

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 077**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07121675 .8**
96 Fecha de presentación: **16.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1889630**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Vacunas que comprenden al antígeno MAGE unido a un fragmento de proteína D**

30 Prioridad:
18.10.2000 GB 0025573
18.10.2000 GB 0025574
18.10.2000 US 690921

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.03.2012

73 Titular/es:
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.
RUE DE L'INSTITUT, 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:
Garcon, Nathalie;
Gerard, Catherine Marie, Ghislaine y
Stephenne, Jean

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 377 077 T3

DESCRIPCIÓN

Vacunas que comprenden el antígeno MAGE unido a un fragmento de proteína D

La presente invención se refiere a una nueva formulación que comprende una combinación de un antígeno tumoral o un derivado del mismo y una composición coadyuvante combinada que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante, una saponina y adicionalmente comprende un lipopolisacárido.

A pesar de las enormes inversiones en recursos humanos y financieros, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte. Por ejemplo, el cáncer es la causa principal de muerte en mujeres de edades comprendidas entre 35 y 74 años. El cáncer de mama es la neoplasia más habitual en mujeres, y la incidencia de desarrollo del cáncer de mama está aumentando. Se estima que una de cada nueve mujeres será diagnosticada de la enfermedad. Las metodologías estándar para curar el cáncer de mama se han centrado en una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia. Estas metodologías han dado como resultado acontecimientos alarmantes en algunas neoplasias. Sin embargo, el cáncer de mama es a menudo incurable, cuando se diagnostica más allá de una cierta etapa. Son necesarias metodologías alternativas de diagnóstico y terapia tempranos.

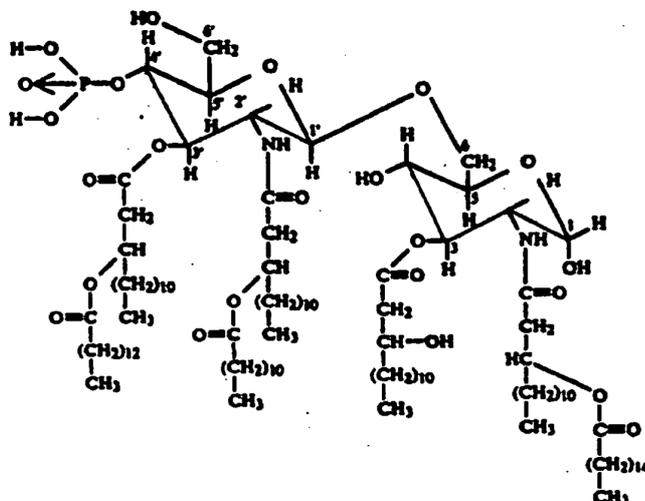
Los oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") se conocen en este campo por ser coadyuvantes cuando se administran tanto por vía sistémica como mucosa (documento WO 96/02555, documento EP 468520, Davis y col., J. Immunol., 1998, 160 (2): 870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 1998, 161 (9): 4463-6). CpG es una abreviatura de los motivos dinucleotídicos de citosina-guanosina presentes en el ADN. Históricamente, se observó que la fracción de ADN de BCG podría ejercer un efecto antitumoral. En estudios adicionales, se demostró que oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias génicas de BCG eran capaces de inducir efectos inmunoestimulantes (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo central CG, portaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación fue elucidado posteriormente en una publicación de Krieg, Nature 374, pág. 546, 1995. Un análisis detallado ha demostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que dichas secuencias son habituales en el ADN bacteriano, pero son raras en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimulante es a menudo: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo dinucleotídico CG no está metilado, pero en la presente invención pueden usarse otras secuencias no CpG metiladas que se sabe que son inmunoestimulantes.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos hay presente una secuencia palindrómica. Muchos de estos motivos, bien, repeticiones de un motivo o bien una combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de uno o más de esta secuencia inmunoestimulante que contiene oligonucleótidos puede activar varios subconjuntos inmunes, incluyendo los linfocitos citolíticos naturales (que producen interferón y tienen actividad citolítica) y los macrófagos (Wooldrige y col Vol. 89 (no. 8), 1977). Aunque ahora se ha demostrado que otras secuencias que contienen CpG no metilados son inmunomoduladoras.

Cuando se formulan CpG en vacunas, generalmente se administra libre en disolución junto con un antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente con un antígeno (publicación PCT Nº WO 98/16247), o formulado con un portador tal como hidróxido de aluminio ((antígeno de superficie de la hepatitis) Davis y col. *supra*; Brazolot-Millan y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 1998, 95 (26), 15553-8).

Las combinaciones coadyuvantes de la presente invención incluyen, en formas de realización preferidas, al menos un coadyuvante derivado del lipopolisacárido enterobacteriano.

Hace mucho que se sabe que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulante del sistema inmune, aunque su uso en coadyuvantes se ha restringido debido sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico del LPS, el monofosforil lípido A (MPL), producido mediante la eliminación del grupo de carbohidrato central y el fosfato del extremo reductor de glucosamina, ha sido descrito por Ribi y col (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, págs. 407-419) y tiene la siguiente estructura:



Una versión desintoxicada adicional del MPL resulta de la eliminación de la cadena de acilo de la posición 3 del esqueleto del disacárido, y se denomina monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Puede purificarse y prepararse mediante los procedimientos enseñados en el documento GB 2122204B, cuya referencia también desvela la preparación del difosforil lípido A, y de variantes 3-O-desaciladas del mismo. Una forma preferida del 3D-MPL estará en la forma de una emulsión con un tamaño de partícula pequeño, inferior a 0,2 μm de diámetro, y su procedimiento de elaboración se desvela en el documento WO 94/21292. Las formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo se han descrito en el documento WO 98/43670A2.

Los coadyuvantes derivados del lipopolisacárido bacteriano que se van a formular en las combinaciones coadyuvantes de la presente invención pueden purificarse y procesarse a partir de fuentes bacterianas, o alternativamente pueden ser sintéticos. Por ejemplo, se describe el monofosforil lípido A purificado en Ribi y col.1986 (*supra*), y el monofosforil o el difosforil lípido A 3-O-desacilado derivado de especies de *Salmonella* se describen en el documento GB 2220211 y en el documento US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (documento WO 98/01139; documento US 6.005.099 y documento EP 0 729 473 B1; Hilgers y col., 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79 (4): 392-6; Hilgers y col., 1987, Immunology, 60 (1): 141-6; y documento EP 0 549 074 B1). Un coadyuvante de lipopolisacárido bacteriano preferido es 3D-MPL.

Las combinaciones de coadyuvantes de 3D-MPL y saponina derivados de la corteza de *Quillaja Saponaria molina* se han descrito en el documento EP 0 761 231B. El documento WO 95/17210 desvela un sistema en emulsión coadyuvante basado en escualeno, α -tocoferol, y polioxitilenmonooleato de sorbitano (TWEEN 80), formulado con el inmunoestimulante QS21, opcionalmente con 3DMPL.

Las saponinas se conocen como coadyuvantes en vacunas para su administración sistémica. La actividad coadyuvante y hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado ampliamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, *supra*). Por ejemplo, el Quil A (derivado de la corteza del árbol suramericano *Quillaja Saponaria Molina*), y fracciones del mismo, se describen en el documento US 5.057.540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y en el documento EP 0 362 279 B 1.

Las estructuras particuladas, denominadas complejos inmunoestimulantes (*Immune Stimulating Complexes*, ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A, son hemolíticas y se han usado en la elaboración de vacunas (Morein, B., documento EP 0 109 942 B1). Se ha informado de que estas estructuras tienen actividad coadyuvante (documento EP 0 109 942 B1; documento WO 96/11711).

Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes coadyuvantes sistémicos, y el procedimiento de su producción se desvela en la patente de EE.UU. N° 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. En estas referencias también se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A), que actúa como un potente coadyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil y col. (1991. J. Immunology, vol. 146, 431-437). También se conocen las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas coadyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7, se describen en el documento WO 96/33739 y en el documento WO 96/11711.

Otras saponinas que se han usado en los estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies vegetales tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford y col., Vaccine, 10 (9): 572-577, 1992).

También se sabe que las saponinas se han usado en estudios de vacunas aplicadas en mucosas, que han cumplido

con un éxito variable la inducción de respuestas inmunes. Previamente se ha demostrado que la saponina Quil-A no tiene efectos inductores de una respuesta inmune cuando se administra el antígeno intranasalmente (Gizurarson y col. 1994. *Vaccine Research* 3, 23-29). Mientras, otros autores han usado este coadyuvante con éxito (Maharaj y col., *Can. J. Microbiol.*, 1986, 32 (5): 414-20; Chavali y Campbell, *Immunobiology*, 174 (3): 347-59). Los ISCOMs que comprenden saponina Quil A se han usado en formulaciones de vacunas intragástricas e intranasales, y han mostrado actividad coadyuvante (Mcl Mowat y col., 1991, *Immunology*, 72, 317-322; Mcl Mowat y Donachie, *Immunology Today*, 12, 383-385).

El QS21, la fracción no tóxica de Quil A, también se ha descrito como coadyuvante oral o intranasal (Sumino y col., *J. Virol.*, 1998, 72 (6): 4931-9; documento WO 98/56415).

