS (1 µg/ml) (control positivo) o medio de cultivo (control negativo). Se recogieron entonces las células y se analizaron mediante citometría de flujo la expresión de la molécula H-2b o los marcadores de maduración CD54 y CD86 (URF: Unidades relativas de fluorescencia).

40 Figura 3: La proteína de fusión EDA-HPVE7 induce la producción de IL-2 por las células dendríticas derivadas de médula ósea o la producción de TNF-α por la línea celular monocítica humana THP-1. (A) Se incubaron células dendríticas derivadas de médula ósea durante 48 horas con EDA-HPVE7 (500 nM), péptido E7(49-57) (500 nM), LPS (1 µg/ml) (control positivo) o medio de cultivo (control negativo). 24 horas después, se recogió el sobrenadante de cultivo y se midió la IL-12 liberada al sobrenadante mediante ELISA. (B) Se incubaron células THP-1 durante 15 horas con EDA-HPVE7 (500 nM), péptido E7(49-57) (500 nM), LPS (1 µg/ml) o medio de cultivo (control negativo). Después del cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se midió el TNF-α liberado mediante ELISA.

45 Figura 4: Inducción *in vivo* de CTL mediante inmunización con proteína EDA-HPVE7 o con el péptido DTc/E7(49-57) en PBS. (A) Se inmunizaron ratones por vía i.v. con 2 nmol de EDA-HPVE7 o con el péptido DTc/E7(49-57). Siete días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se cultivaron las células de bazo en presencia o ausencia de péptido DTc durante 5 días. Se midió la actividad de CTL usando un ensayo de liberación de cromo convencional usando células EL4 radiomarcadas y pulsadas con péptido DTc como células diana en los cultivos de esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con la proteína EDA-HPV-E7 (círculos negros) o con el péptido DTc/E7(49-57) (círculos blancos) (en la gráfica se muestra el valor absoluto, calculado al descontar al valor de lisis en presencia de péptido, el valor obtenido en ausencia de péptido). (B) Medida por ELISPOT de las células productoras de IFN-γ en respuesta al péptido E7(49-57) o a células TC1 o EL-4 irradiadas en los esplenocitos de ratones inmunizados con EDA-HPVE7 o con péptido DTc/E7(49-57).

Figura 5: Inducción *in vivo* de CTL mediante inmunización con proteína EDA-HPVE7 o péptido DTc/E7(49-57) mezclados con poli I:C (pl:C). Se inmunizaron los ratones por vía i.v. con 2 nmol de EDA-HPV-E7 o con péptido DTc/E7(49-57) en presencia de pl:C (50  $\mu$ g/ratón). Siete días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se cultivaron las células de bazo en presencia o ausencia de péptido DTc/E7(49-57) durante 5 días. Se midió la actividad de CTL mediante un ensayo de liberación de cromo convencional usando células EL4 radiomarcadas y pulsadas con el péptido DTc como células diana (A) o células irradiadas TC-1 (B), en los cultivos de esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados con la proteína EDA-HPV-E7+pl:C (círculos negros) o con el péptido DTc/E7(49-57)+ pl:C (círculos blancos) (en la gráfica se muestra el valor absoluto, calculado al descontar al valor de lisis en presencia de péptido, el valor obtenido en ausencia de péptido). (C) Medida de las células productoras de IFN- $\gamma$  en respuesta al péptido E7(49-57) o a células TC1 o EL-4 irradiadas, en esplenocitos de ratones inmunizados con EDA-HPV-E7+pl:C o con DTc E7(49-57) + pl:C.

Figura 6: Eficacia terapéutica de la proteína de fusión EDA-HPVE7 combinada con poli I:C (pl:C). Se inyectaron  $5 \times 10^5$  células TC-1 a ratones y 25 días después, cuando los diámetros tumorales medios eran de aproximadamente 8 mm, se trataron por vía intravenosa con diferentes combinaciones de vacuna basadas en EDA. (A) Se midió el tamaño tumoral, presentado como la media de dos diámetros perpendiculares (milímetros) a intervalos regulares. Se indican el número de ratones exentos de tumor el día 100 respecto al número total de animales incluidos y el porcentaje de supervivencia el día 100 para cada conjunto de experimentos. Se indica el valor de p (\*,  $p < 0.05$ ) determinado mediante la prueba de relación de probabilidad comparando el crecimiento tumoral en el grupo tratado con EDA-E7/pl:C con el crecimiento tumoral en el grupo tratado con pl:C. Se sacrificaron los ratones cuando los diámetros tumorales alcanzaron los 20 mm o cuando era necesario debido al estado clínico de los animales. (B) Curvas de supervivencia de los ratones inmunizados con los inmunógenos indicados (se indica el valor de p (\*,  $p < 0.05$ )). Se muestran los datos combinados de dos experimentos independientes.

Figura 7: Eficacia terapéutica de la proteína de fusión EDA-HPVE7 en un modelo de tumor grande. (A) Se inyectaron a ratones C57B/L  $5 \times 10^5$  células TC-1 y 35 días después, cuando los diámetros tumorales medios eran de aproximadamente 12-15 mm, se dejaron los ratones sin tratar o recibieron 175 mg/kg de ciclofosfamida (CPA), concretamente en una sola administración. El día 36, se inyectó PBS o 30  $\mu$ g de CpG/DOTAP por vía i.v. a los grupos de ratones de control. Los ratones vacunados recibieron 50  $\mu$ g de EDA-E7 y 30  $\mu$ g de CpG-B/DOTAP por vía i.v. El grupo de control tratado con CpG-B/DOTAP recibió una segunda dosis de ciclofosfamida el día 50 y CpG-B/DOTAP el día 51. Los ratones tratados recibieron una segunda dosis de vacunación, inyectándose ciclofosfamida el día 50 y EDA-HPVE7/CpG-B/DOTAP el día 51. (B) Medidas del tamaño tumoral, representado como la media de dos diámetros perpendiculares (milímetros) a intervalos regulares. Se indica el número de ratones exentos de tumores el día 150 respecto al número total de animales incluidos y el porcentaje de supervivencia el día 150 para cada conjunto de experimentos. Se sacrificaron los ratones cuando los diámetros tumorales alcanzaron los 22 mm o cuando era necesario debido al estado clínico de los animales. (C) Curvas de supervivencia de los ratones inmunizados con los inmunógenos indicados (se indica el valor de p (\*,  $p < 0.05$ )). Se muestran los datos combinados de dos experimentos independientes.

### Descripción detallada de la invención

#### Conjugado de la invención

Los autores de la presente invención han observado que una proteína recombinante que comprende la región EDA de la fibronectina y una región inmunogénica de la proteína E7 de HPV-E7 es capaz de inducir la maduración de células dendríticas *in vitro* así como de generar una potente actividad antitumoral mediada por células T CD8+ frente a tumores que expresan dicha proteína. Así, según se observa en el ejemplo 1 de la presente invención, la puesta en contacto de la proteína de fusión mencionada anteriormente con células dendríticas derivadas de médula ósea resulta en la maduración de dichas células según se deduce de la determinación de los niveles de expresión de distintos marcadores de maduración de células dendríticas. Adicionalmente, según se observa en el ejemplo 2 de la presente invención, la administración de dicha proteína de fusión a modelos animales es capaz de generar una respuesta inmune mediada por células T citotóxicas frente a células tumorales que expresan la proteína E7.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un conjugado (en adelante, conjugado de la invención) que comprende:

- (i) la región EDA de fibronectina o una variante funcionalmente equivalente de la misma y
- (ii) al menos un péptido antigénico derivado de HPV E7 según las reivindicaciones.

en el que los componentes (i) e (ii) están acoplados covalentemente y en el que el conjugado promueve una respuesta citotóxica hacia el péptido o péptidos antigénicos.

El primer elemento del conjugado es la región EDA de fibronectina o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra un grado de identidad con respecto a la región EDA de la fibronectina mayor de al menos 70%.

Los términos "región EDA" o "tipo extra III" se usan aquí indistintamente y se refieren a una región de la molécula de fibronectina resultante de la transcripción/traducción de un exón del gen de fibronectina y que muestra una afinidad

específica por los receptores de tipo toll 4 (TLR4). Este dominio fue descrito originalmente por Muro A. F. et al.; (J. Cell. Biol., 2003, 162:149-160). La región EDA puede derivar de fibronectina obtenida a partir de distintas especies tales como la fibronectina de ratón (Número de acceso en GenBank AAD12250.1) o la fibronectina de rata (Número de acceso en GenBank AAB40865.1).

- 5 Por "fibronectina", según se usa aquí, se entiende una glicoproteína multifuncional de alto peso molecular presente en sangre y en la matriz extracelular de los tejidos. La fibronectina es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas idénticas unidas por uniones disulfuro C-terminales. Cada monómero tiene un peso molecular aproximado de 230-250 kDa. Cada monómero contiene tres tipos de módulos: tipo I, tipo II y tipo III. Cada uno de estos módulos está formado por dos hélices  $\beta$  antiparalelas.
- 10 Por "variante funcionalmente equivalente" se entiende todos aquellos péptidos derivados de la secuencia de EDA mediante modificación, inserción y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de unión a los receptores TLR4 y de activación de células dendríticas. Variantes funcionalmente equivalentes son aquellas que muestran un grado de identidad con respecto al dominio EDA de fibronectina mayor de al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%,  
 15 al menos 98% o al menos 99%. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones  
 20 químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc. Así, la expresión "variante funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que el polipéptido o proteína en cuestión mantiene, al menos, una de las funciones de la región EDA de fibronectina, preferentemente, al menos, una función relacionada con la respuesta inmune, en particular, que mantiene la capacidad de interactuar con TLR4 y de promover la maduración de las células dendríticas. La capacidad de la variante funcionalmente equivalente de interactuar con TLR4 puede ser determinada mediante el empleo de métodos convencionales conocidos por los  
 25 expertos en la materia. Por ejemplo, a modo simplemente ilustrativo, la capacidad de unión de la variante de la región EDA de fibronectina a TLR4 puede ser determinada usando experimentos de co-inmunoprecipitación, en donde la proteína de interés (e.g. variante de EDA) se aísla con un anticuerpo específico y las moléculas que interactúan con la proteína (e.g. TLR4) se identifican posteriormente mediante un "western blot". También puede ser utilizado un ensayo de doble híbrido en levadura, o ensayos de electroforesis en condiciones nativas. Esta última metodología se basa en la migración de los complejos proteicos en geles de poliacrilamida en base a su peso molecular. Dado que la migración también está definida por la carga, se utiliza como buffer catódico una solución que contiene azul de Coomassie, el cual otorga carga negativa neta a las proteínas sin desnaturizar ni romper sus interacciones con otras proteínas. Una segunda dimensión desnaturizante en geles SDS-PAGE permite separar  
 30 las manchas (spots) e identificar posteriormente la identidad de las subunidades componentes del complejo mediante espectrometría de masas. Ensayos para determinar la capacidad de las variantes funcionalmente equivalente de EDA de promover la maduración de las células dendríticas son conocidos por un experto en la materia, como por ejemplo el ensayo que se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud basado en la determinación de los niveles de expresión de distintos marcadores de células dendríticas maduras tales como IAb, CD54, CD86 e IL-12.

El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias del dominio EDA que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan su estructura global o su funcionalidad.

- 45 En una realización preferida, la región EDA de fibronectina del conjugado de la invención corresponde a los aminoácidos 1.631 a 1.721 de la fibronectina humana según aparece en la base de datos UniProt con número de acceso FINC\_HUMAN y que corresponde al polipéptido de secuencia SEQ ID NO:1.

- El componente (ii) de los conjugados de la invención es uno o más péptidos antigénicos derivados de la proteína E7 de HPV según las reivindicaciones. La proteína E7 puede provenir de distintos serotipos de HPV. Así, proteínas E7 que pueden ser usadas en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, la proteína E7 del serotipo HPV humano 80 (GenBank: CAA75471.1), E7 del serotipo HPV humano 68 (GenBank: ACL12352.1), E7 del serotipo HPV humano 11 (GenBank: ACL12343), E7 del serotipo HPV humano 59 (GenBank: ACL12335), E7 del serotipo HPV humano 33 (GenBank: ACL12327), E7 del serotipo HPV humano 72 (GenBank: CAA63874), E7 del serotipo HPV humano 16 (GenBank: ACL12311), E7 del serotipo HPV humano 13 (GenBank: ABC79058), E7 del serotipo HPV humano 73 (GenBank: CAA63883), E7 del serotipo HPV humano 96 (GenBank: AAQ88290), variante transformante de la proteína E7 del serotipo HPV humano 31 (GenBank: AAR13015), E7 del serotipo HPV humano 25 (GenBank: BAA09117), E7 del serotipo HPV humano 21 (GenBank: BAA09116), E7 del serotipo HPV humano 20 (GenBank: BAA09115), E7 del serotipo HPV humano 14 (GenBank: BAA09114), E7 del serotipo HPV humano 12 (GenBank: BAA09113), E7 del serotipo HPV humano 27b (GenBank: BAE16264), E7 del serotipo HPV humano 77 (GenBank: CAA75457), E7 del serotipo HPV humano 76 (GenBank: CAA75457), E7 del serotipo HPV humano 75 (GenBank: CAA75450), E7 del serotipo HPV humano 2 (GenBank: NP\_077117), E7 oncogénica del serotipo HPV humano 38 (GenBank: CAQ16115, CAQ16114, CAQ16113, CAQ16112, CAQ16111, CAQ16110, CAQ16109,

CAQ16108, CAQ16107, CAQ16106, CAQ16105, CAQ16104, CAQ16103, CAQ16102, CAQ16101, CAQ16100 ), E7 del serotipo HPV humano 94 (GenBank: CAF05710), E7 del serotipo HPV humano 95 (GenBank: CAF05703), E7 del serotipo HPV humano 43 (GenBank: CAF05784), E7 del serotipo HPV humano 5b (GenBank: BAA42818), E7 del serotipo HPV humano 103 (GenBank: YP\_656493), E7 del serotipo HPV humano 101 (GenBank: AAZ39507), E7 del serotipo HPV humano 103 (GenBank: AAZ39485).

La expresión “péptido antigénico”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de naturaleza peptídica que comprende uno o más epítomos capaces de estimular el sistema inmune de un organismo para generar una respuesta humoral o celular específica del antígeno. Como resultado de la puesta en contacto del péptido antigénico con las células apropiadas en un sujeto, el antígeno genera un estado de sensibilidad o capacidad de respuesta inmune en dicho sujeto de forma que tanto anticuerpos como células inmunes obtenidas a partir de dicho sujeto son capaces de reaccionar de forma específica con el antígeno.

La expresión “péptido antigénico derivado de la proteína E7 de HPV”, tal como se utiliza en el presente documento, se entiende como un fragmento de la proteína E7 de HPV que es capaz de estimular el sistema inmunitario de un mamífero de forma que se genere una respuesta inmune frente a dicha proteína capaz de inhibir el crecimiento de tumores ocasionados por la expresión de E7 o de inhibir la proliferación de HPV.

Se apreciará que el antígeno o los antígenos puede(n) ser la proteína E7 completa, así como dominios aislados de dicha proteína, fragmentos peptídicos de la proteína E7 o proteínas de fusión poliepitópicas que comprenden múltiples epítomos (por ejemplo desde 5 hasta 100 epítomos diferentes). El polipéptido puede incluir opcionalmente segmentos adicionales, por ejemplo, puede incluir al menos 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 90 o incluso 100 o más segmentos, siendo cada uno una parte de la proteína E7 que se produce de manera natural de un agente patógeno y/o de un antígeno tumoral que se produce de manera natural que puede ser el mismo o diferente de la(s) proteína(s) de las que se deriva(n) los otros segmentos. Cada uno de estos segmentos puede tener al menos 8 aminoácidos de longitud, y cada uno contiene al menos un epítomo (preferiblemente dos o más) diferente de los epítomos de los otros segmentos. Al menos uno (preferiblemente al menos dos o tres) de los segmentos en el polipéptido híbrido puede contener, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7 o incluso 10 o más epítomos, particularmente epítomos de unión a MHC de clase I o de clase II. Dos, tres o más de los segmentos pueden ser contiguos en el polipéptido híbrido, es decir, pueden estar unidos extremo con extremo, sin espaciador entre ellos. Alternativamente, dos segmentos adyacentes cualesquiera pueden estar unidos por un aminoácido espaciador o un péptido espaciador.

Ejemplos de péptidos antigénicos derivados de E7 HPV se encuentran en la tabla I.

