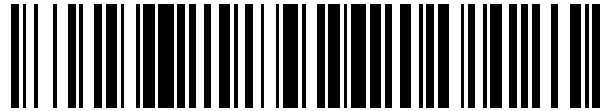


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 442**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2010 E 10721036 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2440242**

54 Título: **Composiciones adyuvantes que comprenden un agente de isotonicidad no iónico**

30 Prioridad:

10.06.2009 GB 0910046

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

15.09.2014

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**HENDERICKX, VERONIQUE y
LEMOINE, DOMINIQUE INGRID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 494 442 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones adyuvantes que comprenden un agente de isotonicidad no iónico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones adyuvantes acuosas que comprenden un agente de isotonicidad no iónico y que tienen concentraciones bajas de sal, en particular que tienen concentraciones de cloruro de sodio en, o por debajo de, 100 mM. La presente invención también se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno o preparación de antígeno y dichas composiciones adyuvantes acuosas.

Antecedentes de la invención

10 Los adyuvantes se usan, a veces, para mejorar la respuesta inmune originada a cualquier antígeno dado. Sin embargo, la inclusión de adyuvantes en una vacuna o composición inmunogénica aumenta la complejidad de la 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 adyuvantes, así como el componente antigénico debe ser considerada por los formuladores. En particular, se debería considerar la compatibilidad del componente antigénico con el componente adyuvante. Este es particularmente el caso en el que antígenos liofilizados o preparaciones antigénicas están destinados para ser reconstituidos con una preparación adyuvante. En una circunstancia como tal, es importante que el tampón de la preparación adyuvante sea adecuado para el antígeno o preparación antigénica y que la inmunogenicidad o la solubilidad del antígeno no se vea afectada por el adyuvante. El documento US 6. 868.607 desvela vacunas que comprenden péptidos, un adyuvante policatión y una o más sustancias solubles en agua o emulsionables con agua que es capaz de hacer la vacuna isotónica.

Sumario de la invención

20 Los presentes inventores han descubierto que algunos antígenos son particularmente sensibles a un fenómeno conocido como "extracción con sal" que se puede definir como la precipitación de una proteína a partir de su solución por saturación con una sal tal como cloruro de sodio. Los presentes inventores han descubierto que los antígenos sensibles se pueden agregar y precipitar a una concentración de cloruro de sodio tan baja como de 150 mM.

25 Por lo tanto la presente invención proporciona una composición adyuvante isotónica acuosa que comprende un agonista del receptor tipo Toll (TLR) 4, y una saponina en una formulación liposomal y un agente de isotonicidad no iónico, en el que la concentración de cloruro de sodio en dicha composición es menos de 100 mM.

30 La presente invención proporciona además una composición adyuvante isotónica acuosa que comprende un agonista de TLB-4, y una saponina, en una formulación liposomal, y un agente de isotonicidad no iónico, en donde el potencial iónico en esta composición es menor de 100 mM.

Además, la presente invención proporciona una composición adyuvante isotónica acuosa, que se puede usar para un intervalo más amplio de antígenos de proteína, incluyendo aquéllos que son susceptibles a la "extracción con sal", así como aquéllos que no lo son.

35 La presente invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o una preparación antigénica, y una composición adyuvante acuosa que comprende un agonista de TLR-4, y una saponina, en una formulación liposomal, y un agente isotónico no iónico, en la que la concentración de cloruro de sodio en la composición adyuvante es menor de 100 mM, y los procedimientos para la elaboración de dichas composiciones inmunogénicas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Curva de actividad lítica de QS21.

Figura 2. Porcentaje de cada congénere de 3D-IVIPL en las diferentes formulaciones de ASA.

Figura 3. Ciclo de secado por congelación empleado para la liofilización de PRAME/CpG.

45 Figura 4. Una comparación pictórica entre PRAME y NYESO-1 reconstituidos en ASA (NaCl 150 mM), y ASA (sorbitol).

Figura 5. Respuesta humoral de los ratones inmunizados con PRAME/CpG formulada con diferentes composiciones adyuvantes en el Experimento 1.

Figura 6. Protección contra tumores en los ratones inmunizados con PRAME/CpG formulada con diferentes

composiciones adyuvantes en el Experimento 1.

Figura 7. Respuesta humoral de los ratones inmunizados con PRAME/CpG formulada con ASA (NaCl 150 mM), ASA (sorbitol), o la formulación líquida de ASA en el Experimento 2.

Figura 8. Respuesta de CD4+ de los ratones inmunizados con PRAME/CpG formulada con ASA (NaCl 150 mM), ASA (sorbitol), o la formulación líquida de ASA en el Experimento 2.

Figura 9. Protección contra tumores en los ratones inmunizados con PRAME/CpG formulada con ASA (NaCl 150 mM), ASA (sorbitol), o la formulación líquida de ASA en el Experimento 2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe el reemplazo o el reemplazo parcial de un agente de isotonicidad que es una sal, tal como cloruro de sodio, en una composición adyuvante acuosa, con un agente de isotonicidad no iónico.

Es bien sabido que, para la administración parenteral, las soluciones deben ser fisiológicamente isotónicas (es decir, deben tener una osmolaridad farmacéuticamente aceptable), para evitar la distorsión o la lisis celular. Un "agente de isotonicidad" es un compuesto que es fisiológicamente tolerado e imparte una tonicidad adecuada a una formulación (por ejemplo, a las composiciones inmunogénicas de la invención) para prevenir el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación.

Se conocen composiciones adyuvantes acuosas que contienen cloruro de sodio 100 mM o más, por ejemplo, el sistema adyuvante A (ASA) en el documento WO2005/112991 y documento W02008/142133 o los adyuvantes liposomales desvelados en el documento W02007/068907. Como se estipula en el documento W02008/142133, las composiciones adyuvantes como tales se pueden usar como diluyentes para reconstituir las composiciones liofilizadas que comprenden antígenos o preparaciones antigénicas antes de la vacunación. Es importante que tales composiciones reconstituidas sean isotónicas, es decir, que contengan una concentración de sal sustancialmente igual a la que se encuentra en las células del cuerpo y de la sangre, de tal manera que con la inyección no se provoque un encogimiento o una expansión celular. En términos generales, se usa cloruro de sodio en forma de un agente de tonicidad. Los presentes inventores han descubierto que ciertos antígenos son particularmente sensibles a la "aglomeración por sal", un procedimiento en el que se aglomeran o se coagulan las proteínas en solución cuando están en soluciones que contienen altas concentraciones de sal.

Las concentraciones de sal en las que se aglomeran los antígenos de proteína varían de proteína a proteína. Los presentes inventores han identificado un grupo de antígenos que se aglomerarán en concentraciones de sal relativamente bajas, por ejemplo, a aproximadamente 100 mM o menos de cloruro de sodio. Esto significa que ciertas composiciones adyuvantes conocidas no son adecuadas para la reconstitución de, o para usarse con, las composiciones que comprenden estos antígenos a medida que se presenta la aglomeración.

La presente invención proporciona composiciones adyuvantes acuosas que se pueden usar con tales antígenos, es decir, los antígenos que se aglomeran en concentraciones de sal de menos de 100 mM de cloruro de sodio. Las composiciones adyuvantes acuosas de la invención comprenden un agonista de TLR-4, y una saponina, en una formulación liposomal, y un agente de isotonicidad no iónico, en la que la concentración de cloruro de sodio en la composición adyuvante está por debajo de aproximadamente 100 mM, por ejemplo, por debajo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En una realización particular, la concentración de cloruro de sodio en la composición adyuvante está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de 5 mM. En una realización específica adicional, la composición adyuvante está esencialmente libre de cloruro de sodio. Esencialmente libre significa que la concentración de cloruro de sodio está en o muy cerca de cero mM (es decir, 1 mM, 2 mM, 63 mM).

La persona experta puede probar fácilmente la concentración de iones tanto de sodio (Na⁺) como de cloruro (Cl⁻), usando las técnicas y los kits conocidos. Por ejemplo, el sodio se puede determinar usando un kit, tal como el Kit de Ensayo Enzimático de Sodio (Número de Catálogo: BQ011EAEL) de Biosupply. El cloruro se puede determinar usando un kit, tal como el Kit de Ensayo Enzimático de Cloruro (Número de Catálogo: BQ006EAEL) de Biosupply.

La presente invención proporciona además una composición adyuvante isotónica acuosa que comprende un agonista de TLR-4 y una saponina, en una formulación liposomal, y un agente de isotonicidad no iónico, en la que el potencial iónico es menor de 100 mM, por ejemplo, menor de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En una realización particular, el potencial iónico en la composición adyuvante está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de 5 mM. En una realización específica adicional, la composición adyuvante tiene una concentración iónica que está en o muy cerca de cero mM.

El potencial iónico de un adyuvante o de la composición inmunogénica de la invención, se puede medir usando las técnicas conocidas por la persona experta, por ejemplo, usando un medidor de conductividad.

Un agente de isotonicidad no iónico adecuado para usar en una composición adyuvante acuosa de la invención que se vaya a combinar con una composición antigénica necesitará ser adecuado para usarse en los seres humanos, así como deberá ser compatible con los antígenos dentro de la composición antigénica, y además deberá ser compatible con otros componentes de la composición adyuvante.

5 En particular, la composición adyuvante acuosa debe ser tal que los antígenos dentro de la composición antigénica, cuando se combinan con la composición adyuvante, son capaces tanto de permanecer en solución como de conservar su inmunogenicidad.

10 En una realización de la presente invención, los agentes de isotonicidad no iónicos adecuados son los polioles, azúcares (en particular sacarosa, fructosa, dextrosa o glucosa) o aminoácidos, tales como glicina. En una realización, el poliol es un alcohol de azúcar, en especial un alcohol de azúcar de 3 a 6 átomos de carbono. Los alcoholes de azúcar ilustrativos incluyen glicerol, eritritol, treitol, arabitol, xilitol, ribitol, sorbitol, manitol, dulcitol e iditol. En un ejemplo específico de esta realización, un agente de isotonicidad no iónico adecuado es sorbitol. En una realización particular de la invención, el agente de isotonicidad no iónico en las composiciones de la invención es sacarosa y/o sorbitol.

15 En una realización, una concentración adecuada de poliol dentro de la composición adyuvante acuosa es de entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 15% (p/v), en particular de entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 10% (p/v), por ejemplo, de entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 7% (p/v), por ejemplo, de entre aproximadamente el 4% y aproximadamente el 6% (p/v). En un ejemplo específico de esta realización, el poliol es sorbitol.

20 La composición adyuvante acuosa comprende un agonista del receptor tipo Toll (TLR) 4, y una saponina, en una formulación liposomal. Esto significa que la saponina y el agonista de TLR-4 se formulan con liposomas.

25 El término "liposomas" se refiere en términos generales a estructuras de lípido uni- o multilamelares (en particular de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 láminas, dependiendo del número de membranas de lípido formadas) que encierran un interior acuoso. Los liposomas y las formulaciones de liposomas son bien conocidos en la técnica. Los lípidos, que son capaces de formar liposomas, incluyen todas las sustancias que tienen propiedades grasas o de tipo grasa. Los lípidos que pueden formar los liposomas se pueden seleccionar a partir del grupo que comprende glicéridos, glicerosfolípidos, glicerosfosfolípidos, glicerosfosfolípidos, sulfolípidos, esfingolípidos, fosfolípidos, isoprenolidas, esteroides, estearinas, esteroides, arqueolípidos, lípidos catiónicos sintéticos, y lípidos que contienen carbohidratos.