Las saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M. y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol. 2, págs. 363-386). Las saponinas son esteroides de glucósidos triterpénicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal marino. Las saponinas destacan por formar disoluciones coloidales en agua que forman espuma al agitar, y por precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de membranas celulares, crean estructuras de poro en la membrana que provocan que la membrana reviente. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de algunas, pero no de todas, las saponinas.

El documento WO 00/09159 desvela que combinaciones de CpG y de saponina tienen efectos inmunoestimulantes.

La presente invención se refiere al sorprendente hallazgo de que las combinaciones de oligonucleótidos inmunoestimulantes (CpG), saponina y un lipopolisacárido son coadyuvantes extremadamente potentes. Consecuentemente, se prevé una combinación de vacuna que comprende una combinación de una saponina, un oligonucleótido inmunoestimulante y un lipopolisacárido con un antígeno tumoral o un derivado del mismo según se define en la reivindicación 1. En una forma de realización preferida, la formulación coadyuvante comprende una saponina, preferiblemente QS21, un oligonucleótido inmunoestimulante y 3D-MPL.

Preferiblemente, la vacuna de la presente invención puede comprender adicionalmente un portador. En una forma preferida de la presente invención, los oligonucleótidos de las composiciones coadyuvantes y de vacuna actúan sinérgicamente con la saponina/lipopolisacárido combinados, en la inducción de respuestas inmunes específicas de antígeno que conducen a un aumento en la regresión tumoral. Las formulaciones son potentes en la inducción de respuestas inmunes asociadas convencionalmente con el sistema inmune de tipo Th1. Consecuentemente, las combinaciones coadyuvantes no son sólo adecuadas para la inmunoprofilaxis de enfermedades, sino también para la inmunoterapia de enfermedades tales como el cáncer.

Las formulaciones contienen un antígeno antitumoral, y son útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación coadyuvante encuentra utilidad con antígenos de rechazo tumoral tales como los de cáncer de próstata, de mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, renal o melanoma. Algunos antígenos ejemplares incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE, tales como los desvelados en el documento WO99/401 PRAME, BAGE, Lage (también conocido como NY Eos 1) SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, págs. 628-636;

Van den Eynde y col., *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (presentada en 1997); Correale y col. (1997), *Journal of the National Cancer Institute* 89, pág. 293. De hecho, estos antígenos se expresan en un amplio intervalo de tipos tumorales tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma vesical.

Los antígenos MAGE pueden expresarse como una proteína de fusión con un incrementador de la expresión o un asociado de fusión inmunológico. En la presente invención, el derivado es una proteína de fusión que comprende un antígeno de la familia de proteínas MAGE unido a un asociado heterólogo, según se define en la reivindicación 1, preferiblemente MAGE 3. Las proteínas pueden conjugarse químicamente, pero preferiblemente se expresan como proteínas de fusión recombinantes, permitiendo que se produzca un incremento en los niveles que se van a producir en un sistema de expresión en comparación con la proteína no fusionada. Por lo tanto, el asociado de fusión puede ayudar a proporcionar epítomos de linfocitos T colaboradores (asociado de fusión inmunológico), preferiblemente epítomos de linfocitos T colaboradores reconocidos por seres humanos, o ayudar a expresar la proteína (incrementador de la expresión) con un rendimiento mayor que la proteína recombinante natural. Preferiblemente, el asociado de fusión será tanto un asociado de fusión inmunológico como un asociado incrementador de la expresión.

El asociado de fusión inmunológico deriva de la proteína D, una proteína de superficie de la bacteria gramnegativa *Haemophilus influenza B* (documento WO91/18926). El derivado de la proteína D comprende aproximadamente el primer 1/3 de la proteína, en particular aproximadamente los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales. Preferiblemente, el derivado de la proteína D está lipidado. Preferiblemente, los primeros 109 residuos del asociado de fusión Lipoproteína D están incluidos en el N-terminal para proporcionar al antígeno candidato a vacuna con epítomos adicionales exógenos de los linfocitos T y aumentar el nivel de expresión en E-coli (actuando así también como un incrementador de la expresión). La cola lipídica asegura una óptima presentación del antígeno a las células presentadoras del antígeno.

Los asociados de fusión inmunológicos mencionados anteriormente también son ventajosos para coadyuvar en la

expresión. En particular, dichas fusiones se expresan con mayores rendimientos que las proteínas MAGE recombinantes naturales. Dichos constructos se desvelan en el documento WO 99/40188.

Los oligonucleótidos preferidos para su uso en coadyuvantes o vacunas de la presente invención contienen preferiblemente dos o más motivos del dinucleótido CpG separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son normalmente desoxinucleótidos. En una forma de realización preferida, el internucleótido del oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace de fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos están el ámbito de la invención, incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforoditioato o fosforoditioato se describen en el documento US5.666.153, en el documento US5.278.302 y en el documento WO95/26204.

Algunos ejemplos de los oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen preferiblemente enlaces internucleotídicos de fosforoditioato modificado. OLIGO 1 (ID. SEC. N°: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) OLIGO 2 (ID. SEC. N°: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) OLIGO 3 (ID. SEC. N°: 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG OLIGO 4 (ID. SEC. N°: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTTGTC GTT (CpG 2006) OLIGO 5 (ID. SEC. N°: 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

Algunos oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores porque tienen deleciones o adiciones intrascendentes en los mismos.

Los oligonucleótidos CpG usados en la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier procedimiento conocido en la materia (por ejemplo, el documento EP 468520). Convenientemente, dichos oligonucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador automático. Normalmente tienen entre 10-50 bases de longitud.

Los oligonucleótidos usados en la presente invención son normalmente desoxinucleótidos. En una forma de realización preferida, el enlace internucleotídico es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace de fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster están el ámbito de la presente invención. Se contemplan oligonucleótidos que comprenden diferentes enlaces internucleotídicos, por ejemplo, fosforotioato fosfodiésteres mixtos. Pueden usarse otros enlaces internucleotídicos que establezcan el oligonucleótido.

Las saponinas que pueden usarse en las combinaciones coadyuvantes de la presente invención incluyen aquellas derivadas de la corteza de *Quillaja Saponaria Molina*, denominada Quil A, y fracciones de las mismas, descritas en el documento US 5.057.540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55; y en el documento EP 0 362 279 B1. Las fracciones particularmente preferidas de Quil A son QS21, QS7 y QS17.

La β -escina es otra de las saponinas hemolíticas preferidas para su uso en las composiciones coadyuvantes de la presente invención. La escina se describe en el índice Merck (12ª ed: entrada 3737) como una mezcla de saponinas presente en la semilla del castaño de indias, Lat: *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe mediante cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y mediante resinas de intercambio iónico (Erbring y col., documento US 3.238.190). Se han purificado las fracciones de escina, [y], y han mostrado ser biológicamente activas (Yoshikawa M, y col. (Chem Pharm Bull (Tokyo) 1996 Aug;44(8):1454-1464)). La β -escina también se conoce como aescina.

Otra saponina hemolítica preferida para su uso en la presente invención es la digitonina. La digitonina se describe en el índice Merck (12ª ed: entrada 3204) como una saponina, derivada de las semillas de *Digitalis purpurea* y purificadas según el procedimiento descrito por Gisvold y col., J. Am. Pharm. Assoc., 1934, 23, 664; y Ruhenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1935, 301, 621. Su uso se describe por ser un reactivo clínico para la determinación del colesterol.

Las combinaciones coadyuvantes de la presente invención pueden comprender adicionalmente un portador, tal como la saponina o los CpG, o puede asociarse un lipopolisacárido con una entidad portadora particulada para incrementar la coadyuvancia de la combinación. Las vacunas sistémicas particularmente preferidas comprenden, por ejemplo, una molécula portadora.

Los CpG usados en las combinaciones coadyuvantes de la presente invención pueden estar libres en disolución o pueden complejarse con portadores particulados tales como sales minerales (por ejemplo, pero no restringidas a, sales de aluminio o de calcio), liposomas, ISCOMs, emulsiones (de aceite en agua, de agua en aceite, de agua en aceite en agua), polímeros (tales como, pero no restringidos a, poliláctico, poliglicólico, polifosfacina, poliaminoácido, alginato, quitosán) o micropartículas. Preferiblemente dichos portadores son catiónicos. Las vacunas de la presente invención comprenden adicionalmente un antígeno que puede asociarse con el complejo CpG-portador, o puede no asociarse con el complejo CpG-portador. En este caso, el antígeno puede estar libre en suspensión o asociado a un portador por separado.

Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden estar separadas en forma de micelas, o pueden estar en forma de grandes estructuras ordenadas tales como ISCOMs (documento EP 0 109 942 B1) o liposomas (documento WO 96/33739) cuando se formulan con colesterol y lípidos, o en forma de una emulsión de aceite en

agua (documento WO 95/17210). Las saponinas pueden asociarse preferiblemente con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287). Alternativamente, la saponina puede asociarse con un portador particulado tal como quitosán. La saponina también puede estar en un estado seco tal como un polvo. Las formulaciones finales en la forma en que se van a administrar a la superficie de la mucosa del paciente que recibirá la vacuna son preferiblemente de naturaleza hemolítica. La saponina puede estar o no asociada físicamente con el antígeno, bien a través de un enlace directo o bien mediante cointeracción con la misma molécula portadora particulada (documento GB9822712.7; documento WO 98/16247).

