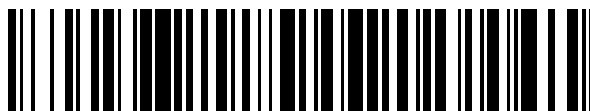


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 192**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08753797 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2155240**

54 Título: **Vacunación intradérmica del péptido de HPV**

30 Prioridad:

31.05.2007 EP 07109287

31.05.2007 US 941070 P

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

01.08.2014

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LUMC (100.0%)
ALBINUSDREEF 2
2333 ZA LEIDEN, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DER BURG, SJOERD HENRICUS;
KENTER, GEMMA G. y
MELIEF, CORNELIS JOHANNES MARIA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 482 192 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

Vacunación intradérmica del péptido de HPV.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la medicina y la inmunología. En particular se refiere a la vacunación intradérmica del péptido de HPV.

10 Antecedentes de la invención

[0002] La infección por HPV es altamente predominante entre individuos masculinos y femeninos jóvenes y sexualmente activos. Grandes estudios prospectivos mostraron que es común esa contracción del HPV de parejas masculinas, se dio en 40-60 % de los sujetos durante un período de seguimiento de 3 años (Koutsky *et al.*, 1997, Ho *et al.*, 1998, Marrazzo *et al.*, 2000). Por lo tanto, el HPV es probablemente la enfermedad de transmisión sexual más común.

[0003] Los virus del papiloma de los tipos de alto riesgo (por ejemplo HPV16, 18, 31, 33, y 45) son responsables del cáncer cervical (Bosch *et al.*, 1995, Zur Hausen, 1996). Tras la infección de las células epiteliales basales, se expresan los genes tempranos inmediatos del HPV E1, E2, E5, E6 y E7. Los genes E1 y E2 regulan la replicación vírica. Además, la proteína E2 controla la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. La proteína E6 de los tipos de HPV de alto riesgo se enlaza específicamente con P53 y dirige su degradación rápida a través de la vía ubiquitina. P53 está implicado en la iniciación de apoptosis y la pérdida de esta proteína tiene como resultado la prevención de apoptosis (Scheffner *et al.*, 1990). La proteína E7 de los tipos de alto riesgo se enlaza con pRB, que normalmente impide que las células entren en el ciclo celular a través de la desactivación de E2F, una proteína que es necesaria para la entrada al ciclo celular (Dyson *et al.* 1989). La expresión de E7 provoca que las células infectadas no se retiren del ciclo celular y se diferencien.

[0004] La expresión elevada y prolongada de las oncoproteínas E6 y E7 está firmemente asociada a la displasia inducida por el HPV y la transformación en el carcinoma cervical.

[0005] El papel de protección del sistema inmunológico en la defensa contra las enfermedades relacionadas con el HPV y contra el cáncer inducido por el HPV en seres humanos se sugiere por el hecho de que, en comparación con los controles normales, los pacientes de trasplante renal inmunosuprimidos y los pacientes infectados con VIH muestran una incidencia superior de 17 pliegues de infección genital por HPV (Ho *et al.*, 1994, Matorras *et al.* 1991, Halpert *et al.* 1986). La menor capacidad de los individuos inmunosuprimidos para resolver la infección por HPV indirectamente indica un papel de protección del sistema inmunológico al principio de la infección. La evidencia de protección contra el HPV a través de la inmunidad contra los antígenos tempranos E2, E6 y E7 viene del modelo de virus del papiloma del conejo de cola de algodón, que es el principal modelo de animal para los virus del papiloma asociados al cáncer. La vacunación con las proteínas no estructurales E1 y E2 causa la regresión de los papilomas inducidos por el virus mientras que se suprime el crecimiento del tumor vírico.

[0006] Además, los conejos vacunados con la combinación de los genes E1, E2, E6, y E7 estaban protegidos completamente contra la inoculación vírica (Han *et al.* 1999, Selvakumar *et al.* 1995). De manera importante, los conejos con verrugas con crecimiento progresivo inducidas por el virus del papiloma pudieron erradicar sus lesiones y limpiar las infecciones víricas latentes con dos inyecciones con una vacuna que incluía los péptidos E6 y E7 largamente superpuestos (Vambutas, Vaccine 2005). Estos datos indican que la inmunidad contra E2, E6, y E7 puede ser eficaz como inmunoprolifaxis de infección del virus del papiloma al igual que terapéuticamente para lesiones inducidas por el HPV y el cáncer.

[0007] Existe un interés considerable en la identificación de epítomos implicados en la respuesta inmune a HPV16, dada la posibilidad de incorporar estos como subunidades en una vacuna o usar estos epítomos para controlar la inmunidad inducida por vacuna *in vivo*. Puesto que las células más epiteliales expresan las MHC clase I pero no las clase II, la atención hasta el momento ha estado centrada en la inducción de linfocitos T citotóxicos tumorocidas específicos de HPV CD8⁺ (Melief *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1995; Rensing *et al.*, 2000; Rensing *et al.*, 1996). La reactividad de las células T específicas de HPV CD8⁺ ha sido descubierta en la sangre periférica de pacientes diagnosticados con lesiones de neoplasia cervical intraepitelial de grado III (CIN III) o carcinoma cervical (Nimako *et al.*, 1997; Rensing *et al.*, 1996) y en las poblaciones de células T de infiltración tumoral aisladas de pacientes con cáncer cervical (Evans *et al.*, 1997). La inmunidad de auxiliar de T ("Th") CD4⁺ específica de tumor se considera también ahora crucial para la erradicación eficaz de tumores sólidos, a pesar del hecho de que la mayor parte de estos tumores no expresen MHC clase II (reseñado en Melief *et al.*, 2000; Pardoll y Topalian, 1998; dedos *et al.*, 1999). Pruebas reciente indican que se requieren células T CD4⁺ específicas de tumor no solo para la inducción óptima de CTL CD8⁺ específicas de tumor sino también para la ejercitación óptima de la función celular del efector local a través de estas CTL (Ossendorp *et al.*, 1998, Toes *et al.*, 1999). Para la inducción de la inmunidad específica de tumor restringido por MHC clase I, la presentación cruzada de antígenos que han sido capturados por células que

presentan antígenos profesionales parece desempeñar un papel dominante. Se requiere ayuda para la inducción apropiada de una CTL específica de tumor a través del cebado cruzado de células T específicas de tumor CD4⁺ (Toes *et al.*, 1999, Schoenberger *et al.*, 1998).

[0008] Sólidos indicios de un papel protector de la inmunidad de Th específica del HPV fueron sugeridos por la predominación de células T CD4⁺ en las verrugas genitales en regresión (Coleman *et al.*, 1994), al igual que por la detección de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado para E7 de HPV16 en la mayoría de los sujetos con lesiones de regresión espontánea de CIN (Hopfl *et al.*, 2000). Además, en la mayoría de las personas sanas, el sistema inmunológico logra eliminar el virus antes del desarrollo de neoplasias (Koutsky, 1997; Evander, 1995). De acuerdo con esto, más de la mitad de todas las mujeres sanas mostraron respuestas de memoria de células Th1/Th2 específicas de E2 y E6 de HPV16 (de Jong, 2002; Welterss, 2003; de Jong, 2004). Además, se descubrió que la reactividad de Th contra E2 ocurrió al mismo tiempo que el aclaramiento vírico (Bontkes, 1999). Los sujetos sanos muestran inmunidad específica de E7 de HPV16 también (Welters, 2003; van der Burg, 2001). En cambio, la incidencia de cáncer inducido por HPV está fuertemente asociada al fallo inmunológico. El análisis de células T CD4⁺ específicas de E2, E6 y E7 de HPV16 en la sangre periférica de pacientes con neoplasia inducida por HPV16+ reveló que la mitad de los pacientes con alto grado de neoplasia vulvar (van Poelgeest, 2005) y la mayoría de los pacientes con CIN III no aumentaron una respuesta inmune apropiada (de Jong, 2004). De los pacientes evaluados con carcinoma cervical, aproximadamente la mitad careció de cualquier respuesta de células T proliferativa detectable. La otra mitad mostró respuestas poco proliferativas de células T específicas de E2 y E6 de HPV16 no asociadas a la producción de citocinas de Th1/Th2 pero con IL-10 (de Jong, 2004). Esto corrobora las observaciones previas que señalaban que las respuestas proliferativas específicas de E6 y E7 pueden estar presentes (Luxton; 2003), pero que la respuesta de Th1 periférica en los pacientes con carcinoma cervical es baja (de Gruijl, 1996; de Gruijl, 1998) o insuficiente (Tsukui, 1996). Puesto que la respuesta de células T CD4⁺ es de crucial importancia para la inducción y el mantenimiento de la inmunidad de CTL CD8⁺ (Melief; 2002), estos datos ofrecen una explicación plausible de por qué los CTL específicos de HPV16 son raramente detectados en pacientes con displasia de alto nivel o cáncer (Ressing, 1996; Bontkes, 2000; Nimako, 1997; Youde, 2000), mientras que tales CTL son más comúnmente detectables en mujeres sin neoplasia por HPV16+ (Nakagawa, 1997; Nakagawa, 1999).

[0009] Para un método clínicamente relevante de inmunización de sujetos contra el HPV en particular, se prefiere que tanto las células T auxiliares específicas como los CTL sean inducidos. Ya hemos mostrado que la inmunización con epítomos de CTL mínimos conlleva la protección contra tumores en algunos modelos (Kast *et al.* 1991), mientras que en otros modelos, esto puede llevar a la tolerancia o la delección funcional de CTL específicas de virus y de tumor que cuando se inducen de otra manera son protectoras (Toes *et al.* 1996ab). La incidencia de tolerancia o delección funcional reduce los efectos de la vacunación de forma significativa. Los epítomos relacionados con este efecto por lo tanto no eran adecuados para fines de inmunización. El procesamiento de antígenos exógenos para presentación por moléculas de MHC de clase I a través del cebado cruzado al igual que a través de otros mecanismos es hoy en día la segunda vía de tratamiento ampliamente reconocida para la presentación por MHC de clase I, junto a la conocida ruta endógena (Jondalet *et al.* 1996, Reimann *et al.* 1997). El resultado normal del tratamiento de antígeno a través de esta vía es la tolerancia de CTL, a menos que tenga lugar la activación de APC por las células T CD4⁺ (Kurts *et al.*, 1997). Para resolver este problema de tolerancia o delección funcional, la WO 02/070006 describió el uso de péptidos largos de HPV como vacuna, teniendo dicho péptido epítomos presentables de MHC de clase I y II, provocando la activación de las células T tanto CD4⁺ como CD8⁺.

[0010] Las vacunas de HPV desarrolladas en la WO 02/070006 pueden todavía ser mejoradas debido a que normalmente se usan altas dosis de péptidos y/o vacunaciones secuenciales para obtener un efecto inmunogénico óptimo. Además, adyuvantes como Montanide ISA-51 son normalmente necesarios para obtener un efecto inmunogénico óptimo. Estos adyuvantes provocan efectos secundarios no deseados tales como inflamación local prolongada en el sitio de la inyección, manos hinchadas rojas, fiebre, vómito, dolor articular, sensación de malestar general similar a los síntomas experimentados durante una infección de gripe. Estos efectos secundarios son experimentados generalmente de manera incómoda y evitarán el tratamiento de pacientes con lesiones de fase temprana.

[0011] Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad de vacunas mejoradas de HPV, que no tengan todos los inconvenientes de las vacunas existentes, entre otras, la vacuna de HPV usada en la invención no necesita altas dosis de péptidos y/o vacunaciones secuenciales y/o un adyuvante.

Descripción de la invención

[0012] La invención se refiere al uso de un péptido derivado de las proteínas E2, E6 y/o E7 de HPV para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es de administración intradérmica y donde la enfermedad relacionada con el HPV es seleccionada de una infección de HPV, una malignidad asociada al HPV, una Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN), una Neoplasia Intraepitelial de Vulva (VIN), una Neoplasia Intraepitelial Anal (AIN), una Neoplasia Intraepitelial Vaginal (VAIN), una Neoplasia Intraepitelial de Pene (PIN), un cáncer cervical, un cáncer de vulva, un cáncer anal, un cáncer de cuello y cabeza o un cáncer de pene.

[0013] La secuencia del péptido usado en la presente invención no es crítica en tanto que es derivada de una proteína E2, E6 y/o E7 de HPV del HPV 16 o 18. Preferiblemente, el péptido se elige de una de las regiones más inmunogénicas de estas proteínas. Más preferiblemente, el péptido es capaz de inducir y/o aumentar una respuesta de célula T específica de E2, E6, y/o E7 de HPV, y por lo tanto el péptido consta de un epítipo de célula T específico.

[0014] Los péptidos con una longitud superior a la longitud de los epítipos de HLA clase I y clase II (p. ej. con una longitud como la indicada aquí) son particularmente ventajosos para usarlos como medicamento porque son suficientemente grandes para requerir la maquinaria fagocítica para la absorción antigénica como está presente en las células que presentan antígenos profesionales (APC), en particular DC, como se explica en la WO02/070006 y se procesa en DC antes de que tenga lugar la presentación de superficie celular de los epítipos de HLA de clase I y clase II. Por lo tanto, la inducción desventajosa de tolerancia de célula T (como se muestra en Toes *et al.*, 1996, PNAS 93:7855 y Toes *et al.*, 1996, J. Immunol. 156:3911), se evita con el uso de péptidos con una longitud como se indica aquí (como se muestra en Zwaveling *et al.*, 2002, J. Immunol. 169:350). Por lo tanto, en una forma de realización preferida se proporciona un uso de la invención donde dicho péptido consta de una secuencia capaz de activar una APC. Por secuencia capaz de activar una APC se entiende una secuencia que es capaz de, al menos parcialmente, activar un APC, preferiblemente una APC profesional. Dicha activación preferiblemente lleva a una presentación de al menos un epítipo de dicho péptido en la superficie de dichas APC. En una forma de realización particularmente preferida dicho péptido consta de al menos dos epítipos de células T para dicho antígeno. La presencia de dos epítipos de células T para dicho antígeno permite una inducción incluso más eficaz y/o la mejora de dicha respuesta de célula T específica del antígeno.