30 En una realización, los liposomas comprenden un fosfolípido. Los fosfolípidos adecuados incluyen (pero no se limitan a): fosfocolina (PC), la cual es un intermedio en la síntesis de fosfatidilcolina; derivados de fosfolípidos naturales: fosfocolina de huevo, fosfocolina de soja, fosfocolina de soja hidrogenada, esfingomielina, como los fosfolípidos naturales; y derivados de fosfolípidos sintéticos: fosfocolina (didecanoil-L- α -fosfatidilcolina [DDPC], dilaurilfosfatidilcolina [DLPC], dimiristoilfosfatidilcolina [DMPC], dipalmitoil fosfatidilcolina [DPPC], diestearoil fosfatidilcolina [DSPC], dioleoil fosfatidilcolina [DOPC], 1-palmitoil 2-oleoilfosfatidilcolina [POPC], Dielaidoil fosfatidilcolina [DEPC]), fosfoglicerol (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DMPG], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DPPG], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DSPG], 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [POPG]), ácido fosfatídico (ácido 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatídico [DMPA], ácido dipalmitoil fosfatídico [DPPA], ácido diestearoil-fosfatídico [DSPA]), fosfoetanolamina (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DMPE], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DPPE], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DSPE], 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DOPE]), fosfoserina, fosfolípido de polietilenglicol [PEG] (fosfolípido mPEG, fosfolípido poliglicerina, fosfolípido funcionalizado, fosfolípido activado terminal). En una realización, los liposomas comprenden 1 - palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina. En una realización se usa fosfatidilcolina altamente purificada y se puede seleccionar del grupo que comprende fosfatidilcolina (EGG), fosfatidilcolina hidrogenada (EGG) fosfatidilcolina (SOY), fosfatidilcolina hidrogenada (SOY). En una realización adicional, los liposomas comprenden fosfatidiletanolamina [POPE] o un derivado del mismo.

50 El tamaño de los liposomas puede variar de 30 nm a varios μ m dependiendo de la composición de fosfolípidos y el procedimiento usado para su preparación. En realizaciones particulares de la invención, el tamaño de los liposomas estará en el intervalo de 50 nm a 500 nm y en realizaciones adicionales de 50 nm a 200 nm. La dispersión de luz láser dinámica es un procedimiento usado para medir el tamaño de los liposomas bien conocido por los expertos en la técnica.

55 Los liposomas contienen adecuadamente un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que es adecuadamente no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) o dilauril fosfatidilcolina. En una realización particular, los liposomas de la presente invención contienen de DOPC. Los liposomas pueden también contener un lípido cargado que aumenta la estabilidad de la estructura liposoma-saponina para liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos la cantidad de lípido cargado es

adecuadamente del 1% as 20% p / p, preferentemente del 5% al 10%. La relación de esteroles a fosfolípido es del 1% al 50% (mol / mol), adecuadamente del 20% al 25%.

5 Una saponina particularmente adecuada para uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada de la árbol sudamericano *Quillaja Saponaria Molina* y fue descrito por primera vez por Dalsgaard y col. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243 - 254) por tener una actividad adyuvante. Los fragmentos purificados de Quil A se han aislado por HPLC, que conservan la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (documento EP 0 362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocido como QA7 y QA21). QS-21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria* Molina, que induce a las células T citotóxicas (CTL) CD8 +, a las células Th1 y una respuesta de anticuerpos IgG2a predominante. QS21 es una saponina preferida en el contexto de la presente invención.

En una forma adecuada de la presente invención, el adyuvante de saponina dentro de la composición inmunogénica es un derivado de *saponaria molina* Quil A, preferiblemente una fracción inmunológicamente activa de Quil A, tal como QS-17 o QS-21, de forma adecuada QS-21.

15 En una realización específica, se proporciona QS21 en su composición menos reactogénica donde se inactiva con un esteroles exógeno, tal como el colesterol, por ejemplo. Existen varias formas particulares de composiciones menos reactogénicas en las que QS21 se inactiva con un colesterol exógeno. La saponina / esteroles está en una estructura de formulación liposomal (documento WO 96/33739, Ejemplo 1).

20 Los esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una realización particular, la composición adyuvante comprende colesterol como esteroles. Estos esteroides se conocen bien en la técnica, por ejemplo el colesterol se describe en el Merck Index, 11ª Edición, página 341, como un esteroles natural que se encuentra en la grasa animal.

25 Cuando la fracción de saponina activa es QS21, la relación de QS21: esteroles será típicamente del orden de 1:100 a 1:1 (p / p), adecuadamente entre 1:10 y 1:1 (p / p), y preferiblemente de 1:5 a 1:1 (p / p). De forma adecuada, el exceso de esteroles está presente, siendo la relación de QS21 : esteroles al menos 1:2 (p / p). En una realización, la relación de QS21: esteroles es 1:5 (p / p). El esteroles es adecuadamente colesterol.

30 La composición adyuvante acuosa comprende un agonista del receptor 4 tipo Toll (TLR-4). Por "agonista de TLR" se refiere a un componente que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR, ya sea como un ligando directo o indirectamente a través de la generación de un ligando endógeno o exógeno (Sabroe y col., JI 2003 pág. 1630 - 5). Un agonista de TLR4 es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de una ruta de señalización de TLR-4. Un ejemplo adecuado de un agonista de TLR-4 es un lipopolisacárido, adecuadamente un derivado no tóxico de lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D - MPL).

35 El 3D-MPL se vende bajo el nombre de MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A. y se conoce en todo el documento como MPL o 3D-MPL, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.436.727; 4,877,611; 4.866.034 y 4.912.094. El 3DMPL promueve principalmente las respuestas de células T CD4 + con un fenotipo IFN-g (Th1). El 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención se puede usar el 3D-MPL de partículas pequeñas para preparar la composición adyuvante acuosa. El 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar para esterilizar a través de un filtro de 0,22 μ m. Tales preparaciones se describen en el documento WO 94/21292. Preferiblemente, el 3D-MPL en polvo se usa para preparar las composiciones adyuvantes acuosas de la presente invención.

45 Otros agonistas de TLR-4 que se pueden usar son los fosfatos de alquil glucosaminida (AGP) tales como los descritos en el documento WO98/50399 o patente de EE.UU. N° 6.303.347 (también se divulgan los procedimientos para la preparación de AGP), adecuadamente RC527 ó RC529 o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se divulga en la patente de EE.UU. N° 6.764.840.

50 Otros agonistas adecuados de TLR-4 son como se describen en el documento WO2003/011223 y en el documento WO 2003/099195, tal como el compuesto I, el compuesto II y el compuesto III divulgados en las páginas 4 - 5 del documento WO2003/011223 o en las páginas 3 a 4 del documento WO2003/099195 y en particular los compuestos divulgados en el documento WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057m ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 y ER804764. Por ejemplo, un agonista de TLR-4 adecuado es ER804057.

55 Las composiciones adyuvantes acuosas de la invención comprenden tanto una saponina como un agonista de TLR-4. En realización determinada, la composición adyuvante acuosa comprende QS21 y 3D-MPL.

Un agonista de TLR-4, tal como un lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, se puede usar en cantidades entre 1 y 100 µg por dosis humana de la composición adyuvante. El 3D-MPL se puede usar a un nivel de aproximadamente 50 µg, por ejemplo entre 40 a 60 µg, adecuadamente entre 45 a 55 µg o entre 49 a 51 µg o 50 µg. En una realización adicional, la dosis humana de la composición adyuvante comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 a 30 µg, adecuadamente entre 21 a 29 µg o entre 22 a 28 µg o entre 28 a 27 µg o entre 24 a 26 µg o 25 µg.

Una saponina, tal como QS21, se puede usar en cantidades entre 1 y 100 µg por dosis humana de la composición adyuvante. QS21 se puede usar a un nivel de aproximadamente 50 µg, por ejemplo entre 40 a 60 µg, adecuadamente entre 45 y 55 µg o entre 49 y 51 µg o 50 µg. En una realización adicional, la dosis humana de la composición adyuvante comprende QS21 a un nivel de aproximadamente 25 µg, por ejemplo entre 20 a 30 µg, adecuadamente entre 21 a 29 µg o entre 22 a 28 µg o entre 28 y 27 µg o entre 24 y 26 µg, o 25 µg.

Tanto el agonista de TLR4 como la saponina están presentes en la composición adyuvante acuosa. La relación ponderal del agonista de TLR4 a saponina es de forma adecuada entre 1:5 a 5:1, de forma adecuada 1:1. Por ejemplo, cuando 3D-MPL está presente en una cantidad de 50 µg o 25 µg, entonces QS21 también puede estar presente de forma adecuada en una cantidad de 50 µg o 25 µg, respectivamente, por cada dosis humana de la composición adyuvante acuosa.

Cuando el adyuvante se va a combinar con una forma líquida de una composición antigénica, la composición adyuvante estará en un volumen de dosis humana adecuado, que es aproximadamente la mitad del volumen final previsto de la dosis humana. Por ejemplo, un volumen de adyuvante de 500 µm para una dosis humana final pretendida de 1 mm, o un volumen de 250 µm para una dosis humana final pretendida de 0,5 mm. La composición adyuvante se diluye cuando se combina con la composición de antígeno para proporcionar la dosis humana final de la vacuna. El volumen final de tal dosis, desde luego, variará dependiendo del volumen inicial de la composición adyuvante y del volumen de la composición de antígeno añadida a la composición adyuvante. En una realización alternativa, el adyuvante acuoso se usa para reconstituir una composición de antígeno liofilizada. En esta realización, el volumen adecuado de la dosis humana de la composición adyuvante es aproximadamente igual al volumen final de la dosis humana. La composición adyuvante líquida se añade al vial que contiene la composición de antígeno liofilizada, y se usa para reconstituir la composición de antígeno liofilizada.

La presente invención, por consiguiente, proporciona un procedimiento para la preparación de una composición inmunogénica, que comprende las etapas de reconstituir una composición liofilizada, que comprende al menos un antígeno o la preparación antigénica como se describe en la presente memoria descriptiva, con una composición adyuvante acuosa como se define en la presente memoria descriptiva.

En una realización adicional de la invención, se proporciona un kit que comprende: (i) una composición liofilizada que comprende un antígeno o preparación antigénica, y (ii) una composición adyuvante acuosa como se describe en la presente memoria descriptiva.

En una realización particular de la invención, se proporciona un kit que comprende: (i) una composición liofilizada que comprende un antígeno o la preparación antigénica como se describe en la presente memoria descriptiva, y (ii) una composición adyuvante acuosa como se describe en la presente memoria descriptiva.

En una realización, la composición liofilizada comprende además un agonista de TLR-9, por ejemplo, como se estipula en el documento WO 2008/142133.

En una realización alternativa, se proporciona un kit en el que el CpG no se co-liofiliza con el antígeno. El CpG se puede ya sea mezclar con la composición adyuvante acuosa, o bien puede estar en un vial separado en una forma acuosa o liofilizada. Por consiguiente, en una realización alternativa, se proporciona un kit que comprende: (i) una composición liofilizada que comprende un antígeno como se describe en la presente memoria descriptiva; (ii) una composición adyuvante acuosa; y (iii) un agonista de TLR9 (por ejemplo, un oligonucleótido de CpG inmunoestimulante).

El agonista de TLR-9 para usarse en los kits de la invención es un oligonucleótido inmunoestimulante, en particular un oligonucleótido que contiene un motivo CpG no metilado. Tales oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/02555, documento WO 99/33488, y documento US 5.865.462. Los agonistas de TLR9 adecuados para usarse en las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria descriptiva son los oligonucleótidos que contienen CpG, que opcionalmente contienen dos o más motivos de dinucleótidos CpG separados por al menos tres, de una manera adecuada al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina.

En una realización, el enlace internucleótidos en el oligonucleótido es fosforoditioato, o posiblemente un enlace de fosfortioato, aunque también se podrían usar los enlaces de fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos, incluyendo los oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mixtos. Los procedimientos para producir los oligonucleótidos de fosfortioato o de fosforoditioato se describen en el documento US5.666.153, documento US5.278.302, y documento W095/26204. Se contemplan oligonucleótidos que comprenden diferentes enlaces

internucleótidos, por ejemplo, fosfodiésteres de fosforotioato mixtos. Se pueden usar otros enlaces internucleótidos que establezcan el oligonucleótido.

Los ejemplos de los oligonucleótidos de CpG adecuados para incluirse en las composiciones inmunogénicas descritas en la presente memoria descriptiva, tienen las siguientes secuencias. En una realización, estas secuencias contienen enlaces internucleótidos modificados por fosforotioato.

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

OLIGO 2 (SEC ID N°: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG1758)

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

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

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

Los oligonucleótidos de CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriores, porque tienen supresiones o adiciones inconsecuenciales a las mismas.