Los CpG y la saponina y el lipopolisacárido de los coadyuvantes o vacunas de la presente invención pueden estar individuales o asociados. Por ejemplo, los CpG y las saponinas pueden estar libres en suspensión o pueden asociarse a través de un portador, más particularmente un portador particulado tal como hidróxido de aluminio, o mediante un liposoma catiónico o un ISCOM.

Una combinación coadyuvante preferida según la presente invención está formada por uno o más oligonucleótidos CpG que contienen al menos 3, preferiblemente al menos 6 nucleótidos entre dos motivos CG adyacentes, junto con QS21 y un portador particulado elegido del grupo formado por una emulsión de aceite en agua o DQ. El lipopolisacárido es un derivado di o monofosforil lipídico, preferiblemente 3 des-O acilado, en particular monofosforil Lípido A 3 des-O acilado.

La vacuna preferida de la presente invención se usa para generar respuestas inmunes sistémicas tras su administración a un individuo a través de una vía sistémica.

Las combinaciones coadyuvantes de la presente invención pueden comprender una emulsión basada en aceite. Los coadyuvantes en emulsión de aceite se conocen desde hace muchos años, incluyendo el trabajo con coadyuvantes en emulsión de aceite mineral de Freund completos e incompletos. Desde entonces se ha realizado mucho trabajo para diseñar alternativas estables y bien toleradas a estas formulaciones coadyuvantes potentes pero reactógenas.

Se han descrito muchos sistemas de emulsión en fase única o múltiple. Se ha sugerido que los coadyuvantes de emulsión de aceite en agua son *per se* útiles como composiciones coadyuvantes (documento EP O 399 843B), también se han descrito combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros principios activos como coadyuvantes para vacunas (documento WO 95/17210; documento WO 98/56414; documento WO 99/12565; documento WO 99/11241). Se han descrito otros coadyuvantes de emulsión oleosos, tales como emulsiones de agua en aceite (documento US 5.422.109; documento EP O 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (documento US 5.424.067; documento EP O 480 981 B).

Los coadyuvantes de emulsión oleosos para su uso en la presente invención pueden ser naturales o sintéticos, y pueden ser minerales u orgánicos. Algunos ejemplos de aceites minerales y orgánicos serán fácilmente apreciables por el experto en la materia.

Con objeto de que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para su administración a seres humanos, la fase oleosa del sistema en emulsión comprende preferiblemente un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la materia. Metabolizable puede definirse como "ser capaz de ser transformado por el metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W. B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético que no sea tóxico para el receptor y que sea capaz de ser transformado por el metabolismo. Los frutos secos (tal como el aceite de cacahuete), las semillas y los granos son fuentes habituales de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también forman parte de esta invención, y pueden incluir aceites disponibles comercialmente tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en menores cantidades en el aceite de oliva, el aceite de germen de trigo, el aceite de fibra de arroz y en la levadura, y es un aceite particularmente preferido para su uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho de que es un intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice Merck, 10ª Edición, entrada nº 8619).

Emulsiones oleosas particularmente preferidas son emulsiones de aceite en agua, y en particular emulsiones de escualeno en agua.

Además, los coadyuvantes de emulsión oleosos más preferidos de la presente invención comprenden un antioxidante, que es preferiblemente el aceite α -tocoferol (vitamina E, documento EP O 382 271 1B1).

Los documentos WO 95/17210 y WO 99/11241 desvelan coadyuvantes de emulsión basados en escualeno, α -tocoferol y TWEEN 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL. El documento WO 99/12565 desvela una mejora en estas emulsiones de escualeno con la adición de un esteroide en la fase oleosa. Adicionalmente puede añadirse un triglicérido, tal como tricaprilina (C₂₇H₅₀O₆), a la fase oleosa con objeto de estabilizar la emulsión (documento WO 98/56414).

El tamaño de las gotitas de aceite encontradas en la emulsión estable de aceite en agua es preferiblemente menor de 1 micrómetro, pueden estar en el intervalo de sustancialmente 30-600 nm, preferiblemente sustancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro, y muy preferiblemente sustancialmente de 150-500 nm de diámetro, y en

particular de aproximadamente 150 nm de diámetro, medido mediante espectroscopia de correlación fotónica. A este respecto, el 80% de las gotitas de aceite en número deberían estar dentro de los intervalos preferidos, más preferiblemente más del 90% y muy preferiblemente más del 95% de las gotitas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones oleosas de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de desde el 2 hasta el 10% de aceite, tal como escualeno; y cuando está presente, del 2 al 10% de α -tocoferol; y del 0,3 al 3% de tensioactivo, tal como polioxietileno monooleato de sorbitano. Preferiblemente, la proporción de aceite: α -tocoferol es igual o inferior a 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente Span 85 a un nivel de aproximadamente el 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante.

El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido para el experto en la materia. Habitualmente, el procedimiento comprende la mezcla de la fase oleosa con un tensioactivo tal como una disolución de PBS/ TWEEN80™, seguido de una homogeneización usando un homogeneizador, para el experto en la materia estaría claro que un procedimiento que comprende hacer pasar la mezcla dos veces a través de la aguja de una jeringa sería adecuado para homogeneizar volúmenes pequeños del líquido. Igualmente, el proceso de emulsionado en un microfluidificador (máquina de microfluidificación M110S, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una presión máxima de entrada de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) podría ser adaptado por el experto en la materia para producir volúmenes menores o mayores de emulsión. Esta adaptación podría conseguirse mediante la especificación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se consigue una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.

Las combinaciones coadyuvantes de la presente invención pueden usarse como coadyuvante sistémico o mucoso. En una forma particular de la invención, se prevé una vacuna sistémica para ser administrada a través de una vía sistémica o parenteral tal como una administración por vía intramuscular, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Una vía de administración preferida es la vía transdérmica, por ejemplo, mediante parches cutáneos.

Las preparaciones de vacunas sistémicas de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible a, o que padece, una enfermedad, mediante la administración de dicha vacuna por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intravenosa o subcutánea. Los procedimientos de administración sistémica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (documento WO99/27961), o un dispositivo de inyección de líquidos a presión sin agujas (documento US 4.596.556; documento US 5.993.412), o parches transdérmicos (documento WO 97/48440; documento WO 98/28037). La presente invención también puede usarse para mejorar la inmunogenicidad de antígenos aplicados sobre la piel (administración transdérmica o transcutánea, documento WO 98/20734; documento WO 98/28037). Se desvela un dispositivo de administración para la administración sistémica precargado con las composiciones de vacuna de la presente invención.

Alternativamente, las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para proteger o tratar a un mamífero susceptible a, o que padece, una enfermedad, mediante la administración de dicha vacuna a través de una vía mucosa, tal como la vía oral/alimentaria o nasal. Las vías mucosas alternativas son intravaginal e intrarrectal. La vía de administración mucosa preferida es la vía nasal, denominada vacunación intranasal. Los procedimientos de vacunación intranasal son bien conocidos en la materia, incluyendo la administración de una gotita, un aerosol o una forma pulverizada seca de la vacuna en la nasofaringe del individuo que se va a inmunizar. Las formulaciones de vacuna nebulizadas o aerosolizadas también forman parte de esta invención. Las formulaciones entéricas tales como cápsulas y gránulos gastroresistentes para su administración por vía oral, los supositorios para su administración por vía rectal o vaginal, también forman parte de esta invención.

Las combinaciones coadyuvantes representan una clase de coadyuvantes mucosos adecuados para su aplicación en seres humanos para sustituir la vacunación sistémica por la vacunación mucosa. En una forma preferida de la invención pueden usarse saponinas puras tales como Quil A, o derivados de las mismas, incluyendo QS21; escina; digitonina; o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa* en combinación con oligonucleótidos inmunoestimulantes y un lipopolisacárido, según se define en la reivindicación 1, como coadyuvantes para la administración mucosa de antígenos para conseguir una respuesta inmune sistémica

Las combinaciones coadyuvantes se usan en la formulación de vacunas, vacunas que pueden administrarse por vía sistémica o por vía mucosa. Preferiblemente, cuando se usan las vacunas para su administración por vía mucosa, la combinación coadyuvante comprende una saponina hemolítica.

Para su administración por vía mucosa, la composición de la invención comprende preferiblemente una saponina hemolítica. La saponina hemolítica, o preparación de saponina, con el significado de esta invención, debe determinarse con referencia al siguiente ensayo.

1. Se lava sangre fresca de cobaya con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) 3 veces en una centrifuga de sobremesa. Después de resuspender hasta el volumen original, la sangre se diluye adicionalmente 10 veces en PBS.

2. Se añaden 50 µl de esta suspensión sanguínea a 800 µl de PBS que contiene diluciones de dos veces de tensioactivo o de saponina.

3. Después de 8 horas se evalúa la hemólisis visualmente o midiendo la densidad óptica del sobrenadante. La presencia de un sobrenadante rojo, que absorbe luz a 570 nm, indica la presencia de hemólisis.

5 4. Los resultados se expresan como la concentración de la primera dilución de saponina a la cual ya no se produce hemólisis.