[0015] Preferiblemente, al menos uno de dichos epítipos comprende un epítipo de célula T auxiliar para dicho antígeno o un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) para dicho antígeno. Es favorable tener al menos uno u otro epítipo presente en el péptido. La inducción eficaz y/o mejora se consigue cuando dicho péptido comprende una secuencia de activación de auxiliar T. Por una secuencia de activación de auxiliar T se entiende aquí una secuencia capaz de activar al menos parcialmente una célula auxiliar T. Dicha activación preferiblemente conduce a una mayor inducción y/o mejora de dicha respuesta de célula T específica de antígeno. En una forma de realización dicho péptido comprende al menos un epítipo de célula auxiliar T para dicho antígeno y al menos un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) para dicho antígeno.

[0016] Por consiguiente, un péptido es preferiblemente usado donde al menos un epítipo de HLA de clase II (célula T colaboradora) y/o al menos un epítipo de HLA de clase I (célula T citotóxica) están presentes dentro de una secuencia de aminoácidos contigua del aminoácido de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV de un serotipo de HPV de alto riesgo tales como los serotipos 16, 18, 31, 33, o 45. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos contigua presente en un péptido usado son del aminoácido de la proteína del E2, E6, o E7 de HPV del serotipo del HPV 16, 18, 31, o 33, incluso más preferiblemente del serotipo del HPV 16 o 18 y de la forma más preferible del serotipo de HPV 16. Las secuencias de aminoácidos de E2, E6 y E7 de HPV16 y HPV 18 están representadas en la SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente.

[0017] Preferiblemente la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua es de no más de 45 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de la proteína E2, E6 y/o E7 de HPV16 o HPV18 (p. ej. SEC ID n°: 1, 2, 3, 4, 5, 6), donde el péptido consta de al menos un epítipo de HLA de clase II y/o al menos de un epítipo de HLA de clase I, ambos de la secuencia de aminoácidos de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV. Más preferiblemente, en el péptido al menos un epítipo de HLA de clase II y/o al menos un epítipo de HLA de clase I están presentes dentro de una aminosecuencia contigua de la secuencia de aminoácidos de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV.

[0018] Por cuestiones de claridad, el péptido usado en la invención comprende preferiblemente al menos un epítipo de HLA de clase I y/o al menos un epítipo de HLA de clase II, cada uno de estos epítipos son presentables y enlazarán con la molécula de HLA específica correspondiente presente en las células después de haber sido procesadas como se describe en este caso. Cada epítipo de HLA, por lo tanto, también puede ser denominado como una unión de HLA y/o epítipo presentable. Más preferiblemente, el péptido usado es capaz de inducir y/o mejorar una respuesta de célula T específica de E2, E6, y/o E7 de HPV, donde el péptido consta de un epítipo de célula T específico para dicha proteína E2, E6, y/o E7 de HPV. Incluso más preferiblemente, el péptido comprende 22-45 residuos de aminoácidos contiguos de la proteína E2, E6 y/o E7 de HPV.

[0019] La longitud de la secuencia de aminoácidos contigua de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV comprendida en el péptido, está preferiblemente comprendida entre los aminoácidos 19-45, 22-45, 22-40, 22-35, 24-43, 26-41, 28-39, 30-40, 30-37, 30-35, 32-35, 33-35, 31-34. En otra forma de realización preferida, los péptidos comprenden los residuos contiguos de aminoácidos 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, o 45 o más de 45 de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV. En otra forma de realización preferida, el péptido de la invención consta de cualquiera de las secuencias de aminoácidos contiguas de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV tal y como se define aquí. Los péptidos usados en la invención pueden ser fácilmente sintetizados y son

suficientemente grandes para que sean tomados por APCs profesionales, se procesen por el proteasoma y tengan capacidad física suficiente y longitud para contener al menos un epítipo de HLA de clase I y/o de HLA de clase II. Por consiguiente, tal como se ha definido anteriormente, en una forma de realización preferida, el péptido consta de una secuencia capaz de activar un APC.

[0020] Alternativamente o en combinación con la forma de realización preferida anterior, el péptido comprende una secuencia de activación de auxiliar T.

[0021] En una forma de realización aún más preferida, el péptido consta al menos de dos epítopos de células T para dicho antígeno. De la forma más preferible, en este péptido al menos uno de dichos epítopos comprende un epítipo de célula T auxiliar para dicho antígeno y/o un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) para dicho antígeno.

[0022] En otra forma de realización preferida, el antígeno presente en el péptido deriva de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV o de una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de esta. Una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de una proteína consta de la misma capacidad inmunogénica del mismo tipo, no necesariamente en la cantidad de dicha proteína en sí. Un derivado de tal proteína puede ser obtenido por sustitución del aminoácido preferiblemente conservador.

[0023] Más preferiblemente, dicho péptido consta de regiones E2, E6 y/o E7 que fueron identificadas aquí como las más inmunogénicas. Además, el mapeo de un número de epítopos de Th naturalmente procesados en esta región ya ha sido identificado. Los métodos incluían respectivamente cultivos de PBMC a largo y corto plazo derivados de donantes de sangre sanos que se pueden utilizar para identificar péptidos adecuados. Los cultivos de PBMC se pueden estimular con los péptidos que deben evaluarse. En paralelo, la inmunidad específica de E2, E6 y/o E7 inducida *in vivo*, como se detectó en los ensayos de ELISPOT para IFN γ , se puede analizar en sujetos sanos al igual que en sujetos diagnosticados con lesiones de HPV16⁺.

[0024] En una forma de realización preferida, el medicamento usado aquí consta al menos de dos péptidos diferentes derivados de las proteínas E2, E6, y/o E7 de HPV. Más preferiblemente, se usan al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más péptidos en combinación como una mezcla o una agrupación en el medicamento. Esto es ventajoso puesto que la vacunación y la protección posterior podría ser obtenida para diferentes epítopos inmunogénicos presentes dentro de una proteína E2, E6, o E7 de HPV usando un tipo único de vacuna.

[0025] Alternativamente o en combinación con una forma de realización preferida anterior, el medicamento contiene péptidos cuyas secuencias de aminoácidos contiguos derivan de al menos dos proteínas E2, E6 y E7 de HPV, más preferiblemente de las tres proteínas E2, E6 y E7 de HPV. Esto es también ventajoso debido a que la vacunación y la protección posterior podría ser obtenida para diferentes epítopos inmunogénicos presentes dentro de diferentes proteínas E2, E6 o E7 de HPV usando un tipo único de vacuna.

[0026] Cuando el medicamento usado comprende más de un péptido, la combinación de diferentes péptidos también se puede denominar agrupación o mezcla de péptidos.

[0027] En una forma de realización preferida, el medicamento contiene al menos uno de los siguientes péptidos, cada péptido contiene o consiste en o superpone las siguientes secuencias derivadas de E2, E6 o E7 de HPV16: E2 31-60 o SEC ID N°: 7, E2 46-75 o SEC ID N°: 8, E2 301-330 o SEC ID N°: 9, E2 316-345 o SEC ID N°: 10, E6 1-32 o SEC ID N°: 11, E6 19-50 o SEC ID N°: 12, E6 41-65 o SEC ID N°: 13, E6 55-80 o SEC ID N°: 14, E6 71-95 o SEC ID N°: 15, E6 85-109 o SEC ID N°: 16, E6 91-122 o SEC ID N°: 17, E6 109-140 o SEC ID N°: 18, E6 127-158 o SEC ID N°: 19, E7 1-35 o SEC ID N°: 20, E7 22-56 o SEC ID N°: 21, E7 43-77 o SEC ID N°: 22, E7 64-98 o SEC ID N°: 23, E2 1-30, E2 16-45, E2 61-90, E2 51-70, E2 61-76, E2 76-105, E2 91-120, E2 106-135, E2 121-150, E2 136-165, E2 151-180, E2 166-195, E2 181-210, E2 196-225, E2 211-240, E2 226-255, E2 241-270, E2 256-285, E2 271-300, E2 286-315, E2 316-330, E2 311-325, E2 331-365, E2 346-355, E2 351-365, E6 1-22, E6 11-32, E6 21-42, E6 31-52, E6 41-62, E6 51-72, E6 61-82, E6 71-92, E6 81-102, E6 91-112, E6 101-122, E6 111-132, E6 121-142, E6 127-140, E6 131-152, E6 137-158, E7 1-22, E7 11-32, E7 21-42, E7 30-50, E7 31-52, E7 35-50, E7 41-62, E7 50-62, E7 51-72, E7 35-77, E7 61-82, E7 71-92, E7 77-98, de las cuales E2 31-60 o SEC ID N°: 7, E2 46-75 o SEC ID N°: 8, E2 301-330 o SEC ID N°: 9, E2 316-345 o SEC ID N°: 10, E6 1-32 o SEC ID N°: 11, E6 19-50 o SEC ID N°: 12, E6 41-65 o SEC ID N°: 13, E6 55-80 o SEC ID N°: 14, E6 71-95 o SEC ID N°: 15, E6 85-109 o SEC ID N°: 16, E6 91-122 o SEC ID N°: 17, E6 109-140 o SEC ID N°: 18, E6 127-158 o SEC ID N°: 19, E7 1-35 o SEC ID N°: 20, E7 22-56 o SEC ID N°: 21, E7 43-77 o SEC ID N°: 22, E7 64-98 o SEC ID N°: 23 son más preferidas. La secuencia de cada uno de estos péptidos se puede deducir de la secuencia de longitud total de las correspondientes E2, E6 o E7 del HPV16 como se representa en la SEC ID n°: 1, 2, o 3.

[0028] En el contexto de la invención, la superposición significa que la secuencia del péptido usada parcialmente o totalmente se superpone a la secuencia dada. Preferiblemente, la superposición significa superponer parcialmente. Parcialmente preferiblemente significa que la superposición es de uno o varios aminoácidos en la extremidad 5' y/o en la extremidad 3' de la secuencia peptídica, más preferiblemente de dos o más aminoácidos en la extremidad 5' y/o en la extremidad 3', o más. También se prefiere a que la superposición es de uno o varios aminoácidos en la

extremidad 5' y/o dos o más aminoácidos en la extremidad 3' de la secuencia peptídica o viceversa. El experto en la materia entenderá que todos los tipos de superposiciones están abarcados por la presente invención siempre y cuando el péptido obtenido muestre una actividad inmunogénica deseada, como se ha definido en la presente anteriormente.

[0029] En otra forma de realización preferida, los péptidos usados en el medicamento son derivados de las secuencias dadas anteriormente por sustitución del aminoácido conservador.

[0030] Más preferiblemente, el medicamento comprende al menos dos de los péptidos como se usan específicamente mencionados arriba, o al menos tres o cuatro, o cinco, o seis o más.

[0031] En formas de realización más preferidas, el medicamento comprende al menos uno de los siguientes grupos de péptidos, donde cada péptido comprende o consiste en o se superpone con las siguientes secuencias:

grupo 1: E2 31-60 y/o E2 46-75, y/o

grupo 2: E2 301-330 y/o E2 316-345, y/o

grupo 3: E2 31-60 y/o E2 46-75, y/o E2 301-330 y/o E2 316-345, y/o

grupo 4: E6 1-32 y/o E6 19-50, y/o

grupo 5: E6 41-65, E6 55-80 y/o E6 71-95, y/o

grupo 6: E6 85-109, y/o E6 91-122 y/o

grupo 7: E6 109-140 y/o E6 127-158, y/o

grupo 8: E6 1-32 y/o E6 19-50, y/o E6 41-65, y/o E6 55-80 y/o E6 71-95, y/o E6 85-109, y/o E6 91- 122 y/o E6 109-140 y/o E6 127-158, y/o

grupo 9: E7 1-35 y/o E7 22-56, y/o

grupo 10: E7 43-77, y/o E7 64-98, y/o

grupo 11: E7 1-35 y/o E7 22-56, y/o E7 43-77, y/o E7 64-98, y/o

grupo 12: grupo 3 y grupo 8 tal como se ha definido anteriormente, y/o

grupo 13: grupo 8 y grupo 11 tal como se ha definido anteriormente, y/o

grupo 14: grupo 3 y grupo 11 tal como se ha definido anteriormente, y/o

grupo 15: grupo 3, grupo 8 y grupo 11 tal como se ha definido anteriormente.

[0032] Preferiblemente, el epítipo de célula Th CD4+ de clase II comprendido en un péptido presente en el medicamento es capaz de activar una célula Th CD4+ en el paciente con enfermedad provocada por el HPV y/o un sujeto sano. La activación es preferiblemente evaluada *ex vivo* o *in vivo*, más preferiblemente en el paciente con enfermedad provocada por el HPV del cual las células infectadas/transformadas por el HPV expresan el antígeno dado. De la forma más preferible, el epítipo de HLA de clase II es capaz de activar una respuesta de memoria de Th CD4+, es decir la activación de una célula T auxiliar CD4+ positiva CD45 RO. Esto conducirá, en virtud de la señal "licencia para matar" a través de la activación CD40 de DC (Lanzavecchia, 1998, Nature 393:413), a un efector CD8+ más robusto y respuesta de células T de memoria.