Tabla I

Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
HEYMLDLQPETTDLY	2	KDYILDLQPETTDLH	27
TLRLCVQSTHVDIRT	3	LRTLQQMLLGTLQVV	28
IRTLEDLLMGTLGIV	4	LQQMLLGTLQVVCPG	29
LEDLLMGTLGIVCPI	5	QMLLGTLQVVCPGCA	30
DLLMGTLGIVCPICS	6	VPTLQDVVLELTPQT	31
KATLQDIVLHLEPQN	7	LQDVVLELTPQTEID	32
IDGVNHQHLPARRAE	8	QDVVLELTPQTEIDL	33
LRAFQQLFLNLSFV	9	CKFVVQLDIQSTKED	34
FQQLFLNLSFVCPW	10	VVQLDIQSTKEDLRV	35
QDYVLDLQPEATDLH	11	TLHEYMLDL	36
DIRILQELLMGSFGI	12	YMLDLQPET	37
IRILQELLMGSFGIV	13	MLDLQPETT	38
ELLMGSFGIVCPNCS	14	QAEPDRAHYNI	39
KEYVLDLYPEPTDLY	15	QAEPDRAHYNIVTFCKCD	40
LRTIQQLLMGTVNIV	16	QAEPDRAHYNIVTF	41

IQQLMGTVNIVCPT	17	QAEPDRAHYNIVT	42
QLLMGTVNIVCPTCA	18	QAEPDRAHYNIVTFCK	43
AETLQEIVLHLEPQN	19	MLDLQPETTDLYCYEQ	44
LRTLQQLFLSTLSFV	20	MLDLQPETTDLY	45
LQQLFLSTLSFVCPW	21	MLDLQPET	46
DLRVVQQLMGALTV	22	REYILDHPEPTDLF	47
LRVVQQLMGALTVT	23	TCCYTCGTTVRLCIN	48
VQQLMGALTVTCPL	24	VRTLQQLMGCTIV	49
QQLMGALTVTCPLC	25	LQQLMGCTIVCPS	50
QLMGALTVTCPLCA	26		

5 Diversos métodos son conocidos por el experto en la materia para determinar si un péptido de HPV E7 es antigénico. Por ejemplo, el método utilizado en el ejemplo 2 (ELISPOT) o los métodos descritos en la patente EP1334177-B1 en donde se describe un procedimiento *in vitro* para detectar la actividad mediada por linfocitos T de un péptido antigénico diana.

En una forma preferida de realización, el péptido o péptidos antigénico/s que forman parte del conjugado de la invención deriva/n de la proteína E7 de HPV16.

10 En una realización particular del conjugado de la invención, éste comprende un péptido antigénico derivado de la proteína E7 de HPV que corresponde a o que contiene los aminoácidos 1 a 29 de E7 (SEQ ID NO: 51), un péptido antigénico que corresponde a o contiene los aminoácidos 43 a 98 de E7 (SEQ ID NO: 52) o ambos.

En una realización particular del conjugado de la invención, la región EDA se encuentra flanqueada por dos péptidos antigénicos de HPV E7. En una realización aún más preferida, la secuencia de la proteína de fusión es SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO:72.

15 En una realización particular el componente ii) forma una única cadena polipeptídica o proteína de fusión con el componente i).

20 Con el fin de facilitar el aislamiento y purificación de la proteína de fusión de la invención, dicha proteína de fusión puede contener, si se desea, un péptido adicional susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento o purificación de la proteína de fusión, tal como un péptido etiqueta ("tag"). Dicho péptido etiqueta puede estar situado en cualquier posición de la proteína de fusión que no altere la funcionalidad de ninguno de los polipéptidos (i) y (ii). A modo ilustrativo, dicho péptido etiqueta puede estar situado en posición N-terminal del conjugado de la invención de forma que el extremo C-terminal del péptido etiqueta se encuentre unido al extremo N-terminal del conjugado de la invención. Alternativamente, el péptido etiqueta puede estar situado en posición C-terminal del conjugado de la invención de forma que el extremo N-terminal del péptido etiqueta se encuentre unido al extremo C-terminal del conjugado de la invención. Prácticamente cualquier péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento o purificación de la proteína de fusión puede ser utilizado, por ejemplo, secuencias de polihistidina, secuencias peptídicas susceptibles de ser reconocidas por anticuerpos que pueden servir para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad, tales como péptidos etiqueta, por ejemplo, epítopos derivados de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe (Field et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165), C-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra él (Evan et al., 1985, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616); la proteína de Herpes Simplex virus D (gD) tag y sus anticuerpos (Paborsky et al., 1990, Protein Engineering, 3:547-553). Otros péptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp et al., 1988, BioTechnology, 6:1204-1210) y el epítipo KT3 (Martin et al., 1993, Science, 255: 192-194). El péptido etiqueta está generalmente dispuesto en el extremo amino- o carboxiloterminales.

35 Una persona experta en el estado de la técnica apreciará que los diferentes elementos del conjugado de la invención pueden estar colocados en cualquier orden de manera siempre que la región EDA de fibronectina mantenga sus propiedades activadoras de células dendríticas y que la o las regiones del péptido antigénico derivado de HPV E7 mantengan las propiedades antigénicas.

40 Así, ejemplos de disposición de los elementos del conjugado de la invención son, entre otros, refiriéndose siempre a la colocación de elementos en sentido N-terminal a C-terminal:

- péptido antigénico derivado de HPV E7- EDA de fibronectina,
  - EDA de fibronectina- péptido antigénico derivado de HPV E7,
  - EDA de fibronectina- péptido antigénico derivado de HPV E7- EDA de fibronectina,
  - péptido antigénico derivado de HPV E7- EDA de fibronectina- péptido antigénico derivado de HPV E7,
- 5    – repeticiones de las dos últimas.

El experto en la materia apreciará que los elementos que forman los conjugados de la invención, es decir, el péptido EDA y al menos un péptido antigénico derivado de HPV E7 pueden estar conjugados directamente o, alternativamente, pueden contener una secuencia de aminoácidos adicional que actúa como enlazador entre dichos componentes. Según la invención, dicha secuencia de aminoácidos intermedia actúa como una región bisagra entre dichos dominios, permitiendo que se muevan de forma independiente el uno del otro mientras mantienen la forma tridimensional de los dominios individuales. En ese sentido, una secuencia de aminoácidos intermedia preferida según la invención sería una región bisagra caracterizada por una ductilidad estructural que permite este movimiento. En una forma de realización particular, dicha secuencia de aminoácidos intermedia es un enlazador flexible. En una forma de realización preferida, dicho enlazador flexible es un péptido enlazador flexible con una longitud de 20 aminoácidos o menos.

El efecto de la región enlazadora es proporcionar espacio entre el péptido EDA y el componente (ii). De este modo se asegura que la estructura secundaria del péptido EDA no está afectada por la presencia del componente (ii) y viceversa. Preferiblemente, el espaciador es de naturaleza polipeptídica. El péptido enlazador preferiblemente comprende al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos diez aminoácidos, al menos 15 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos.

En una forma de realización más preferida, el péptido enlazador comprende 2 aminoácidos o más seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, alanina y treonina. En una forma de realización preferida de la invención, dicho enlazador flexible es un enlazador de poliglicina. Los ejemplos posibles de secuencias de enlazador/espaciador incluyen SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO: 54), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO: 55) o GGSGGAP (SEQ ID NO: 56). Estas secuencias se han usado para la unión de hélices enrolladas diseñadas a otros dominios de proteínas (Muller, K.M., Arndt, K.M. y Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328: 261-281). Preferiblemente, dicho enlazador comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GGGVEGGG (SEQ ID NO: 57).

El enlazador puede estar unido a los componentes que flanquean los dos componentes de los conjugados de la invención por medio de enlaces covalentes y preferiblemente el espaciador es esencialmente no inmunogénico, y/o no es propenso al corte proteolítico, y/o no comprende ningún residuo de cisteína. De forma similar, la estructura tridimensional del espaciador es preferiblemente lineal o sustancialmente lineal.

Los ejemplos preferidos de péptidos espaciadores o enlazadores incluyen aquellos que se han usado para unir proteínas sin deteriorar sustancialmente la función de las proteínas unidas o al menos sin deteriorar sustancialmente la función de una de las proteínas unidas. Más preferiblemente los espaciadores o enlazadores se han usado para unir proteínas que comprenden estructuras con hélices enrolladas.

El enlazador puede incluir los residuos 53-56 de la tetranectina, que en la tetranectina forma una lámina  $\beta$ , y los residuos 57-59 que forman un giro en la tetranectina (Nielsen, B.B. et al., FEBS Lett. 412: 388-396, 1997). La secuencia del segmento es GTKVHMK (SEQ ID NO: 58). Este enlazador tiene la ventaja de que cuando está presente en la tetranectina nativa, está uniendo el dominio de trimerización con el dominio CRD, y por lo tanto es adecuado para conectar el dominio de trimerización a otro dominio en general. Además no se espera que la construcción resultante sea más inmunogénica que la construcción sin un enlazador.

De forma alternativa, un péptido enlazador adecuado puede estar basado en la secuencia de 10 residuos de aminoácidos de la región bisagra superior de la IgG3 murina. Este péptido (PKPSTPPGSS, SEQ ID NO: 59) se ha usado para la producción de anticuerpos dimerizados mediante una hélice enrollada (Pack P. y Pluckthun, A., 1992, Biochemistry 31:1579-1584) y puede ser útil como un péptido espaciador según la presente invención. Incluso más preferible puede ser una secuencia correspondiente de la región bisagra superior de la IgG3 humana. No se espera que las secuencias de la IgG3 humana sean inmunogénicas en seres humanos. Péptidos enlazadores adicionales que pueden ser usados en el conjugado de la invención incluyen el péptido de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 60) y el péptido de secuencia GAP.

Alternativamente, los dos componentes de los conjugados de la invención pueden estar conectados por un péptido cuya secuencia contiene una diana de corte para una proteasa, permitiendo de esta manera la separación del péptido EDA del componente (ii). Los sitios de corte de proteasas adecuados para su incorporación en los polipéptidos de la invención incluyen sitio diana de enteroquinasa (secuencia DDDDK SEQ ID NO: 61), sitio diana de factor Xa (sitio de corte IEDGR, SEQ ID NO: 62), sitio diana de trombina (sitio de corte LVPRGS, SEQ ID NO: 63),

sitio diana de la proteasa TEV (sitio de corte ENLYFQG, SEQ ID NO: 64), sitio diana de la proteasa PreScission (sitio de corte LEVLFQGP, SEQ ID NO: 65) y sitio diana de la inteínas y similares.

Métodos de obtención de los conjugados de la invención

5 Los conjugados de la invención pueden obtenerse usando cualquier método conocido para un experto en la materia. Así, es posible obtener el péptido EDA o la variante de dicha proteína por cualquier método estándar. Por ejemplo, el péptido EDA se puede obtener a partir del cDNA mediante expresión en un organismo heterólogo como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*.

10 Una vez que se disponga de cantidad suficiente del péptido EDA purificado, ésta debe conjugarse a el/los péptidos antigénicos derivados de HPV E7. La conjugación del componente (ii) a la molécula de EDA puede ser llevada a cabo de distintas formas. Una posibilidad es la conjugación directa de un grupo funcional al componente terapéuticamente activo en una posición que no interfiera con la actividad de dicho componente. Grupos funcionales, según se entiende en la presente invención, se refiere a un grupo de átomos específicos en una molécula que son responsables de una reacción química característica de dicha molécula. Ejemplos de grupos funcionales incluyen, sin limitación, hidroxilo, aldehído, alquilo, alquenoilo, alquinoilo, amida, carboxamida, aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, aminoxi, azida, azo (diimida), bencilo, carbonato, éster, éter, glioxili, haloalquil, haloformil, imina, imida, cetona, maleimida, isocianida, isocianato, carbonilo, nitrato, nitrito, nitro, nitroso, peróxido, fenilo, fosfino, fosfato, fosfono, piridilo, sulfuro, sulfonilo, sulfinilo, tioéster, tiol y grupos 3,4-dihidroxi fenilalanina (DOPA) oxidados. Ejemplos de dichos grupos son grupos maleimida o glioxilil que reaccionan de forma específica con grupos tioles en la molécula de Apo A y grupos 3,4-dihidroxi-fenilalanina (DOPA) oxidados que reaccionan con grupos aminos primarios en la molécula de EDA y del componente (ii).

15 Otra posibilidad es conjugar el componente (ii) a la molécula de EDA mediante el uso de grupos homo- o heterobifuncionales. El grupo bifuncional puede ser conjugado en primer lugar al compuesto terapéuticamente activo y, a continuación, conjugado al péptido EDA o, alternativamente, es posible conjugar el grupo bifuncional al péptido EDA y, a continuación, conjugar este al componente (ii). Ejemplos ilustrativos de este tipo de conjugados incluyen los conjugados conocidos como cetona-oxima (descrito en US20050255042) en los que el primer componente del conjugado comprende un grupo aminoxi que se une a un grupo cetona presente en un grupo heterobifuncional que, a su vez, se une a un grupo amino en el segundo componente del conjugado.

20 En otra forma de realización, el agente que se usa para conjugar los componentes (i) y (ii) de los conjugados de la invención puede ser procesado fotolíticamente, químicamente, térmicamente o enzimáticamente. En particular, resulta de interés el uso de agentes enlazantes que pueden ser hidrolizados por enzimas que se encuentran en la célula diana, de forma que el compuesto terapéuticamente activo se libera únicamente en el interior celular. Ejemplos de tipos agentes enlazantes que pueden ser procesados intracelularmente han sido descritos en WO04054622, WO06107617, WO07046893 y WO07112193.

25 En una forma preferida de realización, puesto que el componente (ii) del conjugado de la invención es un compuesto de naturaleza peptídica, incluyendo tanto oligopéptidos como péptidos, se pueden utilizar métodos para modificar químicamente una cadena polipeptídica que son ampliamente conocidos para el experto en la materia e incluyen métodos basados en la conjugación a través de los grupos tioles presentes en los restos de cisteína, métodos basados en la conjugación a través de los grupos amino primario presentes en los restos de lisina (US6809186), métodos basados en la conjugación a través de los restos N- y C-terminales. Reactivos adecuados para la modificación de polipéptidos para permitir su acoplamiento a otros compuestos incluyen: glutaraldehído (permite unir compuestos al extremo N-terminal de polipéptidos), carbodiimida (permite unir el compuesto al extremo C-terminal de un polipéptido), ésteres de succinimida (por ejemplo MBS, SMCC) que permite activar el extremo N-terminal y restos de cisteína, bencidina (BDB), que permite activar restos de tirosina, peryodato, que permite activar restos carbohidratados en aquellas proteínas que se encuentran glicosiladas.

30 Polinucleótidos, construcciones génicas, vectores y células hospedadoras de la invención

35 En el caso particular de que el componente EDA y el o los péptidos antigénicos derivados de HPV E7 formen una única cadena peptídica, es posible la expresión del conjugado en un único paso utilizando un polinucleótido que codifica dicho conjugado. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica el conjugado de la invención. El experto en la materia apreciará que los polinucleótidos de la invención codificarán únicamente aquellos conjugados en los que el componente (ii) y el polipéptido EDA o su variante funcionalmente equivalente formen una única cadena peptídica, independientemente de la orientación relativa e independientemente de que ambos componentes se encuentren directamente conectados o separados por una región espaciadora.

40 El término "polinucleótido", según se usa en la presente invención, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y similares).

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende un polinucleótido de la invención. Preferiblemente, la construcción comprende el polinucleótido de la invención operativamente unido a secuencias reguladoras de la expresión del polinucleótido de

la invención. En principio, cualquier promotor puede ser utilizado para las construcciones génicas de la presente invención siempre que dicho promotor sea compatible con las células en las que se desea expresar el polinucleótido. Así, promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFκB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de tejido.

Otros ejemplos de promotores que son específicos de tejido incluyen el promotor del gen de la albúmina (Miyatake et al., 1997, J. Virol, 71:5124-32), el promotor central del virus de la hepatitis (Sandig et al, 1996, Gene Ther., 3:1002-9); el promotor del gen de la fetoproteína alfa (Arbuthnot et al., 1996, Hum.GeneTher., 7:1503-14), y el promotor del gen de la proteína de unión a la globulina que une tiroxina (Wang, L., et al., 1997, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:11563-11566). Preferiblemente, las construcciones de la invención contienen promotores específicos de células dendríticas tales como el promotor CD11c (Masood, R., et al. 2001. Int J Mol Med 8:335-343; Somia, N.V., et al. 1995. Proc Acad Sci USA 92:7570-7574), el promotor de fascina (Sudowe, S., et al., 2006. J Allergy Clin Immunol. 117:196-203), el promotor del gen CD83, el promotor del gen CD36 o el promotor de Dectina-2 (Gene Ther., 2001, 8:1729-1737).

Las polinucleótidos de la invención o las construcciones génicas que las constituyen pueden estar formando parte de un vector. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende un polinucleótido o una construcción génica de la invención. El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación y para obtener los polinucleótidos o construcciones génicas adecuadas o vectores de expresión en distintos organismos heterólogos adecuados para la purificación de los conjugados. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen vectores de expresión en procariontes tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColEI, pCRI , RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 and pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariontes o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook et al., 2001, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol 1-3 a).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótidos, una construcción génica o un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001, citado *supra*). En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

Células hospedadoras adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinos, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.). células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

Composiciones inmunogénicas de la invención

Los inventores han observado que la combinación del conjugado de la invención y de un agonista de receptores de tipo toll (TLR) permitía generar una respuesta inmune superior a la obtenida cuando cada uno de dichos componentes se administraba por separado. Así, según se observa en el ejemplo 3, las composiciones formadas por la proteína de fusión EDA-HPVE7 y poliI:C son capaces de erradicar tumores que no son tratables cuando se administra únicamente la proteína de fusión.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con una composición (en adelante composición primera de la invención o primera composición de la invención) que comprende, en conjunto o por separado:

- (i) un conjugado de la invención, un polinucleótido o construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula hospedadora según la invención y
- (ii) un ligando de TLR.