10 Para los propósitos de esta invención, la preparación coadyuvante de Saponina es hemolítica si lisa los eritrocitos a una concentración de menos del 0,1%. Como medio de referencia, muestras sustancialmente puras de QuilA, QS21, QS7, digitonina y β-escina son todas saponinas hemolíticas según se define en este ensayo. Dentro de la inherente variabilidad experimental de dicho ensayo biológico, las saponinas de la presente invención tienen preferiblemente una actividad hemolítica de aproximadamente entre el 0,5-0,00001%, más preferiblemente de entre el 0,05-0,00001%, incluso más preferiblemente de entre el 0,005-0,00001%, y muy preferiblemente de entre el 0,001-0,0004%. Idealmente, dichas saponinas deberían tener una actividad hemolítica similar (es decir, dentro de una diferencia de diez veces) a la del QS21.

15 Las vacunas de la presente invención también pueden administrarse por vía oral. En dichos casos, el excipiente farmacéuticamente aceptable también puede incluir tampones alcalinos, o cápsulas entéricas o microgránulos. Las vacunas de la presente invención también pueden administrarse por vía vaginal. En dichos casos, los excipientes farmacéuticamente aceptables también pueden incluir emulsionantes, polímeros tales como CARBOPOL®, y otros estabilizantes conocidos de cremas vaginales y supositorios. Las vacunas de la presente invención también pueden administrarse por vía rectal. En dichos casos, los excipientes también pueden incluir ceras y polímeros conocidos en la materia para formar supositorios rectales.

20

25 Las preparaciones de más de una saponina en las combinaciones coadyuvantes de la presente invención también forman parte de la presente invención. Por ejemplo, combinaciones de al menos dos o más del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, β-escina o digitonina. Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden comprender combinaciones de más de un oligonucleótido inmunoestimulante.

30 Alternativamente, las formulaciones pueden combinarse con vehículos de vacunas formados por quitosán u otros polímeros policatiónicos, partículas de polilactida y polilactida-co-glicólido, matriz polimérica basada en poli-N-acetilglucosamina, partículas formadas por polisacáridos o polisacáridos modificados químicamente, liposomas y partículas basadas en lípidos, partículas formadas por monoésteres de glicerol, etc. Las saponinas también pueden formularse en presencia de colesterol para formar estructuras particuladas tales como liposomas o ISCOMs. Adicionalmente, las saponinas pueden formularse junto con un éter o éster de polioxietileno, en una disolución no particulada o en suspensión, o en una estructura particular tal como un liposoma paucilamelar o ISCOM. Las saponinas también pueden formularse con excipientes tales como Carbopol[®] para aumentar la viscosidad, o pueden formularse en forma de un polvo seco a partir de un excipiente en polvo tal como lactosa.

35 Coadyuvantes particularmente preferidos son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (documento EP 0 671 948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documento WO 95/17210, documento WO 98/56414), o 3D-MPL formulado con otros portadores (documento EP 0 689 454B1) en combinación con los oligonucleótidos CpG, según se describe en este documento. La cantidad de CpG o de oligonucleótidos inmunoestimulantes en los coadyuvantes o vacunas de la presente invención es generalmente pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna, puede estar en la región de 1-1.000 µg por dosis, preferiblemente 1-500 µg por dosis, y más preferiblemente entre 1 y 100 µg por dosis.

40

45 La cantidad de saponina para su uso en los coadyuvantes de la presente invención puede estar en la región de 1-1.000 µg por dosis, preferiblemente 1-500 µg por dosis, más preferiblemente 1-250 µg por dosis, y muy preferiblemente entre 1 y 100 µg por dosis. La proporción de CpG:saponina (p/p) estará, por lo tanto, en el intervalo de 1:1.000 a 1.000: 1, y normalmente estará en el intervalo de 1:100 a 100:1, y preferiblemente en el intervalo de 1:10 a 1:1 ó de 1:1 a 10:1, y muy preferiblemente de 1:1, 4:1 ó 10:1.

50 Las formulaciones de la presente invención pueden usarse tanto para fines profilácticos como terapéuticos. Consecuentemente, se prevé el uso de una combinación de una saponina, un lipopolisacárido y una molécula de CpG en la elaboración de una vacuna para la profilaxis y el tratamiento del cáncer, en particular carcinomas de mama y de próstata. Consecuentemente, la presente invención prevé un procedimiento para tratar a un mamífero susceptible a, o que padece, una enfermedad infecciosa o cáncer, o una alergia o una enfermedad autoinmune. En un aspecto adicional de la presente invención, se prevé una combinación de vacuna que comprende un lipopolisacárido, una saponina y CpG, según se describe en este documento, para su uso como un medicamento. La preparación de vacuna se describe de forma general en New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU., 1978.

55

Se desvela un procedimiento para prevenir que un individuo contraiga una enfermedad elegida del grupo formado por cáncer de próstata, de mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, renal, ovárico o melanoma; que comprende la administración de una composición según se describe sustancialmente en este documento a través de una vía sistémica de dicho individuo.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables para su uso en las combinaciones de la presente invención incluyen agua, disolución salina tamponada con fosfato, disoluciones tamponadas isotónicas.

Los ejemplos que siguen ilustran la invención, pero están fuera del ámbito de las reivindicaciones.

Ejemplo 1:

- 5 • Se produjo ECD-PD en células CHO según los procedimientos del documento WO 00/44899. Las formulaciones se probaron en ratones y conejos.
- Las formulaciones se compararon con varios controles.

SBAS1+SBAS7:

ECD-PD formulada con oligonucleótido CpG 2006 3D-MPL, QS21 en liposomas.

10 **Formulación de SBAS1**

Comprende QS21 en liposomas y 3D-MPL asociado con los liposomas, se preparó según los procedimientos del documento EP 0822831.

Formulación de SBAS1 + SBAS7

15 A la formulación anterior se le añadió oligonucleótido CpG 2006. El antígeno se mezcló con la formulación coadyuvante antes de su uso.

SBAS7 + formulaciones basadas en SBAS2 (ratones)

20 Para una dosis de 50 µl de vacuna, se diluyó la proteína ECD-PD (25 µg) en PBS concentrado 10 veces a pH 6,8 y H₂O antes de la adición consecutiva de una emulsión de aceite en agua que comprende SB62: que se prepara mediante, y comprende, un 5% de escualeno, un 5% de tocoferol, un 2,0% de tween 80; el tamaño de partícula era de 180 nm.

Preparación de la emulsión de SB62 (concentrado 2 veces)

25 Se disuelve Tween 80 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) para dar una disolución al 2% en PBS. Para proporcionar 100 ml de una emulsión concentrada dos veces, se sometieron a agitación vorticial 5 g de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno para mezclarlos minuciosamente. Se añaden 90 ml de una disolución de PBS/Tween y se mezclan minuciosamente. La emulsión resultante se hace pasar entonces a través de una jeringa de finalmente se microfluidifica mediante el uso de una máquina de microfluidificación M110S. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm, 3D-MPL (10 µg), QS21 (10 µg). Entonces se añadieron 50 µg de CpG ODN 2006 seguido 30 minutos después por la adición de 50 µg/ml de tiomersal como conservante. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

30 Las formulaciones de SBAS 2 se prepararon como anteriormente, pero sin la adición del oligonucleótido CpG.

SBAS7 es oligonucleótido CpG 2006

SBAS7 + formulaciones basadas en SBAS2 (conejo)

35 Para una dosis de 500 µl de vacuna, se diluyó la proteína ECD-PD (100 µg) en PBS concentrado 10 veces a pH 6,8 y H₂O antes de la adición consecutiva de 250 µl de SB62, 3D-MPL (100 µg), QS21 (100 µg) y 500 µg de CpG ODN 2006, seguido 30 minutos después por la adición de 50 µg/ml de tiomersal como conservante. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

Ejemplo 2: experimentos de exposición a tumores

40 Se inyectaron los grupos de F1 (C57 x Balb c) de ratones (8 ratones/grupo) con 1/10 de la dosis humana de antígeno (25 µg) en los días 0-14-28-42 y se expusieron el día 56 a células TC1 que expresan Her2 a cerca de 2 x 10⁶ células/animal de TC1 Her2 administradas subcutáneamente.

Se recogieron las células TC1 de la ½ de los bazos de los animales en el día 56 y se tomó una muestra de sangre de los animales.

45 Según se muestra en la figura 1, la adición de un oligonucleótido CpG a una formulación de 3D-MPL/QS21 mejora sinérgicamente la regresión tumoral, y sólo estas formulaciones consiguieron una completa remisión tumoral en los ratones.

Ejemplo 3: inmunogenicidad de la ECD-PD en diferentes coadyuvantes en ratones

Se inmunizaron 6 grupos de 4 conejos en los días 0, 21 y 42 respectivamente con 100 µg de ECD-PD en AS02, AS01, AS05, AS06 (CpG 2006 absorbido en alum), AS07 y AS02B + AS07.

Se analizó la serología 14 días post III, y la tabla 1 muestra que las formulaciones de la presente invención fueron superiores a otras formulaciones probadas para aumentar mucho las respuestas de títulos de anticuerpos.