[0033] La técnica conoce actualmente muchas formas de generar un péptido. La invención no está limitada a ninguna forma de péptido generado siempre y cuando el péptido generado comprenda un epítipo mínimo de célula T. A modo de ejemplo, un péptido presente en el medicamento puede ser obtenido de la proteína E2, E6 o E7, sintetizado *in vitro* o por una célula, por ejemplo a través de un ácido nucleico de codificación. Un péptido usado en el medicamento puede estar presente como un único péptido o incorporado en una proteína de fusión. En una forma de realización dicho péptido está flanqueado por sitios de procesamiento que permiten el tratamiento de dicho péptido dentro de una célula para permitir el transporte y/o la incorporación en una molécula de MHC en la superficie de dicha célula. En una forma de realización preferida un péptido usado en el medicamento, después de procesamiento es capaz de actuar con una molécula de MHC de clase II. La inmunidad de las células T restringidas de MHC de clase II es considerada actualmente importante en la erradicación de, por ejemplo, células tumorales, aunque dichas células tumorales frecuentemente no expresen moléculas de MHC de clase II. Los péptidos usados

en el medicamento están adecuados particularmente bien para obtener, inducir y/o estimular células T dependientes de MHC de clase I y de clase II.

[0034] Un péptido usado en el medicamento puede además ser modificado por delección o sustitución de uno o varios aminoácidos, por extensión en los N y/o C terminales con aminoácidos adicionales o grupos funcionales, que pueden mejorar la biodisponibilidad, el objetivo y la asimilación a través de APC profesionales, o constar de o liberar sustancias de modulación inmunológica que proporcionen adyuvante o funciones (co)estimuladoras. Los aminoácidos adicionales opcionales en el N y/o C terminales preferiblemente no están presentes en las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos E2, E6, y/o E7 de HPV, más preferiblemente no son de la secuencia de aminoácidos E2, E6, o E7 (SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5, 6).

[0035] En otra forma de realización preferida, el medicamento no contiene ningún adyuvante. Más preferiblemente, el medicamento no contiene ningún adyuvante conocido actualmente por estar asociado con al menos uno de los siguientes efectos secundarios no deseados, tales como inflamación local en el sitio de la inyección, manos hinchadas y rojas, fiebre, vómito, dolor articular, un sentimiento de malestar general similar a los síntomas experimentados durante una infección de gripe. Incluso más preferiblemente, el adyuvante no del tipo emulsión de aceite en agua, como el adyuvante de Freund incompleto o IFA, Montanide ISA-51 o Montanide ISA 720 (Seppic France). Incluso más preferiblemente, el adyuvante no tiene una función de depósito y/o es biológicamente degradable. Una función de depósito preferiblemente significa que el péptido está contenido durante mucho tiempo en el sitio de la inyección y va goteando durante un largo periodo. Preferiblemente, un periodo de tiempo largo es de al menos un mes, más preferiblemente de al menos dos o tres meses. Incluso más preferiblemente, el adyuvante no es Montanide ISA-51 (Seppic France).

[0036] En otra forma de realización preferida, el medicamento consiste en uno o varios péptidos como se ha definido aquí anteriormente y en un portador farmacéuticamente aceptable inerte y/o en excipientes. El portador farmacéuticamente aceptable inerte y/o los excipientes son preferiblemente inertes en el sentido de que no invocan una respuesta inmune y/o una respuesta inflamatoria o cualquiera de los efectos secundarios no deseados anteriormente descritos para adyuvantes. La formulación de medicamentos y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen y son habituales en la técnica y, por ejemplo, están descritos en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición 2005, *University of Sciences in Philadelphia*. El medicamento usado en la invención se formula para ser adecuado para la administración o aplicación intradérmica. El término intradérmico es conocido por el experto en la materia. En el contexto de la invención, intradérmico es sinónimo de intracutáneo y es diferente de subcutáneo. Una aplicación más superficial de una sustancia es epicutánea (en la piel), luego vendría una aplicación intradérmica (en o dentro de la piel), luego una aplicación subcutánea (en los tejidos justo debajo de la piel), luego una aplicación intramuscular (en el cuerpo del músculo). Una aplicación intradérmica se da normalmente por inyección. Una inyección intradérmica de una sustancia se hace normalmente para analizar una posible reacción, una alergia y/o una inmunidad celular a ésta. Una aplicación subcutánea también se da normalmente a través de una inyección: una aguja se inyecta en los tejidos debajo de la piel.

[0037] En otra forma de realización preferida más extensa, puesto que el medicamento usado en la invención no contiene ningún adyuvante como Montanide ISA-51, esto significa que la formulación del medicamento es más simple: una emulsión a base de agua en aceite preferiblemente no está presente en el medicamento usado. Por consiguiente, el medicamento usado en la invención no contiene ningún adyuvante como Montanide ISA-51 y/o no contiene ninguna emulsión con base de aceite en agua. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el medicamento usado en la invención es una solución acuosa tamponada con fuerza y/o osmolaridad iónica fisiológica, tal como por ejemplo PBS (solución salina tamponada fosfatada) que contiene o consiste en uno o varios péptidos tal y como se ha definido aquí anteriormente. El experto en la materia sabe cómo preparar tal solución.

[0038] El medicamento como se usa en la invención tiene otra ventaja, que se puede conseguir un efecto inmunogénico a través de la administración intradérmica en bajas cantidades de un péptido como se ha definido anteriormente aquí. La cantidad de cada péptido usado oscila preferiblemente entre 1 y 1000 µg, más preferiblemente entre 5 y 500 µg, incluso más preferiblemente entre 10 y 100 µg.

[0039] El experto en la materia sabría cómo probar si la concentración de péptido previsto es inmunogénica. Preferiblemente, las PBMC son estimulados *in vitro* con concentraciones diferentes de un péptido para ser evaluados como se ilustra en la WO 02/070006. En el ejemplo, un efecto inmunogénico se alcanza cuando las PBMC estimuladas por péptidos comienzan a proliferar al menos 2 veces más fuertes, y/o producen al menos 2 pliegues más de citocina, y/o aumentan los marcadores de activación (p. ej. CD25, HLA-DR, CD69, CD154, CD137) más que las PBMC no estimuladas. Alternativamente, se realiza una prueba cutánea como en los ejemplos. En pocas palabras, el péptido elegido es inyectado por vía intracutánea, preferiblemente 0,05 ml de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,4 mg/ml, más preferiblemente 0,2 mg/ml de péptidos en aproximadamente 10 – 20 %, más preferiblemente aproximadamente 16 % de DMSO (v/v) en 20 mM de tampón de fosfato isotónico (10 µg/péptido). Los péptidos se inyectan separadamente en los sitios de prueba cutánea del individuo del brazo superior.

[0040] En otra forma de realización preferida, el medicamento consta de un péptido como se ha definido en la presente anteriormente y de, al menos, un adyuvante, no siendo formulado dicho adyuvante en una emulsión basada en aceite en agua y/o no siendo de un tipo de emulsión de aceite en agua como se ha definido en la presente anteriormente. Este tipo de medicamento se puede administrar en una única administración. Alternativamente, si es necesario se puede repetir la administración de un péptido como se ha definido anteriormente aquí y/o de un adyuvante y/o se pueden administrar consecutivamente péptidos diferentes y/o adyuvantes diferentes. Además, la presente invención abarca que se administre intradérmicamente un péptido de la invención mientras que un adyuvante, tal y como se define aquí, se administre consecutivamente. El adyuvante puede ser administrado intradérmicamente. No obstante, se puede utilizar para el adyuvante cualquier otra vía de administración.

[0041] Los adyuvantes particularmente preferidos son aquellos que se conocen por actuar a través de los receptores de tipo peaje y/o a través de una proteína RIG-1 (gen inducible por ácido retinoico I) y/o a través de un receptor de endotelina. Los adyuvantes que son capaces de activar el sistema inmunológico innato, se pueden activar particularmente bien a través de receptores de tipo peaje (TLRs), incluyendo los TLRs 1-10. Los compuestos capaces de activar receptores de TLR y modificaciones y derivados de los mismos están bien documentados en la técnica. Los TLR1 se pueden activar por lipoproteínas bacterianas y por formas acetiladas de las mismas, se puede activar además los TLR2 a través de glicolípidos bacterianos Gram positivos, LPS, LPA, LTA, fimbria, proteínas de membrana externa, proteínas de choque térmico de bacterias o del huésped y lipoarabinomano micobacteriano. Los TLR3 se pueden activar por dsRNA, en particular de origen vírico, o por el compuesto químico poli(I:C). Los TLR4 se pueden activar por LPS Gram negativos, LTA, proteínas de choque térmico de huésped o de origen bacteriano, proteínas de revestimiento vírico o de revestimiento, taxol o derivados del mismo, hialuronano con oligosacáridos y fibronectinas. Los TLR5 se pueden activar con flagelos bacterianos o flagelina. Los TLR6 se pueden activar por lipoproteínas micobacterianas y factor soluble lábil al calor de *Streptococcus* del grupo B (GBS-F) o *Staphylococcus modulinus*. Los TLR7 se pueden activar por imidazoquinolinas. Los TLR9 se pueden activar por complejos de DNA CpG no metilado o cromatina - IgG. En particular TLR3, TLR7 y TLR9 juegan un papel importante en la mediación de una respuesta inmune innata contra las infecciones víricas, y los compuestos capaces de activar estos receptores son particularmente preferidos para su uso en la invención. Los adyuvantes particularmente preferidos contienen, pero de forma no limitativa, compuestos sintéticamente producidos que constan de dsRNA, poli(I:C), DNA CpG no metilado que desencadena receptores TLR3 y TLR9, IC31, un agonista de TLR 9, IMSAVAC, un agonista de TLR 4. RIG-1 se conoce por ser activado a través de ds-RNA al igual que TLR3 (Immunity (2005), 1:19-28). En otra forma de realización preferida, los adyuvantes están enlazados físicamente a un péptido como se ha definido aquí anteriormente. La conexión física de los adyuvantes y compuestos coestimuladores o grupos funcionales, al epitopo de HLA de clase I y HLA de clase II que contiene péptidos proporciona una respuesta inmune mejorada a través de la estimulación simultánea de células que presentan antígenos, en particular células dendríticas, que interiorizan, metabolizan y muestran antígeno. Otro compuesto de modificación inmunológica preferido es un inhibidor de adhesión de célula T, más preferiblemente un inhibidor de un receptor de endotelina tal como BQ-788 (Buckanovich RJ *et al* Ishikawa K, PNAS (1994) 91:4892). BQ-788 es N-cis-2, 6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gamma-metilleucil-D-1- metoxicarboniltripotofanil-D-norleucina. No obstante, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto modificado de BQ-788 también está incluido dentro del ámbito de esta invención.

[0042] Además, es preferido el uso de moléculas APC (co)estimuladoras, como se establece en la WO99/61065 y en la WO03/084999, en combinación con un péptido presente en el medicamento usado en la invención. En particular el uso de ligandos 4-1-BB y/o CD40, anticuerpos agonísticos, ligandos OX40 o fragmentos funcionales y derivados de los mismos, al igual que se administran preferiblemente compuestos sintéticos con actividad agonística similar separadamente o combinados con un péptido presente en el medicamento a sujetos que se van a tratar para seguir estimulando el montaje de una respuesta inmune óptima en el sujeto.

[0043] En una forma de realización preferida, el adyuvante comprende un ligando TLR (3, 4, 7, 8, 9) tal como el lípido A de monofosforil y/o el ácido nucleico CpG, y/o una molécula coestimuladora de APC tal como un ligando CD40, anticuerpos agonísticos o fragmentos funcionales y derivados de los mismos, y/o GM-CSF.

[0044] En otra forma de realización preferida, para promover la presentación de un péptido por una célula presentadora de antígeno profesional o células dendríticas, el medicamento que contiene un péptido consta además de un agente de activación de DC como un ligando de TLR como se ha mencionado aquí anteriormente.

[0045] En una forma de realización preferida, el medicamento, que es una vacuna, se administra a un humano o animal. En una forma de realización más preferida, el humano o animal sufre de o corre el riesgo de sufrir una enfermedad relacionada con el HPV (persistente). Dicha enfermedad relacionada con el HPV es seleccionada de una infección por HPV, de una malignidad asociada al HPV, de una Neoplasia Cervical Intraepitelial (CIN), de una Neoplasia Intraepitelial de Vulva (VIN), de una Neoplasia Intraepitelial Anal (AIN), de una Neoplasia Intraepitelial Vaginal (VAIN), de una Neoplasia Intraepitelial Fálica (PIN), de cáncer cervical, de cáncer de cabeza y cuello, en particular de cáncer orofaríngeo y de cánceres amigdalares, de cáncer de pene, de cáncer anal, de cáncer vaginal y de cáncer vulvar.

[0046] Preferiblemente, dicha enfermedad relacionada con el HPV es al menos en parte tratable o evitable induciendo y/o aumentando dicha respuesta inmune.

[0047] El método de la invención es por lo tanto muy adecuado para suministrarlo a un sujeto con inmunidad contra dicho antígeno y/o para aumentar dicha inmunidad. Los métodos de la invención se adecuan a cualquier fin para el que se usan otras estrategias de inmunización. Las inmunizaciones antiguas se usan para usos de vacunación, es decir, para la prevención de la enfermedad. No obstante, los métodos de la invención no son solo adecuados para evitar la enfermedad. Los métodos también pueden usarse para tratar la enfermedad existente, por supuesto con limitaciones de que la enfermedad es tratable si se induce y/o mejora la inmunidad a la célula T específica del antígeno. Esta característica puede utilizarse para tratar, por ejemplo, enfermedades asociadas a infecciones víricas como la infección por HPV y como algunos cánceres. En una forma de realización preferida dicho ser humano o animal sufre de o corre el riesgo de sufrir una enfermedad tal como una infección por HPV, que al menos es tratable en parte o evitable induciendo y/o mejorando dicha respuesta inmune. Preferiblemente dicha enfermedad contiene una enfermedad vírica de HPV y/o cáncer.

[0048] La administración intradérmica de un péptido es muy atractiva debido a que la inyección de la vacuna se realiza en el sitio de la enfermedad o tan cerca como sea posible, dando como resultado la activación local del ganglio linfático de drenaje de la enfermedad, dando como resultado una activación local más fuerte del sistema inmunológico. En particular para VIN, VAIN AIN, PIN, cáncer de pene, cáncer de vulva, cáncer anal, cáncer de cabeza y cuello.