La presente invención proporciona además una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, y una composición adyuvante acuosa como se describe en la presente memoria descriptiva, en la que dicha composición inmunogénica tiene una concentración de cloruro de sodio por debajo de aproximadamente 100 mM, por ejemplo, por debajo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En una realización particular, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de aproximadamente 5 mM. En una realización específica adicional, la composición inmunogénica está esencialmente libre de cloruro de sodio. Esencialmente libre significa que la concentración de cloruro de sodio está en o muy cerca de 0 mM.

La presente invención proporciona además una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, y una composición adyuvante acuosa como se describe en la presente memoria descriptiva, en la que el potencial iónico de la composición inmunogénica es menor de 100 mM, por ejemplo, menor de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En una realización particular, el potencial iónico en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM o está en o por debajo de 5 mM. En una realización específica adicional, la composición inmunogénica tiene una concentración iónica que está en o muy cerca de 0 mM.

Será evidente que, si la composición inmunogénica se ha preparado usando una composición antigénica liofilizada que comprende un agonista de TLR-9, entonces la composición inmunogénica también comprenderá un agonista de TLR-9. Por consiguiente, en una realización, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, un agonista de TLR9, y un agonista de TLR-4 y una saponina, en una formulación liposomal, en la que la composición inmunogénica tiene una concentración de sal por debajo de aproximadamente 100 mM, por ejemplo, por debajo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En un ejemplo específico de esta realización, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de aproximadamente 5 mM.

En una realización adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, un agonista de TLR9, y un agonista de TLR-4 y una saponina, en una formulación liposomal en la que el potencial iónico es menor de 100 mM, por ejemplo, por debajo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En una realización particular, el potencial iónico en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de 5 mM. En una realización específica adicional, la composición inmunogénica tiene una concentración iónica que está en o muy cerca de 0 mM.

En una realización adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, un agonista de TLR9, y un 3D-MPL y QS21 en una formulación liposomal, en la que la composición inmunogénica tiene una concentración de sal por debajo de aproximadamente 100 mM, por ejemplo, por debajo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En un ejemplo específico de esta realización, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de aproximadamente 5 mM.

En una realización adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, un agonista de TLR9, y un 3D-MPL y QS21 en una formulación liposomal, en la que el potencial iónico es menor de 100 mM, por ejemplo, por debajo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En una realización particular, el potencial iónico en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de 5 mM. En una realización específica adicional, la composición inmunogénica tiene una concentración iónica que está en o muy cerca de 0 mM.

En una realización adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, y 3D-MPL y QS21 en una formulación liposomal, y un oligonucleótido de CpG, en la que la composición inmunogénica tiene una concentración de sal por debajo de aproximadamente 50 mM, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 40 mM, 30 mM, 20 mM ó 15 mM. En un ejemplo específico de esta realización, la concentración de cloruro de sodio en la composición inmunogénica está por debajo de 10 mM, o está en o por debajo de 5 mM.

En una realización, el antígeno o preparación antigénica usada en las composiciones inmunogénicas de la invención, es cualquier antígeno que se precipite, se coagule, o se agregue después de mezclarse y/o disolverse con una solución que comprenda una concentración de cloruro de sodio mayor de 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ó 100 mM.

En una realización, el antígeno o preparación antigénica usada en las composiciones inmunogénicas de la invención, es cualquier antígeno que se precipite, se coagule, o se agregue después de mezclarse y/o disolverse con una solución en la que el potencial iónico sea menor de 100 mM, por ejemplo, menor de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 15 mM ó 10 mM. En una realización particular, los antígenos de la invención se precipitan, se coagulan, o se aglomeran en soluciones con una concentración iónica en o por debajo de 5 mM.

La persona experta en la técnica puede determinar si un antígeno cumple con esta definición mediante la mezcla del antígeno en una solución como tal. Un antígeno que no cumpla con esta definición todavía estará en solución, es decir, el líquido todavía estará transparente sin precipitación, 24 horas después de disolverse. Un antígeno que se precipite, se coagule, o se agregue después de mezclarse y/o disolverse en una solución, se puede ver mediante inspección visual cuando se está precipitando, por la nebulosidad de la solución. Además, la aglomeración que no sea detectable visualmente, se puede observar usando los procedimientos conocidos por la persona experta, los cuales incluyen, pero no se limitan a, SEC-HPLC.

En una realización adicional, el antígeno o preparación antigénica se deriva a partir de VIH, *Neisseria meningitidis*, o es un antígeno asociado con tumor. En una realización particular, el antígeno asociado con tumor se selecciona a partir de cualquiera de PRAME o NYESO-1, o de un fragmento o un derivado del mismo.

PRAME (también conocido como DAGE) es un antígeno que se puede usar como el antígeno asociado con tumor de la presente invención. El antígeno y su preparación se describen en la Patente de Estados Unidos Número 5. 830.753. PRAME se encuentra en la base de datos Annotated Human Gene Database H-Inv DB bajo los números de registro: U65011.1, BC022008.1, AK129783.1, BC014974.2, CR608334.1, AF025440.1, CR591755.1, BC039731.1, CR623010.1, CR61 1321.1, CR618501.1, CR604772.1, CR456549.1, y CR620272.1.

También se pueden usar proteínas de fusión que comprendan el antígeno PRAME. PRAME o un fragmento o un derivado del mismo, se puede emplear opcionalmente en la forma de una proteína de fusión con un componente de fusión heterólogo. En particular, el antígeno PRAME se puede emplear adecuadamente en la forma de una proteína de fusión con la proteína D de *Haemophilus influenzae B*, o con una porción de la misma, o con un derivado de la misma. La porción de proteína D que se puede emplear de una manera adecuada no incluye la secuencia de secreción o la secuencia de señal. De una manera adecuada, el componente de la proteína de fusión comprende los aminoácidos Met-Asp-Pro en o dentro del N-terminal de la secuencia de la proteína de fusión, y en el que el componente de la proteína de fusión no incluye la secuencia de secreción o la secuencia de señal de la proteína D. Por ejemplo, el componente de la proteína de fusión puede comprender o puede estar constituido por aproximadamente o exactamente los aminoácidos 17 a 127, 18 a 127, 19 a 127, ó 20 a 127 de la proteína D. Los antígenos PRAME adecuados basados en proteínas de fusión con la proteína D se describen en el documento W02008/0871 02.

NY-ESO-1 es otro antígeno que se puede usar en forma del antígeno asociado con tumor de la presente invención. NY-ESO-1 o un fragmento o un derivado del mismo, se puede emplear opcionalmente en la forma de una proteína de fusión con un componente de fusión heterólogo. NY-ESO-1 se describe en el documento US5804381. La proteína NY-ESO-1 es de aproximadamente 180 aminoácidos de longitud, y se puede describir como compuesta de tres regiones: (a) una región N-terminal que está aproximadamente en los aminoácidos 1 - 70, (b) una región central que está aproximadamente en los aminoácidos 71 - 134, y (c) una región C-terminal que está aproximadamente en los aminoácidos 135 - 180. NY-ESO-1 se puede emplear en forma de una proteína de fusión, por ejemplo, en forma de una fusión con LAGE-1, que es un antígeno CT adicional, o un fragmento del mismo, véase el documento W02008/089074. Cuando se emplean los fragmentos de NY-ESO-1, éstos incluyen adecuadamente uno o más epitopes MHC Clase 1 o Clase 2, por ejemplo, aquéllos conocidos como A31, DR1, DR2, DR4, DR7, DP4, B35, B51, Cw3, Cw6 y A2 (véase el documento W02008/089074). Aunque no es sensible al NaCl como tal, se puede emplear un antígeno adicional que, de acuerdo con la presente invención, sea un antígeno MAGE, o un fragmento o un derivado del mismo, por ejemplo, de la familia MAGE-3, tal como MAGE-A3. Los antígenos MAGE-3, por ejemplo, se han descrito como adecuados para formularse en combinación con NY-ESO-1, véase el documento W02005/105139.

Los antígenos MAGE, tales como MAGE-A3, se pueden usar como tales o en la forma de un derivado, por ejemplo, un derivado químicamente modificado y/o en la forma de una proteína de fusión con un componente de fusión heterólogo. Por ejemplo, el antígeno MAGE puede contener puentes de disulfuro reducidos para formar
 5 tios libres, los cuales se hayan derivado, por ejemplo, con grupos carboxamida o carboximetilo, véase el documento W099/40188. En particular, los antígenos MAGE se pueden emplear adecuadamente en la forma de una proteína de fusión con la proteína D de *Haemophilus influenzae B*, o una porción de la misma, o un derivado de la misma. Por ejemplo, aproximadamente la primera tercera parte de la Proteína D o los 100 a 110 aminoácidos N-terminales de la proteína D se pueden emplear en forma del componente de fusión, véase el documento W099/40188.

10 En una realización adicional, el antígeno o composición antigénica puede ser un derivado de cualquiera de los antígenos descritos en la presente memoria descriptiva. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "derivado" se refiere a un antígeno que se modifica en relación con su forma de origen natural. Los derivados de la presente invención son suficientemente similares a los antígenos nativos para conservar las propiedades antigénicas y seguir siendo capaces de permitir que se proporcione una respuesta inmune contra el
 15 antígeno nativo. El que un derivado dado genere o no una respuesta inmune, se puede medir mediante un ensayo inmunológico adecuado, tal como un ELISA o citometría de flujo.

El término "fragmento", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los fragmentos de un antígeno asociado con tumor, o un derivado del antígeno que contenga al menos un epitope, por ejemplo, un epitope de CTL, típicamente un péptido de al menos 8 aminoácidos. Se considera que los fragmentos de al menos
 20 8, por ejemplo, de 8 a 10 aminoácidos o de hasta 20, 50, 60, 70, 100, 150 ó 200 aminoácidos de longitud, entran dentro del alcance de la invención, siempre que el fragmento demuestre antigenicidad, es decir, que los epitopes mayores (por ejemplo, los epitopes CTL) sean conservados por el fragmento, y el fragmento sea capaz de inducir una respuesta inmune que reaccione de forma cruzada con el antígeno asociado a tumor de origen natural. Los fragmentos ilustrativos pueden ser de 8 a 10, de 10 a 20, de 20 a 50, 20 de 50 a 60, de 60 a 70, de 70 a 100, de
 25 100 a 150, de 150 a 200 residuos de aminoácidos de longitud (incluyendo cualquier valor dentro de estos intervalos).

La presente invención proporciona una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria descriptiva, para usarse en medicina, en particular en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades. La presente invención proporciona además una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria
 30 descriptiva, para usarse en el tratamiento inmunoterapéutico de cáncer.

En los ejemplos específicos de esta realización, la invención proporciona una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria descriptiva, para usarse en el tratamiento inmunoterapéutico de uno o más cánceres seleccionados a partir del grupo que está constituido por cánceres de próstata, de mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, renal, de ovario o melanoma.

35 La presente invención proporciona además un procedimiento de terapia o profilaxis de cáncer en un individuo que lo necesite, el cual comprende la etapa de proporcionar a dicho individuo una cantidad efectiva de una composición inmunogénica como se describe en la presente memoria descriptiva.

En los ejemplos específicos de esta realización, la invención proporciona un procedimiento de terapia o profilaxis de un cáncer seleccionado a partir del grupo que está constituido por cánceres de próstata, de mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, renal, de ovario o melanoma.
 40

La presente invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la composición adyuvante ASA (sorbitol)

45 Se preparó una composición adyuvante que comprendía el MPL 3-desacilado y QS21 en una formulación liposomal. Éste se preparó como sigue:

A. Procedimiento de preparación de liposomas:

Una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina sintética), colesterol y MPL 3-O-desacilado en un didisolvente orgánico, se secó al vacío. Entonces se agregó una solución acuosa (tal como suero tamponada con fosfato [NaCl 100 mM, Fosfato 20 mM, pH de 6,1]), y el recipiente se agitó hasta que todo el lípido estuvo en suspensión. Esta
 50 suspensión se prehomogeneizó entonces con mezclador de alta cizalladura, y luego se homogeneizó a alta presión hasta que se redujo el tamaño de los liposomas hasta alrededor de 90 nm +/- 10 nm medidos mediante DLS. Entonces se filtraron los liposomas para esterilizarse.