5

Tabla 1

	Pre	14posIII
AS02B	50	96923
AS01B	173	196637
AS5	144	76221
AS6	142	74180
AS07A	480	3904
AS02B + AS07A	94	362713

Ejemplo 4: inmunogenicidad de Her 2 neu, ECD-PD en monos Rhesus adultos

Se inmunizaron monos Rhesus adultos con ECD-PD en varias formulaciones coadyuvantes:

10	AS02 B	-	QS21, 3DMPL, en una emulsión de aceite en agua
	AS01	-	QS21 3D-MPL en liposomas
	AS05	-	QS21 en liposomas
	AS06	-	CpG 2006 alum
	AS07	-	CpG 2006
	AS02B + AS07	-	véase el ejemplo 1 para los detalles.

15 La vacunación desencadenó una respuesta de anticuerpos mayor en las formulaciones de la presente invención (AS)2 + AS07). Véase la figura 1.

Un análisis adicional mostró que la respuesta de anticuerpos era policlonal y demostró una actividad inhibidora en el crecimiento *in vitro* de una línea celular de cáncer de mama humano (SKBR3) que sobreexpresaba la molécula Her 2 neu. La herceptina, un anticuerpo monoclonal para el tratamiento de tumores que expresan Her 2 neu, es capaz de inhibir el crecimiento de esta línea celular.

20

Se observó que los anticuerpos generados tras la vacunación activa con la formulación eran, por tanto, funcionales.

Ejemplo 5: inmunización de ratones con antígeno ECD-PD

Este experimento se diseñó para investigar un intervalo de formulaciones coadyuvantes con el antígeno, que es una fusión del dominio extracelular de Her 2 neu unido al dominio de fosforilación (ECD-PD), que fue producido en células CHO según los procedimientos del documento WO 00/44899.

25

Grupo	Antígeno (25 µg)	Coadyuvante
1	ECD-PD	ninguno (disolución salina tamponada con fosfato (PBS))
2	ECD-PD	liposomas con QS21 and 3D-MPL en la membrana
3	ECD-PD	tolcol que contiene una emulsión de aceite en agua con QS21 y 3D-MPL
30	4	ECD-PD CpG
	5	ECD-PD liposomas con QS21 y 3D-MPL en la membrana + CpG
	6	ECD-PD tolcol que contiene una emulsión de aceite en agua con QS21 y 3D-MPL + CpG
	7	ECD-PD 3D-MPL + CpG
	8	ECD-PD QS21 + CpG
35	9	ECD-PD tolcol que contiene una emulsión de aceite en agua +CpG
	10	ECD-PD liposomas con QS21 en la membrana + CpG
	11	ECD-PD liposomas con 3D-MPL en la membrana + CpG

El tolcol que contiene emulsiones de aceite en agua usado en los grupos anteriores usó D,L-tocoferol (CAS Nº 10191-41-0; nombre químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-cromanol)); que está disponible comercialmente en ROCHE™. Si está presente, el tolcol estaba presente en una emulsión de aceite en agua que comprende un 2,5% en volumen, en combinación con escualeno al 2,5% en volumen. Ambos aceites se mezclaron y se añadió polioxi-etilenmonooleato de sorbitano (Tween 80™), antes de la microfluidificación (máquina

40

de microfluidificación M110S; máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una presión máxima de entrada de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar) según se describe en el documento WO 95/17210). Consecuentemente, los grupos 3, 6 y 9 se basaron en la anterior emulsión de tocol con la adición de QS21, 3D-MPL o CpG acuosos.

- 5 Si están presentes QS21 y 3D-MPL en cualquiera de los grupos de vacunación anteriores, se incluyeron a 5 µg/dosis; CpG (OLIGO 4 (ID. SEC. N°: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se añadió a 50 µg/dosis.

- 10 Los coadyuvantes usados para los grupos 2, 5, 10 se prepararon según las técnicas descritas en el documento EP 0 822 831 B1 (cuyo contenido se incorpora al presente documento como referencia). El grupo 11 comprendía 3D-MPL en la membrana de un liposomas. En resumen, se mezclaron 3D-MPL, dioleilfosfatidil colina y colesterol entre sí y se microfluidificaron en liposomas unilaminares (según se describe en el documento EP 0 822 831 B1 – con la omisión de QS21).

Los coadyuvantes usados en los grupos 4, 7 y 8 estaban en suspensión acuosa o en disolución.

Procedimiento de vacunación

- 15 Los grupos de ratones B6F1 se vacunaron en cuatro ocasiones (en volúmenes de 50 µl), intramuscularmente, con 14 días de diferencia. 14 días después de la 4ª dosis de vacuna, los ratones se expusieron subcutáneamente a 2×10^6 células tumorales TC1 que expresan Her 2 neu.

- 20 Las líneas de células tumorales Her 2 neu-TC1 fueron producidas mediante transducción de las células TC1 por vectores retrovíricos que codifican para Her 2 neu. Tras un periodo de selección con blastocidina, se aislaron los clones resistentes y se cribaron mediante FACS buscando la expresión de Her 2 neu. Se seleccionó el clon con la mayor expresión de Her 2 neu, y se identificó que una dosis de exposición de 2×10^6 tenía una cinética de crecimiento similar a la de las células TC1 naturales, y que provocaba el desarrollo de un tumor en el 100% de los animales de control.

Se midió el tamaño de los tumores individuales dos veces por semana y se expresó como una media por grupo.

Resultados

- 25 La Figura 3 muestra los resultados del crecimiento tumoral para los grupos 1, 2, 4, 5 y 6. La Figura 4 muestra los resultados del crecimiento tumoral para los grupos 1, 5, 6, 7 y 11. La Figura 5 muestra los resultados del crecimiento tumoral para los grupos 1, 5, 6, 8, 9 y 10. Las únicas vacunas que indujeron una completa remisión del tumor fueron las vacunas que contenían tanto el oligonucleótido inmunoestimulante como la saponina.

- 30 Las Figuras 6 y 7 muestran la linfoproliferación de esplenocitos *in vitro* tras la incubación con 5 µg/ml de inmunógeno (ECD-PD) o de dominio extracelular (ECD) o de dominio intracelular (ICD) o de Her 2 neu.

Las Figuras 8 y 9 muestra la respuesta humoral inmune al inmunógeno (ECD-PD) en términos de Ig total medida mediante ELISA (FIG. 8) o la distribución de isotipo de IgG en estas respuestas (FIG. 9).

Conclusión:

Después de 3 inyecciones, la inducción de anticuerpos es

- 35 AS02B + AS07A > AS01B > AS02B = AS06 = AS05 > AS07A

Conclusión General

Los coadyuvantes probados (AS1, AS2, AS7) tienen efectos similares. Sin embargo, la combinación de AS1 y AS7 o AS2 y AS7 son coadyuvantes más eficaces.

- 40 Claramente se muestra inmunidad celular después de 4 vacunaciones en animales que recibieron el coadyuvante combinado en la molécula completa de ECD-PD, pero también en cada parte por separado (ECD y ICD). Las formulaciones de la presente invención son muy eficaces induciendo la regresión tumoral.

Ejemplo 6: inmunización de ratones con antígeno P703P

- 45 Este experimento se diseñó para investigar un intervalo de formulaciones coadyuvantes con el antígeno, que es una fusión del dominio antígeno Prostasa (Ferguson, y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 1999, 96, 3114-3119)) y el fragmento N-terminal 1-81 del virus NS1 de la gripe (P703P-NS1).

Grupo	Antígeno (25 µg)	Coadyuvante
1	P703P-NS1	ninguno (disolución salina tamponada con fosfato (PBS))
2	P703P-NS1	CpG
3	P703P-NS1	liposomas con QS21 en la membrana + CpG
4	P703P-NS1	liposomas con QS21 y 3D-MPL en la membrana + CpG
5	P703P-NS1	tolcol que contiene una emulsión de aceite en agua con QS21 y 3D-MPL + CpG
6	P703P-NS1	tolcol que contiene una emulsión de aceite en agua + CpG

5 El tocol que contiene emulsiones de aceite en agua usado en los grupos anteriores usó D,L-tocoferol (CAS N° 10191-41-0; nombre químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-cromanol)); que está disponible comercialmente en ROCHE™. Si está presente, el tocol estaba presente en una emulsión de aceite en agua que comprende un 2,5% en volumen, en combinación con escualeno al 2,5% en volumen. Ambos aceites se mezclaron y se añadió polioxietileno monooleato de sorbitano (Tween 80™), antes de la microfluidificación (máquina de microfluidificación M110S; máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una presión máxima de entrada de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar) según se describe en el documento WO 10 95/17210). Consecuentemente, los grupos 5 y 6 se basaron en la anterior emulsión de tocol con la adición de QS21, 3D-MPL y/o CpG acuosos.

Si están presentes QS21 y 3D-MPL en cualquiera de los grupos de vacunación anteriores, se incluyeron a 5 µg/dosis; CpG (OLIGO 4 (ID. SEC. N°: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se añadió a 5 µg/dosis.

15 Los coadyuvantes usados para los grupos 3 y 4 se prepararon según las técnicas descritas en el documento EP 0 822 831 B1.

Procedimiento de vacunación

Los grupos de ratones B6F1 se vacunaron en cuatro ocasiones (en volúmenes de 50 µl), intramuscularmente, con 14 días de diferencia.