Las concentraciones molares de los componentes que forman parte de la primera composición de la invención, pueden variar, pero preferentemente incluyen ratios de los dos componentes entre 50:1 y 1:50, mas preferiblemente entre 20:1 y 1:20, entre 1:10 y 10:1, entre 5:1 y 1:5.

El primer componente i) de la composición ha sido descrito en detalle en el contexto del péptido de la invención. En una realización particular preferida, dicho primer componente comprende la región EDA de fibronectina de origen humano. En otra forma de realización, el primer componente de la composición de la invención comprende los aminoácidos 1 a 29 de la proteína E7 y/o los aminoácidos 43 a 98 de la proteína E7. En una realización aún más preferida, el primer componente del conjugado que forma parte de la composición de la invención comprende la región EDA flanqueada por dos péptidos antigénicos de HPV E7, tal y como se describe en SEQ ID NO: 53 (que comprende adicionalmente una cola de 6 histidinas) o en SEQ ID NO: 72.

En la presente invención se entiende por "ligando del receptor TLR" a una molécula que se une específicamente a al menos uno de los receptores TLR (receptor toll like) y que al unirse es capaz de estimular algunas de las señales de co-estimulación características de la unión de dicho receptor con su ligando natural u otras señales que resultan de la unión de dicho receptor con un agonista de TLR.

Los receptores tipo Toll (o Toll-like receptor, TLRs) son una familia de proteínas transmembrana de tipo I que forman parte del sistema inmunitario innato. En los vertebrados también posibilitan la adaptación del sistema inmune. Los TLR junto con los receptores de interleuquina forman una superfamilia conocida como Interleukina-1/toll-like receptor. Todos los miembros de esta familia tienen en común el dominio llamado Toll-IL-1 receptor (TIL).

Se ha estimado que la mayoría de los mamíferos poseen entre 10 y 15 tipos de TLRs. En humanos y ratones se han identificado hasta el momento 13 tipos de TLRs (Du X, et al. 2000, Eur.Cytokine Netw. 11: 362–71; Chuang TH. et al, 2000. Eur. Cytokine Netw. 11: 372–378; Tabeta K, et al; 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:3516–3521).

Los ligandos de TLR inducen diversas respuestas inmunes dependiendo de la células donde el TLR esté expresada así como dependiendo del origen del ligando del TLR. Por ejemplo, en el caso de ligandos de origen microbiano, las células inmunes pueden producir citoquinas que van a provocar inflamación. En el caso de un factor viral, las células pueden sufrir apoptosis.

En una realización particular, los ligandos son ligandos agonistas. Los ligandos agonistas de los receptores TLR son (i) los ligandos naturales del propio receptor TLR, o una variante funcionalmente equivalente del mismo que conserve la capacidad de unirse al receptor TLR e inducir señales de coestímulo sobre él, o (ii) un anticuerpo agonista frente al receptor TLR, o una variante funcionalmente equivalente del mismo capaz de unirse específicamente al receptor TLR y, más particularmente, al dominio extracelular de dicho receptor, e inducir algunas de las señales inmunes controladas por este receptor y proteínas asociadas. La especificidad de unión puede ser para el receptor TLR humano o para un receptor TLR homólogo al humano de una especie diferente.

Ejemplos de ligandos de los distintos TLR se encuentran esquematizados en la Tabla 2.

TLR (Nº)	Ligando
TLR 1	Multiples Lipopéptidos de triacilo.
TLR 2	Multiple glicopéptidos, lipopéptidos y lipoproteínas. Acido lipotechoic, HSP70, zymosano de las células anfitrionas.
TLR 3	ARN de doble cadena, poli I:C (ácido polinosinico-policitidilico o ácido de la sal de sodio de polinosinico-policitidilico)
TLR 4	Lipopolisacáridos (bacterias gram negativas), diferentes proteínas heat shock(bacterias y células anfitrionas), fibrinogeno de las células anfitrionas, fragmentos de heparan sulfato de las células

	anfitrionas, fragmentos de ácido hialurónico de las células anfitrionas, muchos otros.
TLR 5	Flagelina
TLR 6	múltiples diacil lipopeptidos (micoplasmas)
TLR 7	Imidazoquinolina, loxoribina (análogo de guanosina), compuestos sintéticos pequeños de bropirimina y ARN de cadena única.
TLR 8	Compuestos sintéticos pequeños, ARN de cadena única.
TLR 9	AND CpG no metilado (bacterias)
TLR 11	Profilina ( <i>Toxoplasma gondii</i> )

Como el experto en la materia entiende, existen una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar la actividad de ligandos agonistas y ligandos en general del receptor TLR, tales como la co-estimulación *in vitro* de células dendríticas. Brevemente, dicho ensayo consiste en poner en contacto un cultivo de células dendríticas con un ligando agonista de TLR y medir la activación de dichas células. Dicha activación puede ser determinada mediante la detección de cualquier marcado, por ejemplo poli(I:C) en el caso de que el receptor sea TLR3. Las células dendríticas activadas expresan diferentes proteínas tales como CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y CD40. Así es posible detectar la actividad agonística de un ligando agonista TLR mediante la detección de cambios en los niveles de expresión de dichas proteínas en las células dendríticas tras ser expuestas a dicho ligando, tal y como describen por ejemplo Chen X.Z. *et al.* (Arch Dermatol Res. 2009 Jul 4 Epub ahead of print).

En otra realización particular preferida, el ligando TLR se selecciona del grupo de un ligando de TLR3, un ligando de TLR9 y una combinación de ambos. De manera más preferida, el ligando de TLR3 es poli(I:C) (ácido polinosínico-policitidílico o ácido de la sal de sodio de polinosínico-policitidílico).

En otra realización preferida, el ligando de TLR9 es un oligonucleótido que comprende al menos un motivo CpG más preferidamente, el CpG-fosforotiato de tipo B (CpG 1826: 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' SEQ ID NO: 66)

Los autores de la presente invención han observado que los conjugados de la invención son capaces de mejorar la respuesta antitumoral obtenida mediante el uso de un ligando TLR y de un agente quimioterapéutico. En concreto, la figura 7 de la invención demuestra como la administración de una composición que comprende la proteína de fusión EDA-HPVE7, el ligando de TLR9 CpG y ciclofosfamida resulta en una mayor reducción del tamaño de tumores que la administración de ciclofosfamida y el ligando TLR9.

Así, en otro aspecto la invención se relaciona con una composición de la invención (en adelante, composición segunda de la invención o segunda composición de la invención) que comprende:

- (i) un conjugado de la invención, un polinucleótido o construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula hospedadora según la invención,
- (ii) un ligando de TLR y
- (iii) un agente quimioterapéutico.

Los componentes (i) (el conjugado de la invención) y (ii) (el ligando de TLR) de la segunda composición de la invención han sido descritos en detalle en apartados anteriores.

Por "agente quimioterapéutico", se entiende cualquier sustancia que es capaz de inhibir la proliferación celular sin matar a la célula necesariamente o que es capaz de inducir la muerte celular. Los agentes capaces de inhibir la proliferación celular sin provocar muerte celular se denominan de forma genérica agentes citostáticos, mientras que aquellos que son capaces de inducir la muerte celular normalmente mediante la activación de la apoptosis se denominan de forma genérica agentes citotóxicos. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen (i) agentes estabilizantes de microtúbulos tales como taxanos, paclitaxel, docetaxel, epotilonas y laulimalides, (ii) inhibidores de quinasas tales como Iressa(R), Gleevec, Tarceva™, (Erlotinib HCl), BAY-43-9006, (iii) anticuerpos específicos para receptores con actividad quinasa incluyendo, Trastuzumab (Herceptin(R)), Cetuximab (Erbix(R)), Bevacizumab (Avastin™), Rituximab (ritusan(R)), Pertuzumab (Omnitarg™); (iv) inhibidores de la ruta mTOR tales como rapamicina y CCI-778; (v) Apo2L/Trail, (vi) agentes anti-angiogénicos tales como endostatina, combrestatina, angiostatina, trombospondina y el inhibidor del crecimiento endothelial vascular (VEGI); (vii) vacunas antineoplásicas incluyendo células T activadas, agentes inmunopotenciadores inespecíficos (por ejemplo interferones, interleuquinas); (viii) agentes citotóxicos antibióticos tales doxorubicina, bleomocina, dactinomicina, daunorubicina, epirubicina, mitomicina y mitozantrona; (ix) agentes alquilantes tales como Melphalan, Carmustina, Lomustina, ciclofosfamida, ifosfamida, Clorambucilo, Fotemustine,

Busulfano, Temozolomida y thiotepa; (x) agentes hormonales antineoplásticos tales como Nilutamida, acetato de ciproterona, anastrozol, Exemestano, Tamoxifeno, Raloxifeno, Bicalutamida, Aminoglutetimida, acetato de leuprorelina, citrato de Toremifeno, Letrozol, Flutamida, acetato de Megestrol y acetato de goserelina; (xi) hormonas gonadales tales como acetato de ciproterona y acetato de medoxiprogesterone; (xii) antimetabolitos tales como Citarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Topotecano, Hidroxiurea, Tioguanina, Metotrexato, Colaspasa, Raltitrexedo y capicitabina; (xiii) agentes anabólicos tales como nandrolone; (xiv) hormonas adrenales esteroideas tales como acetato de metilprednisolona, dexametasona, hidrocortisona, prednisolona y prednisona; (xv) agentes antineoplásticos tales como Carboplatino, Cisplatino, Oxaliplatino, Etoposido and Dacarbazina e (xvi) inhibidores de topoisomerasa tales como topotecana e irinotecano.

10 Sin querer estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que los agentes quimioterapéuticos, cuando se administran en dosis adecuadas, pueden actuar como agentes inmunopotenciadores de forma indirecta mediante la inactivación de células T reguladoras.

15 En una forma preferida de realización, el agente quimioterapéutico es un agente citostático, mas preferentemente es ciclofosfamida o un análogo de ciclofosfamida. Los análogos de ciclofosfamida son bien conocidos en la bibliografía (Cyclophosphamide, Merck Index, 11ª Edición, páginas 429-430; documento US5190929).

20 En adelante, citaremos en ocasiones el término “composición de la invención” para referirnos tanto a la primera composición de la invención como a la segunda composición de la invención. Como un experto en la materia entiende, las composiciones de la invención pueden ser formuladas como un único componente o alternativamente presentadas como formulaciones separadas que pueden ser combinadas para su administración posterior. Las composiciones de la invención pueden ser también presentadas como partes de un kit, en donde cada uno de los componentes es formulado separadamente, pero empaquetado en un único contenedor.

#### Usos médicos de los conjugados y composiciones de la invención

25 Los investigadores han observado que los conjugados de la invención son capaces de inducir la maduración de células dendríticas, inducir la activación de la respuesta inmune antitumoral *in vivo* frente al péptido y de erradicar tumores grandes y bien establecidos que expresan la proteína HPVE7 (véanse ejemplos 1 a 3 de la invención).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención o una composición de la invención para su uso en medicina.

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, o composición farmacéutica de la invención, que comprende una proteína de fusión de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención y al menos un adyuvante o vehículo farmacológicamente aceptable.

Por “adyuvante” se entiende cualquier sustancia que intensifica la efectividad de la composición farmacéutica de la invención.

35 Los ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, adyuvantes formados por sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc, formulaciones de emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite como la Adyuvante completo de Freunds (CFA) así como el Adyuvante incompleto de Freunds (IFA); geles minerales; copolímeros en bloque, Avridine™, SEAM62, adyuvantes formados por componentes de la pared celular de bacterias como adyuvantes que incluyan liposacáridos (P.ej. lípido A o Lípido A monofosforil (MLA), trealosa dimicolato (TDM), y componentes de el esqueleto de la pared celular (CWS), proteínas *heat shock* o sus derivados, adyuvantes derivados de toxinas bacterianas ADP-ribosilatinadas, que incluyen toxina de difteria (DT), toxina pertusis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas de *E.coli* lábiles al calor (LT1 y LT2), Edotoxina A y exotoxina de *Pseudomonas*, exoenzima B de *B.cereus*, toxina de *B. sphaericus*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum* así como las toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriforma* and *C. difficile*, *S. aureus*, EDIM y mutantes de toxina mutantes como la CRM-197, toxina mutante no tóxica de la difteria; saponinas como las ISCOMs (complejos inmunoestimuladores), quemocinas quimioquinas y citoquinas como la interleuquinas (IL-1 IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 12, etc), interferones (como el interferón gama) factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), Factor de necrosis tumoral (TNF), defensinas 1o 2, RANTES, MIPI -alfa,y MEP-2, péptidos muramil como los N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil- normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L- alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-( 1 '-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3 hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE) etc; adyuvantes derivados de la familia de moléculas CpG, CpG dinucleótidos y oligonucleótidos sintéticos que comprendan motivos CpG, lisosum exoenzima de *C. Limosum* y adyuvantes sintéticos como PCPP, la toxina del cólera, toxina de Salmonella, alumbre y similares, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, MTP-PE y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween 80. Otros ejemplos de adyuvantes incluyen DDA (bromuro de dimetiliododecilandamonio), adyuvantes completo e incompleto de Freund y QuilA.

El término “vehículo” se refiere a un diluyente o excipiente con el que se administra el principio activo. Tales

vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como vehículos agua o disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para las disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o el federal o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Los vehículos y las sustancias auxiliares necesarios para fabricar la forma farmacéutica deseada de administración de la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otros factores, de la forma farmacéutica de administración elegida. Dichas formas farmacéuticas de administración de la composición farmacéutica se fabricarán según métodos convencionales conocidos por el experto en la técnica. Una revisión de diferentes métodos de administración de principios activos, excipientes que van a usarse y procedimientos para producirlos pueden encontrarse en "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí y Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993. Ejemplos de composiciones farmacéuticas incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (disoluciones, suspensiones o emulsiones) para la administración oral, tópica o parenteral. Además, la composición farmacéutica puede contener según sea necesario estabilizadores, suspensiones, conservantes, tensioactivos y similares.

Para uso en medicina, los conjugados de la invención pueden encontrarse en forma de prodroga, sal, solvato o clatrato, bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales. Las combinaciones de compuestos de acuerdo con la presente invención pueden ser formuladas conjuntamente con un excipiente que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí y Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

En el caso de que se administren ácidos nucleicos (los polinucleótidos de la invención, los vectores o las construcciones génicas), la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos en forma desnuda, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Rutas de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugados a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en WO07069090 (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). Alternativamente, el polinucleótido puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adenoasociados o en retrovirus, tales como virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

Las composiciones de la invención pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 ó 0.00001 mg por cada kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica.

La dosis depende de la severidad y respuesta de la condición a tratar y puede variar entre varios días y varios meses o hasta que se observe que la condición remite. La dosificación óptima se puede determinar realizando mediciones periódicas de las concentraciones de agente en el organismo del paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir de los valores de EC50 obtenidos mediante ensayos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente, menos

de una vez cada 2, 4, 8 o 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de menos cantidad que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente con dosis que oscilan entre 0,01 µg y 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran, preferiblemente, como mucho una vez cada 5, 10 ó 30 días. El tratamiento se debe continuar durante un tiempo que variará según el tipo de alteración que sufra el paciente, su severidad y el estado del paciente. Tras el tratamiento, se debe monitorizar la evolución del paciente para determinar si se debe incrementar la dosis en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o se disminuye la dosis si se observa una mejora de la enfermedad o si se observan efectos secundarios indeseados.

En una realización particular, los componentes de las composiciones de la invención pueden ser administrados de forma simultánea, secuencial o separada. En una forma preferida de realización, se administra el agente quimioterapéutico (preferiblemente la ciclofosfamida) en primer lugar y posteriormente tras un periodo de tiempo variable, se administran el resto de componentes de las composiciones de la invención, es decir, conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora según la invención y el ligando de TLR. La administración del conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora y del TLR puede llevarse a cabo de forma simultánea, separada o secuencial. En una forma preferida de realización, el ligando de TLR (preferiblemente pl:C o CpG-B/DOTAP) y el conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora de la invención (preferiblemente la proteína de fusión) se administran simultáneamente. En el caso de las composiciones de la invención que comprenden un agente quimioterapéutico y, en concreto, ciclofosfamida (CPA), en una forma preferida de realización, la CPA se utiliza a una concentración subóptima, denominada "dosis metronómica", que es capaz de matar selectivamente a las células Treg (Ghiringhelli et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 2007, 56:641-8).

Las composiciones de la invención pueden administrarse en forma de una única dosis, o alternativamente, como una primera dosis y una o más dosis de recuerdo. Así, en una forma preferida de realización, las composiciones de la invención se administran en una primera dosis y en una segunda dosis de recuerdo. En el caso de que las composiciones de la invención se administren de forma separada en el tiempo, se entiende que se administra, a lo largo del tiempo, una primera dosis del primer componente de la invención, una segunda dosis del segundo componente de la invención, una dosis de recuerdo del primer componente de la invención, una dosis de recuerdo del segundo componente de la invención y así sucesivamente. En una forma de realización aún más preferida, la terapia incluye una primera administración en donde se administra el agente quimioterapéutico (preferiblemente la ciclofosfamida), una segunda administración en donde se administra, conjuntamente, el conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora según la invención y el ligando de TLR; una tercera administración que incluye el agente quimioterapéutico (preferiblemente la ciclofosfamida) y una cuarta administración en donde se administra de nuevo el conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora conjuntamente con el ligando de TLR (preferiblemente pl:C o CpG-B/DOTAP). En la segunda y cuarta administración, el ligando de TLR (preferiblemente pl:C o CpG-B/DOTAP) y el conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora de la invención (preferiblemente la proteína de fusión) se administran de forma simultánea, separada o secuencial.

