

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 333**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2008 E 08759906 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **03.02.2010 EP 2148697**

54 Título: **Composición liofilizada que contiene WT-1 y CPG**

30 Prioridad:

24.05.2007 WO PCT/EP2007/055037

23.11.2007 GB 0723044

06.12.2007 GB 0723900

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

12.02.2013

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)

RUE DE L'INSTITUT, 89

1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

LEMOINE, DOMINIQUE INGRID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 395 333 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

Composición liofilizada que contiene WT-1 y CPG

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a composiciones antigénicas mejoradas y procedimientos de uso de las mismas para preparar composiciones inmunogénicas. En particular la presente invención se refiere a composiciones liofilizadas que comprenden un antígeno y un agonista del receptor de tipo Toll (TLR) 9. Tales composiciones se pueden reconstituir en composiciones inmunogénicas para uso en vacunación con un vehículo seleccionado entre el grupo de vehículos particulados que consiste en liposomas, sales minerales, emulsiones, polímeros e ISCOM. Los procedimientos de preparación de composiciones inmunogénicas a partir de composiciones liofilizadas de la invención y uso de las mismas en la inmunización son también parte de la presente invención.

Antecedentes de la invención

15 Los adyuvantes se usan algunas veces para mejorar las respuestas inmunes que surgen a cualquier antígeno dado. Sin embargo la inclusión de adyuvantes en una vacuna o composición inmunogénica incrementa la complejidad de preparación de los componentes así como la complejidad de distribución y formulación de la composición de vacuna. La preparación de cada uno de los componentes de adyuvantes así como el componente antigénico debe ser considerada por los formuladores. Esto es particularmente verdad porque por ejemplo el pH de los componentes adyuvantes en solución puede ser muy diferente del pH óptimo para un antígeno dado y estas diferencias necesitan ser controladas y tratadas cuidadosamente para evitar, por ejemplo la precipitación o pérdida de propiedades deseables de los componentes. El pH del antígeno en agua para inyección puede, por ejemplo ser aproximadamente pH 7 o ligeramente mayor y cuando el adyuvante se añade el pH puede ser tan bajo como pH 6,3. El antígeno puede, por ejemplo no ser estable cuando se almacena durante períodos prolongados a este pH.

25 Los componentes se deben, por tanto, formular y distribuir en una forma que sea tan estable como sea posible debido a que los productos farmacéuticos para uso humano deben estar bien caracterizados, ser estables y seguros antes de que se puedan aprobar para la comercialización. Por esta razón se deben realizar estudios de estabilidad a largo plazo sobre la formulación final para asegurar que cumple los criterios relevantes. La información generada en tales estudios a largo plazo se usa para apoyar la propuesta a las autoridades reguladoras tal como la FDA (Autoridad de Fármacos Federal - el organismo responsable de la aprobación de medicinas en los Estados Unidos) para mostrar que el producto es adecuado para uso en seres humanos.

30 El secado por congelación o liofilización, se usa en general para incrementar la estabilidad y por lo tanto la vida durante el almacenamiento del material incluyendo los materiales farmacéuticos tales como un antígeno usado en vacunas.

35 A menudo se proporcionan las composiciones antigénicas liofilizadas para las profesiones de la asistencia sanitaria para reconstitución con diluyente (por ejemplo agua para inyección [WFI] o en algunos casos una formulación de adyuvante líquida) un poco antes de la administración al paciente. De esta forma el período de tiempo que los diversos componentes de la vacuna final se mantienen en estrecha proximidad se minimiza.

40 Muchos factores se deben considerar cuando los antígenos se liofilizan para formar tortas liofilizadas (el producto seco de la liofilización). Por ejemplo, la antigenicidad / inmunogenicidad del antígeno se debe mantener en la forma liofilizada. El antígeno no se debe agregar o degradar mientras esté en la forma liofilizada. La torta liofilizada se formará bien y no se colapsará. Finalmente, el antígeno debe naturalmente estar en una forma que se disuelva rápidamente cuando se reconstituya. Cuando la solución para la reconstitución no es simplemente WFI, por ejemplo cuando el antígeno se reconstituye con adyuvante líquido, entonces necesita considerarse el impacto de los componentes de la solución sobre las propiedades del producto reconstituido.

45 Como se ha mencionado los adyuvantes se han usado durante muchos años para mejorar la respuesta inmune al componente antigénico de una vacuna. Una combinación adyuvante particularmente potente es una que comprende Monofosforil Lípido A 3-Desacilado (3D-MPL) y una saponina, particularmente QS21, una fracción purificada de saponina extraída de la corteza de *Quillaja saponaria Monara*. Esta combinación se puede proporcionar, por ejemplo en forma de una emulsión de aceite en agua, formulación liposomal o similares.

50 En los ensayos clínicos previos con antígenos, por ejemplo con los antígenos de malaria tal como RTS,S se proporciona el antígeno liofilizado y también se proporciona un vial separado de adyuvante líquido, por ejemplo una formulación de aceite en agua de MPL y QS21 o una formulación liposomal de MPL y QS21 para reconstituir el antígeno. Los componentes individuales se combinan para formar la composición de vacuna final un poco antes de la administración.

55 Ciertos oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen los dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") son ligandos TLR9 y se han identificado por ser adyuvantes cuando se administran mediante las vías tanto sistémica como mucosal (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, *J.Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, *J.Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6). CpG es una abreviatura de motivos del dinucleótido citosina- guanosina presentes en el ADN. Históricamente, se observó que la fracción de AND de BCG puede ejercer un efecto antitumoral. En estudios posteriores, los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias del gen BCG se mostró que eran capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto in vitro como in vivo). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo central de CG, llevaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación se elucidó más tarde en una publicación de Krieg, *Nature* 374, p 546 1995. El análisis detallado ha mostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que tales secuencias son comunes en el ADN bacteriano pero son raras en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo de dinucleótido CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias de CpG no metiladas son

inmunoestimuladoras y se pueden usar en la presente invención.

También se ha mostrado que un oligonucleótido inmunoestimulador puede retener la actividad inmunológica cuando la Guanosina está mutada a un motivo 7-desazaguanosina (documento WO 03057822).

5 Estos oligonucleótidos inmunoestimuladores se cree que tienen un pH ácido en solución, por ejemplo por debajo de pH 7, tal como 6,3, 6,1 o inferior. Esto puede hacerlos difíciles de incorporar en las formulaciones líquidas de vacunas debido a que son diferentes a otros componentes en las formulaciones. Como se ha descrito esto puede provocar precipitación y / o problemas de estabilidad a largo plazo.

10 Se cree que estos oligonucleótidos inmunoestimuladores es probable que sean adyuvantes muy eficaces, particularmente cuando se usan en combinación con las combinaciones de adyuvantes existentes tales como 3D-MPL y QS21. Se espera que tales adyuvantes se empleen en enfermedades por las que hasta ahora ha sido difícil proporcionar vacunas eficaces, tal como VIH, cáncer y posiblemente malaria.

15 Existe un número de formas diferentes en las que los adyuvantes se pueden incluir en vacunas, pero se deben incluir de una forma que no afecte a la estabilidad o bien de ellos mismos o la composición antigénica y también de una forma en la que no se coloque una carga excesiva sobre el profesional de la asistencia sanitaria que reconstituye la vacuna. La forma más sencilla de lograr esto sería colocar componentes adicionales en viales adicionales de manera que se mantengan separados hasta justo antes de la reconstitución, minimizando por lo tanto el tiempo durante el que los componentes pueden estar afectados entre sí. Esto significa que el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulador se proporcionarán cada uno de ellos en viales separados. Después si se emplean componentes adyuvantes adicionales tales como MPL y QS21 éstos se pueden proporcionar en forma de una mezcla líquida en un tercer vial. Sin embargo, un número creciente de componentes en un número creciente de viales conduce a un incremento de costes, pérdidas y de manera importante a un incremento en la posibilidad de errores durante la constitución.

Sumario de la invención

25 Los presentes inventores han encontrado que cuando un ligando TLR9 tal como un oligonucleótido inmunoestimulador CpG va a ser parte de una composición inmunogénica como un adyuvante, dicho ligando TLR9 se puede liofilizar conjuntamente con el antígeno de manera que se proporcione un solo vial que contenga antígeno y adyuvante de ligando TLR9 juntos en una torta liofilizada.

30 La presente invención por lo tanto proporciona una composición liofilizada que comprende uno o más antígenos no cargados positivamente y un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG, en la que dicho uno o más antígenos es WT-1, o un derivado o fragmento del mismo, en la que el derivado es bastante similar a los antígenos nativos para retener propiedades antigénicas y seguir siendo capaz de permitir una respuesta inmune que sea alta contra el WT-1, y en la que el fragmento tiene al menos 8 aminoácidos de longitud y es capaz de inducir una respuesta inmune que presenta reacción cruzada con el WT-1 de origen natural.

35 En un aspecto, dicho oligonucleótido que contiene CpG comprende una secuencia de Purina, Purina, C,G, pirimidina, pirimidina. En otro aspecto, dicho oligonucleótido inmunoestimulador se selecciona entre el grupo que consiste en: SEC ID N.º:1; SEC ID N.º:2; SEC ID N.º:3; SEC ID N.º:4; y SEC ID N.º:5.

Aunque sin querer estar sujeto a las limitaciones de ninguna teoría se cree que cuando se proporcionan el antígeno y el agonista de TLR9 conjuntamente proporciona un componente que es más estable que simplemente la adición del TLR9 a una formulación líquida de MPL y QS21.

40 La presente invención proporciona la ventaja de que cuando el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG se reconstituyen con WFI se puede proporcionar solamente un vial con formulación liofilizada en él. Además, cuando el WT-1, o un derivado o fragmento del mismo y el oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG se han de reconstituir con una formulación líquida tal como una formulación de adyuvante líquido entonces es ventajoso ser capaz de proporcionar solamente dos viales de componentes (mejor que tres). Esto a su vez tiene beneficios de coste, mientras que se proporciona un producto adecuado para uso como vacuna una vez reconstituida.