Resultados

20 Las Figuras 10 y 11 muestran la linfoproliferación de esplenocitos *in vitro* después de la segunda y 14 días después de la cuarta vacunación, tras una incubación *in vitro* con los 3 µg/ml de P703P expresado como inmunógeno (NS1-P703P) o pichia (15 µg/ml) o una proteína de fusión NS1-OspA no específica.

25 Las Figuras 12 y 13 muestran la respuesta humoral inmune al inmunógeno (NS1-P703P) en términos de Ig total medida mediante ELISA de título en punto medio (FIG. 10) o de la distribución de isotipos de IgG en estas respuestas (FIG. 11).

LISTA DE SECUENCIAS

110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.
 <120> vacunas
 <130> B45245
 30 <140> PCT/EP01/11984
 <141> 2001-10-16
 <150> GB0025573.7
 <151> 2000-10-18
 <150> GB0025574.5
 35 <151> 2000-10-18
 <150> US09/690, 921
 <151> 2000-10-18
 <160> 5
 <170> FastSEQ para windows, version 4.0
 40 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> "Secuencia Artificial"
 <400> 1
 45 tccatgacgt tcctgacgtt 20
 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> "Secuencia Artificial"

ES 2 377 077 T3

<400> 2
tctcccagcg tgcgcat 18
<210> 3
<211> 30
5 <212> ADN
<213> "Secuencia Artificial"
<400> 3
accgatgacg tcgccgtga cggcaccacg 30
<210> 4
10 <211> 24
<212> ADN
<213> "Secuencia Artificial"
<400> 4
tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24
15 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> "Secuencia Artificial"
<400> 5
20 tccatgacgt tcctgatgct 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena que comprende
 - (i) un antígeno MAGE unido a un asociado de fusión heterólogo derivado de la proteína D, en el que el asociado de fusión comprende aproximadamente el primer 1/3 de la secuencia de la proteína D o aproximadamente los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales de la secuencia de la proteína D;
 - (ii) una composición coadyuvante que comprende una saponina, junto con un oligonucleótido Inmunoestimulante; y
 - (iii) un lipopolisacárido elegido del grupo de
 - i monofosforil lípido A
 - ii monofosforil lípido A 3-O-desacilado
 - iii difosforil lípido A.
2. Una composición según se reivindica en la reivindicación 1 en la que la saponina es QS21.
3. Una composición inmunógena según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en la que el oligonucleótido Inmunoestimulante contiene al menos dos motivos CpG.
4. Una composición inmunógena según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el oligonucleótido Inmunoestimulante se elige del grupo:
 - ID. de secuencia Nº 1 - TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
 - ID. de secuencia Nº 2 - TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
 - ID. de secuencia Nº 3 - ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
 - ID. de secuencia Nº 4 - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
 - ID. de secuencia Nº 5 - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
5. Una composición según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que la saponina se formula para formar ISCOMS o liposomas.
6. Una composición según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que la saponina está presente en una emulsión de aceite en agua.
7. Uso de una combinación de una saponina, un oligonucleótido Inmunoestimulante, un lipopolisacárido elegido del grupo de (i) monofosforil lípido A; (ii) monofosforil lípido A 3-O-desacilado; y (iii) difosforil lípido A y un antígeno MAGE unido a un asociado de fusión heterólogo derivado de la proteína D, en el que el asociado de fusión comprende aproximadamente el primer 1/3 de la secuencia de la proteína D o aproximadamente los primeros 100-110 aminoácidos N-terminales de la secuencia de la proteína D, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de tumores.