[0049] En una forma de realización preferida, la administración intradérmica se realiza directamente en el sitio de la lesión o enfermedad. En el sitio de la lesión aquí se entiende que está a menos de 5, 2, 1, 0, 5, 0, 2 o 0, 1 cm del sitio de la lesión.

[0050] En cuanto a la administración intradérmica de un medicamento tal y como se define aquí, no solo se desencadenan respuestas de Th2 sino también de Th1. Esto es sorprendente dado que se descubrió que el cebado de antígeno cutáneo a través de una pistola génica conducía a una respuesta inmune de Th2 selectiva (Alvarez D, *et al*, 2005). Además, la respuesta inmune observada no está solo restringida a la piel como se podría esperar basándonos en Alvarez D., *et al*. Demostramos que las células T específicas que secretan IFN γ circulan a través del sistema linfático secundario puesto que se detectan en la sangre periférica post inoculación.

[0051] Otra ventaja crucial del medicamento de la invención es que cantidades relativamente bajas de péptidos pueden ser utilizadas, en una inyección única, en una simple formulación y sin ningún adyuvante conocido por provocar efectos secundarios no deseados tal como Montanide ISA-51. Sin deseo de estar limitado por cualquier teoría, creemos que el péptido(s) intradérmico de HPV usado en la invención específicamente y directamente se dirige a las células de Langerhans (LC) epidérmicas presentes en el epitelio. Las células de Langerhans son un subtipo específico de DC que muestran capacidad sobresaliente para iniciar respuestas inmunológicas primarias (Romani N., *et al*,). Estas LC se pueden ver como adyuvantes naturales reclutados por el medicamento usado en la invención.

[0052] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al uso de un péptido derivado de una proteína E2, E6, y/o E7 de HPV para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es de administración intradérmica como se ha definido anteriormente y donde además un péptido derivado de una proteína E2, E6, y/o E7 de HPV es posteriormente usado para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es de administración subcutánea.

[0053] El medicamento para la administración intradérmica ya ha sido definido aquí. El péptido usado para la administración subcutánea es el mismo que el usado para la administración intradérmica y ya ha sido definido aquí. El experto en la materia sabe cómo formular un medicamento adecuado para la administración subcutánea. Preferiblemente, el medicamento adecuado para la administración subcutánea comprende un péptido como ya se ha definido aquí en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes preferidos ya han sido mencionados aquí. Otros adyuvantes preferidos son los del tipo emulsiones de aceite en agua, tal como el adyuvante de Freund incompleto o IFA, Montanide ISA-51 o Montanide ISA 720 (Seppic France). En otra forma de realización preferida, el medicamento adecuado para la administración subcutánea comprende uno o varios péptidos, un adyuvante, ambos como se ha definido en la presente anteriormente y un portador y/o excipientes farmacéuticamente aceptables inertes, todos como se ha definido en la presente anteriormente. La formulación de medicamentos y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen y son habituales en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª edición 2005, *University of Sciences in Philadelphia*. El segundo medicamento usado en la invención se formula para ser adecuado para la administración subcutánea.

[0054] En esta forma de realización preferida, el medicamento adecuado para administración intradérmica puede ser simultáneamente administrado con el medicamento adecuado para administración subcutánea. Alternativamente,

ambos medicamentos pueden ser administrados consecutivamente de forma intradérmica y posteriormente de forma subcutánea o viceversa (la primera administración subcutánea va seguida de la administración intradérmica). En esta forma de realización preferida como en la forma de realización anteriormente preferida dedicada a la administración intradérmica, la administración intradérmica y/o subcutánea de un péptido, como se ha definido anteriormente aquí, y/o de un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o de péptidos diferentes y/o de adyuvantes diferentes pueden ser administrados consecutivamente intradérmica y/o subcutáneamente. Además la presente invención abarca que un péptido de la invención sea administrado intradérmica y/o subcutáneamente mientras que un adyuvante tal y como se define aquí sea administrado consecutivamente. El adyuvante puede ser administrado intradérmica y/o subcutáneamente. No obstante, se puede utilizar cualquier otra vía de administración para el adyuvante.

[0055] Esperamos que la combinación de una administración intradérmica y una subcutánea de un medicamento sea ventajosa según la invención. Las DC de la epidermis son claramente diferentes de las DC de la dermis y del tejido subcutáneo. La inmunización intracutánea (intradérmica) provocará el procesamiento del antígeno y la activación de las DC epidérmicas (células de Langerhans langerina positivas) que a través de su red dendrítica están en contacto estrecho con los queratinocitos. Esto también activará óptimamente las vías inflamatorias en las interacciones entre la célula de Langerhans y los queratinocitos, seguido de la circulación de células de Langerhans cargadas de antígeno y activadas a los ganglios linfáticos de drenaje de la piel.

[0056] La administración subcutánea activará otros subconjuntos de DC, que también se cargarán con antígeno y viajarán independientemente a los ganglios linfáticos de drenaje de la piel. Posiblemente, el uso de un medicamento que se pueda administrar tanto intradérmica como subcutáneamente pueda llevar a una estimulación sinérgica de células T en estos nodos de drenaje por los subconjuntos de DC diferentes.

[0057] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "constar de" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para indicar que lo que va después de la palabra está incluido pero lo que no se menciona específicamente no está excluido. Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que allí haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno".

[0058] La invención está ilustrada posteriormente con los siguientes ejemplos, que no deberían ser interpretados para limitar el ámbito de la invención.

Descripción de las figuras

[0059]

Figura 1

Una visión de conjunto del número, día de aparición y antígeno inyectado que indujo unas reacciones cutáneas positivas en el grupo de 19 donantes sanos (HD) y 17 pacientes (P) con historia de neoplasia cervical. Las reacciones cutáneas fueron consideradas positivas cuando las pápulas superiores a 2 mm de diámetro surgieron tan solo 2 días después de la inyección. La disposición indicada se usa para los 8 grupos de péptidos, se indica el primer y el último aminoácido de la proteína del grupo de péptidos usado. La disposición impresa en negrita indica al menos una reacción positiva dentro de este plazo; un cuadrado lleno representa una reacción cutánea positiva de nuevo desarrollo para el grupo indicado de péptidos.

Figura 2

La detección de células T específicas de HPV16 a través de ELISpot para IFN γ en la muestra de sangre antes de la inoculación de donantes sanos se correlaciona significativamente con la aparición de una reacción cutánea positiva temprana (<13 días) para el grupo de péptidos reconocido ($p=0,0003$, prueba exacta de Fisher de dos colas). Las respuestas específicas fueron calculadas a través de la sustracción del número medio de puntos + 2xSD del control medio del número medio de puntos en bienes experimentales. Se da el número de puntos específicos por 100.000 PBMC. Las respuestas se consideraron positivas si las frecuencias de célula T específica del grupo de péptidos eran ≥ 5 en 100.000 PBMCs.

Figura 3

A. Asociación entre la aparición de una reacción cutánea positiva y la detección simultánea (ELISpot para IFN γ) de la circulación de células T específicas de HPV16 en la muestra de sangre posterior a la inoculación de donantes sanos ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher de dos colas). De un total de 88 pruebas cutáneas, 39 fueron positivas. Veinticinco de estas 39 reacciones fueron asociadas con una reacción positiva en el ELISpot (frecuencia de células T ≥ 5 en 100.000 PBMCs). De los 49 sitios de prueba cutánea que no mostraron una reacción cutánea, 10 fueron asociados con un ELISpot positivo.

B. Ejemplo de un donante sano (HD10) que muestra una reacción cutánea positiva el 14º día para el grupo de péptidos 6 (E6₁₀₉₋₁₄₀, E6₁₂₇₋₁₅₈) (panel de la izquierda). Biopsia por punción del sitio de la reacción cutánea positiva (panel de la derecha).

Figura 4

A. Respuestas de célula T específica de HPV16 detectadas por ELISPOT para IFN γ en la muestra de sangre posterior a la inoculación de donantes sanos que muestran una reacción cutánea positiva. Se representa el número medio de puntos por 100. 000 PBMCs. La mezcla de respuesta de memoria (MRM) se usó como control positivo. La barra llena indica el sitio de la reacción cutánea positiva de la que se tomó una biopsia por punción y se puso en cultivo.

B. Los linfocitos T que se exfiltran de biopsias por punción, después del periodo del 14º al 28º día de expansión dirigida por citocina, se evaluaron por su capacidad para proliferar por estimulación con monocitos pulsados con péptidos (10 μ g/ml) – tal y como se inyectaron en la prueba cutánea - o con proteína (20 μ g/ml). La fitohemaglutinina (PHA) sirvió como control positivo. La proliferación se midió por la incorporación de [3 H]timidina y se definió específica una respuesta proliferativa con el índice de estimulación (SI) \geq 3. El donante sano 17 (HD 17) es un ejemplo de un sitio de reacción cutánea positiva que consiste en células T no específicas.

C. Los sobrenadantes de las respuestas proliferativas de B se analizaron para la presencia de IFN γ , interleucina 4 (IL4), IL5 y el factor de necrosis tumoral α , IL2; IL10 (no mostrado) mediante citometría por microesferas. Los valores límite están basados en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 pg/ml IFN γ y 20 pg/ml para las citocinas restantes). La producción de citocina específica del antígeno fue definida como una concentración de citocina por encima del nivel de corte y $>2\times$ la concentración del control medio. El donante sano 15 (HD15) muestra un alto nivel de antecedentes de IL5, pero aumenta en $>2\times$ después de la estimulación con antígeno.

Figura 5

El cultivo de células T de la biopsia cutánea del grupo 4 (E₆₄₁₋₆₅, E₆₅₅₋₈₀, E₆₇₁₋₉₅) del donante sano 15 (HD15) consiste tanto en células T CD4+ como CD8+ específicas de HPV16. La especificidad del cultivo fue evaluada en una tinción de citocina intracelular (ICS) contra la proteína (20 μ g/ml) y los péptidos (10 μ g/ml) correspondientes con la prueba de piel inyectada. Notablemente, en 3 de cada 4 biopsias se detectaron células T CD8+ específicas de HPV 16.

Ejemplos

Materiales y métodos

Diseño de estudio

[0060] Se realizó un estudio piloto de corte transversal para analizar las respuestas de las células T específicas de E2, E6, y E7 de HPV16 según se midió por inyección intradérmica de grupos de péptidos de HPV16 de grado clínico en la parte superior del brazo en pacientes con trastornos relacionados con el HPV del cérvix y en individuos sanos. Puesto que una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado representa una respuesta de células T de memoria, no hubo ningún prerrequisito para la positividad de HPV16 cuando se realizó el análisis.

Sujetos

[0061] Diecisiete mujeres (P) con historial de carcinoma cervical (n=12) o CIN (n=5) y un grupo de diecinueve individuos sanos (HD) participaron en este estudio después de proporcionar consentimiento informado. Las características clínicas de los pacientes, incluyendo el estado de HPV, se resumen en la tabla 1. La edad de los pacientes oscilaba entre 28-72 años (edad media: 46 años). El grupo de individuos sanos mostraba una edad media de 31 años (intervalo: 20- 51 años) y estaba compuesto por un 80 % de mujeres y un 20 % de varones. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de todos los sujetos inmediatamente antes de la administración de la prueba cutánea. La aparición tardía de pruebas de piel positivas en individuos sanos dio como resultado el aislamiento de una segunda muestra de sangre de 11 de los 19 voluntarios sanos. El diseño del estudio fue aprobado por el Comité Ético Médico del Centro Médico de la Universidad de Leiden.

Prueba de piel DTH

[0062] Las pruebas cutáneas, basadas en reacciones de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (DTH), se pueden usar como un método simple y sensible para la medición *in vivo* de respuestas inmunológicas celulares específicas

de HPV (Hopfl, 2000; Hopfl, 1991). Las preparaciones de la prueba cutánea constaron de 8 grupos de péptidos sintéticos de grado clínico largos que abarcaban la proteína entera E6 y E7 de HPV 16 y las regiones más inmunogénicas de la proteína E2 de HPV 16 (de Jong, 2004). Estos péptidos de grado clínico fueron producidos en las instalaciones del GMP interdivisional del LUMC. Cada grupo de la prueba cutánea estaba formado por 2 o 3 péptidos sintéticos, indicados por el primer y el último aminoácido de la región en la proteína cubierta por los péptidos. Grupo 1: E2₃₁₋₆₀, E2₄₆₋₇₅, grupo 2: E2₃₀₁₋₃₃₀, E2₃₁₆₋₃₄₅, grupo 3: E6₁₋₃₁, E6₁₉₋₅₀, grupo 4: E6₄₁₋₆₅, E6₅₅₈₀, E6₇₁₋₉₅, grupo 5: E6₈₅₋₁₀₉, E6₉₁₋₁₂₂, grupo 6: E6₁₀₉₋₁₄₀, E6₁₂₇₋₁₅₈, grupo 7: E7₁₋₃₅, E7₂₂₋₅₆, grupo 8: E7₄₃₋₇₇, E7₆₄₋₉₈. Se inyectó por grupo de péptidos 0, 05 ml de 0, 2 mg/ml de péptidos en 16 % de DMSO en 20 mM de tampón de fosfato isotónico (10 µg/péptido) por vía intracutánea. Los grupos de péptidos y un control negativo (sólo disolvente) fueron inyectados separadamente en sitios de prueba individuales de la piel de la parte superior del brazo. Los sitios de prueba cutánea fueron inspeccionados al menos tres veces, a las 72 horas y 7 días después de la inyección (Hopfl) de los péptidos y a las 3 semanas después del primer informe de una reacción cutánea muy tardía en uno de los primeros sujetos sanos. Las reacciones fueron consideradas positivas cuando las pápulas mayores de 2 mm de diámetro surgieron en menos de 2 días después de la inyección. Se obtuvieron de biopsias por punción en sitios de reacción cutánea positiva (4 mm), se cortaron en piezas pequeñas y se cultivaron en el IMDM que contenía el 10 % del suero AB humano, el 10 % de TCGF y 5 ng/ml IL7 e IL15 para permitir la emigración de linfocitos fuera del tejido cutáneo. Después de 2 a 4 semanas de cultivo, las células T expandidas fueron cosechadas y evaluadas para su reactividad específica de HPV.