45 Además, los presentes inventores han encontrado que la liofilización conjunta de CpG con antígenos que no tengan una carga positiva global en el tampón de reconstitución puede incrementar la solubilidad de los antígenos tras la reconstitución con o bien agua para inyección o adyuvante líquido. Por lo tanto la presente invención también proporciona un procedimiento para incrementar la solubilidad de un antígeno liofilizado tras la reconstitución cuando el antígeno no tenga una carga positiva neta en el tampón de reconstitución que comprende la etapa de liofilización conjunta de un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG con el antígeno, en la que el antígeno es WT-1, o un derivado o fragmento del mismo. La presente invención también proporciona el uso de un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG para incrementar la solubilidad de un antígeno liofilizado no cargado positivamente tras la reconstitución, en la que el antígeno es WT-1, o un derivado o fragmento del mismo. Por "no cargado positivamente" se quiere decir que la carga global de la proteína no es positiva. La proteína puede contener cargas tanto positivas como negativas, pero la carga global de la proteína es o bien neutra o negativa.

50 La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de reconstitución de una composición liofilizada como se describe en el presente documento con un vehículo adecuado. En una realización, dicho vehículo es una solución liposomal o una emulsión de aceite en agua. Dicho vehículo puede opcionalmente contener uno o más inmunoestimuladores, que se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en agonistas de TLR4, antagonistas de TLR4, saponinas, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8, agonistas de TLR9. En una realización, dicho vehículo contiene dos o más inmunoestimuladores y en un aspecto estos pueden ser MPL 3-desacilado y QS21.

La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de una composición liofilizada de la invención que comprende la combinación de uno o más antígenos deseados, un ligando de TLR9 y excipientes adecuados y secar por congelación la mezcla resultante.

Descripción detallada de la invención

5 Los presentes inventores han encontrado que los ligandos de TLR9 tales como los oligonucleótidos CpG se pueden liofilizar con un antígeno de interés sin afectar a la antigenicidad o estabilidad de ese antígeno. Por ligando de TLR9 se quiere decir un compuesto que puede interactuar con el receptor de TLR9. Los miembros de la familia del receptor de tipo Toll (TLR), descubiertos primero en *Drosophila*, se ha mostrado que son receptores de reconocimiento patrones, reconociendo y respondiendo cada miembro a diferentes componentes microbianos para limitar / erradicar los microbios invasores. La unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a los TLR induce la producción de intermedios de nitrógeno y oxígeno reactivos, el inicio de la red de citoquina proinflamatoria, y la regulación hacia arriba de las moléculas coestimuladoras que se asocian a las respuestas innatas rápidas a la inmunidad adaptativa. Se conocen muchos ligandos de TLR que son útiles como adyuvantes. TLR9 se ha mostrado que responde a agonistas de oligonucleótidos. Por lo tanto los ligandos de TLR9 descritos en el presente documento a modo de ejemplo son oligonucleótidos inmunoestimuladores. En un ejemplo, tales ligandos de TLR9 contienen un motivo de CpG. Oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención que contienen CpG pueden comprender modificaciones a los nucleótidos. Por ejemplo, los documentos WO0226757 y WO03057822 divulgan modificaciones a la parte C y G de los oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG.

20 En una realización, un oligonucleótido CpG contiene dos o más motivos de dinucleótidos CpG separados por al menos tres, posiblemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una realización el enlace internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o posiblemente un enlace fosforotioato, aunque también se puede usar el enlace fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos, incluyendo oligonucleótidos con enlaces mixtos internucleótido. Los procedimientos para producir fosforotioato oligonucleótidos o fosforoditioato se describen en los documentos US 5,666,153. US 5,278,302 y WO 95/26204. Se contempla el oligonucleótido que comprende diferentes enlaces internucleótido, por ejemplo, fosforotioato fosfodiésteres mixtos. Se pueden usar otros enlaces internucleótido que estabilizan el oligonucleótido.

Los ejemplos de los oligonucleótidos CpG tienen las siguientes secuencias. En una realización, estas secuencias contienen enlaces internucleótido modificados por fosforotioato.

30 OLIGO 1 (SEC ID N.º:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEC ID N.º:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEC ID N.º:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEC ID N.º:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEC ID N.º:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

35 Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriores ya que tienen supresiones o adiciones sin consecuencias con ellos.

Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo el documento EP 468520). De manera conveniente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automático.

40 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "antígeno" pretende significar un componente inmunogénico adecuado para inducir una respuesta inmune específica y adecuada para la inclusión en una composición de vacuna o inmunogénica.

45 El antígeno puede comprender o constar de WT-1 expresado por el gen del tumor de Wilm, o su fragmento N-terminal WT-1F que comprende alrededor de o aproximadamente 1 - 249 aminoácidos. WT1 es una proteína que originalmente se encuentra sobreexpresada en cáncer de riñón pediátrico, tumor de Wilm. Un antígeno que se puede usar comprende casi la proteína de longitud completa como antígeno. En una realización, el antígeno puede comprender o constar de la proteína WT1-A10, que es una proteína de fusión recombinante de 292 AA constituida por una secuencia tal 12 mero truncada y los aminoácidos números 2 - 281 de la secuencia de WT1. Barret et. Clin. Experim. Immunol. 2077, 148. 189-198, divulga vacunas de WT-1 con montanida como adyuvante.

50 En una realización el antígeno tiene un punto isoeléctrico de 9,6 o menos. En una realización el antígeno tiene un punto isoeléctrico de 9 o menos. En una realización el antígeno tiene un punto isoeléctrico de 8,5 o menos. En una realización el antígeno tiene un punto isoeléctrico de 8,0 o menos. En una realización el antígeno tiene un punto isoeléctrico de 7,5. En una realización el antígeno tiene un punto isoeléctrico en el intervalo entre 7 y 8.

55 La carga neta de una proteína cuando se reconstituye en tampón depende del número de cargas positivas frente a negativas en la proteína, esta carga variará, por supuesto, dependiendo del pH del tampón de reconstitución. El punto isoeléctrico es el pH al que la carga neta de una proteína es neutra. Si el pH del tampón de reconstitución está por debajo del punto isoeléctrico del antígeno, la proteína tiende a llevar una carga positiva neta. Si el pH del tampón de reconstitución está por encima del punto isoeléctrico del antígeno, la proteína tiende a llevar una carga negativa neta. La presente invención es particularmente útil cuando la liofilización y reconstitución de los antígenos que tienen un punto isoeléctrico tal que, en el tampón de reconstitución propuesto, la proteína llevaría una carga negativa neta. En tales circunstancias (véase el ejemplo 3), la presencia de CpG en la composición liofilizada puede potenciar la solubilidad del antígeno en el tampón de reconstitución.

En una realización el antígeno liofilizado y el oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG se proporcionan en forma de una dosis, por ejemplo en un vial.

En una realización el antígeno liofilizado está presente en una cantidad que proporcionan una concentración de antígeno en el intervalo de 10 a 250 µg, cuando se reconstituye.

- 5 En una realización el oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG está presente en una cantidad que proporciona una concentración en el intervalo entre 10 y 1000 µg tal como 500µg, cuando se reconstituye.

10 El antígeno que se combina en la composición liofilizada con un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG puede ser un antígeno antitumoral. Por lo tanto las composiciones inmunogénicas preparadas usando la composición antigénica liofilizada de la invención son útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la composición liofilizada se puede preparar con antígenos de cáncer, antígenos tumorales o antígenos de rechazo tumoral como se describe en el presente documento, tales como las proteínas expresadas en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de hígado y cáncer de de cabeza y cuello, entre otros:

15 La invención también se extiende al uso de los antígenos anteriores, derivados inmunogénicos y fragmentos inmunogénicos y proteínas de fusión que comprenden los mismos en aspectos de la presente invención.

Derivados, fragmentos y proteínas de fusión

Los antígenos asociados a tumores de la presente invención se pueden emplear en la forma de derivados o sus fragmentos en lugar del antígeno de origen natural.

20 Como se usa en el presente documento el término "derivado" se refiere a un antígeno que está modificado con relación a su forma de origen natural. El, el derivado puede incluir una mutación, por ejemplo una mutación puntual. En un ejemplo, el derivado puede cambiar las propiedades de la proteína, por ejemplo mejorando la expresión en sistemas procarióticos o mediante la eliminación de la actividad no deseable, por ejemplo, actividad enzimática. Los derivados de la presente invención son suficientemente similares a los antígenos nativos para mantener las propiedades antigénicas y permanecen capaces de permitir que una respuesta inmune surja contra el antígeno nativo. Si un derivado dado induce o no tal respuesta inmune se puede medir mediante un ensayo inmunológico adecuado tal como un ELISA o citometría de flujo.

25 En una realización de la presente invención el derivado del antígeno asociado a tumor de la presente invención es una proteína de fusión que comprende un antígeno asociado a tumor unido a una proteína pareja de fusión heteróloga. Por "heterólogo" con respecto al antígeno asociado a tumor se quiere decir una secuencia de proteína o de polipéptido que no estaría unida al antígeno asociado a tumor por naturaleza, es decir, está unida al antígeno asociado a tumor mediante intervención humana deliberada.

30 El antígeno y proteína pareja de fusión heteróloga se pueden conjugar químicamente o se pueden expresar como proteínas de fusión recombinantes. En una realización, una proteína de fusión de la presente invención puede permitir la producción de niveles incrementados de la proteína de fusión a producir en un sistema de expresión comparada con la proteína no fusionada. De este modo la proteína pareja de fusión puede ayudar a proporcionar los epítopes auxiliares T, por ejemplo los epítopes auxiliares T reconocidos por los seres humanos (es decir, la proteína pareja de fusión actúa como una pareja de fusión inmunológica). La pareja de fusión puede ayudar a la expresión de la proteína con mayores rendimientos que la proteína recombinante nativa (es decir, actuando la proteína pareja de fusión como un potenciador de expresión). En una realización, la proteína pareja de fusión puede actuar tanto como una pareja de fusión inmunológica como una pareja potenciadora de expresión.

35 Las proteínas pareja de fusión pueden, por ejemplo, derivar de la proteína D. La Proteína D es una lipoproteína (una proteína de unión a inmunoglobulina D de 42 kDa expuesta sobre la superficie de la bacteria Gram-negativa Haemophilus influenzae). La proteína se sintetiza como un precursor con una secuencia señal de 18 restos aminoácidos, que contiene una secuencia de consenso para la lipoproteína bacteriana (véase el documento WO 91/18926). La proteína Proteína D nativa precursora se procesa durante la secreción y se escinde la secuencia señal. La Cys de la proteína D procesada (en la posición 19 en la molécula precursora) llega a ser el resto N terminal de la proteína procesada y se modifica de manera simultánea mediante la unión covalente de ácidos grasos tanto unidos por éster como unidos por amida. Los ácidos grasos unidos al resto de Cisteína amino terminal funcionan entonces como un anclaje de membrana.