B. Formulación de ASA:

Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

Se agregó el tampón fosfato de Na₂/K 100 mM, pH de 6,1, diluido 10 veces, a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de tampón fosfato 10 mM en la formulación final. Entonces se agregó una solución de sorbitol al 30% (p/v) en agua para inyección (WFI), hasta alcanzar una concentración del 4,7% en la formulación final, ésta se agitó durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

- 5 Entonces se agregaron a la mezcla los liposomas concentrados (hechos de DOPC, colesterol y MPL a 40 mg/ml, 10 mg/ml, y 2 mg/ml, respectivamente), hasta alcanzar una concentración de 100 µg/ml de MPL en la formulación final.

La mezcla se agitó subsiguientemente durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 2: Adición de QS21

- 10 Usando una bomba peristáltica, se agregó una sustancia en bruto de QS21 (descongelada durante 24 horas a temperatura ambiente o durante 2 días a 4°C para 200 ml), con una bomba peristáltica, a una velocidad de 200 ml/min, a los liposomas diluidos, bajo agitación magnética, hasta alcanzar una concentración de 100 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó durante 15 a 45 minutos.

La formulación de ASA final contuvo 100 µg de 15 MPL/ml, y 100 µg de QS21/ml.

- 15 Etapa 3: El pH se verificó en 6,1+/- 0,3.

Etapa 4: Filtración de esterilización

La filtración de esterilización se llevó a cabo a una velocidad constante de 400 ml/min sobre un filtro de poliétersulfona (PES) de PALL Corporation.

Etapa 5: Almacenamiento de +2°C a +8°C.

- 20 Se obtuvo la composición adyuvante, que comprendía el MPL 3-O-desacilado y QS21 en una formulación liposomal, y que contenía sorbitol (designado como ASA (sorbitol)), y entonces se almacenó a 4°C.

Ejemplo 2: Preparación de la composición adyuvante de ASA (NaCl 150 mM)

A. Procedimiento de preparación de liposomas:

- 25 Una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina sintética), colesterol, y MPL 3-desacilado (3D-MPL) en un disolvente orgánico se secó al vacío. Entonces se agregó suero tamponado con fosfato, y el recipiente se agitó hasta que todo el lípido estuvo en suspensión. Esta suspensión se pre-homogeneizó entonces con un mezclador de alta cizalladura, y luego se homogeneizó a alta presión hasta que se redujo el tamaño de los liposomas hasta alrededor de 90 nm +/-10 nm medidos mediante DLS. Entonces se filtraron los liposomas para esterilizarse sobre una membrana de PES de 0,22 µm.

- 30 B. Formulación de ASA:

Etapa 1: Dilución de liposomas concentrados

- 35 Se agregó tampón fosfato de Na₂/K 100 mM, pH de 6,45, diluido 10 veces, y NaCl 1,5 M, a agua para inyección, hasta alcanzar respectivamente las concentraciones de fosfato 10 mM y de NaCl 150 mM en la formulación final. Esta mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Entonces se agregaron a la mezcla los liposomas concentrados (hechos de DOPC, colesterol, y MPL a 40 mg/ml, 10 mg/ml, y 2 mg/ml, respectivamente), hasta alcanzar una concentración de 100 µg/ml de MPL en la formulación final. La mezcla subsiguientemente se agitó durante 5 a 15 minutos a temperatura ambiente.

Etapa 2: Adición de QS21

- 40 Se agregó la sustancia en bruto de QS21 (descongelada durante 24 horas a temperatura ambiente, o durante 2 días a 4°C para 200 ml) a los liposomas diluidos, bajo agitación magnética, hasta alcanzar una concentración de 100 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó a temperatura ambiente.

Etapa 3: El pH se verificó para ser de 6,1 +/- 0,1.

Etapa 4: Filtración de esterilización

La filtración de esterilización se llevó a cabo sobre un filtro de poliétersulfona (PES) de PALL Corporation.

- 45 Etapa 5: Almacenamiento de +2°C a +8°C

La composición final de ASA fue de 2 mg de DOPC, 500 µg de colesterol, 100 µg de MPL 3-O-desacilado, y 100 µg de QS21 por 1 ml.

Ejemplo 3. Actividad lítica del QS21

- 50 Se sabe que el QS21 lisa los glóbulos rojos sanguíneos (RBC). Se ensayó la composición adyuvante de ASA (sorbitol) preparada como en el Ejemplo 1, para asegurar que se interrumpiera la actividad lítica del QS21, de la

misma manera en que se vio con la composición adyuvante equivalente, que comprendía NaCl 150 mM (ASA (NaCl 150 mM)).

5 La actividad lítica del QS21 se midió mediante un ensayo de hemólisis usando glóbulos rojos sanguíneos de pollo (RBC). Los RBC se centrifugaron a 550 g a 4°C. El sobrenadante se desechó. El sedimento se volvió a suspender cuidadosamente en tampón PBS hasta alcanzar el volumen inicial, y se repitió la misma operación hasta que el sobrenadante ya no fue rojo (en términos generales, 3 veces). El sedimento se almacenó a 4°C durante 3 a 4 días como máximo si no se usaba directamente (y se lavó de nuevo el día de su uso), o se diluyó alrededor de 10 veces en tampón si se usaba el mismo día.

10 Se preparó una curva de intervalo de dosis de QS21 en tampón ASA (en sal o en tampón de sorbitol después del ensayo de la muestra de ASA) extemporáneamente, y se prepararon las muestras de adyuvante (que contenían un equivalente de 50 µg o de 90 µg de QS21, significando el equivalente de 500 µl o de 900 µl de ASA). El volumen final se ajustó a 900 µl en los patrones y en las muestras con un tampón adecuado (que contenía o no, sorbitol como una función del tampón de la muestra ensayada). Debido a su opalescencia, el ASA interfiere en la densidad óptica (OD). Por consiguiente, se prepararon "controles de referencia" de ASA, y se sustrajo su densidad óptica (OD) de la densidad óptica (OD) de las muestras de ASA ensayadas. Estos controles de referencia correspondieron al mismo volumen de ASA que el volumen ensayado en las muestras, pero se ajustaron a 1 ml con el tampón. No se agregaron glóbulos rojos sanguíneos (RBC) a estos controles de referencia. Los patrones y las muestras se incubaron entonces con los glóbulos rojos sanguíneos (RBC) (se agregaron 100 µl de glóbulos rojos sanguíneos (RBC) diluidos a 900 µl de los patrones y las muestras) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT). Las muestras se centrifugaron entonces durante 5 minutos a 900 g. La densidad óptica a 540 nm se midió después de la centrifugación.

La determinación de la actividad lítica se llevó a cabo mediante un ensayo de límite.

1. El límite de detección (LOD) se definió como la concentración más baja de QS21 que conduce a una densidad óptica (OD): Más alta que el nivel basal (OD>0,1).

25 - Alrededor de tres veces más alta que la densidad óptica (OD) del tampón (la "o pg" de QS21).

- En la parte ascendente de la curva.

- Determinada para cada ensayo.

2. La actividad lítica del QS21 se mantuvo positiva en las muestras de adyuvante si la densidad óptica (OD) para la muestra de adyuvante era mayor de la OD_{LOD}.

30 Ejemplo de curva de QS21:

ug de QS21	OD	QS21 interrumpido
0	0,029	NA
0,5	0,052	< LOD
0,6	0,073	< LOD
0,7	0,091	< LOD
0,8	0,096	< LOD
0,9	0,12	> 98,2%
1	0,195	> 98%
1,1	0,212	> 97,8%
1,2	0,348	> 97,6%
1,3	0,479	> 97,4%
1,4	0,612	> 97,2%
1,5	0,669	> 97%
2	1,139	> 96%
2,5	1,294	> 95%
3	1,391	> 94%
5	1,416	> 90%
Adyuvante *	0,03	> 98,2 %
* Equivalente a 50ug de QS21 ensayado. Tampón cloruro de sodio 150 mM		

El Límite de Detección en este ensayo está en 0,9 ug de QS21, y a una densidad óptica (OD) de 0,12.

Se estimó que la interrupción del QS21 en una composición adyuvante, que comprende cloruro de sodio 150 mM, era mayor del 98,2% para el equivalente de 50 µg de QS21 ensayado. En el caso de un equivalente de 90 µg ensayado, la conclusión es mayor del 99%.

5 Después se comparó la interrupción del QS21 con una composición adyuvante equivalente que comprende sorbitol y solamente 5 mM de cloruro de sodio. Los datos se generaron después del almacenamiento del ASA a 4°C o después de la estabilidad acelerada (7 días a 37°C). Para el ASA en sorbitol, la curva convencional de QS21 se llevó a cabo en un tampón que contenía sorbitol.

Muestra	Punto del tiempo	LOD	QS21 interrumpido
Composición adyuvante (ASA) NaCl 150 mM	T0	< 1,4	>97,2%
	7 d 37°C	<0,9	>98,2%
Composición adyuvante (ASA) sorbitol, NaCl 150 mM	T0	< 2	> 97,8%
	7 d 37°C	< 1	> 96%
	11 M 4°C	< 2	> 97,8%*
Equivalente de 50 µg de QS21 ensayado excepto * equivalente de 90 µg de QS21 ensayado.			

10

Se concluyó que el QS21 se interrumpía adecuadamente en un tampón bajo en cloruro de sodio.

Ejemplo 4: Congéneres de MPL.

15 Químicamente, el 3D-MPL es una mezcla de monofosforilo-5 lípido A 3-desacilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Cada molécula de 3D-MPL separada se denomina congénere. Es importante que la composición congénere permanezca constante, sin cambios entre la proporción de los congéneres. También es importante que cualquier tampón usado haga posible que la composición congénere sea la misma que en los liposomas concentrados usados para elaborar la composición adyuvante.

20 Como se muestra en la Figura 2, la composición congénere se examinó en liposomas 3D-MPL concentrados (Liposomas concentrados LIP07-217, primera columna de la Figura 2), una composición adyuvante, que comprende los liposomas 3D-MPL y QS21 en un tampón NaCl 150 mM (Adyuvante de NaCl 150 mM, o ASA (NaCl 150 mM), segunda columna), y una composición adyuvante, que comprende los liposomas 3D-MPL y QS21 en un tampón sorbitol y NaCl 5 mM (Adyuvante de Sorbitol, o ASA (sorbitol), columnas 3 - 7).

25 La composición congénere también se examinó en dos lotes de adyuvante de ASA (sorbitol) en el día 0 y 7 días después de la preparación y mantenimiento a 37°C para asegurar que no hubiera desprendimiento a través del tiempo (véanse las cuatro columnas finales de la Figura 2).

30 Se determinó la distribución relativa de los congéneres tetra-, penta- y hexa-acilados de MPL en los liposomas concentrados o en las muestras de ASA (sorbitol) mediante detección con 1 P-HPLC-Fluo (ARD). Tanto los patrones como las muestras se derivaron con dansilhidrazina, que introduce un cromóforo Fluo-activo sobre la estructura base del disacárido. Las muestras derivadas se analizaron sobre una columna C18 en fase inversa, usando hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) en forma de un reactivo de emparejamiento de iones. Los congéneres que contenían los mismos números de grupos acilo graso se eluyeron en distintos grupos (tetraacilo, pentaacilo, y hexaacilo). La distribución de los congéneres se deduce mediante la comparación el área pico de cada grupo con el área pico total de todos los congéneres de MPL.

35 La Figura 2 muestra el porcentaje de cada congénere. No se encontró ninguna diferencia significativa en la composición de los congéneres entre los tampones adyuvantes, y la composición congénere fue consistente a través del tiempo en el tampón sorbitol.

Ejemplo 5: Preparación de composiciones y uso en los Ejemplos 6 y 7.