Antígeno para ensayos inmunológicos *in vitro*

[0063] Un conjunto de péptidos, similar a los péptidos usados en la prueba cutánea, fue usado para ensayos de estimulación de células T y ensayos ELISPOT para IFN γ . Los cuatro péptidos de E2 de HPV 16 estaban formados por péptidos de 30 meros superpuestos a 15 residuos, E6 de HPV 16 estaba formada por 32 meros y E7 de HPV 16 por 35 meros, ambas superpuestas a 14 residuos. Los péptidos fueron sintetizados y disueltos tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg, 1999). Especialmente, en los ensayos ELISPOT para IFN γ el grupo de péptidos 4 y 5 difirieron ligeramente de los grupos de péptidos usados en la prueba cutánea, el grupo 4 contenía los péptidos E6₃₇₋₆₈, E6₅₅₋₈₆, E6₇₃₋₁₀₄ y el grupo 5 los péptidos E6₇₃₋₁₀₄, E6₉₁₋₁₂₂.

[0064] La mezcla de respuesta de memoria (MRM 50x) que consistía en una mezcla de toxoide tétanico (0, 75 *Limus flocculentus*/ml; Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente, Bilthoven, Países Bajos), *Mycobacterium tuberculosis* sometido a ultrasonidos (5 µg/ml; generosamente donado por el Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, Ámsterdam, Países Bajos), y *Candida albicans* (0, 15mg/ml, HAL Allergen Lab., Haarlem, Países Bajos). Las proteínas recombinantes de E2, E6 y E7 de HPV 16 fueron producidas en *Escherichia coli* recombinante como se ha descrito previamente (van der Burg, 2001).

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

[0065] La presencia de Células Th específicas de HPV 16 fue analizada por ELISPOT como se describe previamente (van der Burg, 2001). En resumen, fueron sembradas PBMCs frescas en una densidad de 2×10^6 células por pocillo de una placa de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 1 ml de IMDM (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) enriquecida con un 10 % de suero AB humano, en presencia o ausencia de los grupos de péptidos indicados de E2, E6 y E7 de HPV 16. Se usaron péptidos en una concentración de 5µg/ml/péptidos. Después de 4 días de incubación a 37°C, fueron cosechadas PBMCs, lavadas y sembradas en cuatro pocillos repetidos a una densidad de 10^5 células por pocillo en 100µl IMDM enriquecidas con un 10 % de FCS en una placa multipantalla de 96 pocillos (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) recubierto con un anticuerpo infeccioso IFN γ (Mabtech AB, Nacha, Suecia). Se realizaron otras incubaciones de anticuerpos y el desarrollo del ELISPOT según las instrucciones del fabricante (Mabtech). Se contaron los puntos con un sistema de análisis asistido de formación de imágenes de vídeo por ordenador completamente automatizado (Bio Sys). Se calcularon los puntos específicos mediante la sustracción del número medio de puntos + 2xSD del control de medio del número medio de puntos en pocillos experimentales (van der Burg, 2001).

Ensayo de proliferación de célula T

[0066] Se evaluaron cultivos de células T de las biopsias cutáneas para el reconocimiento de los péptidos específicos y el ensayo de proliferación de 3 días de la proteína (van der Burg, 2001). En resumen, los monocitos autólogos fueron aislados de las PBMCs por adherencia a una placa de base plana de 96 pocillos durante 2 horas en el medio X-vivo 15 (Cambrex) a 37°C. Los monocitos fueron usados como APCs, cargados durante toda la noche con 10 µg/ml de péptido y 20 µg/ml de proteína. Los linfocitos de infiltración de prueba cutánea fueron sembrados en una densidad de 2.5×10^4 células por pocillo en IMDM suplementado con un 10 % de suero AB. Fue tomado el medio solo como un control negativo, fitohemaglutinina (0, 5 µg/ml) sirvió como control positivo. La proliferación fue medida por la incorporación de [3 H]timidina (5 µCi/mmol). Una respuesta proliferativa fue definida específica como el índice de estimulación (SI) ≥ 3 . Los sobrenadantes de los ensayos de proliferación fueron cosechados 48 horas tras la incubación para el análisis de producción de citocina específica del antígeno.

El análisis de citocinas asociado a respuestas proliferativas específicas de HPV 16

[0067] La detección simultánea de seis citocinas diferentes Th1 y Th2: IFN γ , factor de necrosis tumoral α , la interleucina 2 (IL2), IL4, IL5 e IL10 fue realizada utilizando la citometría por microesferas (Becton Dickinson) según las instrucciones del fabricante. Los valores de corte estuvieron basados en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 pg/ml IFN γ y 20 pg/ml para las citocinas restantes). La producción de citocina específica del antígeno fue definida como una concentración de citocina sobre el nivel de corte y >2x la concentración del control de medio (de Jong, 2004).

Tinción de citocina intracelular (ICS)

[0068] La especificidad y el carácter de los cultivos de célula T derivados de sitios de reacción cutánea positiva fueron evaluados por circuitos integrados como se proporcionó previamente (de Jong, 2005). En resumen, los linfocitos de infiltración de prueba cutánea fueron cosechados, lavados y suspendidos en IMDM + 10 % de suero AB y las células $2-5 \times 10^4$ fueron adicionadas a monocitos autólogos que fueron pulsados durante toda la noche con 50 μ l de péptido (10 μ g/ml) o de proteína (20 μ g/ml) en el medio X vivo. El medio solo se tomó como control negativo, fitohemaglutinina (0, 5 μ g/ml) sirvió como control positivo. Las muestras fueron simultáneamente manchadas con IFN γ de ratón-antihumano marcado con FITC (0, 5 g/ml, BD PharMingen), IL5 marcado con PE ratón-antihumano (0, 2 mg/ml, BD PharMingen), anti-CD4 marcado con APC (BD bioceánica) y marcado con PerCP anti-CD8 (BD Bioscience). Tras la incubación a 4°C, las células fueron lavadas, fijadas con un 1 % de paraformaldehído y analizadas por citometría de flujo (FACSscan, BD Biosciences).

Análisis estadístico

[0069] La prueba exacta de Fisher (de 2 colas) fue usada para analizar la relación entre la detección de células T específicas de HPV productoras de IFN γ en PBMC, la presencia de una reacción de prueba cutánea o la presencia de células T específicas de HPV en biopsias cutáneas, al igual que diferencias entre pacientes y controles sanos con respecto al tamaño o el número de reacciones cutáneas dentro de estos grupos. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando Graphpad Instat Software (versión 3. 0) y Graphpad Prism 4.

Resultados

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

[0070] Estudiamos reacciones cutáneas tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad inducida por el HPV después de la inyección intracutánea con péptidos de E2, E6 y E7 de HPV16. Las reacciones cutáneas positivas aparecieron como pápulas rojizas planas de 2 a 20 mm de diámetro, y surgieron dentro de 2 a 25 días después de la inyección. Fue detectada una reacción cutánea positiva en 46 de 152 pruebas cutáneas en el grupo de control y en 30 de 136 sitios de prueba cutánea en el grupo de pacientes. El tamaño de las reacciones cutáneas no difirió entre los dos grupos. Entre todos, cada agrupación de péptidos de la prueba cutánea podría dar lugar a una reacción cutánea positiva. Las reacciones más frecuentes contra E2₃₁₋₇₅ (10 de 19 sujetos), E6₃₇₋₁₀₄ (9/16) y E7₄₃₋₉₈ (7/19) fueron observadas en el grupo de control. Este modelo de reacción se asemeja al que hemos observado previamente en PBMC (de Jong, 2002; Welters, 2003), al igual que el modelo observado en el grupo de pacientes (Figura 1).

[0071] El tiempo de aparición de las reacciones cutáneas, difirió considerablemente entre el grupo de voluntarios sanos y pacientes. Una reacción de DTH tradicional, dentro de 24 a 72 horas después de la inyección, fue observada en solo tres casos, 2 pacientes y 1 control sano (Figura 1). La mayoría de las reacciones cutáneas en el grupo de pacientes se desarrolló dentro de 2 a 20 días, alcanzando un máximo después de una semana (Figura 1). Sobre todo, 5 de cada 9 pacientes con historial de una enfermedad relacionada con el HPV 16 mostraron una reacción positiva en 8 días. No obstante, en el grupo de controles la mayor parte de las reacciones cutáneas fueron detectadas entre los días 13-25.

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

[0072] Para comparar los resultados de la prueba cutánea con la presencia de células T circulantes de tipo 1 específicas de HPV 16, un ensayo de ELISPOT para IFN γ fue realizado con las PBMC recogidas antes de que se diera el desafío de péptido intradérmico. En 5 de 19 voluntarios sanos fuimos capaces de detectar una respuesta inmune específica de HPV 16 por ELISPOT para IFN γ . La detección de ≥ 5 células T circulantes específicas de HPV 16 por 100. 000 PBMC en la muestra de sangre antes de la inoculación de individuos sanos fue asociada a una reacción temprana cutánea positiva (≤ 13 días) a la misma secuencia peptídica ($p=0,0003$, prueba exacta de Fisher de dos colas; Figura 2). Ninguna célula T circulante específica de HPV 16 fue detectada en las muestras de sangre de los donantes sanos antes de la inoculación para péptidos que indujeron una reacción cutánea positiva tardía (de

14 a 25 días). Esto sugiere que la frecuencia de células circulantes antígeno-específicas determinan el tiempo de retardo para que aparezcan reacciones cutáneas.

[0073] Para valorar la frecuencia de células T específicas de HPV se recogieron muestras de sangre adicionales de 11 voluntarios sanos al mismo tiempo que apareció una reacción cutánea tardía. En estos individuos, 39 de 88 pruebas cutáneas fueron positivas. En 25 de 39 reacciones cutáneas positivas y en 10 de 49 reacciones cutáneas negativas se detectaron ≥ 5 células T específicas de HPV 16 por 100. 000 PBMC. Llegados a este punto, fue encontrada una correlación significativa entre la detección de células T circulantes específicas de HPV que producen $\text{IFN}\gamma$ en la muestra de sangre después de la inoculación y la presencia de una reacción cutánea ($p < 0, 0001$, prueba exacta de Fisher; Figura 3A). Esto muestra que la frecuencia de células T específicas de HPV 16 en la sangre de voluntarios sanos es significativamente más alta después de una inoculación intradérmica con péptido de HPV 16 e indica que la inyección intracutánea de antígenos de péptido mejora el número de células T específicas de HPV 16 en la sangre de voluntarios sanos.

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

[0074] Aproximadamente el 25 % de las reacciones cutáneas positivas de voluntarios sanos no estaban asociadas a la detección de células T específicas de HPV16 que producen $\text{IFN}\gamma$ en la sangre, mientras se sugiere que otros tipos de células que no producen $\text{IFN}\gamma$ pueden infiltrarse en la piel después de la inyección intradérmica de péptidos de HPV16.

[0075] Para caracterizar las células en una reacción cutánea positiva se tomaron biopsias por punción de sitio, (Figura 3B). En total, se tomaron 8 biopsias de distintos sitios de reacción cutánea positiva de 7 controles sanos y cultivadas con un cóctel de citocinas que permitió el crecimiento de células T *in vitro* sin estimulantes antigénicos. En 7 de cada 8 casos, las células T exfiltraron el tejido y se expandieron en 3-4 semanas. Las células T expandidas fueron evaluadas para su especificidad en un ensayo de proliferación a corto plazo. La figura 4 muestra ejemplos de cultivos de células T que proliferaron concretamente debido a la estimulación con monocitos autólogos pulsadas con el grupo de péptidos, también inyectados en este sitio durante la prueba cutánea (HD2, HD10, HD15) al igual que monocitos pulsados con proteína E6 de HPV16 (Figura 4AB). Esto indica que estas células T fueron capaces de reconocer sus complejos HLA-péptido cognados después de que el antígeno fuera procesado y presentado de forma natural. El análisis de los sobrenadantes de estos cultivos proliferativos de células T revelaron un perfil de citocina de Th1/Th2 mezclada en el que las células T específicas de HPV 16 produjeron $\text{IFN}\gamma$, IL-4 e IL-5 (Figura 4C).

[0076] En cada caso en el que las células T específicas de HPV fueron detectadas en el cultivo de biopsia (4 de 8) esto coincidió con la detección de células T circulantes que producen $\text{IFN}\gamma$ específicas de HPV 16 en la muestra de sangre de después del desafío por ELISPOT (Figuras de confrontación 4A y B). En 3 de otras 4 biopsias de reacción cutánea positiva (HD2, HD17, HD18) las células T no han respondido a los péptidos de HPV16 (Figura 4, HD17) y en un caso ninguna de las células T anteriores filtraron el tejido (HD13). En estos 4 casos nosotros no fuimos capaces de detectar células T circulantes que producen $\text{IFN}\gamma$ específicas de HPV 16 en la muestra de sangre después de la inoculación.

[0077] La cotinción de las células T de biopsia a través de marcadores de superficie celular CD4 y CD8 mostraron que no solo las células T CD4⁺ específicas de HPV 16 sino también las células T CD8⁺ de HPV 16 infiltraron el sitio cutáneo tras la inoculación intradérmica con péptido de HPV 16 (Figura 5). En general, en 3 de cada 4 biopsias infiltradas por células T específicas de HPV 16, fuimos capaces de detectar células T específicas de HPV 16 CD8⁺.