40 En una realización, el derivado antígeno asociado a tumor para uso en la presente invención puede comprender la Proteína D o un derivado de la misma como una proteína pareja de fusión.

45 La proteína D o un derivado de la misma se describe en el presente documento puede comprender, por ejemplo: el tercio primero o N-terminal de la proteína D procesada o aproximadamente o alrededor del tercio primero o N-terminal de la proteína D procesada. En una realización, la proteína D o un derivado de la misma pueden comprender los 100 a 115 aminoácidos primeros o N-terminales de la proteína D procesada; o los 109 aminoácidos primeros o N-terminales de la proteína D procesada. En una realización, los aminoácidos 2-Lys y 2-Leu de la proteína D procesada nativa pueden estar sustituidos por los aminoácidos 2-Asp y 3-Pro.

50 En una realización, la proteína D o un derivado de la misma además incluir la secuencia señal de 18 ó 19 aminoácidos de la proteína D precursora. En una realización, la proteína pareja de fusión derivada de la proteína D comprende o consta de los aminoácidos 20 a 127 de la proteína D precursora. En una realización de la presente invención, los dos aminoácidos 21-Lys y 22-Leu de la proteína pareja de fusión de la proteína D precursora pueden estar sustituidos por los aminoácidos 21-Asp y 22-Pro.

La proteína pareja de fusión de la proteína D como se describe en el presente documento puede adicionalmente o

como alternativa contener supresiones, sustituciones o inserciones dentro de la secuencia de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de la proteína D precursora de tipo salvaje o procesada. En una realización, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más aminoácidos pueden estar insertados, sustituidos o suprimidos. Los aminoácidos pueden estar sustituidos por sustituciones conservadoras como se define en el presente documento, o se pueden usar otros aminoácidos.

En una realización, la proteína pareja de fusión puede comprender o constar de una secuencia de proteína D como se muestra en la SEC ID N.º: 1. En una realización, la proteína de pareja de fusión puede comprender o constar de los aminoácidos subrayados en la Figura 1, es decir, los restos de aminoácidos 20 a 127 de la SEC ID N.º: 12. En una realización, el antígeno para uso en la presente invención puede ser la proteína D-MAGE-3, en la que el antígeno MAGE-3 consta de los aminoácidos 3 a 314 de MAGE-3 y en la que la proteína de pareja de fusión de la proteína D consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.

En otra realización de la presente invención, las proteínas pareja de fusión se pueden seleccionar entre NS1 o LytA o derivados de los mismos como se describe a continuación.

NS1 es una proteína no estructural del virus de la gripe. En una realización, el derivado antígeno asociado a tumor derivado de la presente invención puede comprender NS1 o un derivado de la misma como una proteína pareja de fusión. La NS1 o un derivado de la misma pueden comprender los aminoácidos 1 a 81 N terminales de la misma.

LytA se deriva de *Streptococcus pneumoniae*. El dominio C-terminal de la proteína LytA es responsable de la afinidad a la colina o a algunos análogos de colina tal como DEAE. En una realización, el antígeno derivado asociado a tumor de la presente invención puede comprender LytA o un derivado de la misma como una proteína pareja de fusión. La LytA o un derivado de la misma puede comprender la parte repetida de la molécula LytA encontrada en el extremo C terminal que comienza en el resto 178. En una realización, la LytA o un derivado de la misma comprende los restos 188 - 305 de C-LytA.

Los polipéptidos inmunogénicos para uso en la presente invención serán típicamente proteínas recombinantes producidas, por ejemplo, mediante la expresión en un huésped heterólogo tal como un huésped bacteriano, en células de levaduras o de mamífero cultivadas.

El término "derivado de antígeno asociado a tumor" significa un polipéptido que parcialmente o completamente contiene las secuencias que aparecen de forma natural en un antígeno asociado a tumor o que lleva un alto grado de identidad de secuencia con respecto al mismo (por ejemplo, más del 95% de identidad sobre un tramo de al menos 10, por ejemplo, al menos 20 aminoácidos). Los derivados también incluyen las secuencias que tienen sustituciones conservadoras. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas y se establecen en general como las matrices de puntuación por defecto en los programas de ordenador de alineación de secuencias.

En términos generales, las sustituciones dentro de los siguientes grupos son sustituciones conservadoras, pero las sustituciones entre los siguientes grupos se consideran no conservadas. Los grupos son:

- i) Aspartato/asparagina/glutamato/glutamina
- ii) Serina/treonina
- iii) Lisina/arginina
- iv) Fenilalanina/tirosina/triptófano
- v) Leucina/isoleucina/valina/metionina
- vi) Glicina/alanina

Los derivados de la presente invención también pueden incluir secuencias tratadas químicamente tales como tratamiento con aldehído (tales como formaldehído o glutaraldehído), carboximetilación, carboxiamidación, acetilación y otros tratamientos químicos rutinarios. Las construcciones de la presente invención que tienen restos de tiol libres derivatizados también se pueden usar en la presente invención. En particular se pueden usar derivados de tiol carboxiamidados o carboximetilados.

Como se describe en el presente documento a modo de ejemplo el derivado de antígeno asociado a tumor puede ser un antígeno de MAGE como se describe en el presente documento que tienen restos de tiol libres derivatizados. Los restos de tiol libres derivatizados pueden ser derivados de carboxiamida o carboximetilados.

Como se describe en el presente documento a modo de ejemplo el derivado de antígeno asociado a tumor puede alternativamente comprender una construcción que comprende más de un antígeno asociado a tumor. En un ejemplo, el derivado de antígeno asociado a tumor puede comprender dos o más antígenos asociados a tumores.

El término "fragmento" como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos de un antígeno asociado a tumor o derivado del antígeno que contienen al menos un epítipo, por ejemplo un epítipo CTL, típicamente un péptido de al menos 8 aminoácidos. Los fragmentos de al menos 8, por ejemplo 8 - 10 aminoácidos o hasta 20, 50, 60, 70, 100, 150 ó 200 aminoácidos de longitud se consideran que caen dentro del alcance de la invención siempre que el fragmento muestre antigenicidad, es decir que los epítopes principales (por ejemplo, epítopes de CTL) son retinidos por el fragmento y el fragmento es capaz de inducir una respuesta inmune que reacciona de manera cruzada con el antígeno asociado a tumor de origen natural. Los fragmentos ejemplares pueden ser de 8 - 10, 10 - 20, 20 - 50, 50 - 60, 60 - 70, 70 - 100, 100 - 150, 150 - 200 restos de aminoácidos de longitud (incluido cualquier valor dentro de estos intervalos).

Como se describe en el presente documento a modo de ejemplo, la composición liofilizada que comprende el antígeno Her 2 neu y Oligonucleótido CpG se reconstituye con un vehículo liposoma o de emulsión de aceite en agua que contiene 3D- MPL y QS21. Tales formulaciones reconstituidas producen una respuesta mediada tanto humoral como celular.

- 5 Como se describe en el presente documento a modo de ejemplo las composiciones liofilizadas pueden contener antígenos asociados a mecanismos de apoyo de tumor (por ejemplo, angiogénesis, invasión tumoral) por ejemplo vínculo 2, VEGF.

En otro ejemplo, el antígeno dentro de la composición liofilizada de la invención es un antígeno seleccionado entre antígenos derivados de VIH, particularmente antígenos derivados de VIH-1.

- 10 En una realización específica de la invención una composición liofilizada contiene más de un polipeptido inmunogénico.

La composición liofilizada puede contener un antígeno, o puede contener más de un antígeno.

En un aspecto de la invención, el oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG se usa para mejorar la solubilidad de antígenos no cargados positivamente.

- 15 Los presentes inventores han encontrado que, particularmente con los antígenos que están cargados negativamente, la liofilización conjunta de Cpg puede mejorar su solubilidad tras la reconstitución. El oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG será una molécula con una carga negativa neta. Cuando este ligando se liofiliza conjuntamente con un antígeno con una carga positiva neta, existe una posibilidad de que el ligando de un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG interactuará con el antígeno tras la reconstitución de la composición liofilizada, provocando posiblemente la precipitación del antígeno. Esto no es deseable, pero puede ser evitado por los expertos en la técnica mediante la inclusión con la composición de excipientes de liofilización que se sabe que incrementan la solubilidad en sustituciones tales como, por ejemplo, L-arginina.

- 20 El oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG y uno o más antígenos se combinan con excipientes adecuados para formar la formulación de carga final que se liofilizará. De manera óptima, los excipientes contendrán un crioprotector para proteger a la proteína de la desnaturalización durante las fases tempranas de liofilización, y un lioprotector para evitar la inactivación de la proteína durante el secado. Se pueden usar dos moléculas diferentes, o se puede usar una molécula que tiene ambas propiedades, tal como un disacárido. Opcionalmente, también se puede añadir un agente de carga cristalino tal como manitol o glicina. También se puede añadir un tensioactivo no iónico tal como polisorbato o Tween ® para ayudar a prevenir la agregación de la proteína. Los excipientes también pueden incluir sales tampón para modificar el pH de la carga final.

- 25 Los excipientes adecuados incluyen los siguientes: azúcares tales como sacarosa, trehalosa, rafinosa y maltodextrinas tales como maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa o maltohexaosa; polioles tales como manitol o sorbitol; polímeros tales como dextrano, polietilén glicol (PEG), o polivinilpirrolidona (PVP); aminoácidos tales como glicina, alanina o arginina.

- 30 Los excipientes también se pueden combinar de manera que dos o más, por ejemplo tres o cuatro excipientes se pueden usar conjuntamente. Las combinaciones posibles incluyen azúcar y dextrano, por ejemplo sacarosa y dextrano o trehalosa y dextrano; azúcar y PEG, por ejemplo PEG8000 y sacáridos; azúcar y PVP por ejemplo sacarosa y PVP; azúcar y aminoácidos, por ejemplo glicina y sacarosa; dos azúcares conjuntamente, por ejemplo sacarosa y glucosa o sacarosa y rafinosa; sacarosa y polioles, por ejemplo sacarosa y sorbitol o sacarosa y manitol; polioles y aminoácidos, tales como manitol y glicina.

Se pueden añadir tensioactivos tales como polisorbato o Tween ® a cualquier combinación de excipientes.

- 35 Con el fin de formar una composición inmunogénica que se pueda usar para vacunación, la composición liofilizada que contiene el antígeno y el ligando de TLR9 se reconstituye con un diluyente farmacéuticamente aceptable. Un aspecto preferido de la invención es que tal diluyente sea un diluyente particulado, por ejemplo una solución de partículas de sales metálicas, o liposomas, o una emulsión de aceite en agua.