5.1 Preparación de PRAME con CpG (en todos los Ejemplos se usa CpG 2006)

40 5.1.1 Preparación de PRAME con CpG con ASA (NaCl 150 mM) usada en el experimento 1 y en el experimento 2 del Ejemplo 6 y del Ejemplo 7

Una solución de sacarosa al 30% (p/v) (preparada en agua para inyección) se agregó a agua para inyección hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 5%. Entonces se agregó tampón Tris-HCl 100 mM, pH de 9,5, hasta alcanzar una concentración de tampón Tris de 75 mM. Luego se agregó tampón borato 100 mM, pH de 9,8, hasta alcanzar una concentración de tampón borato 5 mM. Después se agregó una solución de Poloxámero 188 al 10% (p/v) (preparado en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración del 0,313%. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se agregó una solución de CpG en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml (en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración de 1050 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó el antígeno PRAME, hasta alcanzar una concentración de proteína de 1250 µg/ml. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El pH se verificó (9,51). La mezcla obtenida se cargó a 0,5 ml en viales de vidrio de 3 ml, y después se secó por congelación.

La Figura 3 ilustra el ciclo de secado por congelación usado para PRAME (duración= 40 horas).

La torta de liofilización resultante se reconstituyó con 625 µl de la composición adyuvante acuosa preparada como en el Ejemplo 2, que comprende NaCl 150 mM. La torta de liofilización contenía un exceso de la dosis de antígeno de 1,25 veces, para tener la relación correcta de antígeno/adyuvante después de la reconstitución con una composición final de Tris 16 mM, borato 4 mM, sacarosa al 4%, Poloxámero 188 al 0,24%, 840 µg/ml de CpG y 1000 µg/ml de PRAME.

5.1.2 Preparación de PRAME con CpG para la "formulación líquida" (NaCl 70 mM) en el Experimento 1 del Ejemplo 7.

Preparación concentrada de adyuvante

El PBS mod concentrado 10 veces, pH de 6,1, cuando se diluyó 10 veces, se agregó a agua para inyección hasta alcanzar un tampón concentrado 1 vez en la formulación final. Por separado, se preparó una solución previamente mezclada hecha de liposomas y QS21 previamente diluidos a 400 µg/ml. La pre-mezcla se mezcló magnéticamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los liposomas concentrados usados en la pre-mezcla se hacen de 40 mg/ml de DOPC, 10 mg/ml de colesterol, y 2 mg/ml de MPL 3-desacilado. La pre-mezcla se agregó al PBS hasta alcanzar una concentración de MPL de 200 µg/ml, y una concentración de QS21 de 200 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se agregó CpG a alrededor de 23 mg/ml, hasta alcanzar una concentración final de 1680 µg/ml. La mezcla se agitó magnéticamente durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente. El pH se verificó para ser de 6,1+/- 0,1. La sustancia activa (AS) se filtró sobre un filtro de PES de 0,22 µm, y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Formulación final

Se añadió sacarosa al 25%, borato 25 mM, pH de 9,8, y Lutrol al 10%, a agua para inyecciones (WFI), hasta alcanzar respectivamente el 9,25%, 5 mM, y el 0,24% en la formulación final. Se agregó la preparación de AS + CpG concentrada 2 veces, dando como resultado una concentración de 1 vez en la formulación final. La mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se agregó el antígeno PRAME en sacarosa al 3,15%, y borato 5 mM, y la mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente.

5.1.3 Preparación de PRAME con CpG para la "formulación líquida" en el Experimento 2 del Ejemplo 7.

Preparación concentrada de adyuvante

El ASA para la formulación líquida se preparó como sigue. Se agregó tampón fosfato 1M (pH de 6,1, diluido 100 veces), bajo agitación magnética, a agua para inyecciones (WFI), hasta alcanzar una concentración final de 45 mM, tomando en cuenta la concentración de fosfato 50 mM en los liposomas concentrados. Después se agregó sorbitol al 35%, hasta alcanzar una concentración final del 21,15%. Se agregaron a la mezcla los liposomas concentrados hechos de 40 mg/ml de DOPC, 10 mg/ml de colesterol, y 2 mg/ml de MPL 3-desacilado, hasta alcanzar una concentración final de MPL de 450 µg/ml. Se agregó QS21 a granel (a alrededor de 5000 µg/ml), hasta alcanzar una concentración final de QS21 de 450 µg/ml. La mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El pH se verificó y se ajustó a un pH de 6,1 +/- 0,1. La concentración final en este ASA fue, respectivamente, de 450 µg/ml para el MPL, de 450 µg/ml para el QS21, fosfato 45 mM, NaCl 22,5 mM, y sorbitol al 21,15%.

Formulación final

Una solución de sacarosa al 30% (p/v) (preparada en agua para inyección) se agregó a agua para inyección, hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 4% en la formulación final. Entonces se agregó el tampón Tris-HCl 1M, pH de 9,0, hasta alcanzar una concentración del tampón Tris 16 mM en la formulación final. Luego se agregó el tampón borato 100 mM, pH de 9,8, hasta alcanzar una concentración del tampón borato 4 mM en la formulación final. Entonces se agregó la solución de Poloxámero 188 al 10% (p/v) (preparado en agua para inyección), hasta

alcanzar una concentración del 0,24% en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó una solución de CpG en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml (en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración de 840 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó el tampón antigénico PRAME (Borato 5 mM - Sacarosa al 3,15%, pH de 9,8), para ajustar la concentración del antígeno PRAME a 1000 µg/ml. Entonces se agregó el antígeno PRAME hasta alcanzar una concentración de proteína de 8 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó la sustancia activa concentrada 4,5 veces en sorbitol, hasta alcanzar las concentraciones finales de 100 µg/ml de MPL y QS21. El pH se verificó (+/-8,0).

5 se agregó el tampón antigénico PRAME (Borato 5 mM - Sacarosa al 3,15%, pH de 9,8), para ajustar la concentración del antígeno PRAME a 1000 µg/ml. Entonces se agregó el antígeno PRAME hasta alcanzar una concentración de proteína de 8 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó la sustancia activa concentrada 4,5 veces en sorbitol, hasta alcanzar las concentraciones finales de 100 µg/ml de MPL y QS21. El pH se verificó (+/-8,0).

10 5.1.4 Preparación de PRAME con CpG para ASA (sorbitol), y ASA (sacarosa) en el Experimento 1 del Ejemplo 7

Una solución de sacarosa al 30% (p/v) (preparada en agua para inyección) se agregó a agua para inyección, hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 5% en la formulación, entonces se agregó tampón borato 100 mM, pH de 9,8, hasta alcanzar una concentración de tampón borato 5 mM en esta formulación, luego se agregó tampón Tris-HCl 100 mM, pH de 9,0, cuando se diluyó 20 veces, hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 5 mM en esta formulación. Luego se agregó una solución de Poloxámero 188 al 10% (p/v) (preparado en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración del 0,3% en la formulación. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó una solución de CpG en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml (en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración de 1050 µg/ml en la formulación. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó el antígeno PRAME, hasta alcanzar una concentración de proteína de 1250 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El pH se midió a 9,4. La mezcla obtenida se cargó a 0,5 ml en viales de vidrio de 3 ml, y después se secó por congelación.

El ASA (sorbitol) se preparó como se menciona en el Ejemplo 1 con algunas ligeras diferencias: la concentración de sorbitol fue del 4,6%, y el QS21 se diluyó previamente a 400 µg/ml antes de agregarse a los liposomas diluidos concentrados.

El ASA (sacarosa) se preparó como se menciona en el Ejemplo 1, con las siguientes diferencias: el sorbitol es reemplazado por sacarosa (se usó una solución madre del 30% en p/v de solución de sacarosa, y la concentración final de sacarosa es del 8,3%), y el QS21 se diluyó previamente a 400 µg/ml antes de agregarse a los liposomas diluidos concentrados.

30 La torta de liofilización resultante se reconstituyó con 625 µl de la composición adyuvante acuosa, y la composición final comprendió Tris 4 mM, borato 4 mM, sacarosa al 4%, Poloxámero 188 al 0,24%, 840 µg/ml de CpG, y 1000 µg/ml de PRAME.

5.1.5 Preparación de PRAME con CpG para ASA (sorbitol) en el Experimento 2 del Ejemplo 7

35 Una solución de sacarosa al 30% (p/v) (preparada en agua para inyección) se agregó a agua para inyección, hasta alcanzar una concentración de sacarosa del 5% en la formulación, entonces se agregó tampón Tris-HCl 1M, pH de 9,0, cuando se diluyó 50 veces, hasta alcanzar una concentración de tampón Tris 20 mM en esta formulación, después se agregó tampón borato 100 mM, pH de 9,8, cuando se diluyó 20 veces, hasta alcanzar una concentración de tampón borato 5 mM en esta formulación. Después se agregó una solución de Poloxámero 188 al 10% (p/v) (preparado en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración del 0,3% en la formulación. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se agregó una solución de CpG en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml (en agua para inyección), hasta alcanzar una concentración de 1050 µg/ml en la formulación. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó el antígeno PRAME, hasta alcanzar una concentración de proteína de 1250 µg/ml en la formulación final. La mezcla se agitó magnéticamente (150 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El pH se midió a 9,1. La mezcla obtenida se cargó a 0,5 ml en viales de vidrio de 3 ml, después se secó por congelación.

45 El sorbitol ASA se preparó como se describe en el Ejemplo 1. La torta de liofilización resultante se reconstituyó con 625 µl de la composición adyuvante acuosa, y la composición final comprendió Tris 16 mM, borato 4 mM, sacarosa al 4%, Poloxámero 188 al 0,24%, 840 µg/ml de CpG, y 1000 µg/ml de PRAME.

50 5.2 Preparación de NY-ESO1 con CpG

5.2.1 Preparación de NY-ESO1 con CpG en el Ejemplo 6.

Se agregó el tampón Fosfato de Na/K₂ 200 mM, pH de 6,3, diluido 20 veces, bajo agitación magnética, a agua para inyección, hasta alcanzar 12,5 mM en la formulación final. Después se agregaron a la mezcla los siguientes excipientes, y en el siguiente orden: monoioglicerol al 10% en p/v hasta alcanzar el 0,3125% final, Poloxámero 188 al 5% en p/v, hasta alcanzar el 0,0625%, sacarosa al 25% hasta alcanzar el 5% final, y base de L-arginina 287 mM, hasta alcanzar 6,25 mM. Entonces se agregó a esta mezcla CpG a granel a alrededor de 20 mg/ml, hasta

alcanzar una concentración de 1050 µg/ml en la formulación final. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética (alrededor de 150 rpm) a temperatura ambiente durante 10 minutos. El pH se verificó para ser de 7,1+/- 0,3. La agitación magnética se incrementó para crear un vórtex. Entonces se agregó NY-ESO1 hasta alcanzar una concentración final de 750 µg/ml. La agitación magnética se redujo entonces hasta alrededor de 150 rpm, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se tomó una alícuota para verificar el pH final (que tiene que ser de 7,02). Después el volumen final se secó por congelación.

La torta de liofilización resultante se reconstituyó con 625 µl de tampones ASA (NaCl 150 mM y sorbitol).

Ejemplo 6. Prevención de "extracción con sal" en la composición adyuvante que comprende sorbitol en forma de tampón.

La Figura 4 demuestra que la reducción de la concentración de sal hasta 5 mM y que incluye sorbitol en la composición adyuvante, previene la "extracción con sal" de tanto PRAME como NY-ESO-1 en las composiciones inmunogénicas (como se prepararon en los Ejemplos 5.1.1 y 5.2.1, respectivamente). En la Figura 4:

1. Antígeno PRAME reconstituido en tampón ASA de NaCl 150 mM.
2. Antígeno PRAME reconstituido en tampón ASA de sorbitol.
3. Antígeno NYESO-1 reconstituido en tampón ASA de NaCl 150 mM.
4. Antígeno NYESO-1 reconstituido en tampón ASA de sorbitol.

La Figura 4 es una comparación fotográfica entre PRAME y NYESO-1 reconstituidos en ASA (NaCl 150 mM), y ASA (sorbitol). Como se puede ver, el PRAME reconstituido en ASA (NaCl 150 mM) aparece nebuloso en comparación con el PRAME reconstituido en ASA (sorbitol). De una manera similar, el NY-ESO reconstituido en ASA (NaCl 150 mM) aparece nebuloso en comparación con el antígeno NYESO reconstituido en ASA (sorbitol).