[0078] En conjunto, la población de células inmunológicas que migran en la piel tras una inoculación intradérmica con péptidos de HPV16 contiene células T específicas citotóxicas de HPV 16 Th1, Th2 CD4⁺ y CD8⁺. Esta infiltración se alinea por la aparición en la sangre de células T circulantes que producen $\text{IFN}\gamma$ específicas de HPV 16.

Discusión

[0079] Las pruebas cutáneas se usan comúnmente como un simple ensayo para la medición *in vivo* de inmunidad por medio de células. Hemos convalidado el uso del ensayo de la prueba cutánea para la medición de la respuesta inmune celular específica de HPV16 contra los antígenos tempranos E2, E6 y E7 *in vivo* a través de la comparación de los resultados con los de las mediciones paralelas de reactividad de célula T a través de ensayos *in vitro*.

[0080] La mayoría de las reacciones cutáneas positivas en pacientes con neoplasia relacionada con el HPV apareció dentro de 2-8 días después de la administración de la prueba cutánea similar a la que fue observada en los pacientes de CIN por Höpfl *et al.* (Höpfl, 2000). También en el grupo de voluntarios sanos aparecieron reacciones cutáneas tempranas entre 4 y 12 días después de la inoculación intradérmica del antígeno. En este último grupo, conocido por mostrar respuestas de célula T de tipo específico de HPV16 1 *in vitro* (de Jong, 2002; Welters, 2003), la aparición de una reacción cutánea temprana (dentro de 13 días) estuvo significativamente asociada a la detección de células T específicas de HPV 16 que producen $\text{IFN}\gamma$ a una frecuencia de al menos 1 por 20. 000 PBMC (Figura 2,

p<0, 001). Los mismos criterios de corte para una reacción positiva en el ensayo ELISPOT para IFN γ se recomiendan por Jeffries *et al* (Jeffries; 2006), quienes usaron herramientas matemáticas para definir el corte apropiado del ELISPOT en relación con las pruebas de Mantoux. El bajo número de células T de memoria circulantes (Figura 2) puede explicar por qué las reacciones cutáneas aparecen un poco retardadas en comparación con las pruebas DTH tradicionales. Las células T necesitan ser impulsadas o reactivadas y comienzan a dividirse antes de que se produzcan suficientes células para causar una reacción inflamatoria local: la prueba positiva de piel. De hecho, al mismo tiempo que aparece una reacción cutánea positiva, una frecuencia más alta de respuestas de Th1 específicas de HPV 16 se pueden detectar en la sangre periférica (Figura 3).

[0081] A diferencia de los individuos sanos, las reacciones cutáneas en la población de pacientes no estaban asociadas a células T circulantes de tipo específico de HPV16 1 como se midió por ELISPOT para IFN γ , esto sugiere que las células T específicas de HPV16 que producen otras citocinas diferentes de las del IFN γ infiltrado en el sitio de prueba cutánea en pacientes. Históricamente ha sido postulado que la célula Th1 induce respuestas DTH, no obstante, diferentes estudios ahora han mostrado que las células Th2 también infiltran los sitios de prueba cutánea (Wang, 1999; Woodfolk, 2001). De forma similar, este estudio muestra que los sitios de prueba de piel positiva en voluntarios sanos contienen tanto células T Th1 y como Th2 específicas de HPV 16 (Figuras 4 y 5). Además, las reacciones cutáneas positivas también pueden ser el resultado del flujo de células T no específicas como se dedujo evidentemente de dos estudios en profundidad de sitios de prueba de piel positivos usados para evaluar la respuesta inmune específica que sigue a la vacunación de pacientes con cáncer de célula renal o melanoma (Bleumer, 2007). No obstante, si nos basamos en estos resultados y en vista de nuestros estudios precedentes que muestran que la mayor parte de los pacientes de carcinoma cervical carecen de inmunidad funcional a células T específicas de HPV CD4+ (de Jong, 2004), asumimos que las reacciones cutáneas positivas en pacientes con cáncer son el resultado bien de células circulantes Th1 no específicas de HPV o bien de células T infiltrantes que no son específicas para HPV16.

[0082] De forma imprevista, observamos que la mayoría de las reacciones cutáneas en individuos sanos aparecieron de 2 a 3 semanas después de la inyección intradérmica del antígeno. Aunque estas reacciones cutáneas tardías positivas no estaban correlacionadas con la detección de células T de memoria circulantes específicas de HPV CD4+ en la sangre antes de la inoculación (Figura 2), la constitución inmunológica de estos sitios cutáneos de prueba son similares a las pruebas clásicas de DTH (Platt, 1983; Poulter, 1982) y constan de células Th1 y Th2 específicas de HPV16 CD4+ al igual que de células T específicas de HPV 16 CD8+ (Figuras 4 y 5). Suponemos que estas reacciones pueden ser el resultado del cebado de las células T. Esto se ha notado también en el 29 % de los pacientes a los que se les sometió a un protocolo de análisis de piel de tuberculina de 2 pasos y que fueron solo positivos en la segunda ronda de pruebas (Akçay, 2003). En general, las respuestas de célula T inducidas por la vacuna llegaron al punto máximo 10-14 días después de la vacunación y no a las tres semanas. No obstante, se debe tener presente que en tal protocolo se inyecta una dosis de antígeno más alta al igual que adyuvantes fuertes. Por lo tanto es razonable asumir que las respuestas de célula T inducidas por la inoculación intradérmica se desarrollan más lentamente y alcanzan un valor máximo en un periodo más tardío. Puesto que la inoculación del péptido intradérmica en voluntarios sanos da como resultado la inducción de células T específicas de HPV16 tanto CD4+ como CD8+, por lo tanto, debería ser considerada como una única vacunación de dosis baja.

[0083] El objetivo principal de este estudio piloto era validar el uso de la prueba específica de piel de HPV16 para detectar de respuestas inmunológicas *in vivo* de tipo 1. En voluntarios sanos, una reacción cutánea positiva en 13 días está relacionada, de hecho, con la presencia de células T circulantes de memoria que producen IFN γ como se detectó en el ELISPOT para IFN γ *in vitro*. De manera importante, también observamos discrepancias entre los resultados obtenidos por la prueba cutánea y ELISPOT. En un número de casos, las células T circulantes específicas de HPV 16 que producen IFN γ fueron detectadas en las muestras de sangre después de la inoculación pero sin una reacción cutánea concomitante y viceversa (Figura 3A), y esto se puede considerar como un resultado falso negativo o falso positivo. Para entender completamente el impacto de esto en la interpretación de la detección de la inmunidad de tipo 1 contra el HPV, hemos iniciado una prueba de campo en un grupo amplio de pacientes y voluntarios sanos en Indonesia.

Tabla 1 Características del paciente

| paciente | edad (años) | diagnóstico | grado/etapa | Tratamiento | tiempo (meses) ^a | HPV |
|----------|-------------|-------------|-----------------|-----------------------|-----------------------------|-------|
| 1 | 72 | CxCa | IB ^b | Histerectomía radical | 9 | 16 |
| 2 | 57 | CxCa | IA | Histerectomía radical | 18 | 16 |
| 3 | 57 | CxCa | IIB | Radioterapia | 36 | ? |
| 4 | 50 | CxCa | IB | Histerectomía radical | 6 | 16 |
| 5 | 44 | CxCa | IA | Histerectomía | 36 | 16 |
| 6 | 53 | CxCa | IIB | Quimiorradioterapia | 36 | 16neg |
| 7 | 34 | CxCa | IB | Histerectomía radical | 48 | ? |
| 8 | 44 | CxCa | IB | Histerectomía radical | 7 | 16 |

| | | | | | | |
|----|----|------|-----|-----------------------|----|-----|
| 9 | 43 | CxCa | IB | Histerectomía radical | 39 | 16 |
| 10 | 32 | CxCa | IA | Histerectomía radical | 20 | ? |
| 11 | 58 | CxCa | IB | Histerectomía radical | 74 | 18 |
| 12 | 44 | CxCa | IIA | Histerectomía radical | 10 | 16 |
| 13 | 28 | CIN | Yo | LEEP ^c | 0 | neg |
| 14 | 29 | CIN | III | LEEP | 2 | ? |
| 15 | 42 | CIN | II | LEEP | 3 | ? |
| 16 | 49 | CIN | III | LEEP | 60 | 18 |
| 17 | 44 | CIN | III | LEEP | 12 | 16 |

^aTiempo de tratamiento antes de que las pruebas cutáneas fueran realizadas ^bFase de cáncer cervical según el procedimiento de escisión electroquirúrgico de FIGO^c Loop

Referencias

[0084]

- 5 Akcay, A., Erdem, Y., Altun, B., Usalan, C., Agca, E., Yasavul, U., Turgan, C., and Caglar, S. The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am. J. Infect. Control*, 31: 371-374, 2003.
- 10 Alvarez D. *et al*, *J. of Immunology*, (2005), 174:1664-1674
- Black, C. A. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol. Online. J.*, 5: 7, 1999.
- 15 Bleumer, I., Tiemessen, D. M., Oosterwijk-Wakka, J. C., Voller, M. C., De Weijer, K., Mulders, P. F., and Oosterwijk, E. Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. *J. Immunother.*, 30: 116-122, 2007.
- 20 Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., van den Muysenberg, A. J., Verheijen, R. H., Stukart, M. J., Meijer, C. J., Scheper, R. J., Stacey, S. N., Duggan-Keen, M. F., Stem, P. L., Man, S., Borysiewicz, L. K., and Walboomers, J. M. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int. J. Cancer*, 88: 92-98, 2000.
- 25 Bosch *et al.*, Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87, 796-802 (1995).
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J., and Shah, K. V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.*, 55: 244-265, 2002.
- 30 Burk, R. D., Kelly, P., Feldman, J., Bromberg, J., Vermund, S. H., DeHovitz, J. A., and Landesman, S. H. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm. Dis.*, 23: 333-341, 1996.
- 35 Dyson *et al.*, The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 (4893): 934, 1989
- Chambers, M. A., Stacey, S. N., Arrand, J. R., and Stanley, M. A. Delayed-type hypersensitivity response to human papillomavirus type 16 E6 protein in a mouse model. *J. Gen. Virol.*, 75 (Pt 1): 165-169, 1994.
- 40 Claas, E. C., Melchers, W. J., van der Linden, H. C., Lindeman, J., and Quint, W. G. Human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical carcinomas and metastases of the carcinomas by the polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.*, 135: 703-709, 1989.
- 45 de Jong, A., van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Franken, K. L., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Kenter, G., Vermeij, P., Melief, C. J., and Offringa, R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res.*, 62: 472-479, 2002.
- de Jong, A., van der Hulst, J. M., Kenter, G. G., Drijfhout, J. W., Franken, K. L., Vermeij, P., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Rapid enrichment of human papillomavirus (HPV)-specific polyclonal T cell populations for adoptive immunotherapy of cervical cancer. *Int. J. Cancer*, 114: 274-282, 2005.

- de Jong, A., van Poelgeest, M. I., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res.*, 64: 5449-5455, 2004.
- 5 de Vries, I. J., Bernsen, M. R., Lesterhuis, W. J., Scharenborg, N. M., Strijk, S. P., Gerritsen, M. J., Ruiter, D. J., Figdor, C. G., Punt, C. J., and Adema, G. J. Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J. Clin. Oncol.*, 23: 5779-5787, 2005.
- 10 Evander, M., Edlund, K., Gustafsson, A., Jonsson, M., Karlsson, R., Rylander, E., and Wadell, G. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J. Infect. Dis.*, 171: 1026-1030, 1995.
- 15 Evans, E. M., MAN, S., EVANS, A. S. AND BORYSIEWICZ, L. K., Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.*, 57, 2943-2950 (1997).
- Feltkamp *et al.*, Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* 23 (9): 2242, 1993
- 20 Halpert *et al.*, Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 68 (2): 251, 1986
- Han *et al.*, Protection of rabbits from viral challenge by gene gun-based intracutaneous vaccination with a combination of cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6, and E7 genes. *J Virol* 73 (8): 7039, 1999.
- 25 Ho GY *et al.*, Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 56 (6):788, 1994
- 30 Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J., and Burk, R. D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, 338: 423-428, 1998.
- Hopfl, R. M., Christensen, N. D., Angell, M. G., and Kreider, J. W. Skin test to assess immunity against cottontail rabbit papillomavirus antigens in rabbits with progressing papillomas or after papilloma regression. *J. Invest Dermatol.*, 101: 227-231, 1993.
- 35 Hopfl, R., Heim, K., Christensen, N., Zumbach, K., Wieland, U., Volgger, B., Widschwendter, A., Haimbuchner, S., Muller- Holzner, E., Pawlita, M., Pfister, H., and Fritsch, P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet*, 356: 1985-1986, 2000.
- 40 Hopfl, R., Sandbichler, M., Sepp, N., Heim, K., Muller-Holzner, E., Wartusch, B., Dapunt, O., Jochmus-Kudielka, I., ter Meulen, J., Gissmann, L., and. Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 337: 373- 374, 1991.
- Huebner, R. E., Schein, M. F., and Bass, J. B., Jr. The tuberculin skin test. *Clin. Infect. Dis.*, 17: 968-975, 1993.
- 45 Jaeger, E., Bernhard, H., Romero, P., Ringhoffer, M., Arand, M., Karbach, J., Ilseemann, C., Hagedorn, M., and Knuth, A. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides *in vivo*: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int. J. Cancer*, 66: 162-169, 1996.
- 50 Jeffries, D. J., Hill, P. C., Fox, A., Lugos, M., Jackson-Sillah, D. J., Adegbola, R. A., and Brookes, R. H. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in The Gambia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 10: 192-198, 2006.
- Jenkins, D., Sherlaw-Johnson, C., and Gallivan, S. Can papilloma virus testing be used to improve cervical cancer screening? *Int. J. Cancer*, 65: 768-773, 1996.
- 55 Jondal *et al.*, MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity* 5 (4): 295, 1996
- Karlsson, R., Jonsson, M., Edlund, K., Evander, M., Gustavsson, A., Boden, E., Rylander, E., and Wadell, G. Lifetime number of partners as the only independent risk factor for human papillomavirus infection: a population-based study. *Sex Transm. Dis.*, 22: 119-127, 1995.
- 60