En una realización, el diluyente contiene inmunoestimuladores adicionales. Esto significa que la composición inmunogénica reconstituida final contendrá otros inmunoestimuladores además del oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG encontrado en la composición liofilizada.

- 40 Existe un número de inmunoestimuladores conocidos que se sabe que son adyuvantes o bien solos o en combinación. El sistema inmune innato o natural reconoce un amplio espectro de patógenos sin una necesidad de la exposición anterior. Las células principales responsables de la inmunidad innata, monocitos/macrófagos y neutrófilos, fagocitan los patógenos microbianos y desencadenan las respuestas inmunes innatas, inflamatorias, específicas.

- 45 Los lipopolisacáridos (LPS) son la molécula de superficie principal de, y se producen exclusivamente en, la hoja externa de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Los LPS se ha mostrado que son ligandos de TLR4 . Los LPS impiden la destrucción de bacterias mediante complementos de suero y células fagocíticas, y están implicados en la adherencia para la colonización. Los LPS son un grupo de moléculas de complejos relacionadas estructuralmente de aproximadamente 10.000 Daltons de tamaño y constan de tres regiones unidas de manera covalente:

- (i) una cadena de polisacáridos específica de O (antígeno O) en la región externa

(ii) una región central de oligosacáridos central

(iii) lípido A - la región más interna que sirve como anclaje hidrófobo, comprende unidades de disacáridos de glucosamina que llevan ácidos grasos de cadena larga.

5 Las actividades biológicas de los LPS, tales como toxicidad letal, pirogenicidad y adyuvanticidad, se ha mostrado que están relacionadas con el resto del lípido A. Por el contrario, la inmunogenicidad está asociada al componente de polisacárido específico de O (antígeno O). Tanto los LPS como el lípido A se han conocido desde hace mucho tiempo por sus fuertes efectos adyuvantes, pero la alta toxicidad de estas moléculas ha imposibilitado su uso en las formulaciones de vacuna. Por lo tanto se ha hecho un esfuerzo significativo para reducir la toxicidad de LPS o lípido A manteniendo al mismo tiempo su adyuvanticidad.

10 El mutante de *Salmonella minnesota* R595 se aisló en 1966 a partir de un cultivo de la cepa precursora (*suave*) (Luderitz *et al.* 1966 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 133: 349 - 374). Se rastrearon las colonias seleccionadas para evaluar su susceptibilidad a la lisis mediante un panel de fagos, y solamente las colonias que mostraron un intervalo estrecho de sensibilidad (susceptible a uno o dos fagos solamente) se seleccionaron para un estudio posterior. Este esfuerzo condujo al aislamiento de una cepa mutante *rugosa profunda* que es defectuosa en la biosíntesis de los LPS y se denomina *S. minnesota* R595.

15 En comparación con otros LPS, los producidos por el mutante *S. minnesota* R595 tienen una estructura relativamente simple.

(i) no contienen una región específica de O - una característica que es responsable del cambio desde el fenotipo liso de tipo salvaje al fenotipo rugoso mutante y da como resultado una pérdida de virulencia.

20 (ii) la región central es muy corta - esta característica incrementa la susceptibilidad de la cepa a una diversidad de compuestos químicos

(iii) el resto del lípido A está altamente acilado con hasta 7 ácidos grasos.

25 El lípido A 4'-monofosforilo (MPL), que se puede obtener mediante la hidrólisis ácida de los LPS extraídos de una cepa mutante rugosa profunda de las bacterias Gram negativas, retiene las propiedades adyuvantes de los LPS mientras que demuestra una toxicidad que se reduce por un factor de más de 1000 (como se mide mediante la dosis letal en huevos de embriones de pollo) (Johnson *et al.* 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Suppl: S512 - S516). Los LPS se calientan a reflujo típicamente en soluciones de ácido mineral de fortaleza moderada (por ejemplo, HCl 0,1 M) durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. Este procedimiento da como resultado la desfosforilación en la posición 1, y la descarbohidratación en la posición 6', produciendo MPL.

30 El monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL), que se puede obtener mediante hidrólisis alcalina suave de MPL, tiene una toxicidad adicionalmente reducida mientras se mantiene de nuevo la capacidad de adyuvantarse, véase el documento US 4.912.094 (Ribi Immunochemicals). La hidrólisis alcalina se realiza típicamente en disolvente orgánico, tal como una mezcla de cloroformo/metanol, mediante la saturación con una solución acuosa de base débil, tal como carbonato de sodio 0.5 M a pH 10,5.

35 Información adicional sobre la preparación de 3D-MPL está disponible en, por ejemplo, los documentos US 4.912.094 y WO 02/078637 (Corixa Corporation).

40 Algunas moléculas que no son ligandos de TLR se ha mostrado que tienen actividad adyuvante. Las saponinas de Quillaja son una mezcla de glicósidos de triterpeno extraídos de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*. Se han empelado saponinas brutas de manera extensiva como adyuvantes veterinarios. Quil-A es un extracto acuoso parcialmente purificado del material de la saponina de Quillaja. QS21 es una fracción no tóxica purificada por Hplc de Quil A y su procedimiento de su producción se divulga (como QA21) en la patente de Estados Unidos N° 5.057.540.

45 En un aspecto de la invención, el diluyente contiene un inmunoestimulador adicional. En otro aspecto de la invención, el diluyente contiene más de un inmunoestimulador adicional. Tales inmunoestimuladores pueden ser ligando de TLR4, saponinas, ligandos de TLR7, ligandos de TLR8 o ligandos de TLR9. En una realización de la invención, el inmunoestimulador adicional es un ligando de TLR4 tal como 3D-MPL como se describe en el presente documento. En una realización adicional de la invención, el inmunoestimulador adicional es QS21 como se describe en el presente documento. En todavía otra realización adicional de la invención, el diluyente contiene QS21 y 3D-MPL. En un aspecto de esta realización, el diluyente es una emulsión de aceite en agua que contiene QS21 y 3D-MPL. En otro aspecto de esta realización, el diluyente es una solución de liposomas que contiene QS21 y 3D-MPL.

Ejemplos

Ejemplo 1: Secado por congelación de un Oligonucleótido CpG y CPC-P501S como antígeno

55 El antígeno usado fue CPC - P501S. Este antígeno se muestra en la figura 1 en forma de diagrama, en el que la sección que muestra TM2 a TM12 representa el antígeno P501S; las formas ovales en la parte izquierda representan las parejas de fusión de CPC y la cola His se muestra en la parte derecha.

El antígeno se produjo con una etiqueta His como se muestra en *S. cerevisiae* y después se preparó hasta una concentración de 700 µg/ml usando un tampón de Tris (5 mM pH 7,5) y Tween 80 (0,3 %).

60 Para preparar la carga final, se añadió sacarosa (35 %) al agua para inyección hasta alcanzar una concentración final de 6,3%. Después se añadió Tris (1M pH 8,8), seguido de Tween 80 (25%) hasta alcanzar una concentración

final de 0,2%. Esta mezcla se agitó con agitador magnético durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió CPC-P501S y la mezcla se agitó con agitador magnético durante 4 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió oligo CpG de la SEC ID N.º: 4, y la mezcla resultante se agitó con agitador magnético durante 15 minutos a temperatura ambiente proporcionando la carga final. La composición se analizó como sigue:

	Carga final (500 µl)	Recipiente final (500 µl) Dosis humana		Carga final (500 µl)	Recipiente final (500 µl) Dosis humana
Tortas		<i>Después de la reconstitución con 625 µl de AS01B</i>	Tortas		<i>Después de la reconstitución con 625 µl de AS01B</i>
CPC- P501	125 µg	100 µg	CPC- P501	25 µg	20 µg
CpG	625 µg	500 µg	CpG	625 µg	500 µg
Tris	50 mM	40 mM	Tris	50 mM	40 mM
Tween 80	0,50 %	0,40 %	Tween 80	0,20 %	0,16 %
sacarosa	6,3 %	5,0 %	sacarosa	6,3 %	5,0 %
pH	9,1 +/- 0,1	7,4 +/- 0,1	pH	9,1 +/- 0,1	7,4 +/- 0,1

5

Se llenaron 0,5 ml de una composición en un vial de vidrio, que se sometió al ciclo de liofilización como se muestra en la figura 2.

10

La caracterización de la torta se llevó a cabo mediante inspección visual y medida del diámetro a T0, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, y 4 semanas a 37°C, en los tres viales de la composición (véase la figura 3). Se midió el contenido de humedad residual en los mismos momentos y temperaturas usando termogravimetría (TG) o Karl Fischer (KF). Como se puede ver a continuación, las tortas eran estables durante hasta dos semanas.

Torta secada por congelación

Programación de la estabilidad	Aspecto visual	Diámetro de la torta (mm)	Contenido en humedad (% p de H ₂ O/p de torta)	
			KF	TG
T0	OK	12,6 ± 0,1	0,3% (1,5 meses a 4°C)	0,8% (5 meses a 4°C)
1 semana 37°C	OK	nd	0,59%	nd
2 semana 37°C	Retracción +	9,8 ± 0,8	nd	1,4%
3 semana 37°C	Retracción ++	7,7 ± 1,0	nd	1,2%
4 semana 37°C	Retracción ++	8,7 ± 1,5	No medible	1,3%

KF: procedimiento de Karl Fischer
 TG: procedimiento de termogravimetría
 nd: no hecho
 OK: ni agregación ni degradación
 Especificaciones: 3% (termogravimetría)

15

La humedad en un recipiente final almacenado a 37°C (para acelerar el análisis de estabilidad) aumenta con el tiempo. Después de un mes a 37°C, las tortas contienen 1,3% de H₂O y se retrajeron. En este experimento, el incremento en humedad se debe al hecho de que el polvo higroscópico absorbe agua de los tapones. La sustitución de los tapones con nuevos tipos de tapones puede ayudar a prevenir esta retracción.

5 Las tortas se reconstituyen después bien con agua para inyección, o con los siguientes líquidos vehículos: el sistema adyuvante A (un adyuvante liposomal preparado como se establece en el documento WO2005/112991), el sistema adyuvante E (un adyuvante de emulsión de aceite en agua preparado como se establece en el documento WO2005/112991) o un sistema adyuvante F (un adyuvante de emulsión de aceite en agua preparado como se establece en el documento WO2005/112991).