FIGURA 1

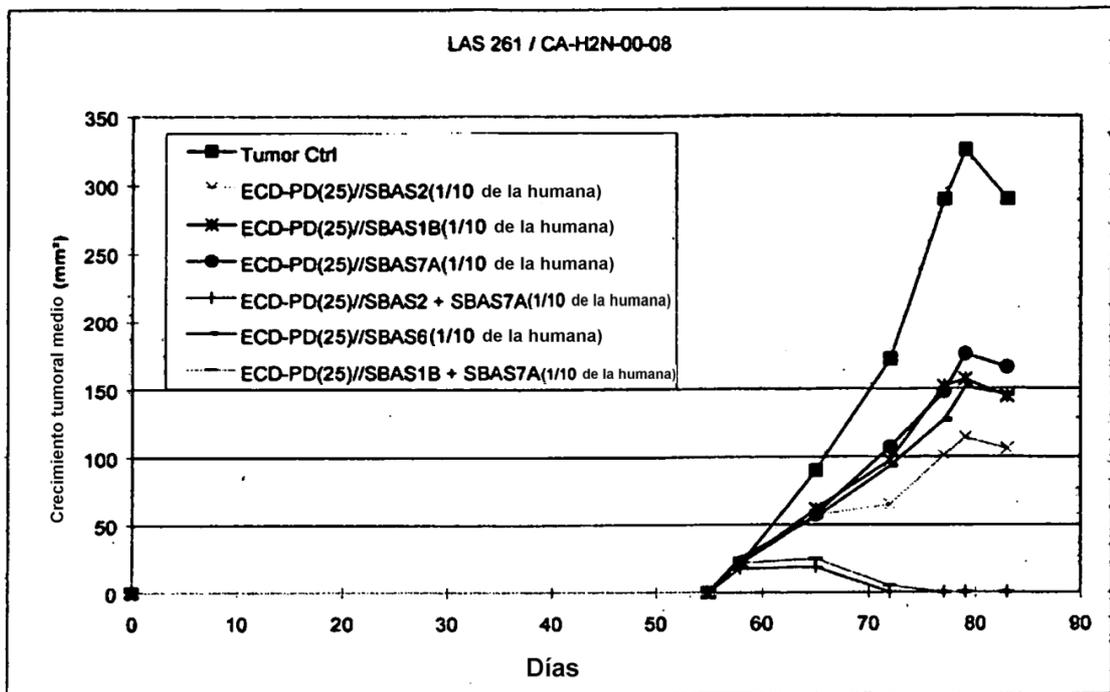


FIGURA 2

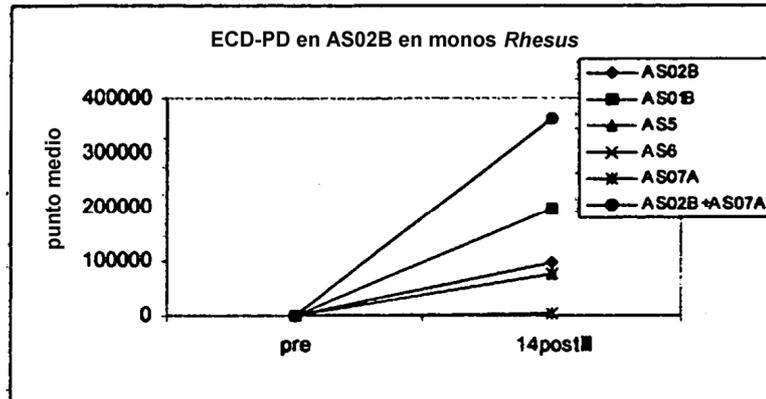


FIGURA 3 - Crecimiento tumoral *in vivo* tras la vacunación

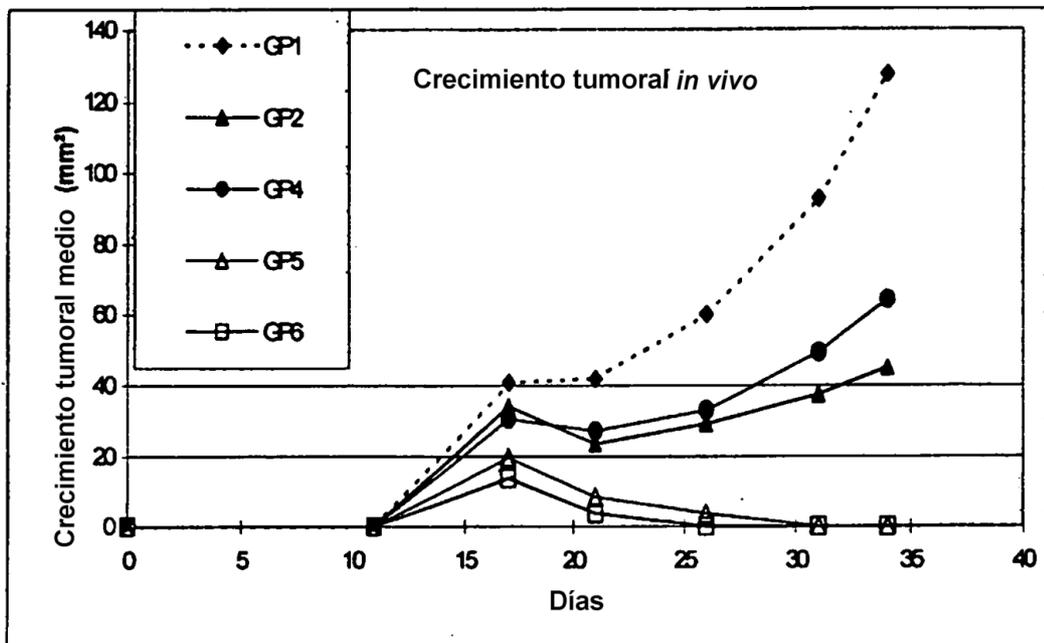


FIGURA 4

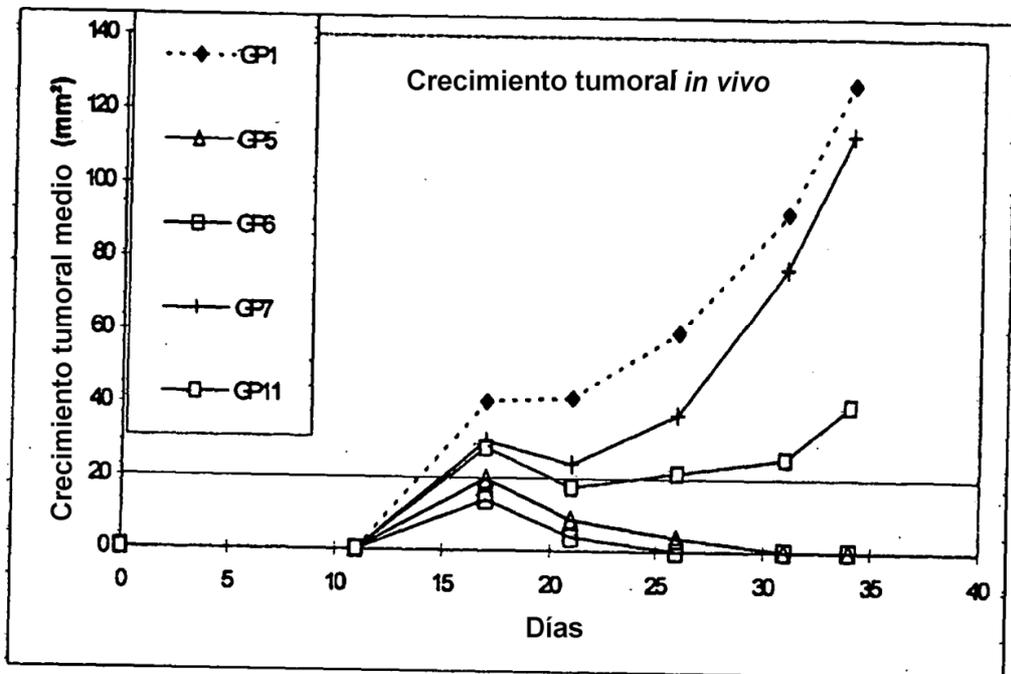


FIGURA 5

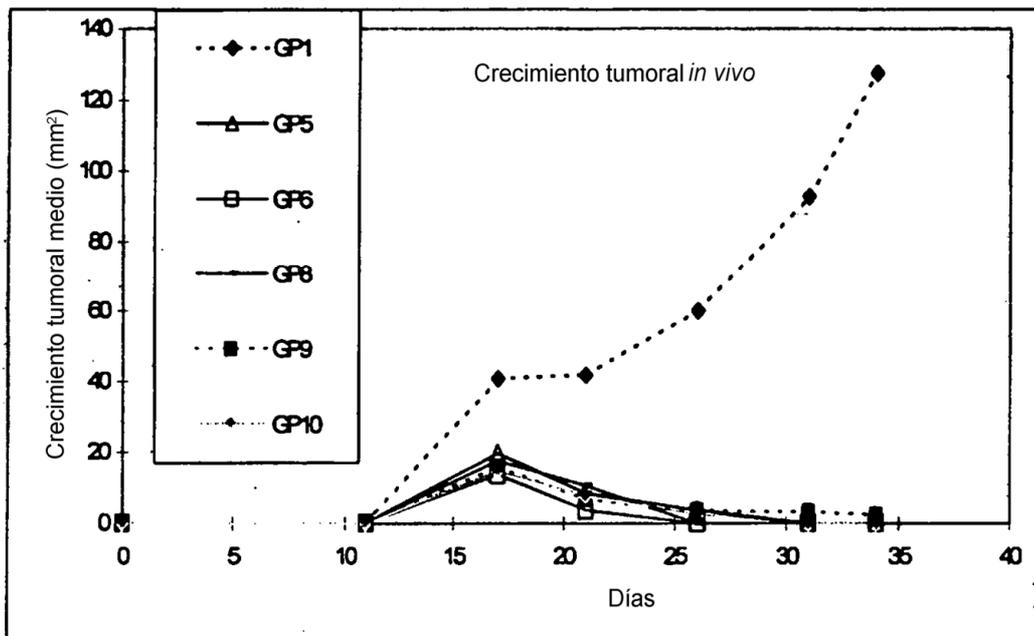


FIGURA 6 - Proliferación de linfocitos (tras la vacunación, antes de la exposición al tumor)

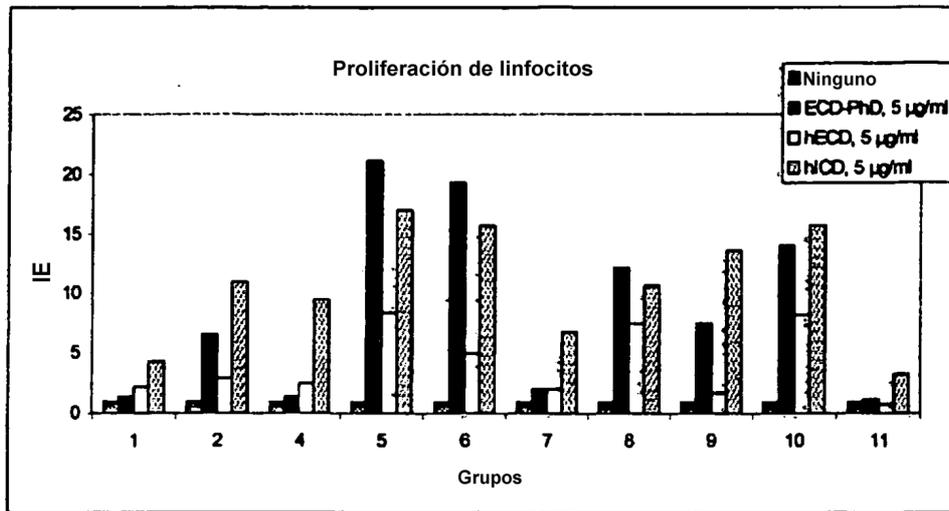


FIGURA 7 - Proliferación de linfocitos (tras la exposición al tumor)