Ejemplo 7. Modelo de Ratón *In Vivo*

Experimento 1:

Siete grupos de veinte ratones CB6F1 hembras (híbridos de ratones C57BL/6 y Balb/C) de 6 a 8 semanas de edad, se inmunizaron dos veces intra-muscularmente (cada dos semanas, en inyecciones alternadas en el músculo gastrocnemio izquierdo y derecho) con la proteína de PRAME formulada en una dosis fija de ASA +CpG que corresponden a 1/10 de una dosis humana (50 µl que contienen 5 µg de MPL, 5 µg de QS21, y 42 µg de CpG7909). 14 días después de la última inmunización, cuatro grupos de ratones (n = 8 en cada grupo) se estimularon subcutáneamente con células tumorales 10e5 CT26- PRAME, como se describe más adelante. Los siete grupos de ratones fueron:

grp1: tampón.

grp2: PRAME + CpG coliofilizados, resuspendidos en ASA "clásico" (NaCl 150 mM), en el que se precipita la proteína de PRAME.

grp3: PRAME + CpG coliofilizados, resuspendidos en ASA (sacarosa).

grp4: PRAME + CpG coliofilizados, resuspendidos en ASA (sacarosa - incubación durante 48 horas a 25°C).

grp5: PRAME + CpG coliofilizados, resuspendidos en ASA (sorbitol).

grp6: PRAME + ASA - formulación "líquida" que contiene NaCl 70 mM + CpG.

grp7: PRAME + ASA- formulación "líquida" que contiene NaCl 70 mM + CpG (+ poloxámero).

7 días después de la última inmunización, se analizó la respuesta celular por medio de la capacidad de las células T para secretar citoquinas (n = 4 grupos de 3 ratones).

Todos los ratones recibieron 0,4 µg de PRAME en 1/10 de la dosis humana del Sistema Adyuvante de ASA + CpG (525 µg de MPL, 5 µg de QS21, y 42 µg de CpG).

Resultados:

Crecimiento tumoral

El crecimiento tumoral promedio a través del tiempo, como se mide por la superficie (mm²) (+SD) por grupo, está representado en la Figura 6. El ASA formulado con PRAME (NaCl 150 mM) + CpG y PRAME en el ASA en formulación líquida, induce una protección más baja contra los tumores (mayor crecimiento tumoral) que el ASA de PRAME (sorbitol) + CpG.

Respuesta celular (7 días después de 2 inmunizaciones - n = 4 grupos de 3 ratones por grupo de tratamiento):

La frecuencia de células T CD4 y CD8 capaces de producir citoquinas como IFN γ y TNF α después de la inmunización de los ratones con el antígeno tumoral PRAME ASA-CpG se usa para reflejar la capacidad de las

diferentes formulaciones con el objeto de inducir una respuesta celular funcional. 7 días después de la segunda inmunización, se midieron los porcentajes de células T CD4 y CD8 productoras de citoquinas (IFN γ y TNF α) mediante tinción de citoquina intracelular (ICS) en las células del bazo de los ratones inmunizados.

El porcentaje de CD4 que produjo IFN γ y TNF α (promedio +/-desviación convencional) se muestra en la Figura 5.

5 No se encontró ninguna respuesta de CD8 medible en este experimento.

Se mostró que la proteína de PRAME formulada en ASA (NaCl 150 mM) +CpG se precipita e induce una respuesta de células T específica más baja en comparación con la PRAME formulada en ASA (sorbitol) + CpG. Se obtuvo una respuesta de CD4 específica de PRAME similarmente buena cuando se formuló la proteína de PRAME en ASA (sorbitol) + CpG y en la formulación "líquida" de ASA (NaCl 70 mM) + CpG (ninguna diferencia estadística).
10 También se ensayó la respuesta inmunitaria humoral, pero los datos después de 2 inyecciones no fueron interpretables.

Experimento 2:

Cuatro grupos de veinticuatro ratones CB6F1 hembras (híbridos de ratones C57BL/6 y Balb/C) de 6 a 8 semanas de edad, se inmunizaron cuatro veces intramuscularmente (cada dos semanas, en inyecciones alternadas en el músculo gastrocnemio izquierdo y derecho) con la proteína de PRAME formulada en una dosis fija de ASA +CpG que corresponde a 1/10 de una dosis humana (50 μ l que contienen 5 μ g de MPL, 5 μ g de QS21 y 42 μ g de CpG7909). 14 días después de la última inmunización, cuatro grupos de ratones (n = 12 en cada grupo) se estimularon subcutáneamente con células tumorales 10e5 CT26-PRAME, como se describe más adelante. Los cuatro grupos de ratones eran:

20 grp1: tampón.

grp2: PRAME + CpG coliofilizados resuspendidos en el ASA "clásico" (NaCl 150 mM), en el que se precipita la proteína de PRAME.

grp3: PRAME + CpG coliofilizados resuspendidos en ASA (sorbitol).

grp4: PRAME + ASA - formulación "líquida" + CpG (+poloxámero).

25 14 días después de la última inmunización, la respuesta inmunitaria se analizó usando diferentes lecturas como sigue:

- Respuesta humoral (n = 12).

- Respuesta celular por la capacidad de las células T para secretar citoquinas (n = 4 grupos de 3 ratones).

- Efecto protector contra un estímulo tumoral (n = 12).

30 Todos los ratones recibieron 0,4 μ g de PRAME en 1/1 o de la dosis humana del Sistema Adyuvante de ASA + CpG (μ g de MPL, 5 μ g de QS21, y 42 μ g de CpG).

Resultados:

Crecimiento tumoral

35 El crecimiento tumoral promedio a través del tiempo, como se mide por la superficie (mm²) (+SD), por grupo, está representado en la Figura 9. El ASA formulado con PRAME (NaCl 150 mM) + CpG induce una protección más baja contra tumores (mayor crecimiento tumoral) que el ASA de PRAME (sorbitol) + CpG. Se observó una protección similar para PRAME ASA (sorbitol) + CpG, y para PRAME en la formulación líquida de ASA + CpG).

Análisis de muestras: Respuesta humoral:

40 Los sueros de los ratones (n = 12) se ensayaron mediante un ELISA para determinar la presencia de anticuerpos específicos de PRAME 14 días después de la última de las 4 inmunizaciones, como se describe más adelante. La respuesta del anticuerpo (Ig total) se evaluó mediante un ELISA usando la proteína de PRAME recombinante purificada en forma del antígeno de recubrimiento. Los sueros a partir de los animales inmunizados se analizaron para determinar la presencia de anticuerpos específicos de PRAME. La media geométrica de las titulaciones convencionales (n = 12 ratones) +/- los intervalos de confianza del 95% obtenidos después de 4 inmunizaciones se muestran en la Figura 7. La PRAME/ASA + CpG que contiene el ASA clásico (NaCl 150 mM) induce una respuesta de anticuerpos muy pequeña, mientras que la PRAME/ASA + CpG que contiene ASA (sorbitol) induce titulaciones de anticuerpos muy altas. Esta respuesta es similar a aquella inducida por la formulación líquida de ASA.

Respuesta celular (14 días después de 4 inmunizaciones - n = 4 grupos de 3 ratones por grupo de tratamiento):

50 La frecuencia de células T CD4 y CD8 capaces de producir citoquinas como IFN γ y TNF α después de la inmunización de los ratones con el antígeno tumoral PRAME ASA-CpG se usa para reflejar la capacidad de las diferentes formulaciones con el objeto de inducir una respuesta celular funcional. 14 días después de la cuarta

inmunización, se midieron los porcentajes de células T CD4 y CD8 que producen citoquinas (IFN γ y TNF α) mediante tinción de citoquina intracelular (ICS) en las células del bazo de los ratones inmunizados.

5 El porcentaje de CD4 que produce IFN γ y TNF α (promedio +/- desviación estándar) se muestra en la Figura 8. Los valores p son en gran parte inferiores a 0,05, demostrando una diferencia significativa entre el grupo 2 y los grupos 3 y 4.

No se encontró ninguna respuesta de conmensurable en este experimento.

10 Se mostró que la proteína de PRAME formulada en ASA (NaCl 150 mM) + CpG se precipita e induce una respuesta de células T específica estadísticamente más baja, en comparación con la PRAME formulada en ASA (sorbitol) + CpG. En contraste, se obtuvo una respuesta de CD4 específica de PRAME similarmente buena cuando la proteína de PRAME se formuló en ASA (sorbitol) + CpG, y en la formulación "líquida" de ASA+ CpG.

Procedimiento

Modelo de tumor CT26-PRAME y crecimiento tumoral

15 La línea celular CT26-PRAME se generó mediante la transfección de la línea celular de carcinoma de colon CT26 con el plásmido de expresión de mamífero, pCDNA3, que codifica el ADNc para PRAME (Invitrogen, Carlsbad, CA). La selección con G418 (200 μ g/ml), y la clonación de dilución de límite proporcionó un clon que expresa la PRAME (CT26-PRAME) como se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (copias de ARNm de 10e-3 PRAME / copia de β -actina de ratón, que está en el intervalo del nivel de expresión de PRAME por parte de los tumores humanos).

20 Las células CT26 PRAME se cultivaron *in vitro* a 37°C con CO $_2$ al 5% en el medio RPMI con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina al 1%, penicilina-estreptomina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, piruvato de sodio al 1%, y β -mercaptoetanol al 0,1%. Las células se tripsinizaron, se lavaron dos veces en el medio sin suero, y se inyectaron en 200 μ l del medio RPMI subcutáneamente en el flanco derecho de cuatro grupos de ratones CB6F1, 14 días después de la última inmunización con PRAME, como se describe anteriormente. El crecimiento tumoral individual se midió dos veces por semana. El producto de los 2 diámetros principales de cada tumor se registró a través del tiempo, y los datos se muestran como la superficie tumoral promedio (mm 2) en cada grupo de animales.

25 Análisis de muestras: Respuesta humoral

30 Antes de la adición de los sueros, la inmunoplaaca se recubrió con el antígeno PRAME durante la noche a 4°C. Después de la reacción con los sueros durante 90 minutos a 37°C, se agregó un anticuerpo entero de conejo biotinilado contra las inmunoglobulinas de ratón durante 90 minutos a 37°C. El complejo de antígeno - anticuerpo se reveló mediante incubación con un complejo de estreptavidina - peroxidasa biotinilada durante 30 minutos a 37°C. Este complejo se reveló entonces mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB) durante 10 minutos a temperatura ambiente, y la reacción se interrumpió con H $_2$ SO $_4$ 0,2 M. Las densidades ópticas se registraron a 450 nm.

Procedimiento de análisis de muestras: Respuesta celular (Producción de IFN γ /TNF α)

35 La producción de IFN γ y TNF α por parte de las células T CD4 y CD8 se midió mediante citometría de flujo (LSR2 de Becton Dickinson) usando tinción con citoquina intracelular (ICS) en las células del bazo de los ratones inmunizados (4 grupos de 3 ratones por grupo) después de 2 horas de estimulación con una reserva de péptidos 15 mer solapados que cubrían la secuencia entera de la proteína PRAME.

Estimulación de las células T:

40 - Las células del bazo de los animales inmunizados se volvieron a estimular con una reserva de 123 péptidos 15 mer sopados por 11 aminoácidos, que cubrían la secuencia entera de PRAME. Los péptidos (1 μ g/ml/péptido) se mezclaron con células T 10e6 (las células del bazo) durante 2 horas a 37°C en una placa de 96 pocillos (U) en un volumen final de 200 μ l de RPMI con FCS al 5% que contenía 2 μ g/ml de anti-CD49d y anti-CD28 a 2 μ g/ml

45 - después de la incubación, se agregaron 50 μ l de brefeldina (1/1000) en RPMI con suero fetal de becerro (FCS) al 5%.

Tinción intracelular:

• Tinción de CD4/CD8:

- Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos (pocillos cónicos)

50 - Centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

- Lavado con 250 μ l de tampón FACS (PBS y FCS al 1%).