10 No se observó agregación o degradación de proteína con agua para inyección, con sistema adyuvante E o sistema adyuvante F. Se observó alguna agregación y degradación con el sistema adyuvante A. Se concluyó que esto se debía a la disminución del pH por debajo del punto isoelectrico de CPC-P501S. Un incremento en la concentración del excipiente Tris hasta 50 mM solucionó el problema y ya no se observó ninguna agregación con el sistema adyuvante A. Se encontró también que la presencia de CpG en la torta liofilizada (es decir la liofilización conjunta de antígeno y oligonucleótido CpG) ayudó a prevenir la agregación del antígeno cuando se reconstituye con el sistema adyuvante A. Una comparación de la reconstitución de las tortas liofilizadas con y sin CpG que usa el sistema adyuvante A mostró que se reducía la agregación después de la liofilización conjunta (datos no mostrados)

15 También se estudió el impacto de los excipientes del tamaño de los liposomas en el sistema adyuvante A, y se encontró que no había diferencia de tamaño entre los liposomas encontrados en un vial del sistema adyuvante A solo y liposomas encontrados en un vial del sistema adyuvante A después de la reconstitución de una torta liofilizada que contenía antígeno, CpG, Tris y Tween. Por lo tanto los inventores pueden concluir que los componentes de la torta liofilizada no afectan al sistema adyuvante (figura 4)

20 Finalmente, se estudió la antigenicidad de la formulación, y se encontró que en términos de la proliferación de linfocitos y producción de citoquina intracelular (IFN γ), no existía diferencia entre un líquido frente a una formulación liofilizada de CPC-P501S (datos no mostrados). Por lo tanto los inventores pueden concluir que la inmunogenicidad del antígeno no está afectada por la liofilización conjunta con CpG.

Ejemplo 2: secado por congelación de Oligonucleótido CpG y Mage-3 como antígeno

25 El antígeno usado era una parte de la proteína D de la proteína unida a MAGE-3, que a su vez estaba unida a una cola His para facilitar la purificación de PD-Mage3-His (véase la Figura 5: SEC ID N.º: 13).

El antígeno de carga purificado se produjo con una etiqueta His en E. coli y después se preparó hasta una concentración de 750 μ g/ml usando un tampón de NaH $_2$ PO $_4$.2H $_2$ O/K $_2$ HPO $_4$.2H $_2$ O (2 mM) y Tween 80 a aproximadamente 0,2% v/v (teórico) pH 7,5.

30 Para preparar la carga final, se añadió sacarosa (30%) a agua para inyección proporcionando una concentración final de 3,15%. Después se añadió NaH $_2$ PO $_4$.2H $_2$ O/K $_2$ HPO $_4$.2H $_2$ O (100 mM pH 7,5) proporcionando una concentración final de PO $_4$ de 5 mM teniendo en cuenta el fosfato encontrado en el tampón de antígeno. También se añadió Tween 80 (3%) proporcionando una concentración final de 0,15%, teniendo en cuenta el Tween encontrado en el tampón de antígeno. Esta mezcla se agitó con agitador magnético durante entre 5 y 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió PD-Mage3-His (750 μ g/ml) y la mezcla se agitó con agitador magnético durante 5 - 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió oligo CpG de la SEC ID N.º:4, y la mezcla resultante se agitó con agitador magnético durante 15 minutos (+/- 5 minutos) a temperatura ambiente proporcionando la carga final. El pH se ajustó hasta pH 7,5 +/- 0,1 con NaOH 0,05 M o 0,5 M, o HCl 0,03 M o 0,3 M.

La composición se analizó como sigue:

Nº	Ingredientes			Antes de secado por congelación			Por HD (después de la reconstitución con 0,625 ml de diluyente	
	Nombre	Componente	Src	CC	Peso (en 0,5 ml)		Concentración	Peso (en 0,5 ml)
1	PD-Mage3-His	NaH $_2$ PO $_4$.2H $_2$ O-K $_2$ HPO $_4$.3H $_2$ O 2 mM / Tween 80 ~ 0,2% v/v teo pH 7,5		750 μ g/ml	375 μ g		600 μ g/ml	300 μ g
2	CpG			1250 μ g/ml	625 μ g		1000 μ g/ml	500 μ g
3	Sacarosa			3,15% p/v	15,75 mg		2,52% p/v	12,6 mg
4	Tween 80		1	0,15% p/v			0,12% p/v	
5	PO4		1	5 mM			4 mM	
6	WFI					Añad 0,5 ml		
7	pH					7,5 +/- 0,1		

Se llenaron 0,5 ml de esta composición en un vial de vidrio, que se sometió en el ciclo de liofilización mostrado en la Figura 6.

El impacto de los excipientes y ciclo de secado por congelación sobre la composición de la torta se analizó después de entre 7 y 9 días de almacenamiento de la torta a 37°C.

5 **Aspecto de la torta y humedad residual**

Aspecto de la torta	Sin colapso (T0)	Sin retracción (T7d 37°C)
humedad residual	-	0,59% (T8d 37°C)

Se puede observar que las tortas no presentan ningún colapso a los 7 días y no cambian durante 8 días de estabilidad de estrés

10 La humedad residual de las tortas almacenadas durante entre 7 y 9 días a 37°C permanecía por debajo de la especificación de 3%.

No hubo ninguna evolución en el diámetro después del almacenamiento durante entre 7 y 9 días a 37°C.

Después las tortas se reconstituyeron con el sistema adyuvante A (un adyuvante liposomal preparado como se establece en el documento WO2005/112991). No se observó agregación o degradación de proteínas, confirmando por lo tanto que el antígeno se puede liofilizar conjuntamente con CpG sin afectar su capacidad para reconstituirse.

15 Se estudió la antigenicidad de la formulación. Se encontró que, después de la reconstitución en el sistema adyuvante A, había una disminución en la antigenicidad con el tiempo, después de 24 horas. Se cree que esto es debido al pH ácido (6,2 +/- 0,1) encontrado después de la reconstitución. Esto se confirmó cuando se encontró que la caída de la antigenicidad se podía disminuir incrementando el pH. Sin embargo había todavía alguna disminución en la antigenicidad con el tiempo. Por lo tanto se ensayaron las formulaciones para ver si esta disminución tenía un efecto sobre el ensayo de potencia *in-vivo*. Se administraron diluciones de 3/10, 1/10 y 1/30 de una dosis humana a grupos de ratones, 10 ratones por grupo como se muestra en la Figura 7. Se extrajo sangre de los ratones el día 28.

T0, 4 h y 24 h son los tiempos después de la reconstitución de la torta con el sistema adyuvante A. Como se puede observar en la Figura 7, no hubo efecto sobre la potencia.

25 **Ejemplo 3: Impacto de CpG en la solubilidad de antígeno después de la reconstitución.**

1. WT1 es una proteína encontrada originalmente que se sobreexpresa en cáncer de riñón pediátrico, tumor de Wilm. El antígeno candidato usado en el caso presente usa casi la proteína de longitud completa como antígeno. La proteína WT1-A10 es una proteína de fusión recombinante de 292 AA expresada en E. coli que consta de la secuencia troncada de 12 mero (secuencia guía) y los aminoácidos números 2 - 281 de la secuencia de WT1. Después de la liofilización sola, este antígeno precipita si se reconstituye con el sistema adyuvante A debido a que su punto isoeléctrico (5,85 a 7,5) que está cerca del pH del sistema adyuvante A (6,1) y la presencia de cloruro sódico en el sistema adyuvante A.

Se prepararon dos formulaciones de WT1-A10. La dosis reconstituida contenía 400 µg/ml de antígeno WT1-A10, 10% de sacarosa, Tris 100 mM, y 0,2% de Tween 80, más o menos 840 µg/ml de CpG.

35 Ambas formulaciones se reconstituyeron con 500 µl de sistema adyuvante A. El líquido resultante se centrifugó y se realizó una transferencia de Western sobre el líquido no centrifugado (NC), el sobrenadante (SN) y el sedimento (P). Los resultados se muestran en la Figura 8.

40 Como se puede observar en la Figura 8, en la presencia de CpG, la solubilidad del antígeno después de la reconstitución se mejora como se evidencia por la carencia de antígeno en el sedimento precipitado. El antígeno precipitado se puede observar en el sedimento de la composición liofilizada reconstituida donde la torta liofilizada no contenía CpG. Esto es una evidencia de que, en el caso de un antígeno no cargado positivamente, la liofilización conjunta de CpG mejora la solubilidad del antígeno tras la reconstitución.

2. PRAME

45 Se prepararon dos formulaciones de PRAME. La dosis reconstituida contenía 1000 µg/ml de antígeno PRAME, 3,15% de sacarosa, Borato 5 mM, cloruro sódico 150 mM, más o menos 840 µg/ml de CpG. Ambas formulaciones se reconstituyeron con 500 µl de sistema adyuvante A. El líquido resultante se centrifugó y se realizó una transferencia de Western sobre el líquido no centrifugado (NC), el sobrenadante (SN) y el sedimento (P). Los resultados se muestran en la Figura 9, donde NC = no centrifugado, SN = sobrenadante y P = sedimento

50 Como se puede observar en la Figura 9, en la presencia de CpG, la solubilidad después de la reconstitución se mejora como se evidencia por la carencia de antígeno en el sedimento precipitado. El antígeno precipitado se puede observar en el sedimento de la composición liofilizada reconstituida donde la torta liofilizada no contenía CpG. Esto es una evidencia adicional de que, en el caso de un antígeno no cargado positivamente, la liofilización conjunta de CpG mejora la solubilidad del antígeno tras la reconstitución.