- Kast *et al.*, Protection against lethal Sendai virus infection by *in vivo* priming of virusspecific cytotoxic T lymphocytes with a free synthetic peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 (6): 2283, 1991
- 5 Kjaer, S. K., van den Brule, A. J., Paull, G., Svare, E. I., Sherman, M. E., Thomsen, B. L., Suntum, M., Bock, J. E., Poll, P. A., and Meijer, C. J. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. BMJ, 325: 572, 2002.
- 10 Koutsky Epidemiology of genital human papillomavirus infection. Am J Med 102 (5A): 3, 1997.
- Kurts *et al.*, CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self antigens and favors autoimmunity. J Exp Med 186 (12): 2057, 1997
- 15 Marrazzo *et al.*, Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women: a review. Am J Obstet Gynecol 183 (3): 770, 2000
- Matorras *et al.*, Human immunodeficiency virus-induced immunosuppression: a risk factor for human papillomavirus infection. Am J Obstet Gynecol 164(1 Pt 1): 42, 1991
- 20 Melief *et al.*, Strategies for Immunotherapy of Cancer. Adv. Immunol., 75, 235-281 (2000).
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., and Meijer, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N. Engl. J. Med., 348: 518- 527, 2003.
- 25 Nakagawa, M., Stites, D. P., Farhat, S., Sisler, J. R., Moss, B., Kong, F., Moscicki, A. B., and Palefsky, J. M. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: relationship to cervical intraepithelial neoplasia. J. Infect. Dis., 175: 927-931, 1997.
- 30 Nijman, H. W., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. Int. J. Cancer, 118: 675-683, 2006.
- 35 Nimako *et al.*, Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. Cancer Res., 57, 4855-4861 (1997).
- Nimako, M., Fiander, A. N., Wilkinson, G. W., Borysiewicz, L. K., and Man, S. Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. Cancer Res., 57: 4855-4861, 1997.
- 40 Ossendorp *et al.*, Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. J. Exp. Med. 187 (5): 1, 1998.
- Ozsaran, A. A., Ates, T., Dikmen, Y., Zeytinoglu, A., Terek, C., Erhan, Y., Ozacar, T., and Bilgic, A. Evaluation of the risk of cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection in renal transplant patients receiving immunosuppressive therapy. Eur. J. Gynaecol. Oncol., 20: 127-130, 1999.
- 45 Pardoll *et al.*, The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. Curr. Opin. Immunol., 10, 588-94 (1998).
- 50 Platt, J. L., Grant, B. W., Eddy, A. A., and Michael, A. F. Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. J. Exp. Med., 158: 1227-1242, 1983.
- Poulter, L. W., Seymour, G. J., Duke, O., Janossy, G., and Panayi, G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. Cell Immunol., 74: 358-369, 1982.
- 55 Reimann *et al.*, Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. Curr Opin Immunol 9 (4): 462, 1997
- 60 Ressing *et al.*, Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies of HLA-A*0201 binding peptides. J. Immunol., 154, 5934-5943(1995).

- Ressing *et al.*, Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J. Immunother.*, 23, 255-66 (2000).
- 5 Ressing *et al.*, Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.*, 56, 582-588 (1996).
- 10 Remmink, A. J., Walboomers, J. M., Helmerhorst, T. J., Voorhorst, F. J., Rozendaal, L., Risse, E. K., Meijer, C. J., and Kenemans, P. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. *Int. J. Cancer*, 61: 306-311, 1995.
- 15 Rieser, C., Ramoner, R., Holth, L., Rogatsch, H., Papesh, C., Stenzl, A., Bartsch, G., and Thurnher, M. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol. Int.*, 63: 151-159, 1999.
- 20 Romani N. *et al*, Springer Semin Immunopathol., (1992), 13:265-279.
- 20 Schoenberger *et al.*, T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393 (6684): 480, 1998.
- 25 Selvakumar *et al.*, Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol* 69(1): 602, 1995.
- 25 Sscheffner *et al.*, The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (6): 1129, 1990.
- 30 Sun, X. W., Kuhn, L., Ellerbrock, T. V., Chiasson, M. A., Bush, T. J., and Wright, T. C., Jr. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.*, 337: 1343-1349, 1997.
- 30 Thomas-Kasel, A. K., Zeiser, R., Jochim, R., Robbel, C., Schultze-Seemann, W., Waller, C. F., and Veelken, H. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int. J. Cancer*, 119: 2428-2434, 2006.
- 35 Toes *et al.*, Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (15):7855, 1996a.
- 40 Toes *et al.*, Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol* 156 (10): 3911, 1996b.
- 40 Toes *et al.*, CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J. Exp. Med.*, 189, 753-756 (1999).
- 50 Turk, J. L. Delayed hypersensitivity. 2nd ed. 1975. Amsterdam, Elsevier. Ref Type: Generic
- 45 Vambutas, A., DeVoti, J., Nouri, M., Drijfhout, J. W., Lipford, G. B., Bonagura, V. R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Therapeutic vaccination with papillomavirus E6 and E7 long peptides results in the control of both established virus-induced lesions and latently infected sites in a pre-clinical cottontail rabbit papillomavirus model. *Vaccine*, 23: 5271-5280, 2005.
- 50 van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., Geluk, A., van der, K. M., Pontesilli, O., Hovenkamp, E., Franken, K. L., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Ottenhoff, T. H., Melief, C. J., and Offringa, R. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J. Immunol.*, 162: 152-160, 1999.
- 55 van der Burg, S. H., Ressing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., and Offringa, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int. J. Cancer*, 91: 612-618, 2001.
- 60

van Poelgeest, M. I., Nijhuis, E. R., Kwappenberg, K. M., Hamming, I. E., Wouter, D. J., Fleuren, G. J., van der Zee, A. G., Melief, C. J., Kenter, G. G., Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res.*, 63: 636-641, 2003.

Vukmanovic-Stejić, M., Reed, J. R., Lacy, K. E., Rustin, M. H., and Akbar, A. N. Mantoux Test as a model for a secondary immune response in humans. *Immunol. Lett.*, 107: 93-101, 2006.

Wang, S., Fan, Y., Brunham, R. C., and Yang, X. IFN-gamma knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. *Eur. J. Immunol.*, 29: 3782-3792, 1999.

Woodfolk, J. A. and Platts-Mills, T. A. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. *J. Immunol.*, 167: 5412-5419, 2001.

Youde, S. J., Dunbar, P. R., Evans, E. M., Fiander, A. N., Borysiewicz, L. K., Cerundolo, V., and Man, S. Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res.*, 60: 365-371, 2000.
Zur Hausen Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1288 : F55, 1996.

LISTA DE SECUENCIAS

[0085]

<110> Academisch ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC

<120> Intradermal HPV peptide vaccination

<130> P6013940PCT

<150> EP.07109287. 8

<151> 2007-05-31

<150> US. 60/941, 070

<151> 2007-05-31

<160> 23

<170> PatentIn version 3. 3

<210> 1

<211> 365

<212> PRT

<213> HPV

<213> HPV

<400> 1

ES 2 482 192 T3

Met Glu Thr Leu Cys Gln Arg Leu Asn Val Cys Gln Asp Lys Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr His Tyr Glu Asn Asp Ser Thr Asp Leu Arg Asp His Ile Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala Arg Glu
 35 40 45
 Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val Val Pro Thr Leu Ala Val
 50 55 60
 Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu Gln Leu Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Thr Ile Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Asn Glu Lys Trp Thr Leu Gln Asp
 85 90 95

ES 2 482 192 T3

Val Ser Leu Glu Val Tyr Leu Thr Ala Pro Thr Gly Cys Ile Lys Lys
100 105 110

His Gly Tyr Thr Val Glu Val Gln Phe Asp Gly Asp Ile Cys Asn Thr
115 120 125

Met His Tyr Thr Asn Trp Thr His Ile Tyr Ile Cys Glu Glu Ala Ser
130 135 140

Val Thr Val Val Glu Gly Gln Val Asp Tyr Tyr Gly Leu Tyr Tyr Val
145 150 155 160

His Glu Gly Ile Arg Thr Tyr Phe Val Gln Phe Lys Asp Asp Ala Glu
165 170 175

<210> 2

Lys Tyr Ser Lys Asn Lys Val Trp Glu Val His Ala Gly Gly Gln Val
180 185 190

Ile Leu Cys Pro Thr Ser Val Phe Ser Ser Asn Glu Val Ser Ser Pro
195 200 205

Glu Ile Ile Arg Gln His Leu Ala Asn His Pro Ala Ala Thr His Thr
210 215 220

Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
225 230 235 240

Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
245 250 255

Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
260 265 270

Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
275 280 285

Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg
290 295 300

Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
305 310 315 320

Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
325 330 335

Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
340 345 350

Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile
355 360 365

<211> 158

<212> PRT

<213> HPV

ES 2 482 192 T3

<400> 2

```

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1          5          10          15

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

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
          35          40          45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
          50          55          60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65          70          75          80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
          85          90          95

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
          100          105          110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
          115          120          125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
130          135          140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145          150          155

```

<210> 3

<211> 98

5 <212> PRT

<213> HPV

<400> 3

ES 2 482 192 T3

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30
 Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95
 Lys Pro

<210> 4
 <211> 365
 5 <212> PRT
 <213> HPV
 <400> 4

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

ES 2 482 192 T3

Cys Phe Lys Lys Gly Gly Gln Thr Val Gln Val Tyr Phe Asp Gly Asn
 115 120 125
 Lys Asp Asn Cys Met Thr Tyr Val Ala Trp Asp Ser Val Tyr Tyr Met
 130 135 140
 Thr Asp Ala Gly Thr Trp Asp Lys Thr Ala Thr Cys Val Ser His Arg
 145 150 155 160
 Gly Leu Tyr Tyr Val Lys Glu Gly Tyr Asn Thr Phe Tyr Ile Glu Phe
 165 170 175
 Lys Ser Glu Cys Glu Lys Tyr Gly Asn Thr Gly Thr Trp Glu Val His
 180 185 190
 Phe Gly Asn Asn Val Ile Asp Cys Asn Asp Ser Met Cys Ser Thr Ser
 195 200 205
 Asp Asp Thr Val Ser Ala Thr Gln Leu Val Lys Gln Leu Gln His Thr
 210 215 220
 Pro Ser Pro Tyr Ser Ser Thr Val Ser Val Gly Thr Ala Lys Thr Tyr
 225 230 235 240
 Gly Gln Thr Ser Ala Ala Thr Arg Pro Gly His Cys Gly Leu Ala Glu
 245 250 255
 Lys Gln His Cys Gly Pro Val Asn Pro Leu Leu Gly Ala Ala Thr Pro
 260 265 270
 Thr Gly Asn Asn Lys Arg Arg Lys Leu Cys Ser Gly Asn Thr Thr Pro
 275 280 285
 Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser Leu Lys Cys Leu Arg Tyr
 290 295 300
 Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg Asp Ile Ser Ser Thr Trp
 305 310 315 320
 His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr Val Thr
 325 330 335
 Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe Leu Asn Thr Val Ala Ile
 340 345 350
 Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr Met Thr Met
 355 360 365

<210> 5
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> HPV

ES 2 482 192 T3

<400> 5

```

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100     105     110

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

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

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

```

<210> 6

<211> 105

5 <212> PRT

<213> HPV

<400> 6

ES 2 482 192 T3

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

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

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

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

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

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

Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
100 105

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

10 <400> 7

Asp Tyr Trp Lys His Met Arg Leu Glu Cys Ala Ile Tyr Tyr Lys Ala
1 5 10 15

Arg Glu Met Gly Phe Lys His Ile Asn His Gln Val Val Pro
20 25 30

<210> 8

<211> 30

15 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

20 <400> 8

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

Leu Ala Val Ser Lys Asn Lys Ala Leu Gln Ala Ile Glu Leu
20 25 30

<210> 9

<211> 30

25 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 9

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

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

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 10

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

Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln
20 25 30

<210> 11

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 11

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

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

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 12

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

Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr
20 25 30

<210> 13

<211> 25

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 13

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp
1 5 10 15
Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
20 25

<210> 14
<211> 26
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 14

Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys
1 5 10 15
Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
20 25

<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 15

Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr
1 5 10 15
Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu
20 25

<210> 16
<211> 25
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 16

His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn
1 5 10 15
Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg
20 25