ES 2 494 442 T3

- Los sedimentos de células se incubaron con 50 µl de 2.4G2 1/50 en tampón FACS durante 10 minutos a 4°C.
 - Se agregaron 50 µl de la Mezcla Maestra CD4-PE (dilución de Mab: 1/200), y CD8PerCP (dilución de Mab: 1/200) en tampón FACS durante 30 minutos a 4°C.
 - 5 - Lavado en tampón FACS (1200 rpm durante 10 minutos).
 - Permeabilización de las células:
 - Los sedimentos se incubaron con 200 µl de solución cytoFix-cytoPerm durante 20 minutos a 4°C.
 - Se lavaron con permWASH 1 x (1200 rpm durante 10 minutos) la solución permWASH está concentrada 10 veces; dilución en agua estéril.
 - 10 • Tinción intracelular de IFN γ y TNF α :
 - Los sedimentos se incubaron durante 2 horas a 4°C con 50 µl de la Mezcla de IFN γ APC (dilución de Mab: 1/50), y TNF α FITC (dilución de Mab: 1/50) en la solución permWASH 1 x.
 - Se lavaron con permWASH 1 X (1200 rpm durante 10 minutos).
 - Los sedimentos se volvieron a suspender en tampón FACS.
 - 15 - Análisis FACS.
- Brefeldina (Gologi Plug): BD cat. 555029
Cytofix 1 cytoperm: Pharmingen (BD) Cat n° 554722
Tampón Perm/wash: Pharmingen (BD) Cat n° 554723
NA LE purificado CD49d de Rata Anti-Ratón: BD Cat n° 553154
20 NA LE purificado CD28 de Rata Anti-Ratón: BD Cat n° 553295
CD8a perCp de Rata Anti-Ratón: BD Cat n° 553036
CD4 PE de Rata Anti-Ratón: BD Cat n° 556616
IFN γ APC de Rata Anti-Ratón: BD Cat n° 554413
TNF α FITC de Rata Anti-Ratón: BD Cat n° 554418
25 CD16/CD32 Anti-Ratón (2.4G2) Becton Dickinson cat n° 553142 (0,5 mg/ml)

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Lemoine, Dominique Henderickx, Veronique
- <120> Composiciones novedosas
- 30 <130> VB63569
- <160> 5
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 20
- 35 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido
- <400> 1
- 40 tccatgacgt tctgacgt 20
- <210> 2
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 2
 tctcccagcg tgcgcat 18
 5 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido
 <400> 3
 accgatgacg tcgccgtga cggcaccag 30
 <210> 4
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 4
 20 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 5
 tccatgacgt tctgatgct 20
 30

REIVINDICACIONES

1. Una composición adyuvante acuosa que comprende: (a) un agonista de TLR-4 y una saponina, en una formulación liposomal; y (b) un agente de isotonicidad no iónico, en la que la concentración de cloruro de sodio o el potencial iónico en la composición adyuvante es menor de 100 mM.
- 5 2. Una composición adyuvante acuosa de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que el agente de isotonicidad no iónico es un poliol.
3. Una composición adyuvante acuosa de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el poliol es sorbitol.
4. Una composición adyuvante acuosa de la reivindicación 3, en la que la concentración de sorbitol es de entre aproximadamente el 4% y aproximadamente el 10% (p/v).
- 10 5. La composición adyuvante acuosa de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el agonista de TLR-4 es 3D-MPL.
6. Una composición adyuvante acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha saponina es QuilA o un derivado de la misma.
7. Una composición adyuvante acuosa de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el derivado de QuilA es QS21.
- 15 8. Una composición adyuvante acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende aproximadamente cloruro de sodio 5 mM, y entre el 5% y el 6% en p/v de sorbitol.
9. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno o preparación antigénica, y una composición adyuvante acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 10. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho antígeno o preparación antigénica no es soluble en concentraciones de sal, o en soluciones en las que el potencial iónico es más alta que 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ó 100 mM.
- 25 11. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, que comprende la etapa de reconstituir una composición liofilizada que comprende al menos un antígeno o preparación antigénica con una composición adyuvante acuosa como se define en cualquiera de reivindicaciones 1 a 8.
- 30 12. Un kit que comprende: (i) una composición liofilizada que comprende un antígeno o preparación antigénica, y (ii) una composición adyuvante acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
13. El procedimiento o kit de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que el antígeno o preparación antigénica no es soluble en concentraciones de sal, o en soluciones en las que el potencial iónico es mayor de 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ó 100 mM.
14. Una composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 9 ó 10 para su uso en medicina.