SEC ID N.:1

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

SEC ID N.:2

TCT CCC AGC GTG CGC CAT

5 SEC ID N.:3

ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

SEC ID N.:4

TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT

SEC ID N.:5

10

TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT

SEC ID N.:6

MKVKETRKNY	QHLWRWGTM	LGMLMICSAA	EQLWVTVYYG	VPVWKEATTT	50
LFCASDAKAY	DTEVHNVWAT	HACVPTDPP	QEVVLGNVTE	YFNMWKNMV	100
DQMHEDIISL	WDQSLKFCVK	LTPLCVTLDC	DDVNTTNSTT	TTSNGWTGEI	150
RKGEIKNCSF	NITTSIRDKV	QKEYALFYNL	DVVPIDDDNA	TTKNKTTRNF	200
RLIHCNSSVM	TQACPKVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNNK	TFDGKGLCTN	250
VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL	NGSLAEEEVV	IRSDNFMDNT	KTIIVQLNES	300
VAINCTRPNN	NTRKGIHIGP	GRAFYAARKI	IGDIRQAHCN	LSRAQWNNTL	350
KQIVIKLREH	FGNKTIFNQ	SSGGDPEIVR	HSFNCGGEFF	YCDTTQLFNS	400
TWNGTEGNNT	EGNSTITLPC	RIKQIINMWQ	EVGKAMYAPP	IGGQIRCSSN	450
ITGLLLTRDG	GTEGNGTENE	TEIFRPGGGD	MRDNWRSELY	KYKVVKVEPI	500
GVAPTRAKRR	VVQR				514

SEC ID N.:7

1	MRVMEIQRNC	QHLLRWGIMI	LGMIIICSTA	DNLWVTVYYG	VPVWRDAETT
51	LFCASDAKAY	STEKHNWVAT	HACVPTDPP	QEIPLDNVTE	EFNMWKNMV
101	DQMHEDIISL	WDQSLKPCVQ	LTPLCVTLNC	SNARVNATFN	STEDREGMKN
151	CSFNMTTEL	DKKQQVYSLF	YRLDIEKINS	SNNNSEYRLV	NCNTSAITQA
201	CPKVTFEPIP	IHYCAPAGFA	ILKCNDETFN	GTGPCKNVST	VQCTHGKIPV
251	VSTQLLLNGS	LAEREVRIRS	ENIANNAKNI	IVQFASPVKI	NCIRPNNNTR
301	KSYRIGPGQT	FYATDIVGDI	ROAHCNVSRT	DWNNTLRLVA	NQLRKYFSNK
351	TIIFTNSSGG	DLEITTHSFN	CGGEFFYCNT	SGLFNSTWTT	NNMQESNDTS
401	NGTITLPCRI	KQIIRMWQRV	GQAMYAPP	GVIRCESNIT	GLILTRDGGN
451	NNSANETFRP	GGGDIRDNWR	SELYKYKVVK	IEPLGVAPTR	AKRRVVVEREK
501	RAVGIGAVFL	GFLGAAGSTM	GAASITLTVQ	ARQLLSGIVQ	QOSNLLRAIE
551	AQQQLLKLTV	WGIKQLQARV	LAVERYLRDQ	QLLGIWGCSSG	KLICCTTNVPW
601	NSSWSNKSVD	DIWQNMTWLQ	WDKEISNYTD	IIYSLIEESQ	NQQEKNEQDL
651	LALDKWANLW	NWFDISKWLW	YIRS		

15

SEC ID N.º:8

```

1  MGARASVLSG  GELDRWEKIR  LRPGGKKKYK  LKHIVWASRE  LERFAVNPGL
51  LETSEGCRQI  LGQLQPSLQT  GSEELRSLYN  TVATLYCVHQ  RIEIKDTKEA
101  LDKIEEEQNK  SKKKAQAAAA  DTGHSNQVSQ  NYPIVQNIQG  QMVHQAI SPR
151  TLNAWVKVVE  EKAFSPEVIP  MFSALSEGAT  PQDLNMLNT  VGGHQAMQM
201  LKETINEEAA  EWDRVHPVHA  GPIAPGQMR  PRGSDIAGTT  STLQEQIGWM
251  TNNPPIPVGE  IYKRWIILGL  NKIVRMYSPT  SILDIRQGPK  EPFRDYVDRF
301  YKTLRAEQAS  QEVKNWMTET  LLVQANPDC  KTILKALGPA  ATLEEMMTAC
351  QGVGGPGHKA  RVLMPISPI  ETVPVKLPK  MDGPKVKQWP  LTEEKIKALV
401  EICTEMEKEG  KISKIGPENP  YNTPVFAIK  KDS TKWRKLV  DFRELNKRTQ

451  DFWEVQLGIP  HPAGLKKKKS  VTVLDVGDAY  FSVPLDEDFR  KYTAFTIPSI
501  NNETPGIRYQ  YNVLPQGWKG  SPAIFQSSMT  KILEPFRKQN  PDIVIIYQMD
551  DLYVGSLEI  GQHRTKIEEL  RQHLLRWGLT  TPKKHQKEP  PFLKMGYELH
601  PDKWTVQPIV  LPEKDSWTVN  DIQKLVGKLN  WASQIYPGK  VRQLCKLLRG
651  TKALTEVIPL  TEEAELELAE  NREILKEPVH  GVYYDPSKDL  IAEIQKOGOG
701  QWTYQIYQEP  FKNLKTGKYA  RMRGAHTNDV  KQLTEAVQKI  TTESIVIWGK
751  TPKFKLPIQK  ETWETWTEY  WQATWIPWE  FVNTPLVKL  WYQLEKEPIV
801  GAETFYVDGA  ANRETKLGKA  GYVTNRGRQK  VVTLTDTNQ  KTELQAIYLA
851  LQDSGLEVNI  VTDSQYALGI  IQAQPDQSES  ELVNQIIEQL  IKKEKVYLAW
901  VPAHKGIGGN  EQVDKLVSAG  IRKVLVGF  VTPQVPLRPM  TYKAAVDLSH
951  FLKEKGGLEG  LIHSQRRQDI  LDLWIYHTQG  YFPDQNYTP  GPGVRYPLTF
1001  GWCYKLPVE  PDKVEEANKG  ENTSLHPVS  LHGMDDPERE  VLEWRPDSRL
1051  AFHHVARELH  PEYFKNC

```

SEC ID N.º:9

atggttatcgtgcagaacatccaggggcaaatggtagatcaggccatcaccctagaactttaaatgcatggg
 taaaagtagtagaagagaaggctttcagcccagaagtaatacccaatggtttcagcattatcagaaggagccac
 cccacaagatttaaacaccatgctaaacacagtggggggacatcaagcagccatgcaaatggttaaaagagacc
 atcaatgaggaagctgcagaatgggatagagtacatccagtgcatgcagggcctattgcaaccagggcagatga
 gagaaccaaggggaagtgacatagcaggaactactagtagcccttcaggaacaaaataggtggatgacaaaataa
 tccacctatcccagtaggagaaatttaaaaagatggaataatcctgggattaaataaaaatagtaagaaatgat
 agccctaccagcattctggacataagacaaggacaaaagaaccttttagagactatgtagaccgggtctata
 aaactetaagagccgagcaagcttcacaggaggtaaaaaaatggatgacagaaaccttgttgggtccaaaatgc
 gaaccagatgtaagactattttaaaagcattgggaccagcggctacactagaagaaatgtgacagcatgt
 cagggagtagggagaccggccataaggcaagagttttgcatatgccccattagccctattgagactgtgt
 cagtaaaataaagccaggaatggatggcccaaaagttaaacaatggccattgacagaagaaaaataaaagc
 attagtagaaatttgtacagagatggaaaaggaagggaaaaattcaaaaatgggctgaaaaatccatacaat
 actccagtatggccataaaagaaaaagacagtaactaaatggagaaaatagtagatttcagagaacttaata
 agagaactcaagacttctgggaagtcaattaggaataccacatcccgcaggggtaaaaaaagaaaaatcagt
 aacagtagctggatgtgggtgatgcatattttcagttcccttagatgaagacttcaggaataatactgcattt
 accatacctagtataaaacaatgagacaccagggattagatcagtagcaatgtgcttccacagggatggaaag
 gatcaccagcaatattccaaagttagcatgacaaaaatcttagagcccttttagaaaacaaaaatccagacatagt
 tatctatcaatacacatggatgatttgtatgtaggatctgacttagaaataggcagcatagaacaaaaatagag
 gagctgagacaacatctgttgagggtgggacttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaaacctccattcc
 ttaaaaatgggttatgaactccatcctgataaatggacagtagcagcctatagtgctqccagaaaaagacagctg
 gactgtcaatgacatacagaagttagtgggaaaatggaatgggcaagtcagatttaccaggggattaaagta
 aggcaattatgtaaaactccttagaggaaccaaagcactaacagaagtaataaccactaacagaagaagcagagc
 tagaactggcagaaaaacagagagattctaaagaaccagtagcatggagtgatattatgacccatcaaaaagactt
 aatgacagaaatcacagaagcaggggcaaggccaatggacatacaaatttatcaagagcatttaaaaatctg
 aaaaacagaaaaatgcaagaatgaggggtgcccacactaatgatgtaaaaacaatcaacagggcagtgcaaa
 aaataaccacagaaagcatagtaatatggggaaagactcctaaatttaaaactgccatacaaaaggaaacatg
 ggaaacatggtggacagagtagttggcaagccacctggattcctgagtgagggtttgttaatacccctccttta
 gtgaaattatggtaccagtagagaaagaacccatagtaggagcagaaaccttctatgtagatggggcagctg
 acaggggagactaaattaggaaaagcaggatagttactaatagaggaagacaaaaagttgtcacccctaactga
 cacaacaaatcagaagactgagttacaagcaatttatctagctttgcaggatccgggatagaagtaaacata
 gtaacagactcacaatatgcattaggaatcattcaagcacaaccagatcaaaagtgaaatcagagttagtcattc
 aaataatagagcagtttaataaaaaaggaaaaggtctatctggcatgggtaccagcacacaaaggaattggagg
 aatgaacaagtagataaattagtcagtgctggaatcaggaaagtgctatcctatgggtgggcaagtggtcaaaa
 agtagtggtgggtggatggcctactgtaaggaaagaatgagacgagctgagccagcagcagatgggggtgggag
 cagcatctcgagacctggaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcaagctaccaatgctgctttgtgc
 ctggctagaagcacaaagaggaggagggtgggtttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgact
 tacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaaagaaaaaggggggactggaagggctaatcactcccaac
 gaagacaagatataccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattggcagaactacacacc
 agggccaggggtcagatataccactgacctttggatgggtctacaagctagtagcagttgagccagataaggtg
 gaagagqccaataaaaggaqagaacaccagcttqttacacctgtgagcctgcatggaaatggatgaccctgaga
 gagaagtgtagagtgagggtttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccagagagctgcatccggagta
 cttaagaactgcaggccatgggtgagagagcagtagtatgaagcgggggagaattagatcgatgggaaaaa
 attcgcttaaggccagggggaagaaaaataaaataaaacataatgtagggcaagcagggagctagaac
 gattccaggttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaaactgggacagctacaaccatc

ccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatcacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaagg
 atagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaaaaaaagcac
 agcaagcagcagctgacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattactaa

5

10

SEC ID N.:10

MVIVQNIQGGQMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALESEGATP	50
QDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDVRVHPVHAGPIAPGQMREP	100
RGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWII LGLNKIVRMYSPTS	150
ILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDC	200
TILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLHMGPISPIETVSVKCLKPG	250
MDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKK	300
KDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAY	350
FVPLDEDFRKYTAFTIP SINNETPGIRYQYNVLPQGWKGS PAIFQSSMT	400
KILEPFRKQNPDIYIYQYMDLDLYVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLT	450
TPDKKHQKEPPFLKMGYELHPDKWTVQPIVLPKDSWTVNDIOKLVGKLN	500
WASQIYPGIKVRQLCKLLRGTKALTEVIPLTEEALELELAENREILKEPVH	550
GVYYDPSKDLIAEIQKQGGQWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMGAHTNDV	600
KQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWTEYQATWIPWE	650
FVNTPLVLKWLWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRET KLGKAGYVTNRGRQK	700
VVTLTDTTNQKTELQAIYLAALQDSGLEVNIVTDSQYALGI IQAQPQSES	750
ELVNQIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSA GIRKVLAMGGK	800
WSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNA	850
CAWLEAQEEEEVGFVTPQVPLRPMTYKA AVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQ	900
RRQDILDWIIYHTQGYFPDQWNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVE	950
EANKGENTSLHFPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFK	1000
NCREMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYK LKHIVWASRELEFAV	1050
NPGLLETSEGRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKD	1100
TKEALDKIEEEQNKSKKKAQAAAADTGHSNQVSQNY	1136

SEC ID N.:11

1	MAARASILSG	GKLDWEKIR	LRPGGKKKYR	LKHLVWASRE	LDRFALNPSL
51	LETTEGCQOI	MNQLQPAVKT	GTEEIKSLFN	TVATLYCVHQ	RIDVKDTKEA
101	LDKIEEIQNK	SKQKTQAAA	DTGDSSKVSQ	NYPIIQNAQG	QMIHQNLSPR
151	TLNAWVKVIE	EKAFSPEVIP	MFSALSEGAT	PQDLNVMLNI	VGGHQAAMQM
201	LKDTINEEAA	EWDRHLHPVQA	GPIPPGQIRE	PRGSDIAGTT	STPQEQQLQWM
251	TGNPPIPVGN	IYKRWII LGL	NKIVRMYSPV	SILDIKQGP	EPFRDYVDRF
301	FKALRAEQAT	QDVKGWMTET	LLVQANPDC	KSILKALGSG	ATLEEMMTAC
351	QGVGGPGHKA	RVLAEAMSQA	QQTNIMMQRG	NFRGQKRIK	FNCGKEGHLA
401	RNCRAPRKKG	CWKCGKEGHQ	MKDC TERQAN	FLGKIWPSSK	GRPGNFPPQSR
451	PEPTAPPAEL	FGMGEGIASL	PKQE QKDREQ	VPPLVSLKSL	FGNDPLSQGS
501	PISPIETVPV	TLKPGMDGPK	VKQWPLTEEK	IKALTEICTE	MEKEGKISKI
551	GPENPYNTPI	FAIKKKDSTK	WRKLVDFREL	NKRTQDFWEV	QLGIPHPAGL
601	KKKKSVTVLD	VGDAYFSVPL	DENFRKYTAF	TIPSTNNETP	GVRYQYNVLP
651	QGWKGS PAIF	QSSMTKILEP	FRSKNPEIII	YQYMAALYVG	SDLEIGQHRT
701	KIEELRAHLL	SWGFTTPDKK	HQKEPPFLWM	GYELHPDKWT	VQPIMLPDK
751	SWTVNDIQKL	VGKLNWASQI	YAGIKVKQLC	RLLRGAKALT	DIVTLTEEA
801	LELAENREIL	KDPVHGVYYD	PSKDLVAEIQ	KQGQDQWYQ	IYQEPFKNL
851	TGKYARKRSA	HTNDVRQLAE	VVQKVAMESI	VIWGKTPKFK	LPIQKETWET
901	WWMDYQATW	IPEWEFVNTP	PLVKLWYQLE	KOPI LGAETF	YVDGAANRET
951	KLKAGYVTD	RGRQKVVS LT	ETTNQKTELH	AILLALQDSG	SEVNI VTD SQ
1001	YALGIIQAQP	DRSESELVNO	IIEKLGKDK	IYLSWVPAHK	GIGGNEQVDK
1051	LVSSGIRKVL	FLDGIDKAQE	DHERYHSNWR	TMASDFNLPP	IVAKEIVASC
1101	DKCQLKGEAM	HGQVDCSPGI	WQLACTHLEG	KVILVAVHVA	SGYIEAEVIP
1151	AETGQETAYF	LLKLAGRWPV	KVVHTANGSN	FTSAAVKAAC	WWANIQQEFG
1201	IPYNPOSQGV	VASMNKELKK	IIGQVRDOAE	HLKTAVOMAV	FIHNFRRKGG
1251	IGGYSAGERI	IDIIATDIQT	KELQKQITKI	QNF RVYYRDS	RDPIWKGP
1301	LLWKGE GAVV	IQDNSDIKVV	PRR KAKILRD	YGKQ MAGDDC	VAGRQDEDRS
1351	MGGKWSKGS I	VGWPEIRERM	RRAPAAA PGV	GAVSQDLDKH	GAITSSNINN
1401	PSCVWLEAQE	EEEVGFVVRP	QVPLRPMTYK	GAFDLSHFLK	EKGGLDGLIY

ES 2 395 333 T3

1451 SRKRQEILD L WVYHTQGYFP DWQNYTPGPG VRYPLTEGWC FKLVPMEPDE
1501 VEKATEGENN SLLHPICQHG MDDEEREVLI WKFDSRLALK HRAQELHPEF
1551 YKDC

SEC ID N:º:12

Proteína D_H gripe (1) MKLKTLALSLLAAGVLACSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRCASGYLPEH

51) TLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRH(101) RKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFET

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición liofilizada que comprende uno o más antígenos no cargados positivamente y un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG, en la que dicho uno o más antígenos es WT-1, o un derivado o fragmento del mismo, en la que el derivado es bastante similar a los antígenos nativos para retener propiedades antigénicas y seguir siendo capaz de permitir una respuesta inmune que sea alta contra el WT-1, y en la que el fragmento tiene al menos 8 aminoácidos de longitud y es capaz de inducir una respuesta inmune que presenta una reacción cruzada con el WT-1 de origen natural.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicho oligonucleótido inmunoestimulador comprende una secuencia Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina.
- 10 3. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicho oligonucleótido inmunoestimulador se selecciona entre el grupo que comprende:
 - TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEC ID N.º:1);
 - TCT CCC AGC GTG CGC CAT (SEC ID N.º:2);
 - ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEC ID N.º:3);
 - 15 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (SEC ID N.º:4);
 - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (SEC ID N.º:5).
4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el oligonucleótido inmunoestimulador contiene al menos dos repeticiones CG no metiladas que están separadas por al menos 3 nucleótidos.
- 20 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el oligonucleótido inmunoestimulador contiene al menos dos repeticiones CG no metiladas que están separadas por 6 nucleótidos.
6. Un procedimiento de fabricación de una composición liofilizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende las etapas de mezclar el antígeno deseado y el oligonucleótido inmunoestimulador con excipientes adecuados, y someter la formulación resultante a un ciclo de liofilización.
- 25 7. Un procedimiento de fabricación de una composición inmunogénica que comprende las etapas de reconstitución de la composición liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con un vehículo adecuado.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicho vehículo es un vehículo particulado seleccionado entre el grupo que comprende sales minerales, emulsiones, polímeros, liposomas, ISCOM.
- 30 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicho vehículo es una solución liposomal o una emulsión de aceite en agua.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 en el que dicho vehículo comprende además uno o más inmunoestimulantes.
- 35 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que dicho uno o más inmunoestimulantes se seleccionan entre el grupo que consiste en agonistas del receptor de tipo Toll 4 (TLR 4) , antagonistas de TLR 4, saponinas, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8, agonistas de TLR9.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 en el que dicho antagonista de TLR 4 es MPL 3-desacilado.
13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 en el que dicha saponina es QS21.
- 40 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 en el que dicho vehículo comprende dos inmunoestimulantes.
15. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14 en el que dichos inmunoestimulantes son MPL 3-desacilado y QS21.

Figura 1

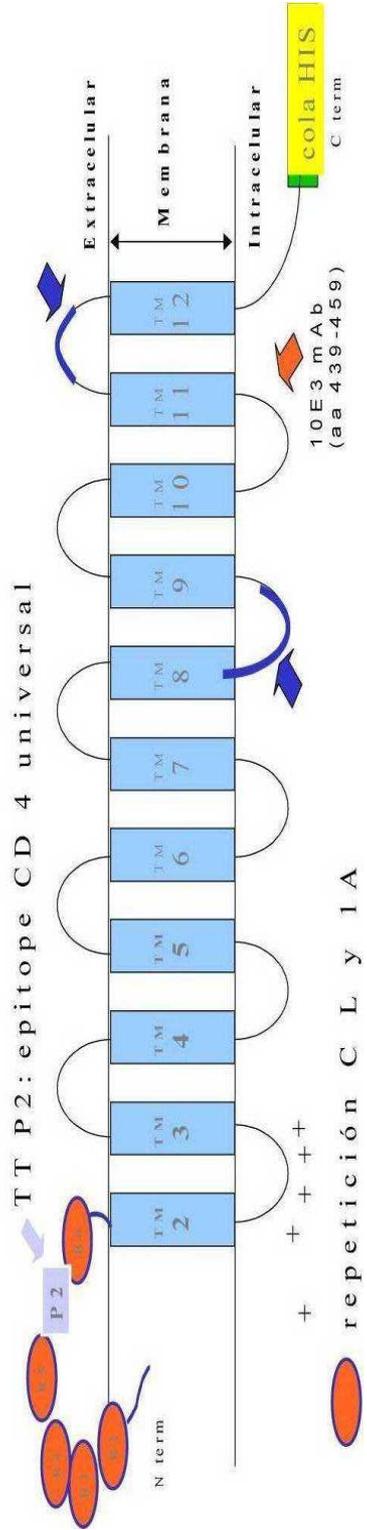


Figura 2

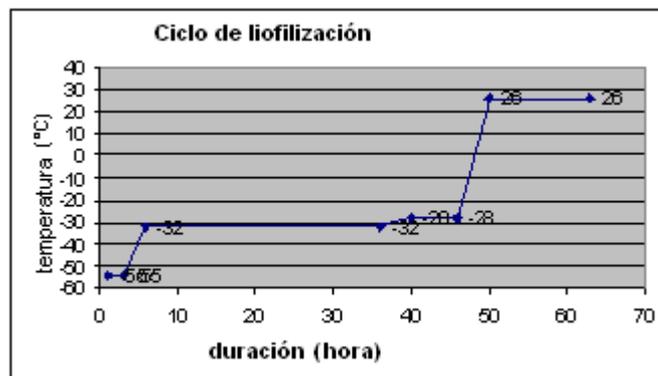
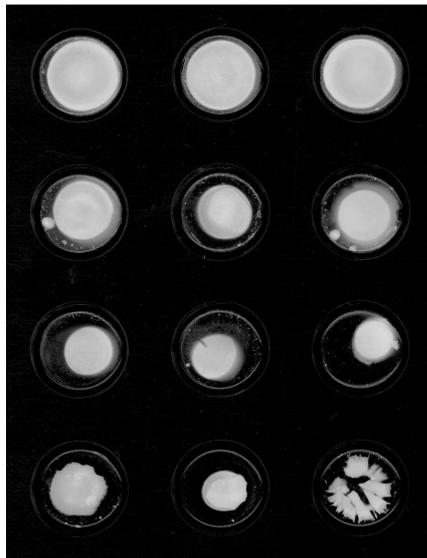