En una forma preferida de realización, el ligando de TLR (preferiblemente pl:C o CpG-B/DOTAP) y el conjugado, polinucleótido, construcción génica, vector o célula hospedadora de la invención (preferiblemente la proteína de fusión) se administran simultáneamente.

La dosis diaria se puede administrar en una única dosis o en dos o más dosis según las circunstancias particulares. Si se desea una administración repetida o administraciones frecuentes, es aconsejable la implantación de un dispositivo de administración tal como una bomba, un catéter semipermanente (intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un reservorio.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de una vacuna. Dicho de otro modo, la invención se relaciona con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o composición farmacéutica de la invención para su uso como vacuna.

Por "vacuna" se entiende un preparado de antígenos que una vez dentro del organismo provoca una respuesta de ataque, denominada anticuerpo. Esta respuesta genera memoria inmunológica produciendo, en la mayoría de los casos, inmunidad permanente.

La vacuna se administra de manera sistémica o local. La administración de la vacuna puede realizarse mediante administración única, o con refuerzo mediante múltiples administraciones tal y como se ha descrito anteriormente para la administración de las composiciones de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una

composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV. Alternativamente, la invención se relaciona con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en la prevención y el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV.

Infecciones y enfermedades causadas por el virus del papiloma humano incluyen verrugas (como verrugas del pie), verrugas genitales, papilomatosis respiratoria recurrente (como palipomas laríngeos) y cánceres asociados con infecciones de papilomas. Cánceres que han sido asociados con el virus del papiloma incluyen cánceres anogenitales (e.g. cáncer cervical, perianal, vulvar, vaginal, de pene, etc), cánceres de cabeza y cuello (e.g. cáncer de la cavidad oral-faríngea, esófago, etc) y cánceres de piel (e.g., carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas).

Métodos de vacunación con células dendríticas de la invención

Otro enfoque de la terapia del cáncer es aprovechar el papel normal de la célula dendrítica como un educador inmune. Como se ha comentado con anterioridad, las células dendríticas atrapan a antígenos de virus entre otros y los presentan a las células T para reclutar su ayuda en una respuesta inmune de célula T inicial. Esto funciona bien en contra de células extrañas que entran al cuerpo, pero las células cancerosas frecuentemente evaden al sistema de detección de "lo propio"/"lo extraño". Los investigadores, modificando las células dendríticas, son capaces de activar una respuesta autoinmune de tipo especial que incluye un ataque de células T contra las células cancerosas. Debido a que un antígeno tumoral por sí solo no es suficiente para generar una respuesta inmune, es posible el poner en contacto una célula dendrítica inmadura con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención, lo que resulta en la activación de las células dendríticas, la captación del o de los antígenos derivado de HPV E7 y su presentación en la superficie asociado al antígeno mayor de histocompatibilidad. Estas células así activadas pueden ser administradas al paciente, de forma que se produzca la presentación de los antígenos de tumor al sistema inmunológico del paciente, lo que eventualmente resulta en la generación de una respuesta inmune mediada por células T sobre las células cancerosas del paciente.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para obtener células dendríticas maduras que presenten al menos un antígeno de HPV E7 que comprende:

(i) poner en contacto células dendríticas con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención en condiciones adecuadas para que tenga lugar la maduración de las células dendríticas y

(ii) recuperar las células dendríticas maduras.

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno (APC) más potentes y tienen una capacidad única para interactuar con los linfocitos T no activados (linfocitos T *naive*) e iniciar la respuesta inmunitaria primaria, activando a los linfocitos T cooperadores CD4+ (*helper*) y a los linfocitos T citotóxicos CD8+.

En ausencia de inflamación y de respuesta inmunitaria, las células dendríticas patrullan a través de la sangre, tejidos periféricos, linfa y órganos linfoides secundarios. En los tejidos periféricos, las células dendríticas capturan antígenos propios y ajenos. Los antígenos capturados son procesados dando lugar a fragmentos de los mismos que pasan a las moléculas MHC de clase I y II (para la activación de linfocitos T CD8+ o CD4+, respectivamente). Este proceso de captura de antígeno, degradación y carga se denomina presentación antigénica. Sin embargo, en ausencia de estimulación, las células dendríticas periféricas presentan los antígenos de modo ineficiente. La(s) señal(es) exógena(s) provenientes de los patógenos o la(s) señal(es) endógena(s) induce(n) a las células dendríticas para que inicien un proceso de desarrollo denominado maduración, que transforma a las células dendríticas en APC y en activadores de linfocitos T.

Existen diferentes tipos de células dendríticas que pueden ser usadas en la invención. Por un lado existen las células dendríticas mieloides (mDC) que son similares a los monocitos y que a su vez se dividen en dos subtipos: las mDC-1, que son las más comunes y que son las estimuladoras principales de las células T y las mDC-2, más raras y que principalmente tienen la función de luchar contra infecciones de heridas.

Por otro lado, se encuentran las células dendríticas plasmocíticas (pDC), que se asemejan a células plasmáticas pero que presentan ciertas características propias de las células dendríticas mieloides.

Las células dendríticas inmaduras, se derivan de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Estas células progenitoras se diferencian en células inmaduras que poseen una alta capacidad endocítica y baja capacidad de activar células T. Estas células presentan en su membrana diferentes receptores de membrana como los TLR.

Los productos bacterianos y virales, así como las citoquinas inflamatorias y otras moléculas propias, inducen la maduración de las células dendríticas mediante interacción directa con los receptores de superficie de las células dendríticas innatas. Los linfocitos T, a través de vías dependientes e independientes de CD40, y las células endoteliales, contribuyen a la maduración final de las células dendríticas mediante contacto directo célula a célula y mediante secreción de citoquinas. Poco tiempo después de que surja una señal de peligro, se modifican la eficiencia de la captura de antígenos, el transporte intracelular y la degradación, y el tráfico intracelular de moléculas MHC. Se incrementa la carga de péptidos, así como la vida media y el traslado a la superficie celular de las moléculas MHC. También aumenta la expresión en superficie de las moléculas co-estimuladoras de células T. De este modo, las células dendríticas se convierten en las APC más potentes, y las únicas capaces de activar a los linfocitos T no activados e iniciar la respuesta inmunológica. Junto a la modificación de sus capacidades en la presentación de antígenos, la maduración induce también la migración masiva de células dendríticas fuera de los tejidos periféricos. Las modificaciones en la expresión de receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión, así como los importantes cambios en la organización del citoesqueleto, contribuyen a la migración de las células dendríticas a través de la linfa hasta los órganos linfáticos secundarios.

Las células dendríticas responden a dos tipos de señales: al reconocimiento directo de patógenos (mediante receptores con patrón de reconocimiento específico) y al reconocimiento indirecto de la infección (mediante citoquinas inflamatorias, compuestos celulares internos y respuestas inmunitarias específicas). En respuesta a estas señales, las células dendríticas se activan e inician su proceso de maduración, que las transforma en estimuladores eficientes de células T. Una de las señales más eficientes para la maduración de las DC está mediada por las interacciones de los receptores tipo peaje ("toll-like receptors"), TLR, (TLR1-9) con sus respectivos ligandos (revisado por Kaisho y Akira, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1589: 1-13).

Las células dendríticas inmaduras utilizadas en la presente invención pueden ser células de cultivos primarios. Así, las células dendríticas utilizadas en el método de la invención pueden ser de origen autólogo o heterólogo.

El término "autólogo" tal como se usa en el presente documento significa que las células provienen del mismo individuo.

El término "heterólogo" tal como se usa en el presente documento significa que las células provienen de un individuo diferente.

Las células dendríticas pueden ser generadas *in vitro* a partir de células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) usando un protocolo que básicamente consistiría en sembrar las células PBMCs en una botella de cultivo de manera que se permita la adhesión de dichas células. Tras ello las células serían tratadas con interleuquina 4 (IL4) y factor estimulador de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) que lleva consigo la diferenciación de las células a células inmaduras dendríticas (iDCs) en aproximadamente una semana. Opcionalmente, las células pueden ser maduras tratándolas con factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ).

Las células dendríticas se pueden obtener usando métodos estándar a partir de las fuentes adecuadas. Estos tejidos adecuados para el aislamiento de células dendríticas incluyen la sangre periférica, la médula espinal, células que infiltran tumores, células que infiltran tejidos peritumorales, biopsias de nódulos linfáticos, timo, bazo, piel, sangre del cordón umbilical, monocitos obtenidos de la sangre periférica, células positivas para CD34 o CD14 obtenidas de la sangre periférica, así como cualquier otro tejido o fluido adecuado.

Opcionalmente, se pueden utilizar cultivos celulares estables. En el documento WO9630030 se describen métodos para conseguir hibridomas de células de tipo dendrítico/célula tumoral y pluralidades de híbridos de célula de tipo dendrítico/célula tumoral. Estos híbridos e hibridomas son generados por la fusión de células tumorales con células de tipo dendrítico. Por ejemplo, se pueden fusionar células tumorales inmortales de una línea celular tumoral autóloga con células de tipo dendrítico alogénicas emparejadas con HLA autólogas. Las líneas de células tumorales autólogas se pueden obtener de tumores primarios y de sus metástasis. Alternativamente, se pueden fusionar células de tipo dendrítico inmortales de una línea celular de tipo dendrítico emparejada con HLA alogénica o autóloga con células tumorales autólogas. En el documento WO/2002/048167 también se describen métodos para generar líneas estables de células dendríticas. Otra línea celular que se puede utilizar es la CB1 (Paglia P. et al 1993. *Journal of Experimental Medicine*, Vol 178, 1893-1901).

Una primera etapa del método de la invención consiste en poner en contacto células dendríticas con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una construcción génica de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención en condiciones adecuadas para que tenga lugar la maduración de las células dendríticas.

La invención contempla cualquier posible forma de poner en contacto las células dendríticas con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una construcción génica de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención. El experto en la materia apreciará que, dependiendo del tipo de compuesto, la puesta en contacto se lleva a cabo de forma distinta. Así, en el caso de que se trate del conjugado de la invención o un péptido de la invención, estos pueden ser directamente añadidos al medio de cultivo en el que se encuentren las células o pueden ser unidos a una superficie

de plástico, cristal etc que va ser expuesta a las células dendríticas. Formas de unión de los componentes del conjugado de la invención, así como del péptido de la invención a superficies sólidas son conocidas por un experto en la materia.

5 En el caso de que se trate de una construcción génica de la invención o de un vector de la invención, las técnicas utilizadas para introducir dichos componentes a una célula (célula de la invención) han sido descritas anteriormente en el apartado de construcciones génicas de la invención. En una realización particular, las células de la invención presentan en su membrana los componentes del conjugado de la invención de manera que sean accesibles a las células dendríticas.

10 Por "condiciones adecuadas para que tenga lugar la maduración", se entienden todas aquellas condiciones del cultivo (oxígeno, temperatura, humedad, nutrientes etc) que permiten que las células dendríticas, tras haber estado en contacto con un conjugado de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención, una célula de la invención, una composición de la invención o una composición farmacéutica de la invención, de manera que al menos un antígeno derivado de HPV E7 haya sido presentado, se activen. Esta activación ocurre cuando las células dendríticas inmaduras han fagocitado alguno de los antígenos presentados y han degradado dichos antígenos en pequeñas piezas presentando dichas piezas en su superficie usando moléculas de sistema de histocompatibilidad (MCH). De manera simultánea, las células dendríticas maduras regulan al alza receptores de membrana que actúan como co-receptores en la activación de las células T, tales como CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), y CD40, de manera que se aumente así su capacidad de activar a dichas células T. Las células dendríticas maduras, también regulan al alza la expresión de CCR7, un receptor que induce que las células dendríticas viajen por todo el torrente sanguíneo hasta el bazo y de allí pasen al sistema linfático. Las células dendríticas maduras son capaces de activar células ayudantes T, células T killer y linfocitos B presentado los antígenos que han procesado.

15 Así, por célula dendrítica madura que presente al menos un antígeno de HPV E7 se entiende aquella célula dendrítica que, tras capturar un antígeno de HPV E7, es capaz de presentar dicho antígeno en la superficie de sus membranas unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tras haberlo procesado. Adicionalmente, las células dendríticas maduras pueden presentar expresados al alza los receptores de membrana arriba indicados.

20 En otro paso, las células son mantenidas bajo condiciones adecuadas para la internalización, procesamiento y presentación de uno o más péptidos de derivados del conjugado de la invención. Las condiciones apropiadas para la internalización, procesamiento y presentación de el al menos un péptido antigénico derivado del conjugado de la invención puede ser determinado usando ensayos estándar para determinar la activación de las células dendríticas.

30 La maduración de las DC se puede seguir usando un número de marcadores moleculares y de alteraciones fenotípicas de la superficie celular. Estos cambios pueden ser analizados por ejemplo usando técnicas de citometría de flujo. De manera típica, los marcadores de maduración se marcan usando anticuerpos específicos y las DCs que expresan un marcador o un grupo de marcadores puede ser separado del total de DCs usando por ejemplo sorteo celular FACS. Los marcadores de la maduración de DCs incluyen genes que aparecen expresados a altos niveles en células DCs maduras comparadas con células DCs inmaduras. Estos marcadores incluyen, MHC clase II de la superficie celular (en particular HLA-DR), moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86, CD83, moléculas de tráfico celular como la CD45, CD11c y CD18, etc. Además, la maduración de la DCs puede ser determinada midiendo la expresión de ciertos ligandos Notch como el ligando Delta-like (DLL4), Jagged1 y Jagged2 que están asociados con la inducción de la respuesta de Th1. Por otro lado, las células dendríticas maduras pueden ser identificadas usando su habilidad para estimular la proliferación de células T alogénicas en una reacción de leucocitos mista (MLR). Además, se ha visto que, en general, mientras que las DC inmaduras son muy eficientes en la internalización de antígenos pero presentan una baja presentación de antígenos, las células DC maduras presentan una baja internalización de antígenos pero son muy eficientes presentando antígenos.

35 La función presentadora de las células dendríticas puede ser medida usando ensayos de activación de células T con MHC-limitada, antígeno dependientes así como otros ensayos bien conocidos por los expertos en la materia como la capacidad de estimulación in vitro en linfocitos de sangre periférica, por ejemplo, determinando la cantidad de IFN- $\gamma$  producido por linfocitos CD8+ en la presencia de DCs. Esta determinación puede ser llevada a cabo usando la técnica llamada ELISPOT. La activación de células T puede ser adicionalmente determinada midiendo por ejemplo la inducción de producción de citocinas por las células dendríticas estimuladas. La estimulación de la producción de citocinas puede ser determinada usando una gran variedad de técnicas estándar, como ELISA, que son bien conocidas por un experto en la materia.

45 Otros ensayos de citotoxicidad como la unión de células diana con timidina tritiada (3H-TdR) pueden ser usadas. 3H-TdR es incorporada en el núcleo de las células. La liberación de  $^3\text{H}$ -TdR es una medida de la muerte celular por fragmentación del ADN.

50 En un segundo paso del método de la invención se procede a recuperar las células dendríticas maduras obtenidas en el paso (a).

Para la recuperación de las células maduras obtenidas en el paso a) del método de la invención, se pueden usar diferentes estrategias. Por ejemplo, se puede hacer uso de los marcadores de membrana que las células maduras

expresan y que han sido descritos anteriormente, como por ejemplo el CD80.

La expresión de marcadores de superficie celular puede determinarse, por ejemplo, por medio de citometría de flujo usando métodos y aparatos convencionales. Por ejemplo, se puede utilizar el sistema de FACS (separador de células activado por fluorescencia) Calibur de Becton Dickinson usado anticuerpos disponibles comercialmente y protocolos habituales conocidos en la técnica. Así, se pueden seleccionar las células que presenten una señal para un marcador de superficie celular específico en la citometría de flujo por encima de la señal de fondo. La señal de fondo se define como la intensidad de señal dada por un anticuerpo no específico del mismo isotipo que el anticuerpo específico usado para detectar cada marcador de superficie en el análisis de FACS convencional. Para que un marcador se considere positivo, la señal específica observada tiene que ser más intensa del 20%, preferiblemente, el 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 500%, 1000%, 5000%, 10000% o superior, que la intensidad de señal de fondo usando métodos y aparatos convencionales (por ejemplo, un sistema de FACS Calibur de Becton Dickinson usado con anticuerpos disponibles comercialmente y protocolos habituales conocidos en la técnica).

Las células dendríticas obtenidas mediante el método de acuerdo a la invención han demostrado ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades que respondan a la generación de una respuesta inmune frente a antígenos de E7. Usando dicho método se obtienen células maduras y que presentan al menos un antígeno proveniente del conjugando de la invención. Así en otro aspecto, la invención se relaciona con células dendríticas presentadoras de antígeno y que presentan al menos un antígeno proveniente del conjugando de la invención y que son positivas para CD40 obtenidas por medio del método de la invención o células dendríticas de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con células dendríticas de la invención, para su uso en medicina. Dichas células dendríticas de la invención pueden ser usadas para provocar una respuesta inmune en un paciente usando éstas como una vacunación de DC, es decir por medio de la administración a dicho paciente de dichas células. Así en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula dendrítica de la invención para la generación de una respuesta inmune en un paciente. En otras palabras, la invención se relaciona con un método para provocar una reacción inmune en un sujeto que comprende la administración a un sujeto de la célula presentadora de antígeno.