FIGURA 1

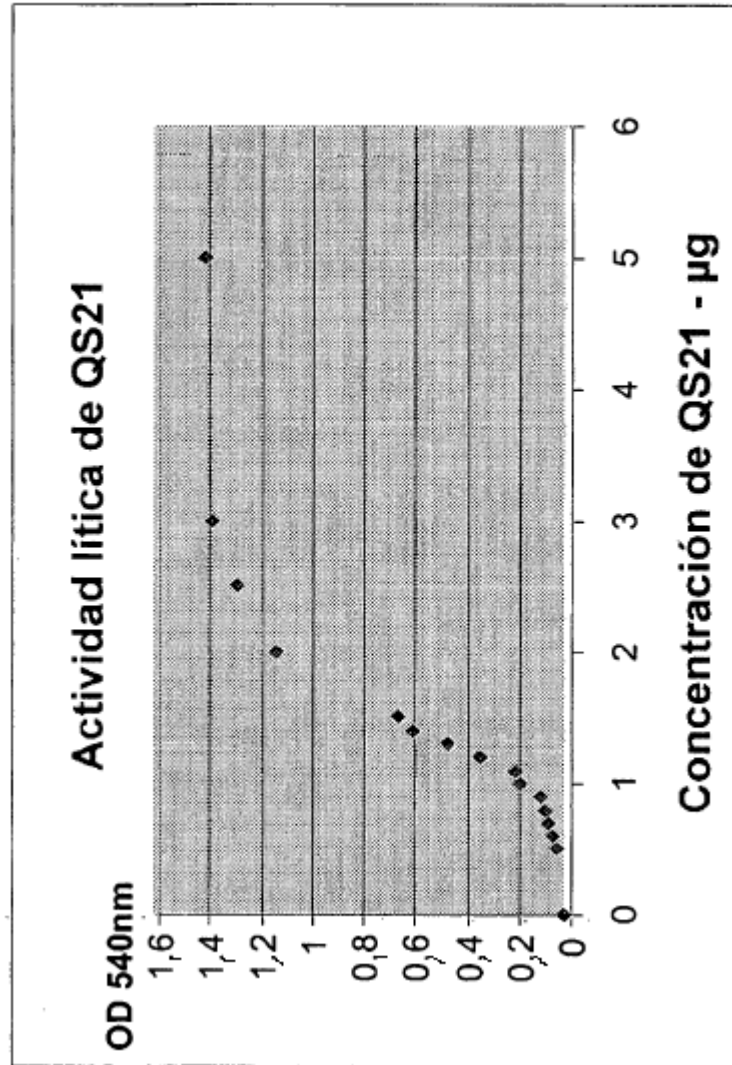


FIGURA 2

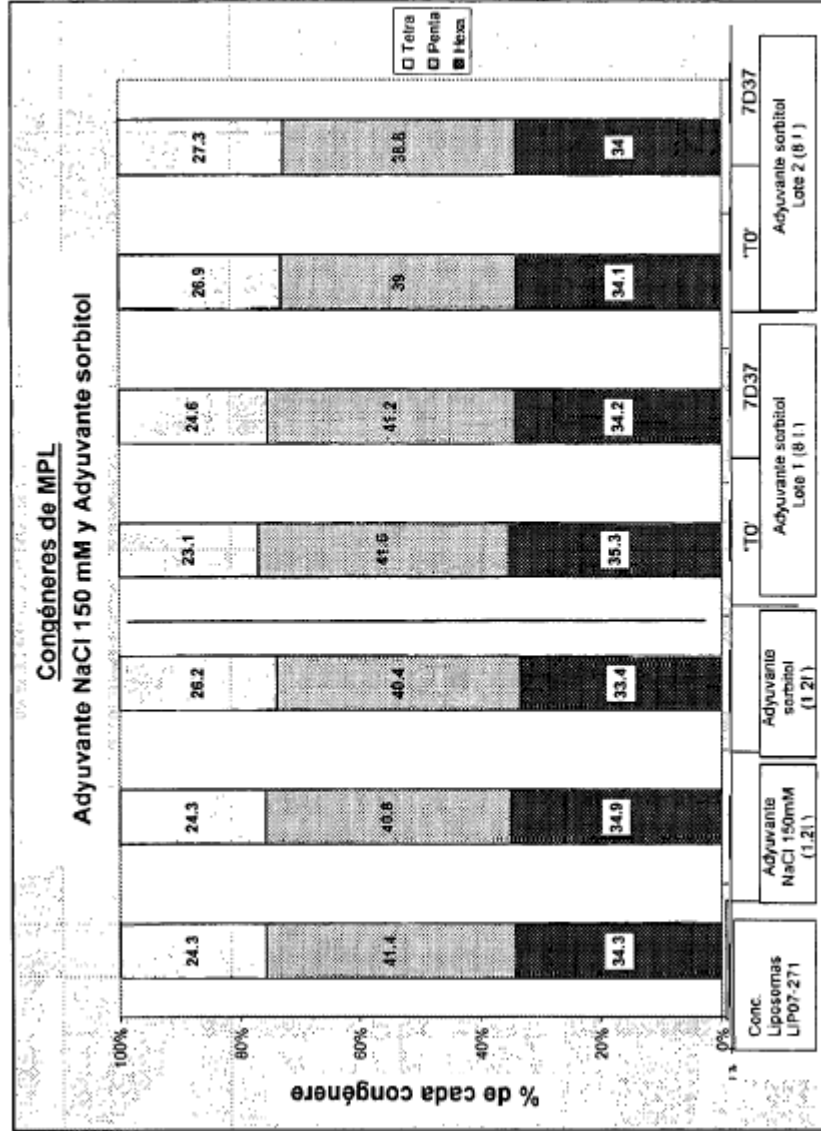


FIGURA 3

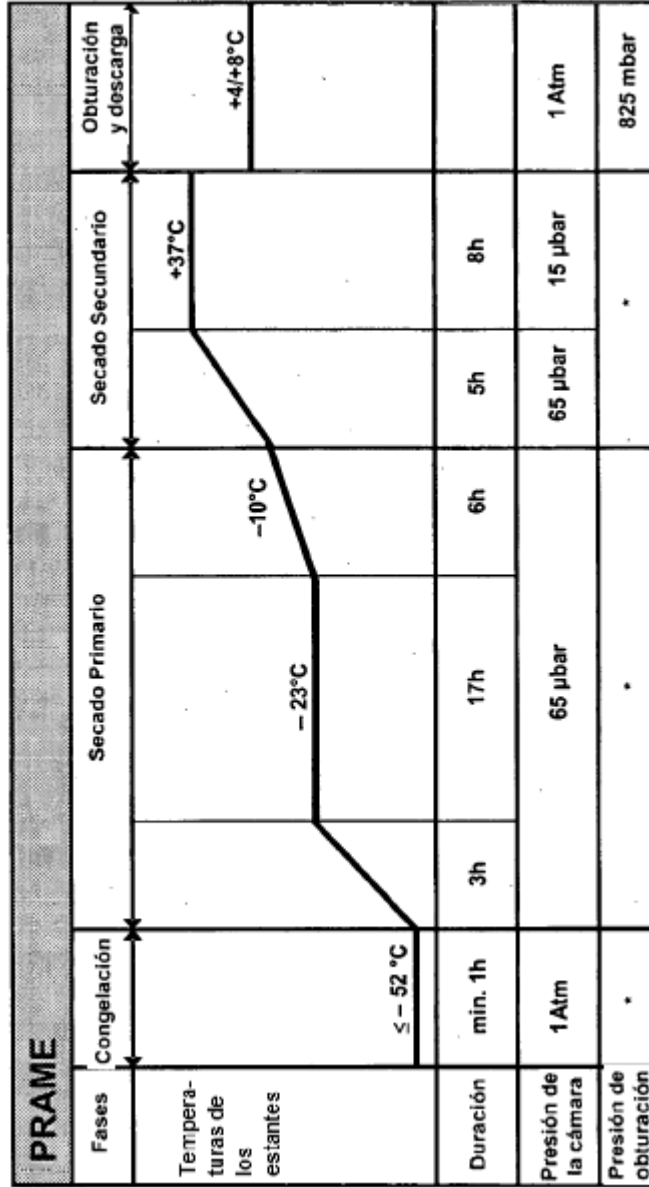


FIGURA 4

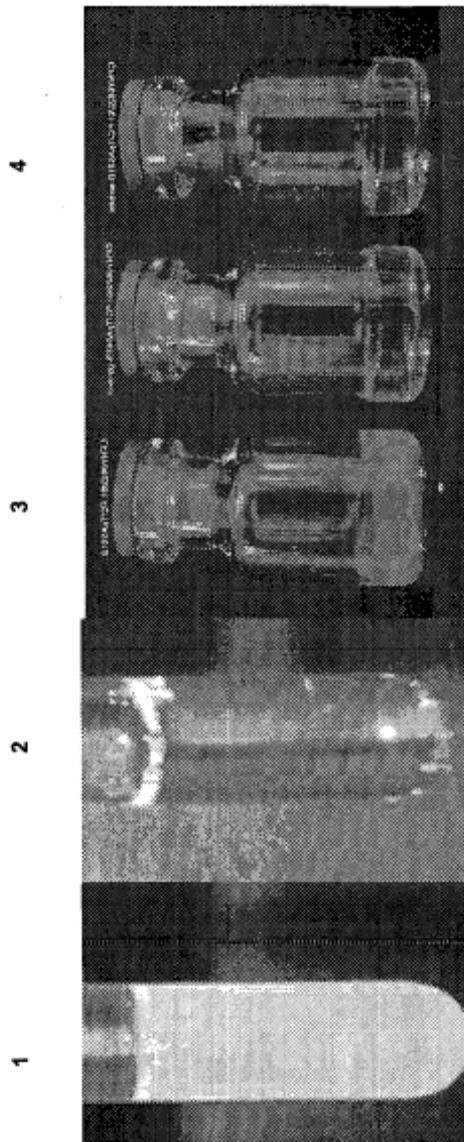


FIGURA 5

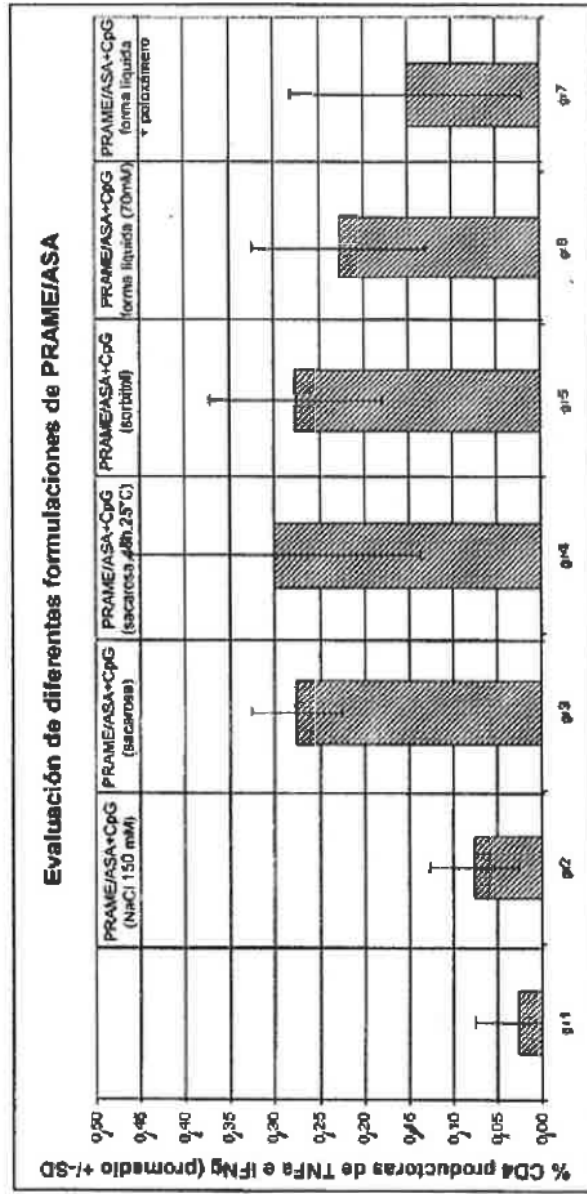


FIGURA 6

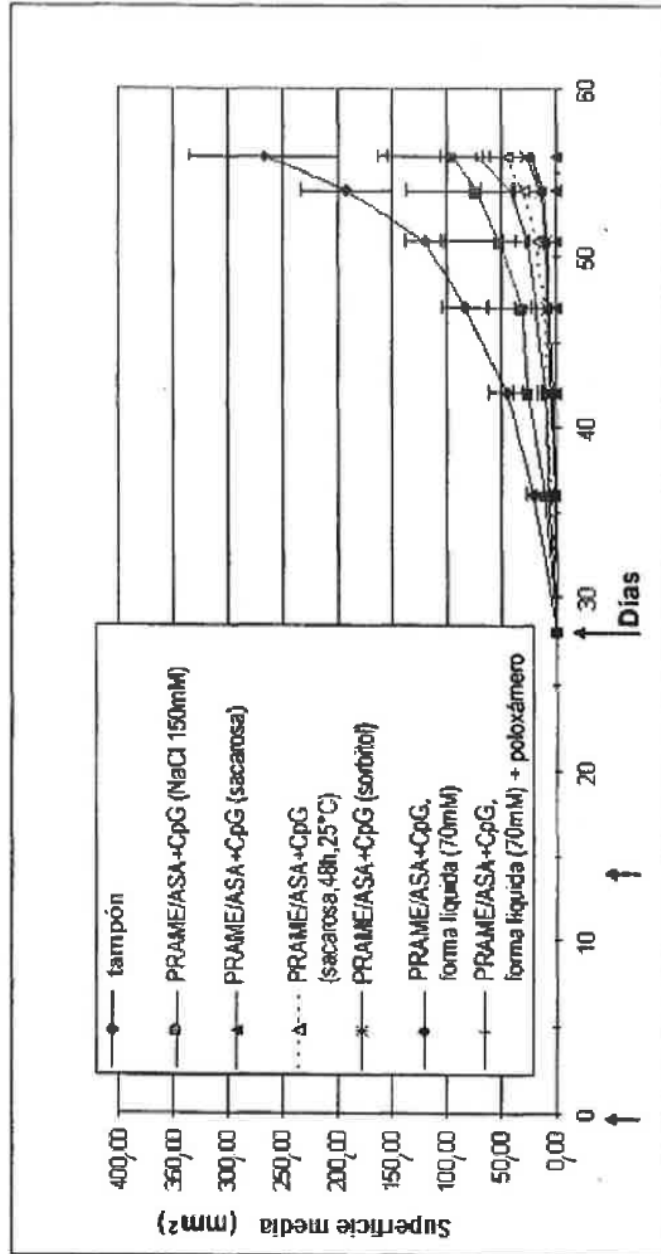


FIGURA 7

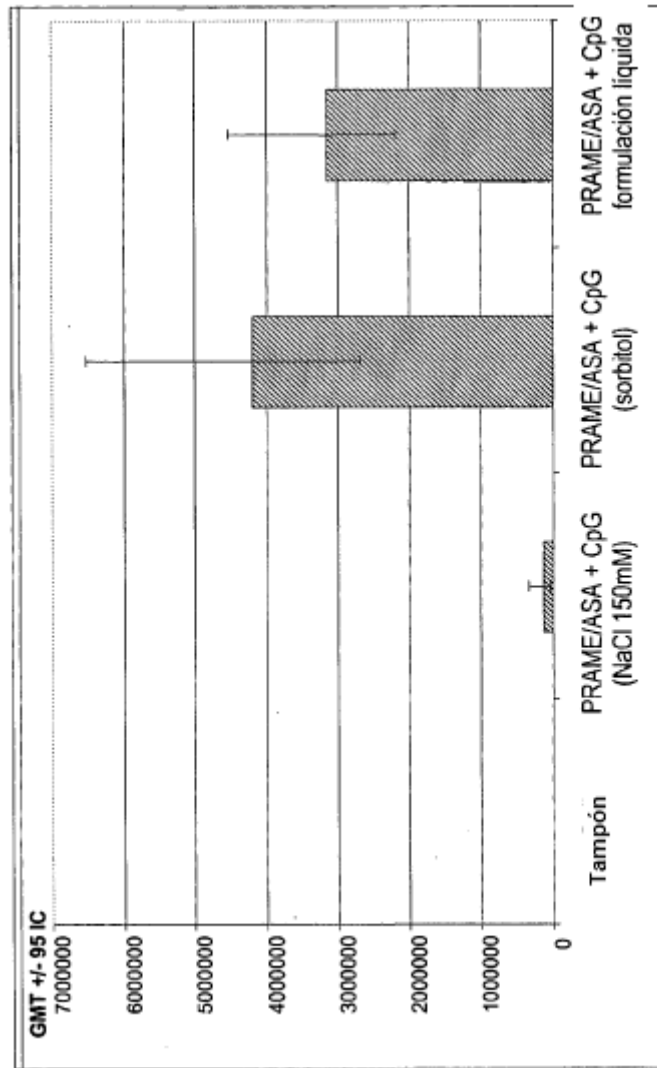


FIGURA 8

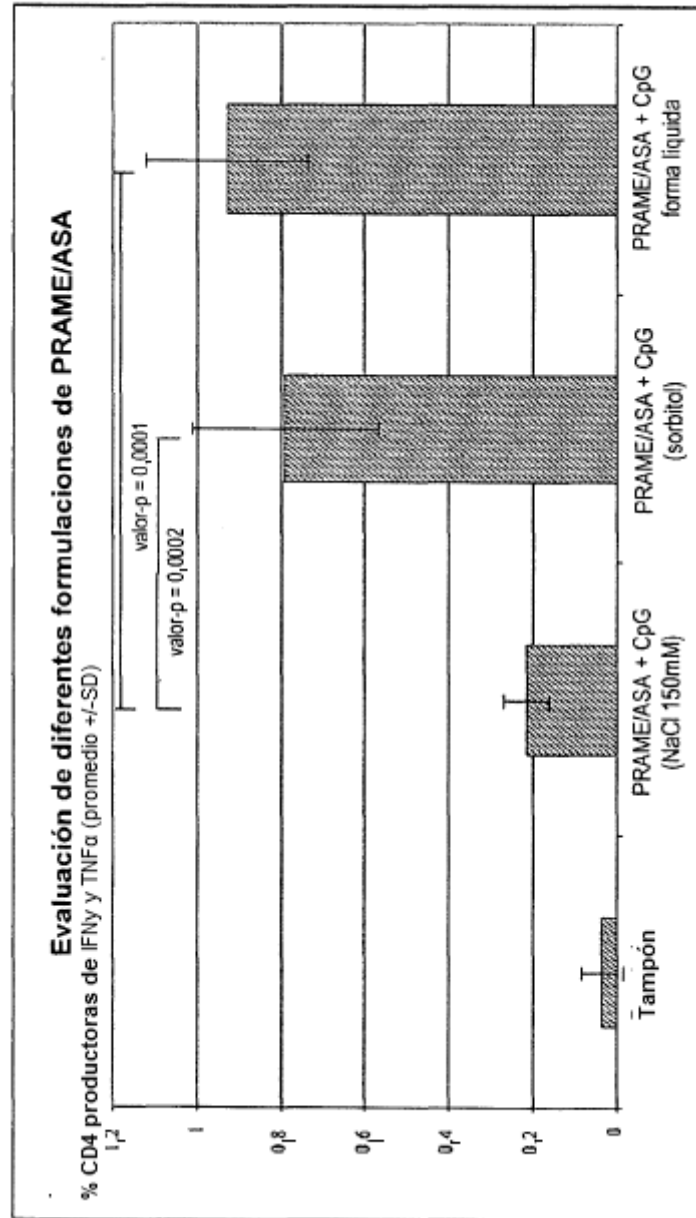


FIGURA 9