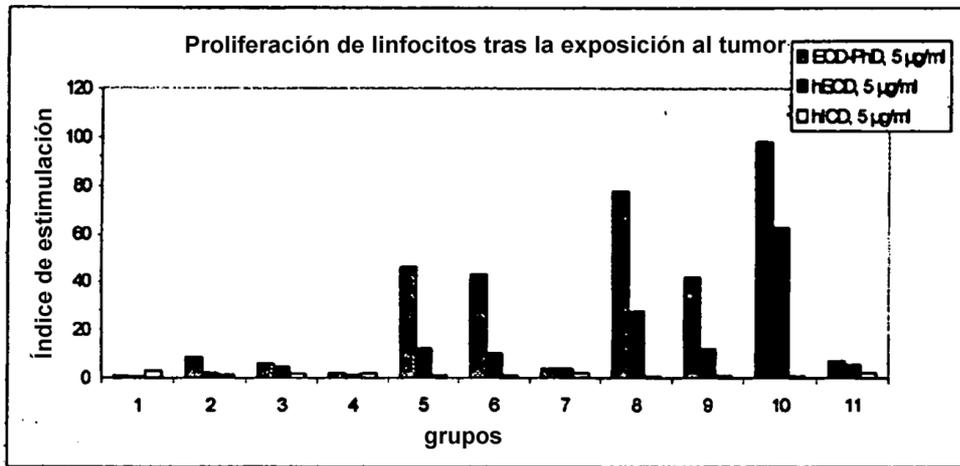


FIGURA 8- Respuesta total de Ig anti-ECD tras la vacunación

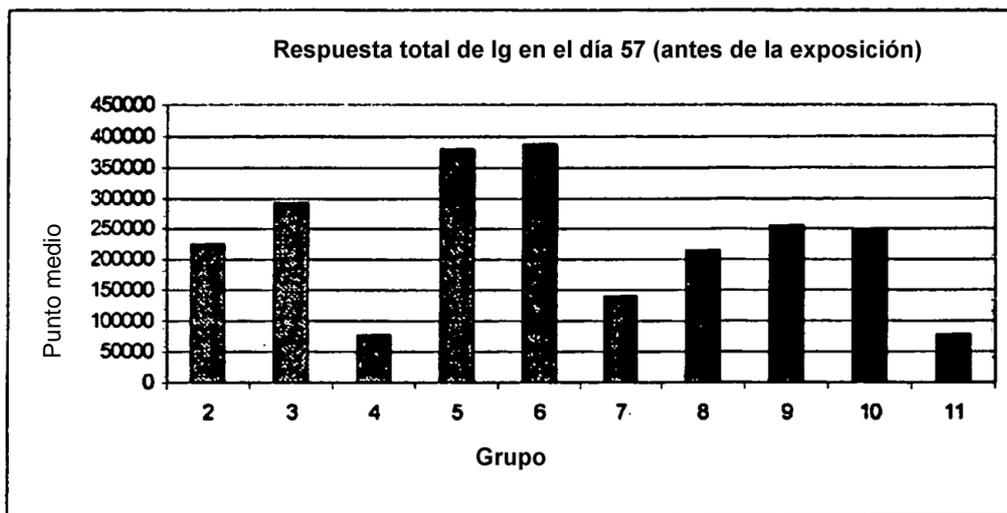


FIGURA 9 - Distribución de isótopos inducida por las vacunas

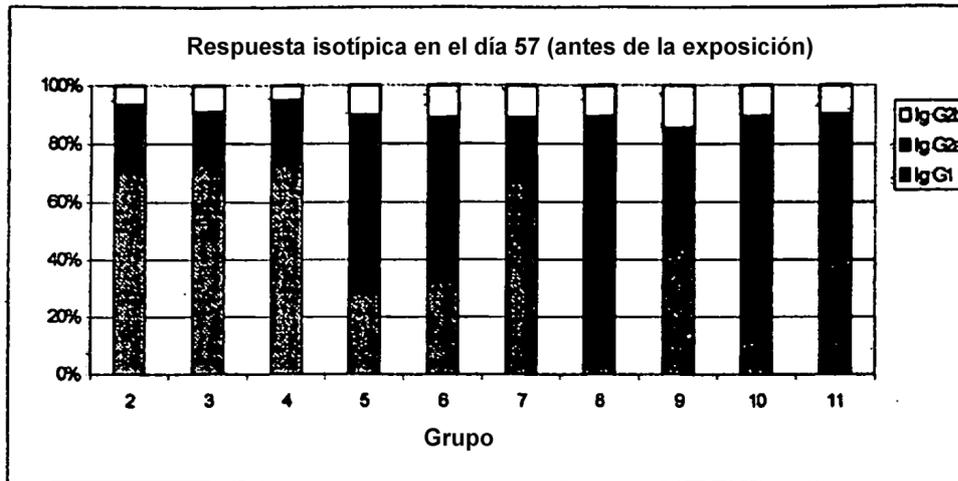


FIGURA 10 - Proliferación de linfocitos tras la segunda vacunación con P703

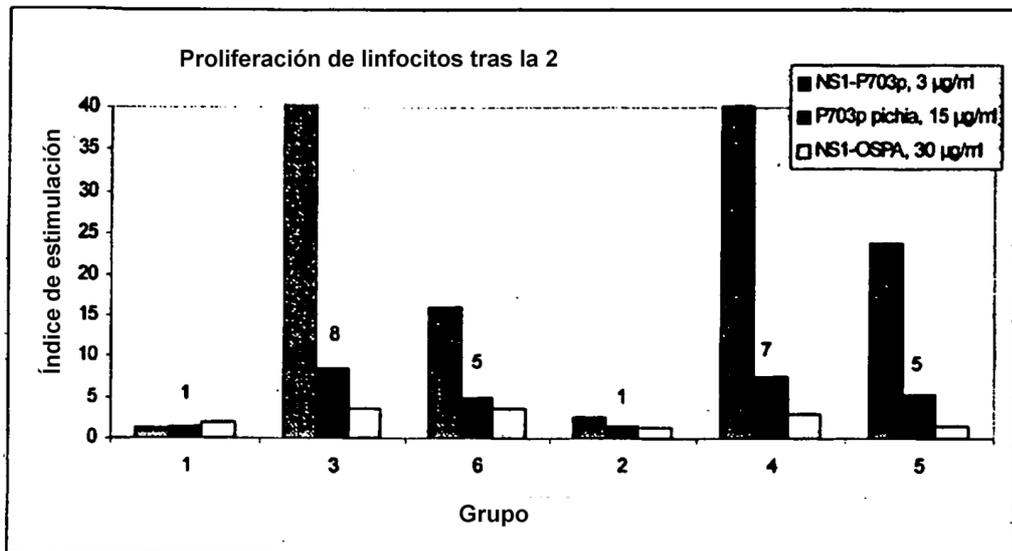


FIGURA 11 - Proliferación de linfocitos tras la cuarta vacunación con P703

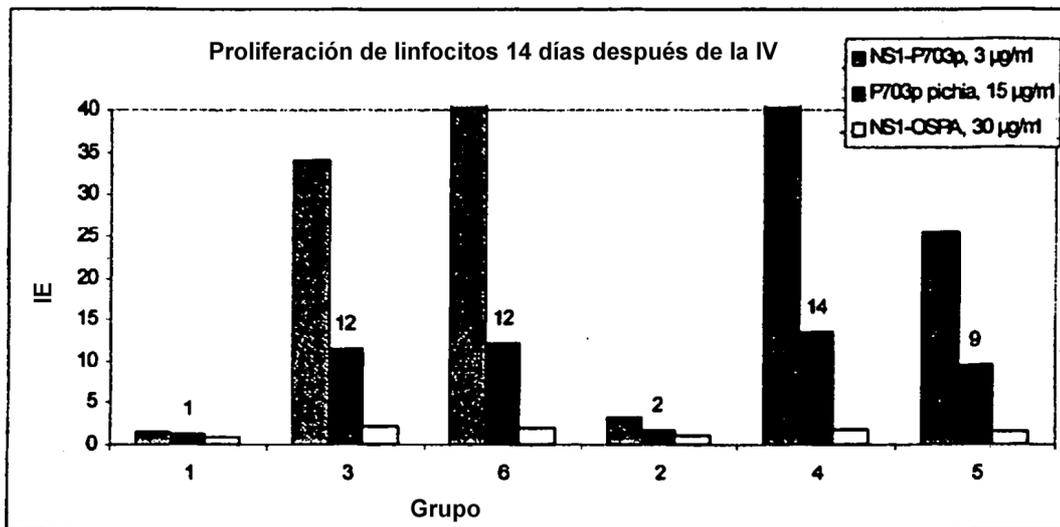


FIGURA 12

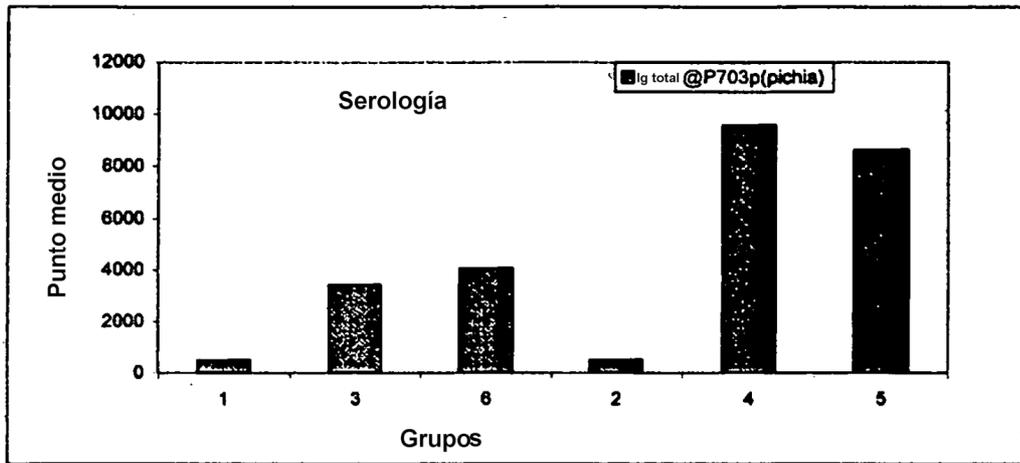


FIGURA 13 - Títulos de anticuerpos anti-NS1-P703 inducidos mediante vacunación

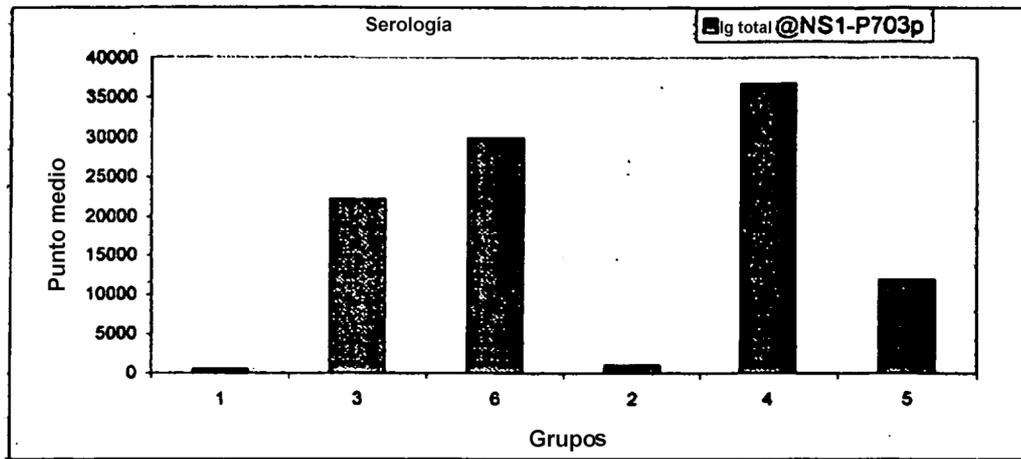


FIGURA 14 - Distribución de isotipos anti-NS1-P703P inducidos mediante vacunas