La vacunación con DC se lleva a cabo administrando la DC presentadora de antígeno a un sujeto (ejemplo un paciente humano) en donde se induce una respuesta inmune. Típicamente, la respuesta inmune incluye una respuesta CTL contra células dianas que están marcadas con los péptidos antigénicos (por ejemplo los componentes del conjugado de la invención). Estas células diana son típicamente células cancerígenas. Cuando las DCs modificadas son para ser administradas a un paciente, estas células son preferiblemente aisladas de células precursoras del mismo paciente (es decir, que células DCs son administradas a un paciente autólogo). Sin embargo, las células pueden ser administradas a pacientes alogénicos que son compatibles respecto al HLA o a pacientes alogénicos donde no hay coincidencia. En este último caso deben ser administradas drogas inmunosupresoras al paciente que reciba las células.

Las células pueden ser administradas en cualquier forma adecuada, preferentemente con un transportador (por ejemplo solución salina). Normalmente, la administración será intravenosa, pero administraciones intra-articulares, intramusculares, intradermales, intraperitoneales o subcutáneas son también aceptables. La administración o inmunización puede ser repetida a diferentes intervalos de tiempo.

La inyección de DC puede ser combinada con la administración de citocinas que actúan de manera que se mantenga el número de DCs y su actividad como GM-CSF, IL-12.

La dosis administrada a un paciente debe ser eficiente para inducir una respuesta inmune que pueda ser detectada usando ensayos que midan la proliferación de las células T, la citotoxicidad de linfocitos T y/o el efecto terapéutico beneficioso de respuesta de los pacientes a lo largo del tiempo. Típicamente  $10^6$  a  $10^9$  células DCs son inyectadas siempre que se dispone de éstas. Las vacunas pueden ser administradas una o más veces a un paciente para conseguir resultados beneficiosos. El tiempo entre la primera y la o las dosis sucesivas de la vacuna dependen de una variedad de factores, que incluyen la salud del paciente, la edad, el peso, etc. La vacuna puede ser administrada a cualquier intervalo de tiempo apropiado, por ejemplo incluyendo pero sin estar limitado a, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes. En una realización particular, la vacuna puede ser administrada de manera indefinida. En otra realización particular, la vacuna es administrada tres veces en intervalos de dos semanas. Las dosis de la vacuna también dependen de una variedad de factores, que incluyen pero no se limitan a la salud del paciente, estabilidad, la edad, el peso, etc. Una vez que se ha conseguido un nivel de inmunidad suficiente que lleve consigo un beneficio clínico, dosis de refuerzo pueden ser utilizadas, que son generalmente administradas con una frecuencia menor (por ejemplo mensuales o semi-anales).

Las DCs usadas en el método para provocar una respuesta inmune, son preferentemente formuladas de manera que puedan ser usadas como un fármaco "off-the-shelf" o listo para su uso en caso de que exista histocompatibilidad entre las células de la preparación y las del paciente tratado. La falta de compatibilidad entre el sujeto objeto de la terapia y las células dendríticas puede resultar en una disminución del efecto de la vacuna, bien porque se produce una eliminación prematura de las células (especialmente tras múltiples administraciones) o bien por la generación de una fuerte respuesta anti-alotípica que distraiga el sistema inmune de la diana prevista. En este contexto, es

ventajoso el uso de vacunas en donde al menos algunos de los alelos de HLA Clase I en la células dendríticas de la invención (especialmente en el locus A y más particularmente en el alelo A2) sean compartidos con el paciente. De esta manera al menos algunos de los antígenos tumorales serán presentados en moléculas de clase I autólogas, con lo que la respuesta antitumoral se verá aumentada y la respuesta anti-alotípica disminuida.

5 Una coincidencia parcial puede ser obtenida usando una vacuna con DCs hecha con células que posean dos o más de los alotipos HLA-A más comunes (HLA-A2, A1, A19, A3, A9, and A24). Una coincidencia total para la mayoría de los pacientes puede ser conseguida proporcionando al médico una batería de DCs diferentes de donde se puede seleccionar diferentes posibilidades que posean solo un alotipo en el locus HLA-A. El tratamiento llevará consigo la identificación de uno o más alotipo(s) HLA en el paciente usando métodos estándar de "tissue-taping", y el  
10 tratamiento de los pacientes con las DCs que tengan el o los alotipos HLA que coincidan con los del paciente. Por ejemplo un paciente que sea HLA-A2 y HLA-A19 puede ser tratado o con células homocigóticas para HLA-A2 o para HLA-A19 o con una mezcla de ambas.

Efectos negativos potenciales de la falta de coincidencia de HLA puede también ser tratado generando inmunotolerancia contra los alotipos extraños. Durante la preparación de la vacuna las células DCs se dividen en  
15 dos grupos: una para generar células inmaduras toleragénicas y otras para general DCs maduras para la presentación del antígeno. Las células toleragénicas están diseñadas de manera que generen una aceptación de las células maduras. Las células toleragénicas van a ser administradas una o más veces al paciente de manera que se genere un grado suficiente de ausencia de respuesta inmune (medida por ejemplo en una reacción de linfocitos mixta). Una vez que el paciente es tolerante (tras una semana o un mes) se administra al sujeto las células maduras  
20 presentadoras de antígeno en la cantidad y en la frecuencia que sea necesaria para una respuesta inmune contra el antígeno diana tumoral.

En una realización particular, las células dendríticas presentadoras de antígeno de la invención son autólogas al sujeto a ser tratado. La composición de la vacuna puede incluir un adyuvante. El adyuvante puede ser cualquier adyuvante disponible o una combinación de estos. Ejemplos de adyuvantes se han citado en el apartado de usos  
25 médicos de los conjugados y composiciones de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de células dendríticas de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV. Alternativamente, la invención se refiere a células dendríticas de la invención para su uso en la prevención y el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV. Por último, la invención se relaciona con un método de  
30 tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de células dendríticas de acuerdo a la invención.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que deben ser considerados como  
35 meramente ilustrativos.

## Ejemplos

### Materiales y procedimientos

#### Ratones y líneas celulares

Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 5 semanas de edad exentos de patógenos específicos en Harlan Laboratories (Barcelona, España) y se mantuvieron en las instalaciones para animales del CIMA en condiciones exentas de patógenos con agua y alimento a voluntad. Se realizaron los experimentos que implican animales según  
40 las directrices internacionales para cuidado animal.

Se usaron células THP1 (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA) para ensayos *in vitro* de activación monocítica por proteínas de fusión derivadas de EDA. Las TC-1, células tumorales que expresan proteínas HPV16-E6 y HPV16-E7 derivadas de células epiteliales pulmonares primarias de ratón, se obtuvieron en la American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, Francia). Se mantuvieron las células en RPMI 1640 con GlutaMAX suplementado con suero fetal de ternera termoinactivado al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, estreptomycin 100 µg/ml, geneticina 0,4 mg/ml y 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  mol/l (Life Technologies, Cergy-Pontoise, Francia). Se inyectaron  $5 \times 10^5$  células TC-1 en el lomo afectado (lado izquierdo) de ratones C57BL/6 en  
45 200 µl de PBS. Se midió el tamaño tumoral, presentado como la media de dos diámetros perpendiculares (milímetros) a intervalos regulares. Las células tumorales EL-4 (timoma de ratón) se obtuvieron en la American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, Francia) y se utilizaron como células diana en ensayos de citotoxicidad (incubadas con o sin péptidos DTc) y como control tumoral negativo ya que no expresan ninguna proteína del HPV.  
50

#### Reactivos

Se adquirió el péptido sintético E7<sub>49-57</sub> [RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 67) código de una letra para aminoácidos]

correspondiente al epítipo restringido por H2-D<sup>b</sup> de HPV16-E7 en Proimmune (Oxford, R.U.). Se adquirió el ácido poliinosínico-policitidílico (PIC polil:C, pIC ó pl:C) en Invivogen (San Diego, CA) y se diluyó en PBS antes de la inyección. Se sintetizaron oligodesoxinucleótidos de CpG-fosforotiato de tipo B [CpG 1826: 5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3' (SEQ ID NO: 66)] por Proligo (París, Francia). Se diluyeron 30 µg de oligodesoxinucleótidos CpG en 50 µl de medio Optimen (Gibco, Grand Island, NY, EE.UU.) y se mezclaron con 60 µg de DOTAP (Roche, Mannheim, Alemania) diluidos en 100 µl de Optimen. Se diluyó la ciclofosfamida (CPA) (Sigma, Steinheim, Alemania) en PBS antes de la inyección y se administró 24 horas antes de la vacunación. Se inyectaron simultáneamente las diversas formulaciones antigénicas y coadyuvantes. Se efectuó la administración intravenosa mediante inyección retroorbital en un volumen de 200 µl.

#### 10 Preparación de la proteína de fusión EDA-HPVE7 recombinante

Se preparó el plásmido pET20b-EDA, que expresa el dominio extra A de fibronectina como se describe anteriormente (Lasarte, Casares y col., 2007) y se usó para la construcción del plásmido de expresión pET20b-EDA-HPVE7 para expresar una proteína de fusión que contenía los primeros 1-29 aminoácidos de la proteína HPV-E7 ligados al extremo N de la proteína EDA y los aminoácidos 43-98 de HPV-E7 con el extremo C de EDA. Se construyó este plásmido de expresión en dos etapas como se describe a continuación. Se aisló ARN de células TC-1 a partir de  $1 \times 10^7$  células según los procedimientos de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987) usando Ultraspec (Biotecx, Houston, TX, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se transcribió de forma inversa el ARN total y se amplificó el gen que codifica la proteína HPV-E7 mediante PCR como se describe anteriormente (Lasarte, Casares y col., 2007) usando el cebador cadena arriba UP-1 CATATGCATGGAGATACACCTAC [SEQ ID NO: 68] (que contiene el sitio de restricción NdeI, subrayado) y el cebador cadena abajo DW-1 GCGGCCGCTGGTTTCTGAGAACAGAT [SEQ ID NO: 69] (que contiene el sitio de restricción NotI). Se clonaron los productos de PCR resultantes en pCR2.1-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), conduciendo al plásmido pCR2.1-TOPO-HPV-E7. Para la primera etapa de la construcción del plásmido de expresión pET20b-EDA-HPVE7, la reacción PCR usó los cebadores UP-1 (SEQ ID NO: 68) y DW-2 (CATATGATTTAATTGCTCATAACA, SEQ ID NO: 70) y el plásmido pCR2.1-TOPO-HPV-E7 como molde. Se subclonó el fragmento resultante en pCR2.1-TOPO, conduciendo al plásmido pCR2.1-TOPO-(1-29)E7. Se digirió este plásmido con la enzima de restricción NdeI y se subclonó el fragmento resultante en el plásmido pET20b-EDA digerido con NdeI, conduciendo al plásmido pET20b-EDA-(1-29)E7. En una segunda etapa, se llevó a cabo una reacción PCR que usaba los plásmidos UP-2 (GCGGCCGAGGACAAGCAGAACCGGA, SEQ ID NO: 71) y DW-1 (SEQ ID NO: 69) y el plásmido pCR2.1-TOPO-HPV-E7 como molde. Se subclonó el producto de PCR resultante en pCR2.1-TOPO, conduciendo al plásmido pCR2.1-TOPO-(43-98)E7, que se digirió con NotI para purificar el fragmento que codifica esta parte de la proteína E7. Se subclonó este producto en el plásmido pET20b-EDA-(1-29)E7 anteriormente digerido con NotI. Después de este proceso, se obtuvo el plásmido pET20b-EDA-HPVE7, que se secuenció para confirmar la correcta expresión de la proteína de fusión (1-29)E7-EDA-(43-98)E7 que porta 6 residuos de histidina (marcajes 6xHis) en el extremo carboxilo. Se transfectó este plásmido en células BL21(DE3) para la expresión de la proteína recombinante, que se purificó a partir de la fracción soluble de extractos celulares mediante cromatografía de afinidad (HisTrap, Pharmacia) usando una plataforma FPLC (AKTA, Pharmacia). Se desaló la proteína eluida usando columnas de desalado Hitrap (Pharmacia) y se concentró usando un dispositivo de filtrado centrífugo Amicon Ultra 4-5000 MWCO (Millipore Carrighwahill, Irlanda). Se purificó la proteína recombinante de endotoxinas usando columnas Endotrap (Profos Ag, Regensburg, Alemania) hasta que los niveles de endotoxina estuvieron por debajo de 0,2 UE/µg, ensayado mediante el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* cromogénico cuantitativo (Cambrex, Walkersville, MD, EE.UU.). Se separó la proteína recombinante purificada mediante SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie usando el reactivo Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, Hercules, CA) según las instrucciones del fabricante (Figura 1).

#### 45 Caracterización de proteína mediante transferencia Western y espectrometría de masas

Análisis de transferencia Western: Se cargaron proteínas purificadas en geles de PAGE-SDS al 10% mediante transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa. Se detectaron las proteínas marcadas con histidina usando anticuerpos anti-His (Qiagen) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Pharmacia). Se detectaron bandas de proteína mediante quimioluminiscencia potenciada (Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Alemania). Se obtuvieron las huellas peptídicas (PMF) a partir de digestiones tríplicas usando un espectrómetro de masas GL-REF MALDI-TOF de Waters. Brevemente, se mezclaron 1,2 µl de la digestión tríplica con un volumen igual de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico en 0,1% de TFA en 50% de acetonitrilo y se sembró sobre una placa diana de MALDI-TOF. Se efectuó el procesamiento de datos con Masslynx 4.0 (Waters) usando ACTH como patrón de referencia interno de masas.

Se efectuó una CL en fase inversa microcapilar con un sistema capilar CapLC (Waters). Se efectuó la separación en fase inversa de digestiones tríplicas con una columna capilar de sílice de pirólisis Atlantis, C18, 3 µm, 75 µm x 10 cm Nano Ease (Waters) equilibrada con 5% de acetonitrilo y 0,2% de ácido fórmico. Después de la inyección de 6 µl de muestra, se lavó la columna durante 5 min con el mismo tampón y se eluyeron los péptidos usando un gradiente lineal de 5-50% de acetonitrilo en 30 min a un caudal constante de 0,2 µl/min. Se acopló la columna en línea con un Q-TOF Micro (Waters) usando una fuente de ionización por nanopulverización PicoTip (Waters). La temperatura capilar calentada era de 80°C y el voltaje de pulverización era de 1,8-2,2 kV. Se recogieron los datos de EM/EM en un modo automatizado dependiente de los datos. Se fragmentaron secuencialmente los tres iones más intensos en

cada barrido de análisis mediante disociación inducida por colisión (CID) usando una amplitud de aislamiento de 2,5 y una energía de colisión relativa de 35%. Se efectuó el procesamiento de datos con Masslynx 4.0. Las identificaciones de proteína basadas en PMF se aceptaron sólo cuando la puntuación Masslynx era al menos 7 y los péptidos coincidentes representan al menos un 30% de la secuencia proteica propuesta. Las identificaciones de proteína a partir de datos de EM/EM se consideraron sólo para valores de puntuación por encima de 7 y cuando estaban basados en la secuencia de al menos 3 péptidos independientes.

Análisis *in vitro* de la activación monocítica. THP-1

Se sembraron células THP-1 a  $1 \times 10^6$  células/pocillo y se cultivaron durante una noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio completo para la estabilización del cultivo. Se añadieron a los cultivos diferentes concentraciones de los antígenos indicados y, después de 15 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo. Se cuantificó la concentración de TNF- $\alpha$  humano liberado al medio por la línea celular THP-1 usando un ensayo ELISA comercial (BD-Pharmingen), según las instrucciones del fabricante.

Análisis *in vitro* de la maduración de CD

Se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (BM) a partir de cultivos de células de médula de fémur de ratón. Después de lisar eritrocitos con tampón de lisis ACK, se lavaron las células de médula ósea y se eliminaron posteriormente linfocitos y granulocitos mediante incubación con una mezcla de anticuerpos contra CD4 (GK1, ATCC, Manassas, VA), CD8 (53.6.72; ATCC), Ly-6G/Gr1 (BD-Pharmingen; San Diego, CA) y CD45R/B220 (BD-Pharmingen), seguido de complemento de conejo. Se cultivaron las células restantes a  $10^6$  células/ml en placas de 12 pocillos en CM (RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, estreptomicina 100  $\mu$ g/ml y 2-mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M) suplementado con mGM-CSG 20 ng/ml y mL-4 20 ng/ml (ambos de Peprotech; Londres, RU). Cada dos días, se reemplazaron dos tercios del medio por medio reciente que contenía citoquinas. Se recogieron células dendríticas no adherentes el día 7 y se cultivaron en presencia o ausencia de diferentes estímulos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 h de cultivo, se recogieron los sobrenadantes y se midieron IL-12 (p70) y TNF- $\alpha$  mediante ELISA (BD-Pharmingen) según las instrucciones del fabricante. Se midió la expresión de la maduración de los marcadores de maduración de CD mediante citometría de flujo. Se preincubaron las células con un mAAb de rata anti-CD16/32 (clon 2.4G2, BD Pharmingen) durante 15 min, para bloquear la unión no específica de anticuerpos primarios. Después de esta incubación inicial, se tiñeron las células con los anticuerpos primarios a 4°C durante 15 min, se lavaron y se adquirieron en un citómetro FACScan (BD Biosciences, San Diego, CA) y se analizaron usando software Cell Quest (BD Biosciences). Los anticuerpos usados fueron: anti-IA $\beta$ b (clon 25-9-17), anti-H-2Kb (clon AF6-88.5), anti-CD40 (clon 3/23), anti-CD54 (clon 3E2), anti-CD80 (clon 16-10A1), anti-CD86 (clon GL1), anti-CD11c (clon HL-3), todos de BD Pharmingen.