Figura 3

Vial 1

2

3



T0

2 semanas 37°C

3 semanas 37°C

4 semanas 37°C

Figura 4

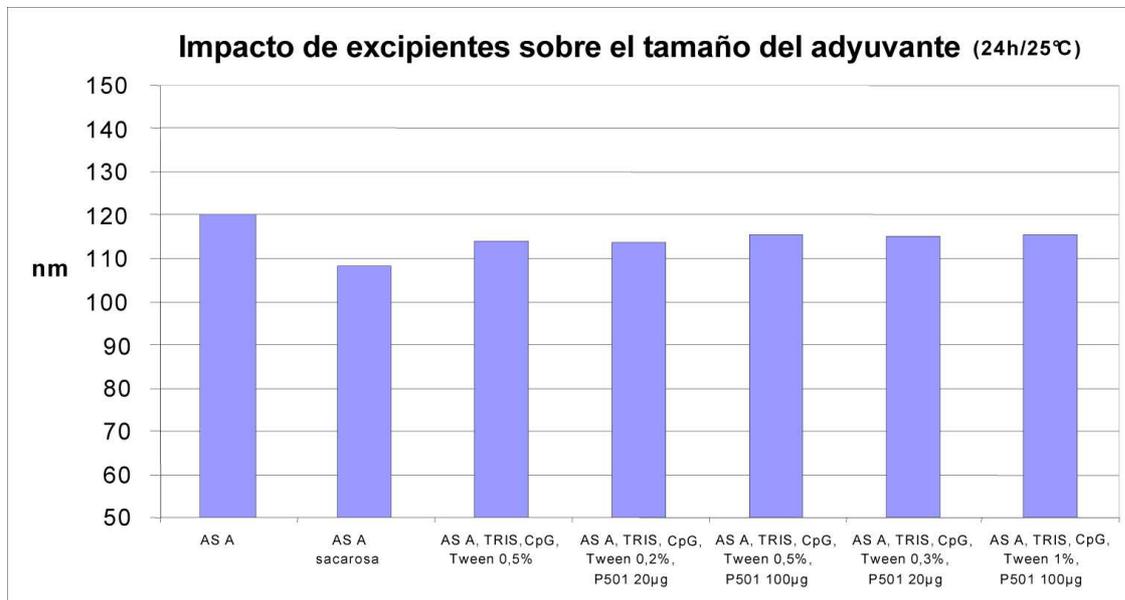


Figura 5

Proteína LipoD1/3 - MAGE3 - HIS:

N term MDP	protD 1/3	Met ASP	Mage 3	GlyGly 7xHis	C term
2	124	3	314		

SEC ID N.º: 13

MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKS DKIIIAH 40
 RGASGYLPEHTLESKALAFQAQQADYLEQDLAMTKDGRLLV 80
 IHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDG RYYVIDFTLKEIQSLE 120
 MTENFETMDLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT 160
 EEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAESPDPQPQSPQGASSLPT 200
 TMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKV 240
 AELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSK 280
 ASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDN 320
 QIMPKAGLLIIVLAIAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEG 360
 REDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW 400
 GPRALVETSYYVKVLHMHMKISGGPHISYPPLHEWVLREGE 440
 EGGHHHHHHH. 451

ROJO = secuencia señal 15 aa

Azul = los 109 aminoácidos primeros de la Proteína D

Rosa = aminoácidos no relacionados

- * (MDP primeros aa de gripe)
- * (Met-Asp en aa 128 - 129 para crear un sitio de clonación))
- * (Gly-Gly en 442 - 443).

Verde = fragmento de MAGE3; aminoácidos 3 - 314 de MAGE3 (312 aminoácidos total)

Naranja = cola 7 his

Figura 6

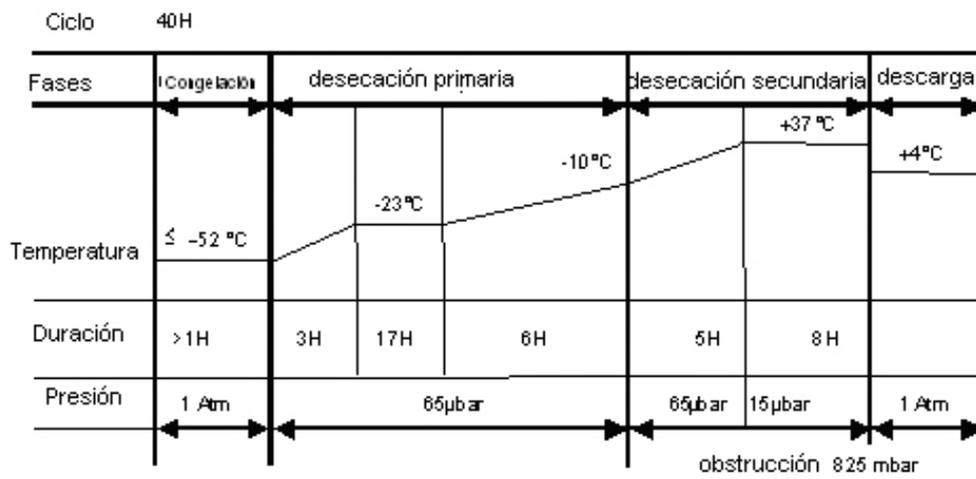


Figura 7

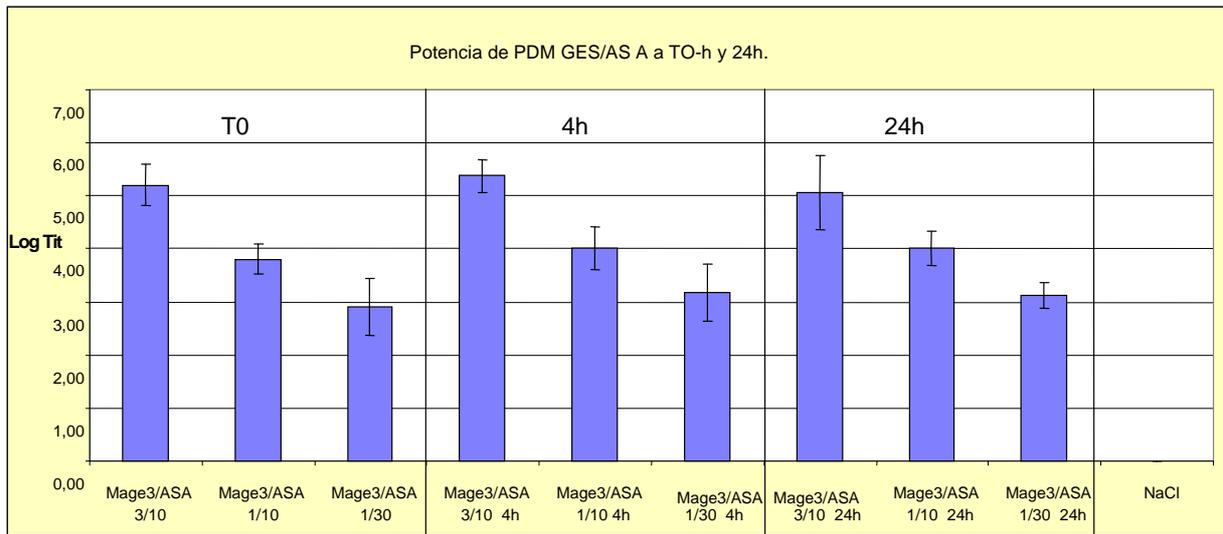


Figura 8

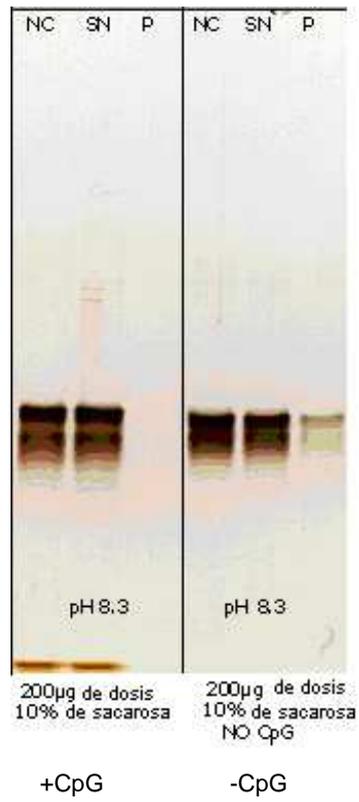
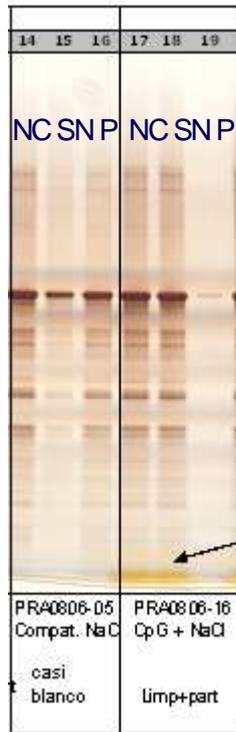


Figura 9



- CpG + CpG