<210> 17
<211> 33

<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 17

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

Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu
20 25 30

Lys

<210> 18
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 18

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

His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr
20 25 30

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 19

Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg
1 5 10 15

Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
20 25 30

<210> 20
<211> 35
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> PÉPTIDO

<400> 20

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

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

Glu Glu Glu
35

<210> 21

<211> 35

<212> PRT

5 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

10 <400> 21

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

Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn
20 25 30

Ile Val Thr
35

<210> 22

<211> 35

<212> PRT

15 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

20 <400> 22

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
35

<210> 23

<211> 35

<212> PRT

25 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> PÉPTIDO

30 <400> 23

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Leu | Arg | Leu | Cys | Val | Gln | Ser | Thr | His | Val | Asp | Ile | Arg | Thr | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Glu | Asp | Leu | Leu | Met | Gly | Thr | Leu | Gly | Ile | Val | Cys | Pro | Ile | Cys | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Gln | Lys | Pro | | | | | | | | | | | | | |
| | | 35 | | | | | | | | | | | | | |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un péptido derivado de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, donde el medicamento es de administración intradérmica, y donde la enfermedad relacionada con el HPV es seleccionada de una infección por HPV, una malignidad asociada al HPV, una Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN), una Neoplasia Intraepitelial de Vulva (VIN), una Neoplasia Intraepitelial Anal (AIN), una Neoplasia Vaginal Intraepitelial (VAIN), una Neoplasia Intraepitelial de Pene (PIN), un cáncer cervical, un cáncer de vulva, un cáncer anal, un cáncer de cuello y de cabeza o un cáncer de pene.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde al menos un epítipo de HLA de clase II y/o al menos un epítipo de HLA de clase I están presentes dentro de una secuencia de aminoácidos contigua de la secuencia de aminoácidos de al menos una de las proteínas E2, E6, y/o E7 de HPV.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, donde la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua es de 19-45 residuos de aminoácidos contiguos de la proteína E2, E6, y/o E7 de HPV, preferiblemente de 22-45, más preferiblemente de 22-40, más preferiblemente de 22- 35, incluso más preferiblemente de 22, 25, 28, 32 o 35 aminoácidos contiguos.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el medicamento contiene al menos dos péptidos diferentes derivados de las proteínas E2, E6, y/o E7 de HPV.
- 25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las secuencias de aminoácidos contiguas son de las secuencias de aminoácidos de al menos dos de las proteínas E2, E6 y E7 de HPV, preferiblemente de las tres proteínas E2, -E6 y E7 de HPV.
- 30 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el medicamento no comprende un adyuvante.
- 35 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el medicamento consiste en uno o varios péptidos tal y como se define en las reivindicaciones 1-6 y un portador farmacéuticamente aceptable inerte.
- 40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el medicamento contiene un péptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y al menos un adyuvante, no siendo dicho adyuvante formulado en una emulsión a base de aceite en agua y/o no siendo de un tipo de emulsión de aceite en agua.
- 45 9. Uso según la reivindicación 8, donde el medicamento contiene un ligando Receptor Tipo Peaje (TLR) (3, 4, 7, 8, 9) como el lípido monofosforil A y/o ácido nucleico CpG, y/o una molécula coestimuladora de Célula Presentadora de Antígeno (APC) como un ligando CD40, anticuerpos agonísticos o fragmentos funcionales y derivados de los mismos, y/o GM-CSF.
- 50 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el medicamento es administrado intradérmicamente directamente en el sitio de la lesión.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde además un péptido derivado de las proteínas E2, E6, y/o E7 de HPV se usa para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con el HPV, seleccionado de una infección por HPV, una malignidad asociada al HPV, una Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN), una Neoplasia Intraepitelial de Vulva (VIN), una Neoplasia Intraepitelial Anal (AIN), una Neoplasia Intraepitelial Vaginal (VAIN), una Neoplasia Intraepitelial de Pene (PIN), un cáncer cervical, un cáncer de vulva, un cáncer anal, un cáncer de cuello y de cabeza o un cáncer de pene, donde el medicamento es de administración subcutánea.

Fig 1

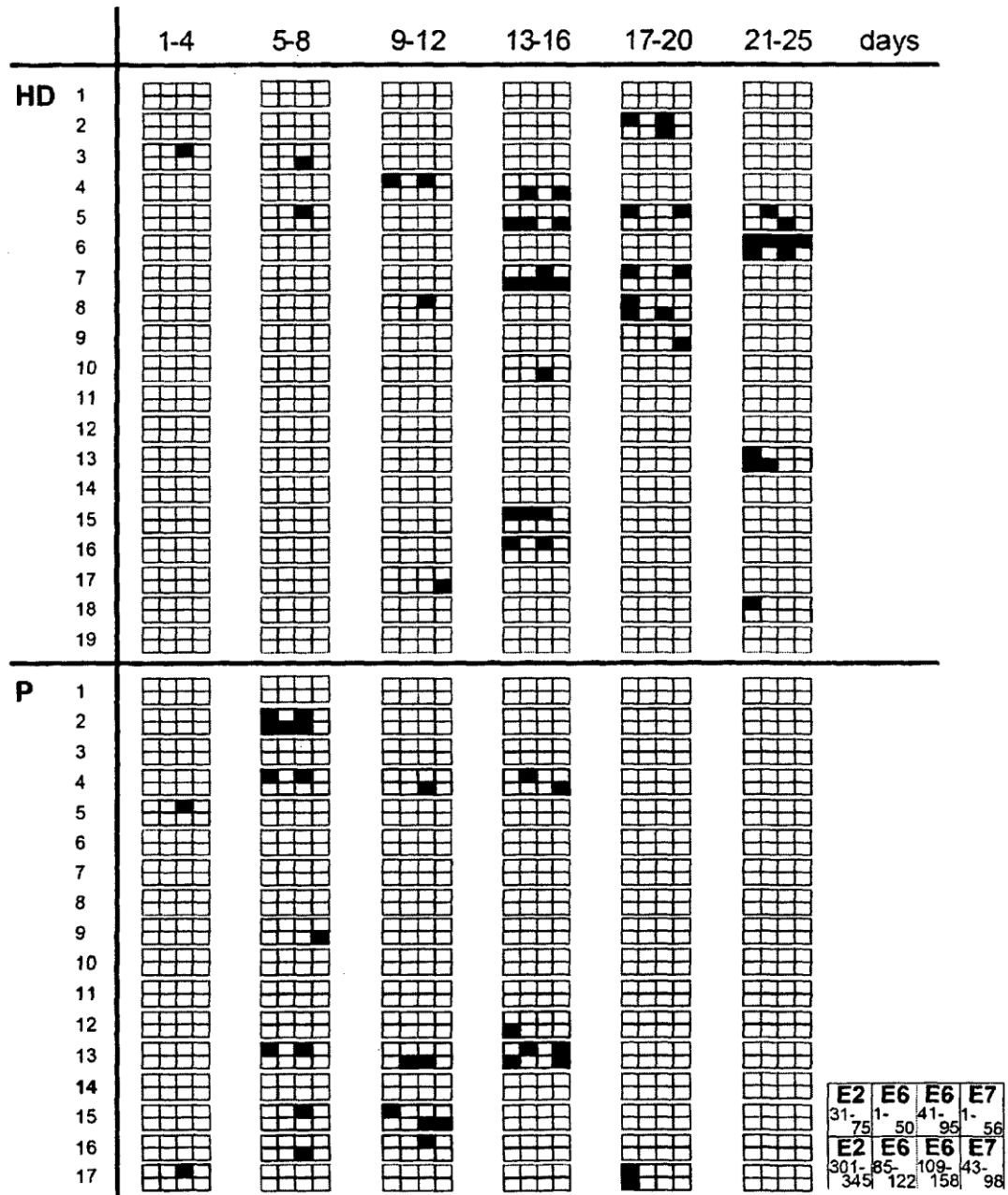


Fig 2

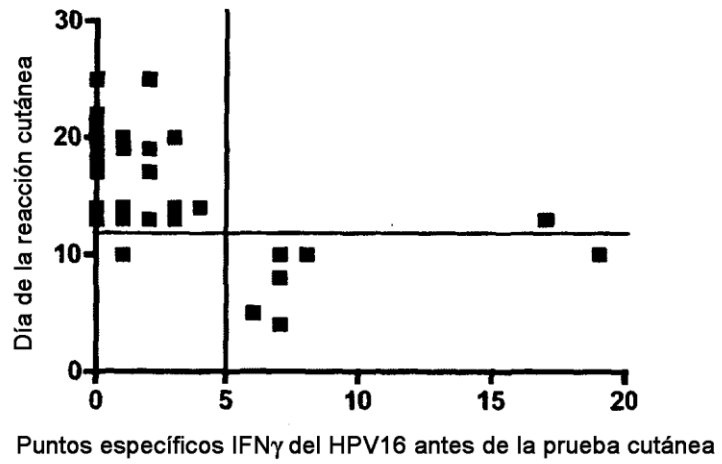


Fig 3a

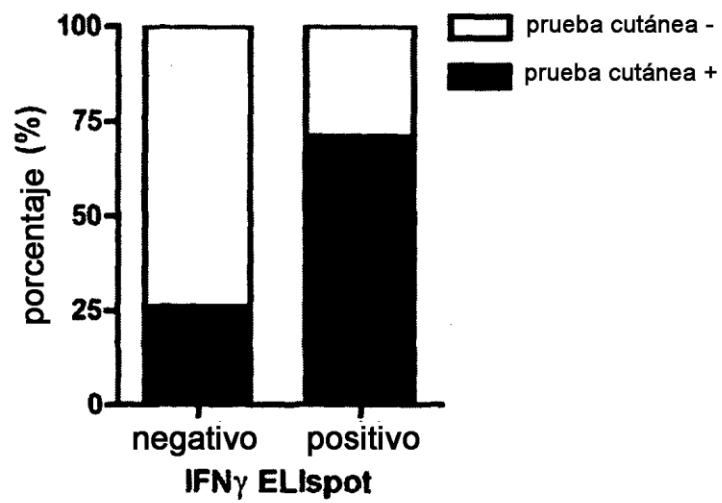


Fig 3b

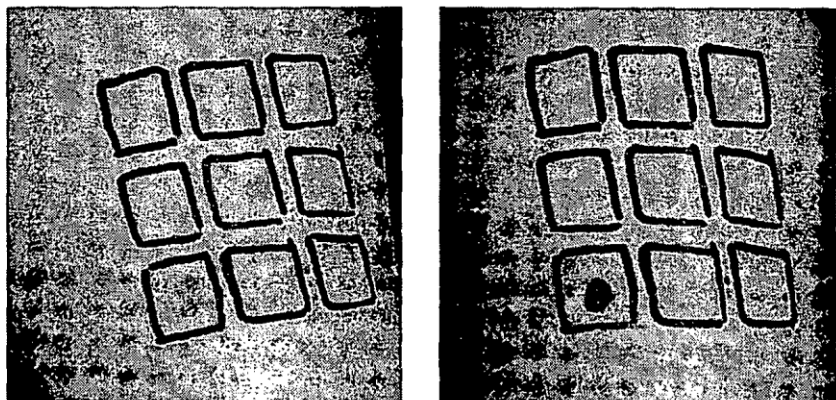


Fig 4

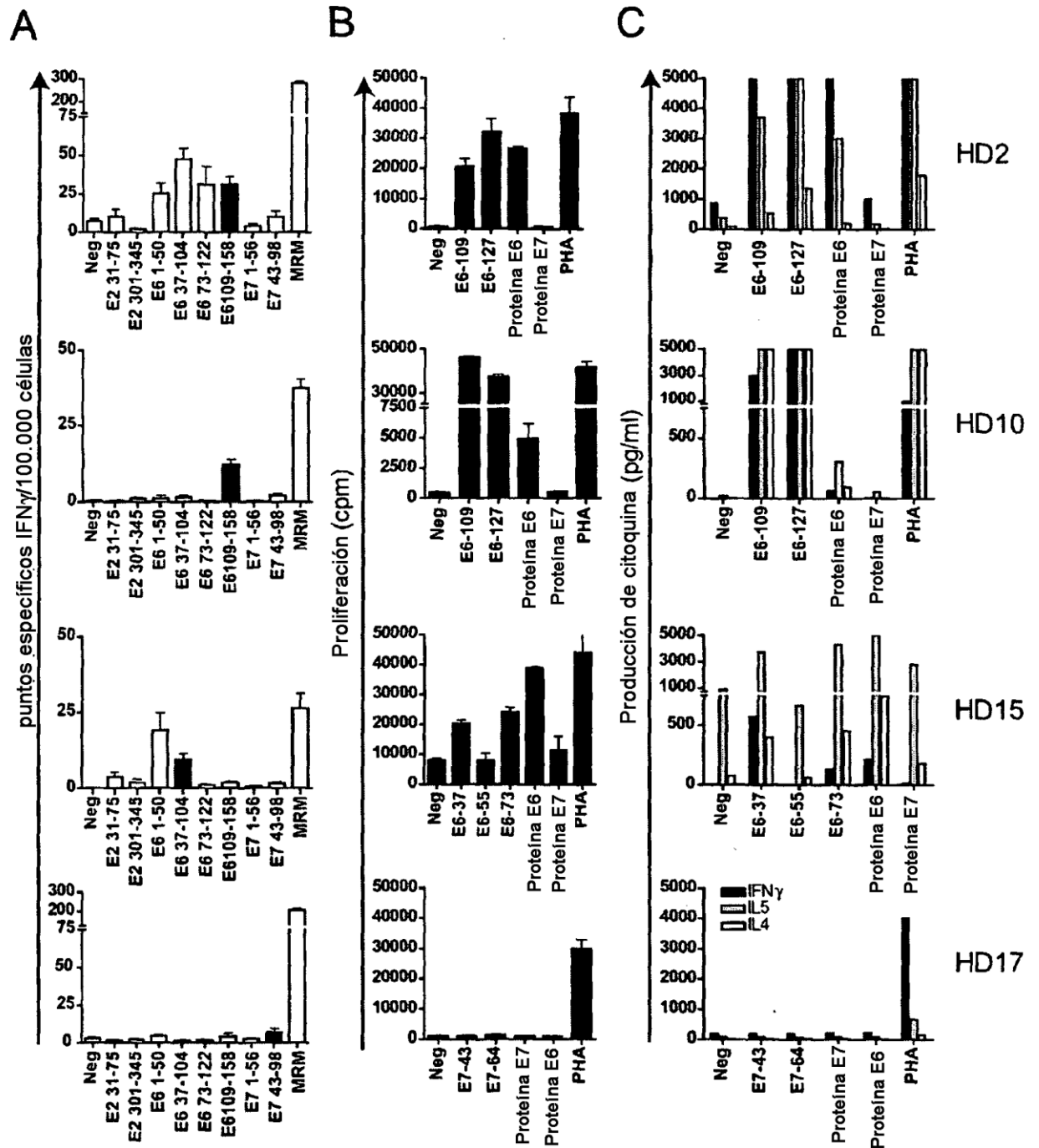


Fig 5