Análisis estadístico

Se usó software Monolix (<http://www.monolix.org/>) para el análisis de los datos de crecimiento tumoral con modelos de efecto mixto no lineales. Se ajustaron los diámetros medios de tumores con el tiempo usando el modelo descrito en la ecuación 1.1 y se compararon los tratamientos usando la prueba de relación de probabilidad.

$$y_{ij} = y_0 + k_c \cdot t_{ij} - k_a \cdot e^{-k_e \cdot t_{ij}}$$

en la que  $y_{ij}$  es el diámetro tumoral en el ratón  $i$  en el momento  $t_{ij}$ ,  $y_0$ ,  $k_c$ ,  $k_a$  y  $k_e$  son los coeficientes del modelo que expresan, respectivamente, el diámetro tumoral inicial, la velocidad de crecimiento tumoral, la actividad destructiva intrínseca de las células efectoras y la velocidad de eliminación de las células efectoras.

Se usaron gráficas de Kaplan-Meier para analizar la supervivencia. Se usó software Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, EE.UU.) para determinar la significación de las diferencias en las curvas de supervivencia con una prueba del orden logarítmico. Se analizaron los resultados del análisis de destrucción *in vivo* mediante ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Se consideró que los valores de  $p$  menores de 0,05 eran estadísticamente significativos.

## Ejemplo 1

La proteína de fusión EDA-HPVE7 es capaz de inducir la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea *in vitro*

El documento WO06134190 describe que la proteína recombinante que comprende el dominio extra A de fibronectina (EDA), un ligando endógeno para el receptor similar a Toll 4 (TLR4), es capaz de unirse a y activar la ruta de señalización de TLR4, según se ha descrito. La EDA estimulaba también la producción por CD de citoquinas proinflamatorias tales como IL-12 o TNF- $\alpha$ , e inducía su maduración *in vitro* e *in vivo*. Por tanto, se ensayó si la proteína recombinante EDA-HPV-E7 era también capaz de inducir la maduración de BMDC *in vitro*. Se encontró que la incubación de BMDC con EDA-HPV-E7 500 nM era capaz de regular positivamente la expresión de los marcadores de maduración de moléculas IAB, CD54 y, en menor medida, CD86 (Figura 2). Además, la EDA-HPV-E7 era capaz de estimular fuertemente la producción de citoquina IL-12 por BMDC (Figura 3A). De forma similar, la

proteína de fusión recombinante EDA-HPVE7 era capaz de inducir la producción de citoquina TNF- $\alpha$  por la línea celular de monocitos humanos THP-1 (Figura 3B), que expresa también la molécula TLR4. Estos resultados indican que la proteína de fusión entre EDA y la proteína HPVE7 mantiene las propiedades proinflamatorias de EDA.

### Ejemplo 2

5 La proteína de fusión EDA-HPVE7 induce CTL específicos de HPVE7 *in vivo* en ausencia de coadyuvantes

Se ensayó si los ratones inmunizados con la proteína de fusión EDA-HPVE7 desarrollaban respuestas de linfocitos T específicas de HPVE7. Se comparó la capacidad de la proteína de fusión frente al péptido sintético E7(49-57) que comprende el determinante de linfocito T citotóxico reconocido por ratones C57BL6. Se inmunizaron ratones por vía i.v. con 2 nmol de EDA-HPVE7 o con péptido DTc/E7(49-57) en PBS. Siete días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se cultivaron las células de bazo en presencia o ausencia de péptido DTc durante 5 días. Se midió la actividad de CTL usando un ensayo de liberación de cromo convencional usando células EL4 radiomarcadas y pulsadas con el péptido DTc o sin péptido como células diana (Figura 4A) (en la gráfica se muestra el valor absoluto, calculado al descontar al valor de lisis en presencia de péptido, el valor obtenido en ausencia de péptido). Se muestra que los ratones inmunizados con proteína EDA-HPVE7 tenían niveles mayores de actividad de CTL frente a células diana sometidas a pulsos con el epítipo de linfocito T citotóxico E7. Se midió también mediante ELISPOT el número de células productoras de IFN- $\gamma$  cultivadas en presencia o ausencia del péptido E7(49-57) o en respuesta a células tumorales TC1 irradiadas (que expresan proteína HPVE7) ó a células tumorales EL-4 (control negativo) en esplenocitos de ratones inmunizados con EDA-HPVE7 o con péptido E7(49-57) (Figura 4B). Se encontró que aquellos ratones inmunizados con EDA-HPVE7 tenían un número mayor de puntos productores de IFN- $\gamma$  específicos para E7(49-57) o células TC1, confirmando la mayor inmunogenicidad de esta proteína en comparación con el determinante de linfocito T citotóxico solo.

### Ejemplo 3

La proteína de fusión EDA-HPVE7 induce CTL específicos de HPVE7 *in vivo* en presencia de coadyuvantes

Se ensayó si los ratones inmunizados con la proteína de fusión EDA-HPVE7 mejoraban las respuestas de linfocitos T específicas de HPVE7 en presencia del ligando de TLR3 poliI:C (pl:C). Se inmunizaron ratones por vía i.v. con 2 nmol de EDA-HPVE7 o péptido DTc/E7(49-57) en presencia de pl:C (50  $\mu$ g/ratón). Siete días después de la inmunización, se sacrificaron los ratones y se cultivaron las células de bazo en presencia de péptido DTc/E7(49-57). Tras cinco días de cultivo se midió la actividad de CTL usando un ensayo de liberación de cromo convencional usando células EL4 radiomarcadas y pulsadas con el péptido DTc o sin péptido como células diana (Figura 5A) o células irradiadas TC-1 (Figura 5B) (en las gráficas se muestra el valor absoluto, calculado al descontar al valor de lisis en presencia de péptido, el valor obtenido en ausencia de péptido. De forma paralela, los esplenocitos de los ratones inmunizados con EDA-HPVE7 o péptido DTc/E7(49-57) fueron incubados durante 24 horas en presencia o ausencia del péptido E7(49-57) o de células TC1 o EL-4 irradiadas, para medir la producción de IFN- $\gamma$  por ELISPOT (Figura 5C).

### Ejemplo 4

Eficacia terapéutica de la proteína de fusión EDA-HPVE7 combinada con poli I:C y ciclofosfamida.

Para evaluar mejor la potencia de EDA-HPVE7 como sistema de suministro de antígeno y como vacuna, se comparó la eficacia terapéutica de esta proteína de fusión con la del péptido E7(49-57), ambos suplementados con el ligando de TLR pl:C. Así, se inyectaron  $5 \times 10^5$  células TC-1 a ratones C57BL/6 por vía s.c. y se trataron terapéuticamente 25 días después, cuando los diámetros tumorales medios eran de aproximadamente 8 mm. Por tanto, se trataron los ratones por vía i.v. con las siguientes combinaciones de vacunas de EDA: (i) 2 nmol de EDA-HPVE7 más 50  $\mu$ g de pl:C; (ii) 2 nmol de péptido E7(49-57) más 50  $\mu$ g de pl:C; (iii) 2 nmol de péptido E7(49-57) más 2 nmol de EDA más 50  $\mu$ g de pl:C; (iv) 2 nmol de EDA más 50  $\mu$ g de pl:C; (v) 50  $\mu$ g de pl:C solo; (vi) 2 nmol de EDA-HPVE7 sola o (vii) con PBS.

En los ratones inyectados con PBS (grupo de control), los tumores crecieron progresivamente y los ratones tuvieron que sacrificarse entre los días 30 y 40 (Figura 6A). La mayoría de los tumores tratados con coadyuvantes sin antígeno, concretamente ratones tratados con pl:C y EDA+pl:C, seguían la misma cinética de crecimiento tumoral, aunque en algunos ratones se observó un retardo del crecimiento tumoral. Este retardo condujo a una ligera prolongación de la supervivencia que no alcanzó significación estadística (Figura 6B). La adición de péptido E7 (E7(49-57)) al cóctel de inmunización mejoró ligeramente la detención del crecimiento tumoral inducida por los coadyuvantes (Figura 6A). Algunos tumores mostraron una remisión del tamaño tumoral durante varios días, e incluso en un ratón, el tumor desapareció completamente, sin embargo, los tumores siguieron creciendo y los ratones se sacrificaron finalmente. La proteína de fusión EDA-HPVE7 sola era incapaz de erradicar los tumores, aunque se observó un retardo en el crecimiento tumoral. Sin embargo, la combinación de EDA-HPVE7 con pl:C, un coadyuvante suave que se une a TLR3, era capaz de conseguir la erradicación de estos tumores establecidos grandes en un 60% de los ratones (Figura 6A). Tanto el crecimiento tumoral (Fig 6A) como la supervivencia (Fig 6B) diferían significativamente de los ratones tratados con pl:C ( $p=0.0004$  determinado con la prueba de la razón de verosimilitudes (*likelihood ratio test*) entre los ratones tratados con E7(49-57) + pl:C vs. EDA-HPVE7 + pl:C (Figura

6A), y  $p < 0.05$  determinado por el test del rango logarítmico (*log-rank test*) para la comparación de las curvas de supervivencia) (Figura 6B)). Por tanto, es necesaria la unión covalente de antígeno y EDA y la coadministración de coadyuvante para erradicar tumores grandes en ratones.

5 Se ensayó también la eficacia terapéutica de la vacunación basada en EDA-HPV en una situación más difícil. Así, se inyectaron  $5 \times 10^5$  células TC-1 a ratones C57BL/6 por vía s.c. y se trataron terapéuticamente 35 días después, cuando los diámetros tumorales medios eran de aproximadamente 12-15 mm. En este modelo, se combinó EDA-HPVE7 con el tratamiento de los ratones con una dosis baja del agente quimioterapéutico ciclofosfamida (CPA, 175 mg/kg). Veinticuatro horas después, se inmunizaron los ratones con EDA-HPVE7 (2 nmol/ratón) y CpG-B/DOTAP (30  $\mu$ g/ratón). Se usaron como controles ratones inmunizados con PBS solo o con los coadyuvantes y tratamiento con CPA sola (figura 7B). Todos los animales recibieron una segunda dosis de su correspondiente tratamiento al día 10 50 del estudio como se indica en el esquema de la figura 7A.

15 Se encontró que el tratamiento de ratones con dos inmunizaciones de la combinación de EDA-HPVE7 más CpG/DOTAP y CPA era capaz de rechazar estos tumores muy grandes en un 50% de los ratones, mientras que sólo un 12% de los ratones se curaban después del tratamiento con los coadyuvantes y la administración de CPA ( $p = 0.0064$ , determinada con la prueba de la razón de verosimilitudes (*likelihood ratio test*) entre los ratones tratados con CPA+CpG/DOTAP vs. CPA+CpG/DOTAP+EDA-HPVE7 (Figura 7A), y  $p < 0.05$  determinado por el test del rango logarítmico (*log-rank test*) para la comparación de las curvas de supervivencia) (Figura 7C).

20 En resumen, se ha probado que la proteína de fusión recombinante EDA-HPV7 es capaz de inducir la maduración de células dendríticas, inducir la activación de la respuesta inmune antitumoral *in vivo* y es capaz de erradicar tumores grandes y bien establecidos que expresan la proteína HPVE7. Estos datos sugieren que la proteína EDA-HPVE7 puede ser considerada para el desarrollo de una terapia alternativa contra carcinoma de cuello del útero humano.

# ES 2 655 687 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.  
<120> COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR HPV  
<130> P4869PC00  
<150> P200901847  
<151> 2009 09 11  
<160> 72  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 91  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 1

Asn Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp  
1 5 10 15

Ser Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr  
20 25 30

Arg Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro  
35 40 45

Ala Pro Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro  
50 55 60

Gly Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu  
65 70 75 80

Ser Gln Pro Leu Ile Gly Thr Gln Ser Thr Ala  
85 90

<210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 2

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

## ES 2 655 687 T3

<210> 3  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV  
  
<400> 3  
  
Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr  
1 5 10 15

<210> 4  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV  
  
<400> 4  
  
Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val  
1 5 10 15

<210> 5  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV  
  
<400> 5  
  
Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile  
1 5 10 15

<210> 6  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV  
  
<400> 6  
  
Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser  
1 5 10 15

<210> 7  
<211> 15  
<212> PRT

## ES 2 655 687 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 7

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

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 8

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

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 9

Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val  
1                   5                   10                   15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 10

Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp  
1                   5                   10                   15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

# ES 2 655 687 T3

<400> 11

Gln Asp Tyr Val Leu Asp Leu Gln Pro Glu Ala Thr Asp Leu His  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 12

Asp Ile Arg Ile Leu Gln Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 13

Ile Arg Ile Leu Gln Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile Val  
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 14

Glu Leu Leu Met Gly Ser Phe Gly Ile Val Cys Pro Asn Cys Ser  
1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 15

Lys Glu Tyr Val Leu Asp Leu Tyr Pro Glu Pro Thr Asp Leu Tyr

## ES 2 655 687 T3

1                    5                    10                    15

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 16

Leu Arg Thr Ile Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val  
 1                    5                    10                    15

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 17

Ile Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val Cys Pro Thr  
 1                    5                    10                    15

<210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 18

Gln Leu Leu Met Gly Thr Val Asn Ile Val Cys Pro Thr Cys Ala  
 1                    5                    10                    15

<210> 19  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 19

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

<210> 20

## ES 2 655 687 T3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 20

Leu Arg Thr Leu Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser Phe Val  
1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 21

Leu Gln Gln Leu Phe Leu Ser Thr Leu Ser Phe Val Cys Pro Trp  
1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 22

Asp Leu Arg Val Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val  
1 5 10 15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 23

Leu Arg Val Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val Thr  
1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

# ES 2 655 687 T3

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 24

Val Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val Thr Cys Pro Leu  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 25

Gln Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val Thr Cys Pro Leu Cys  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 26

Gln Leu Leu Met Gly Ala Leu Thr Val Thr Cys Pro Leu Cys Ala  
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 27

Lys Asp Tyr Ile Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu His  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 28

# ES 2 655 687 T3

Leu Arg Thr Leu Gln Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Gln Val Val  
1 5 10 15

<210> 29  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 29

Leu Gln Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Gln Val Val Cys Pro Gly  
1 5 10 15

<210> 30  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 30

Gln Met Leu Leu Gly Thr Leu Glr. Val Val Cys Pro Gly Cys Ala  
1 5 10 15

<210> 31  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 31

Val Pro Thr Leu Gln Asp Val Val Leu Glu Leu Thr Pro Gln Thr  
1 5 10 15

<210> 32  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 32

Leu Gln Asp Val Val Leu Glu Leu Thr Pro Gln Thr Glu Ile Asp  
1 5 10 15

## ES 2 655 687 T3

<210> 33  
<211> 15  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 33

Gln Asp Val Val Leu Glu Leu Thr Pro Gln Thr Glu Ile Asp Leu  
1 5 10 15

<210> 34  
<211> 15  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 34

Cys Lys Phe Val Val Gln Leu Asp Ile Gln Ser Thr Lys Glu Asp  
1 5 10 15

<210> 35  
<211> 15  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 35

Val Val Gln Leu Asp Ile Gln Ser Thr Lys Glu Asp Leu Arg Val  
1 5 10 15

<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 36

Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu  
1 5

<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT

# ES 2 655 687 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 37

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr  
1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 38

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr  
1 5

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 39

Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile  
1 5 10

<210> 40

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 40

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

Lys Cys Asp

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

# ES 2 655 687 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 41

Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe  
1                   5                   10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 42

Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr  
1                   5                   10

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 43

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

Lys

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 44

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

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

# ES 2 655 687 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 15

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr  
1                   5                   10

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 46

Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr  
1                   5

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 47

Arg Glu Tyr Ile Leu Asp Leu His Pro Glu Pro Thr Asp Leu Phe  
1                   5                   10                   15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 48

Thr Cys Cys Tyr Thr Cys Gly Thr Thr Val Arg Leu Cys Ile Asn  
1                   5                   10                   15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

## ES 2 655 687 T3

<400> 49

Val Arg Thr Leu Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Cys Thr Ile Val  
 1                   5                   10                   15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de E7 HPV

<400> 50

Leu Gln Gln Leu Leu Met Gly Thr Cys Thr Ile Val Cys Pro Ser  
 1                   5                   10                   15

<210> 51

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido antigénico derivado de HPV E7 que contiene los aminoácidos 1 a 29 de E7

<400> 51

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

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

<210> 52

<211> 56

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido antigénico derivado de HPV E7 que contiene los aminoácidos 43 a 98 de E7

<400> 52

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

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

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val





# ES 2 655 687 T3

1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador/espaciador

<400> 58

Gly Thr Lys Val His Met Lys

1

5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador/espaciador

<400> 59

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser

1

5

10

<210> 60

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido enlazador/espaciador

<400> 60

Ala Pro Ala Glu Thr Lys Ala Glu Pro Met Thr

1

5

10

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia diana/sitio de corte de la enteroquinasa

<400> 61

Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

<210> 62

## ES 2 655 687 T3

<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia diana/sitio de corte de factor Xa

<400> 62

Ile Glu Asp Gly Arg  
1 5

<210> 63  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia diana/sitio de corte de la trombina

<400> 63

Leu Val Pro Arg Gly Ser  
1 5

<210> 64  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia diana/sitio de corte de la proteasa TEV

<400> 64

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly  
1 5

<210> 65  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia diana/sitio de corte de la proteasa PreScission

<400> 65

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro  
1 5

<210> 66  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

## ES 2 655 687 T3

<220>

<223> Motivo CpG-fosforotiato de tipo B

<400> 66

tccatçacgt tcctgacgtt

20

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético E7(49-57)

<400> 67

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1

5

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador UP-1

<400> 68

catatçcatg gagatacacc tac

23

<210> 69

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador DW-1

<400> 69

gcgçccgctg gtttctgaga acagat

26

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador DW-2

<400> 70

catatçattt aattgctcat aaca

24

# ES 2 655 687 T3

<210> 71  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador UP-2

<400> 71  
 ggggcccgcag gacaagcaga accgga  
 26

<210> 72  
 <211> 185  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Proteína de fusión sin cola de histidinas

<400> 72

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

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

Ile Asp Arg Pro Lys Gly Leu Ala Phe Thr Asp Val Asp Val Asp Ser  
 35 40 45

Ile Lys Ile Ala Trp Glu Ser Pro Gln Gly Gln Val Ser Arg Tyr Arg  
 50 55 60

Val Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile Arg Glu Leu Phe Pro Ala  
 65 70 75 80

Pro Asp Gly Glu Asp Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Leu Arg Pro Gly  
 85 90 95

Ser Glu Tyr Thr Val Ser Val Val Ala Leu His Asp Asp Met Glu Ser  
 100 105 110

Gln Pro Leu Ile Gly Ile Gln Ser Thr Ala Ala Ala Gly Gln Ala Glu  
 115 120 125

Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp  
 130 135 140

Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr

145 150 155 160

Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys  
 165 170 175

Ser Gln Lys Pro Ala Ala Ala Leu Glu  
 180 185

**REIVINDICACIONES**

1. Un conjugado que comprende:
  - i) la región EDA de fibronectina o una variante funcionalmente equivalente de la misma que muestra un grado de identidad con respecto a la región EDA de la fibronectina mayor de al menos 70% y
  - 5 ii) al menos un péptido antigénico derivado de HPV E7, en el que el al menos un péptido antigénico derivado de HPV E7 es un fragmento de la proteína HPV E7 que es capaz de estimular el sistema inmune de un mamífero de tal manera que se genere una respuesta inmune contra dicha proteína capaz de inhibir el crecimiento de tumores causados por la expresión de E7 o de inhibir la proliferación de HPV,
- 10 en el que los componentes (i) e (ii) están acoplados covalentemente y en el que el conjugado promueve una respuesta citotóxica hacia el péptido o péptidos antigénicos.
2. El conjugado según la reivindicación 1, en donde el componente (ii) comprende un péptido antigénico que contiene los aminoácidos 1 a 29 de SEQ ID NO: 51, un péptido antigénico que contiene los aminoácidos 43 a 98 de SEQ ID NO: 52 o ambos.
- 15 3. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el componente (ii) forma una única cadena polipeptídica con el componente (i).
4. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región EDA se encuentra flanqueada por dos péptidos antigénicos de HPV E7.
5. El conjugado según la reivindicación 4, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 53 o la secuencia SEQ ID NO: 72.
- 20 6. Un polinucleótido o construcción génica que codifica un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. Una célula que contiene un polinucleótido o una construcción génica según la reivindicación 6.
8. Una composición que comprende, en conjunto o por separado:
  - (i) un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, o una célula hospedadora según la reivindicación 7 y
  - 25 (ii) un ligando de TLR
9. Una composición que comprende, en conjunto o por separado:
  - (i) un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, o una célula hospedadora según la reivindicación 7,
  - (ii) un ligando de TLR y
  - 30 (iii) un agente quimioterapéutico.
10. La composición según las reivindicaciones 8 ó 9 en donde el ligando TLR se selecciona del grupo que consiste en un ligando de TLR3, un ligando de TLR9 y una combinación de ambos.
11. La composición según la reivindicación 10 en donde el ligando de TLR3 es poli(I:C), en donde el ligando TLR9 es un oligonucleótido que comprende al menos un motivo CpG o en donde el agente quimioterapéutico (iii) es ciclofosfamida.
- 35 12. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, una célula según la reivindicación 7 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y al menos un adyuvante o vehículo farmacológicamente aceptable.
- 40 13. Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, una célula según la reivindicación 7 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su uso en medicina.
14. Uso de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, una célula según la reivindicación 7 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para la fabricación de una vacuna.
- 45 15. Un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, una célula según la reivindicación 7 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a

11, para uso en la prevención o el tratamiento de una infección causada por el virus del papiloma humano y/o del cáncer de cérvix asociado a infecciones por HPV.

16. Un método *in vitro* para obtener células dendríticas maduras que presenten al menos un antígeno de HPV E7, que comprende:

- 5
- i) poner en contacto células dendríticas con un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido o construcción génica según la reivindicación 6, una célula según la reivindicación 7 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en condiciones adecuadas para que tenga lugar la maduración de las células dendríticas y
  - ii) recuperar las células dendríticas maduras.

10

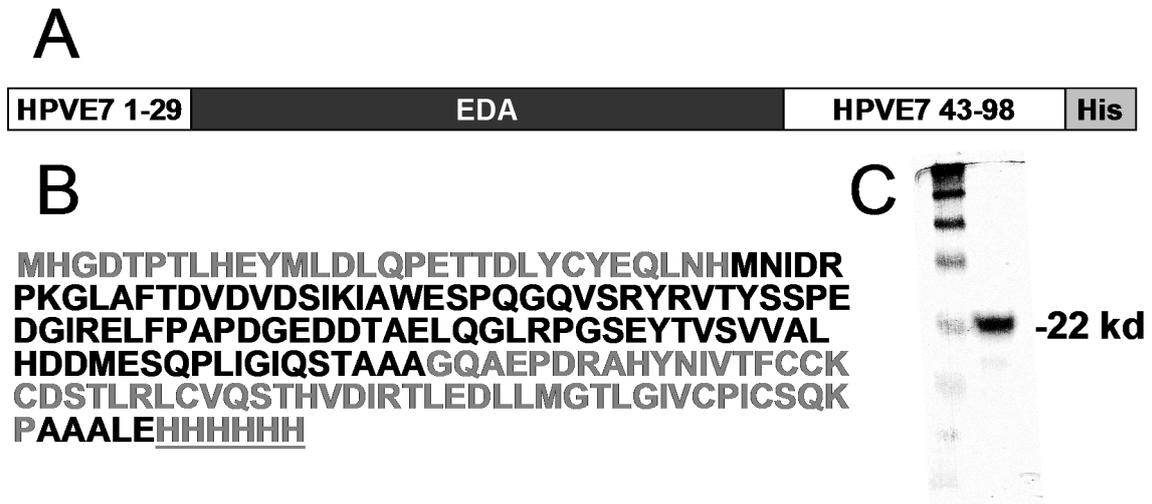


FIGURA 1

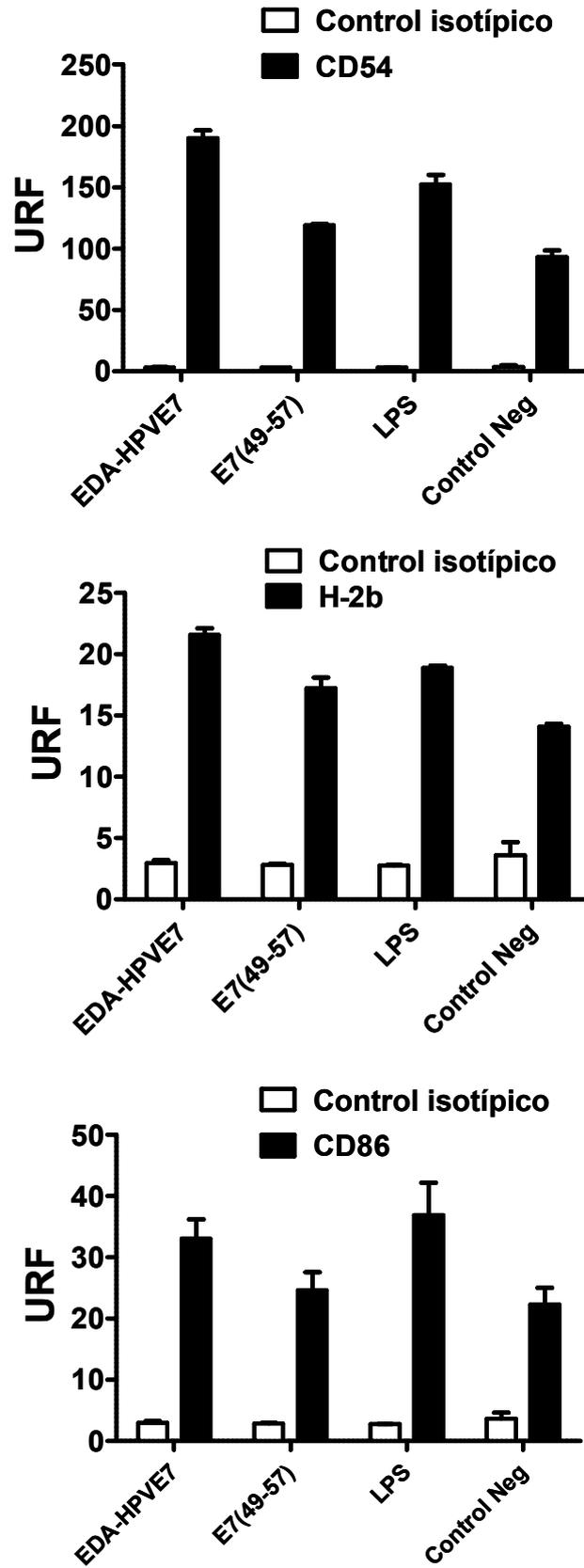


FIGURA 2

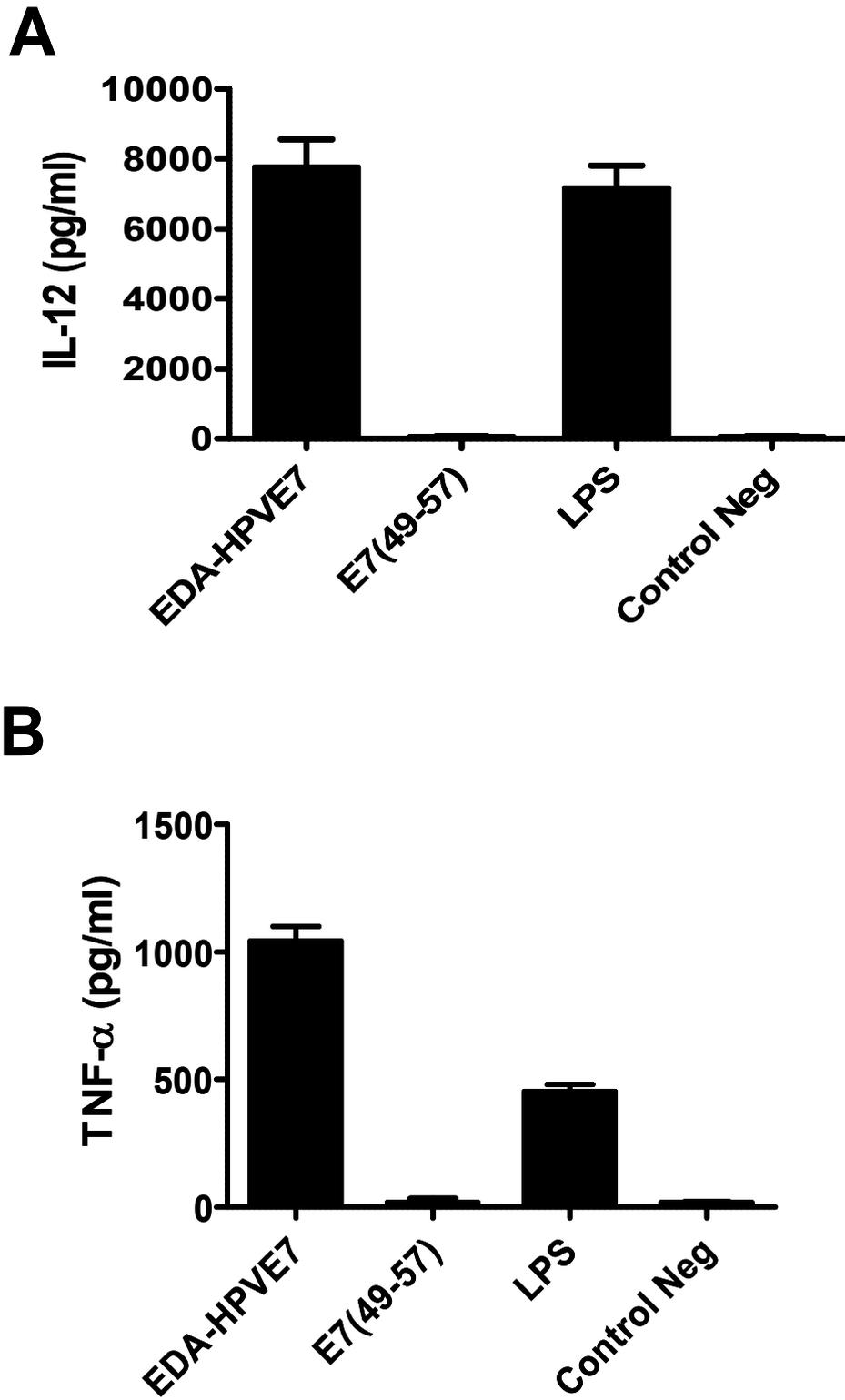
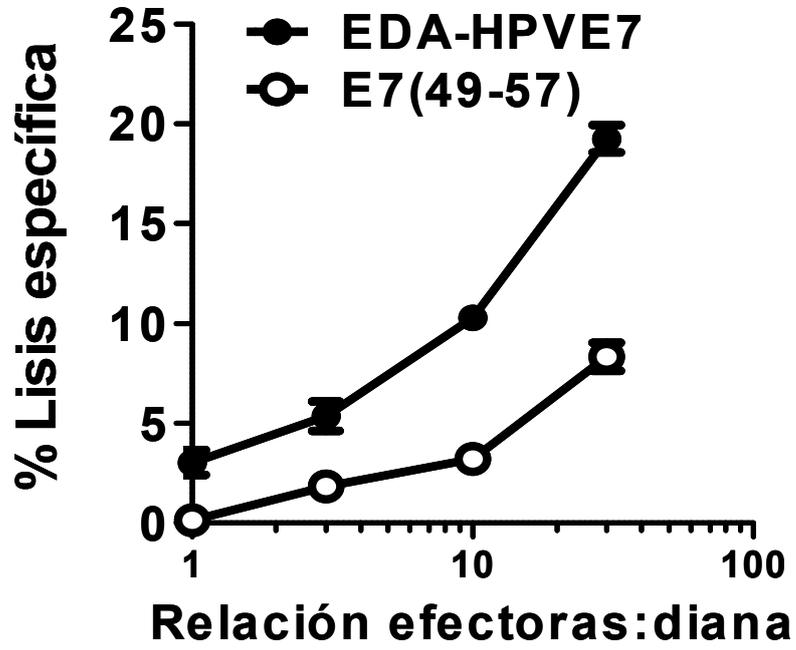


FIGURA 3

**A**



**B**

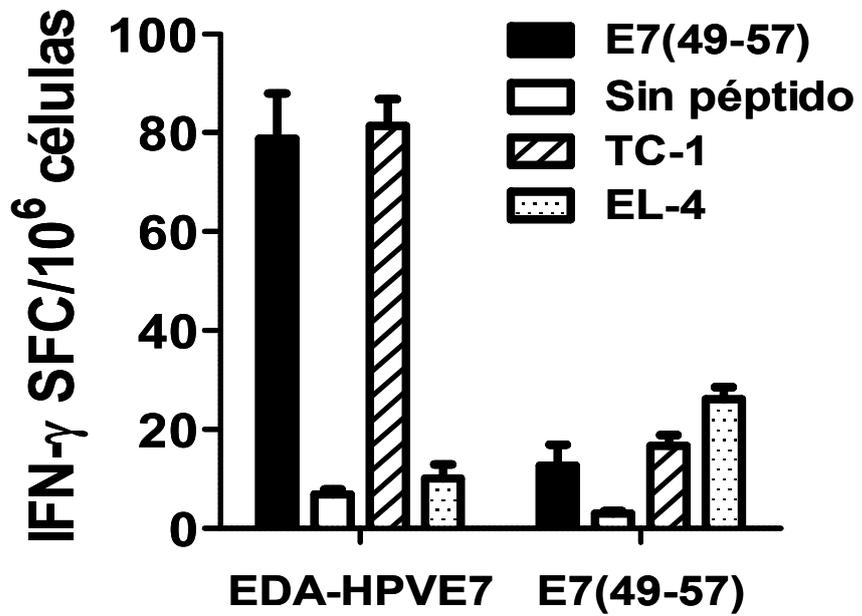


FIGURA 4

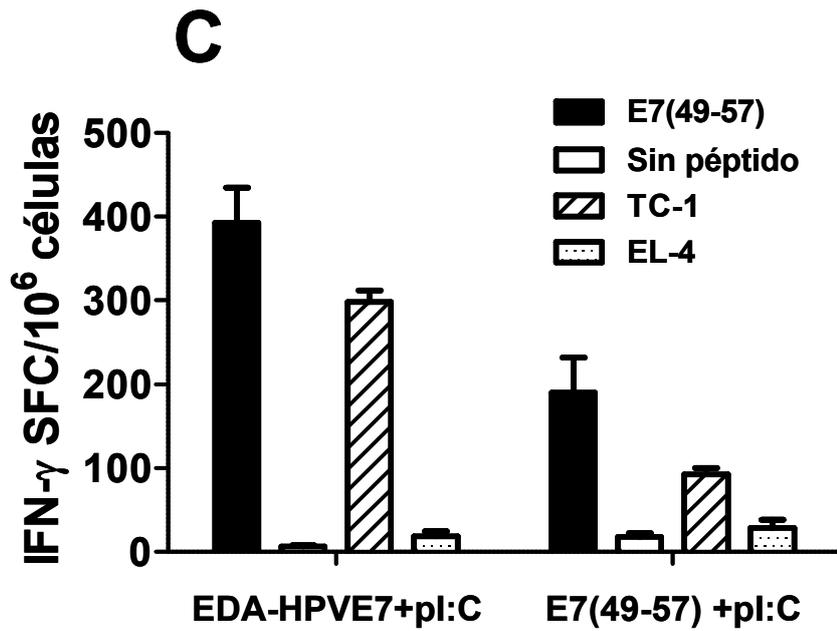
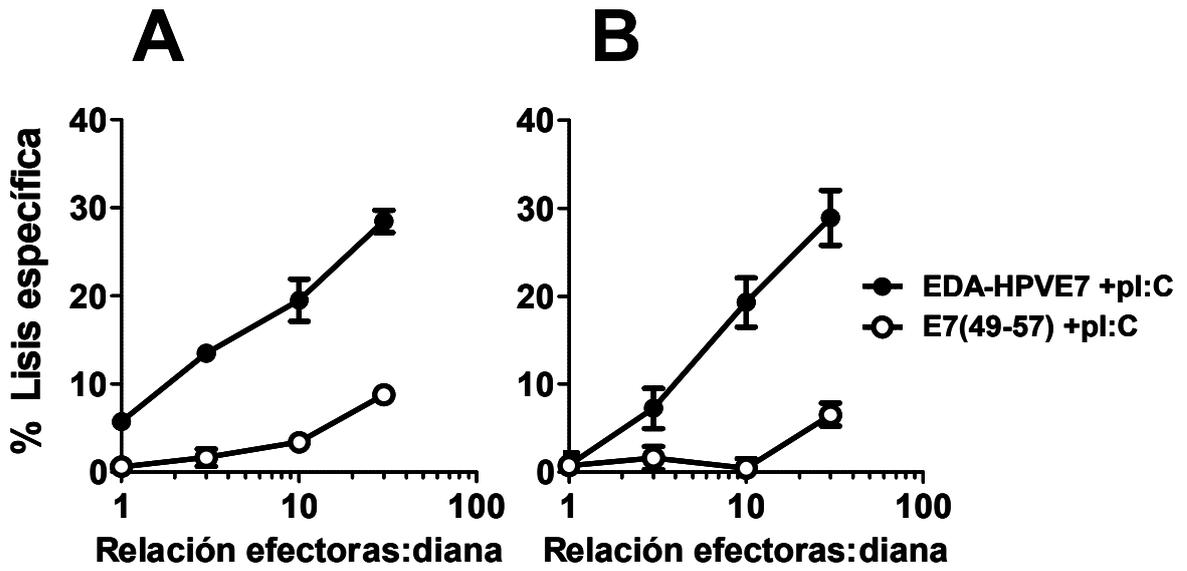


FIGURA 5

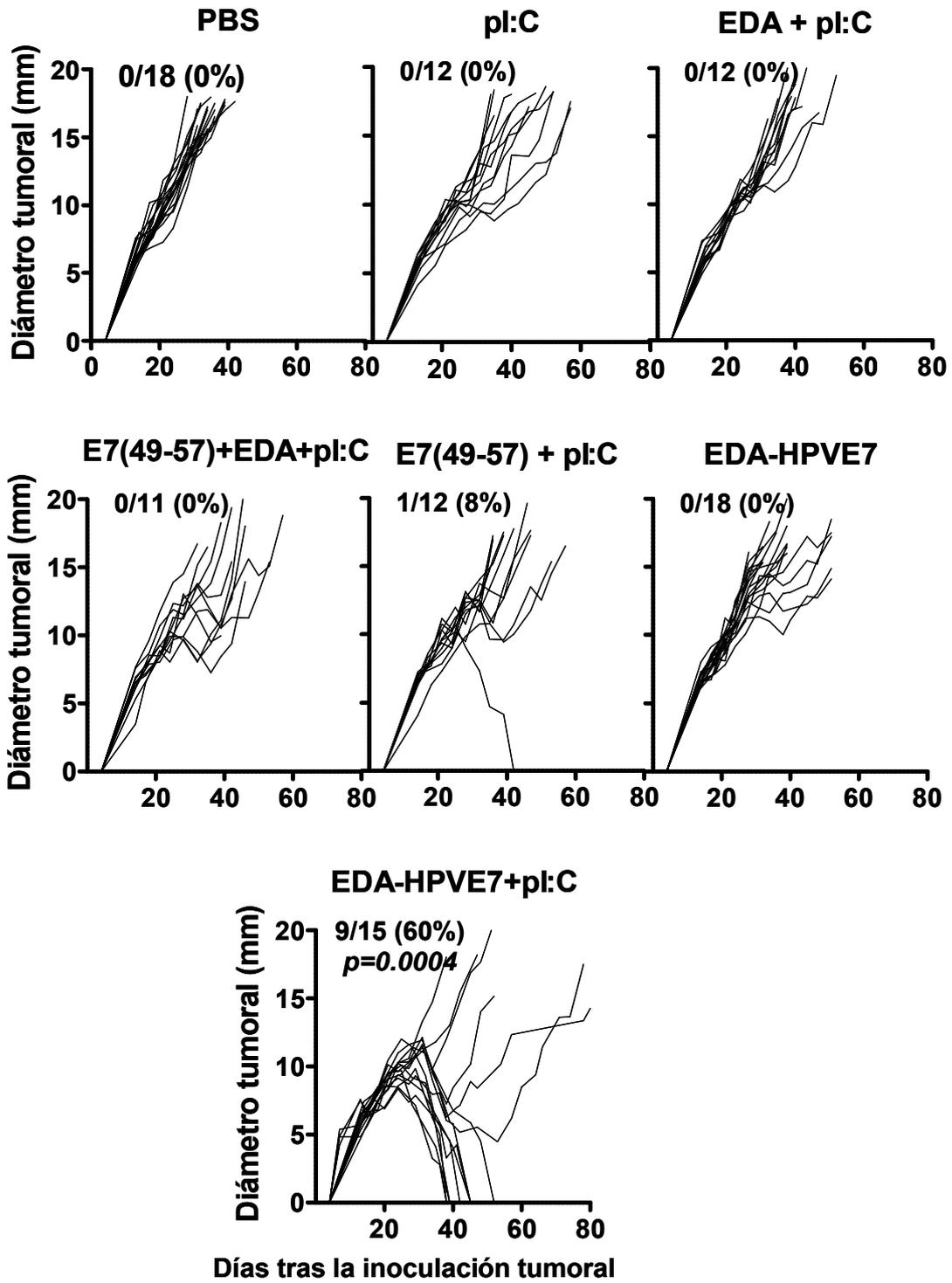


FIGURA 6A

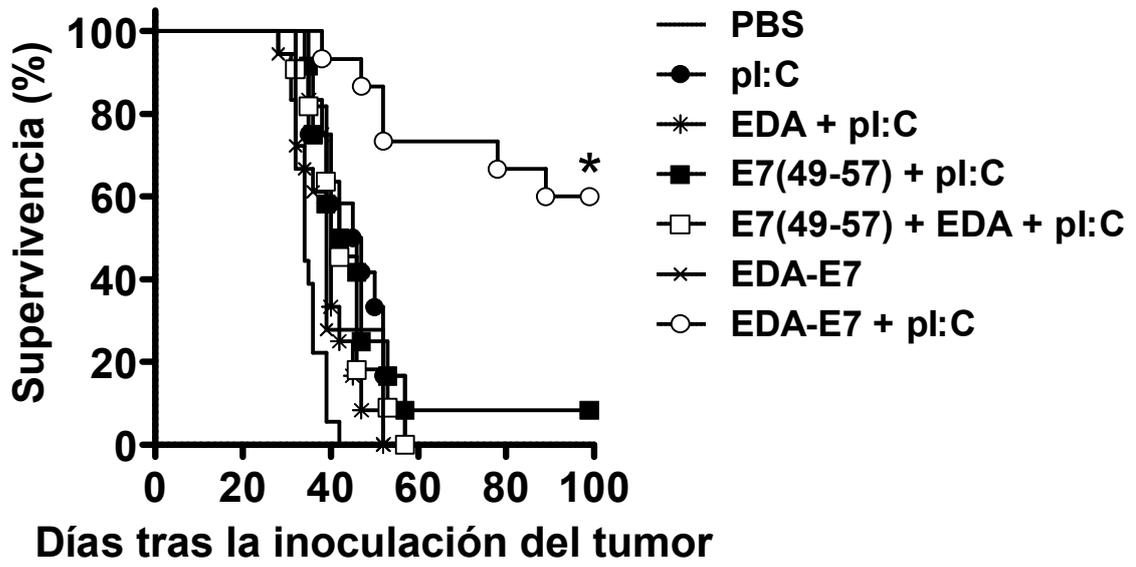


FIGURA 6B

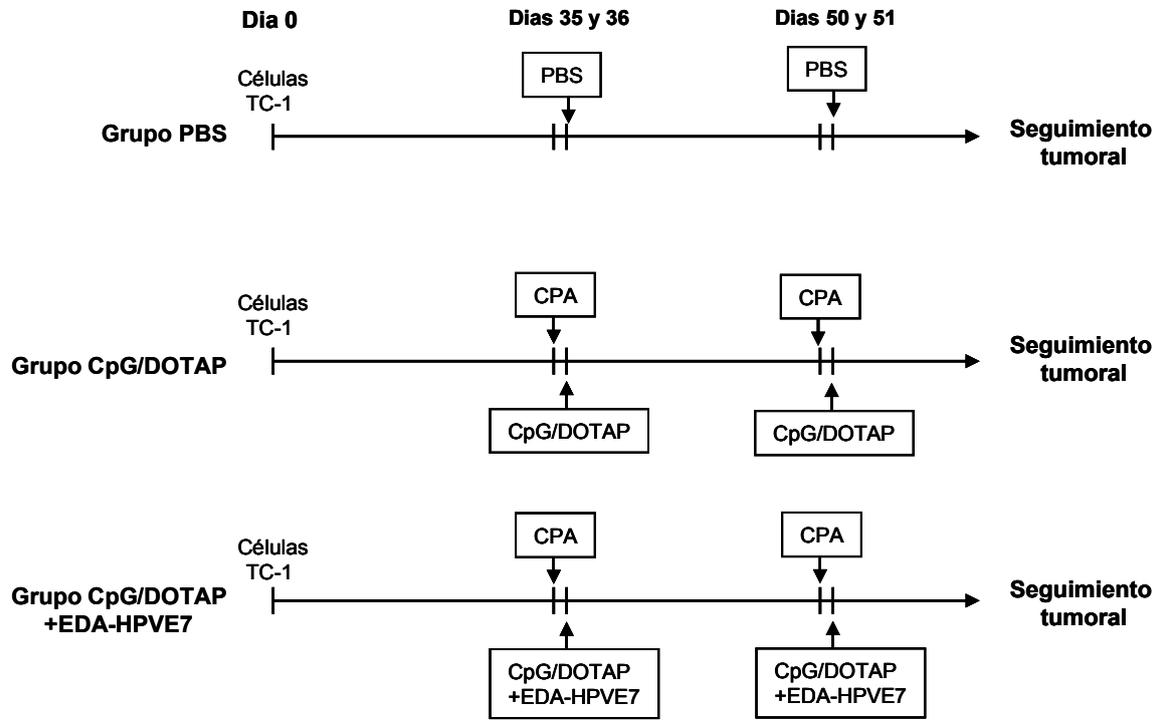


FIGURA 7A

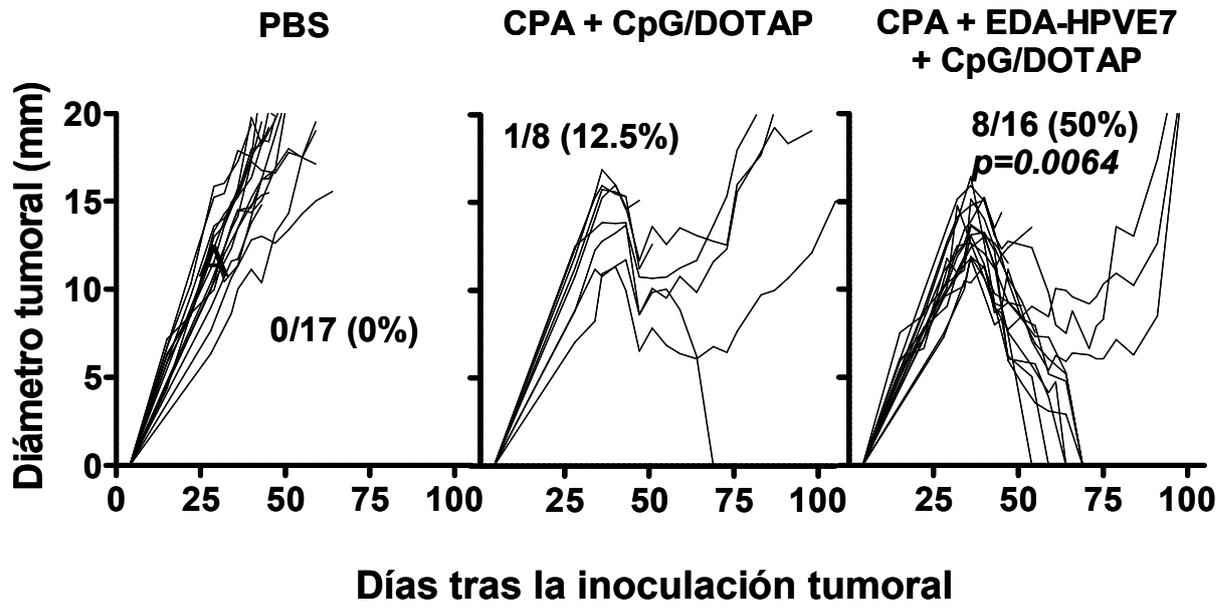


FIGURA 7B

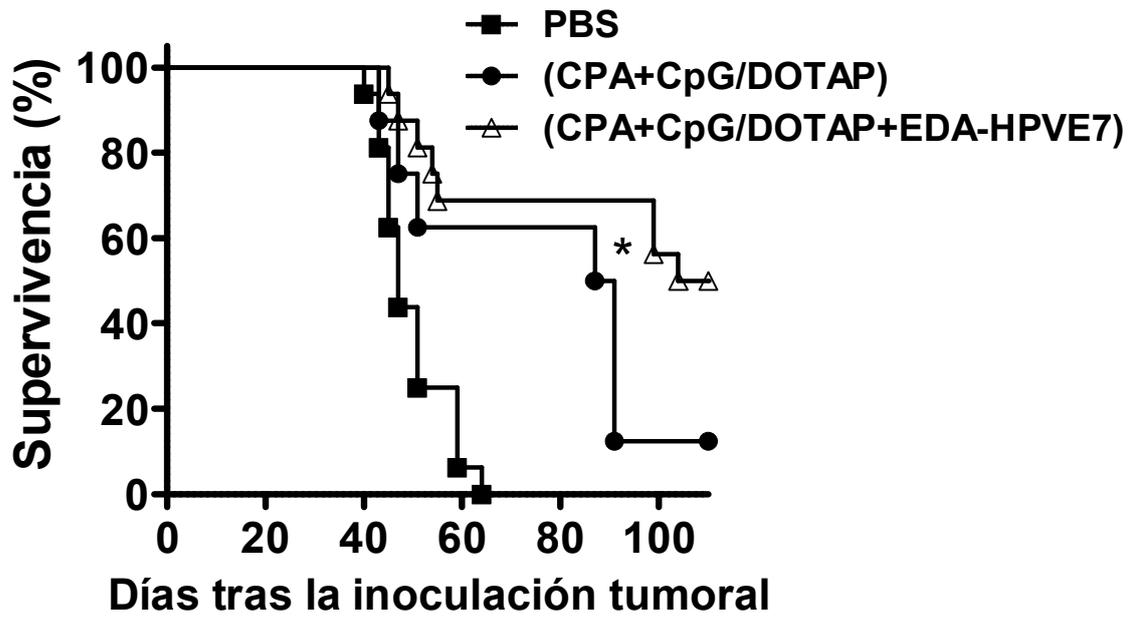


FIGURA 7C