

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2001.10.16	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. RUE DE L'INSTITUT, 89 1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade(s): 2000.10.18 GB 0025573 2000.10.18 GB 0025574 2000.10.18 US 690921	(72) Inventor(es): JEAN STEPHENNE BE NATHALIE GARCON BE CATHERINE MARIE GHISLAINE GERARD BE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.02.20	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.11.23 042/2012	

(54) Epígrafe: **VACINAS COMPREENDENDO O ANTIGÉNIO MAGE LIGADO A UM FRAGMENTO DA PROTEÍNA D**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA NOVAS FORMULAÇÕES DE ADJUVANTE PARA UTILIZAÇÃO COM ANTIGÉNIOS DE CANCRO. O ADJUVANTE COMPREENDE UMA SAPONINA E UM OLIGONUCLEÓTIPO IMUNOESTIMULADOR.

RESUMO

"VACINAS COMPREENDENDO O ANTIGÊNIO MAGE LIGADO A UM FRAGMENTO DA PROTEÍNA D"

A presente invenção proporciona novas formulações de adjuvante para utilização com antigénios de cancro. O adjuvante compreende uma saponina e um oligonucleótido imunoestimulador.

DESCRIÇÃO

"VACINAS COMPREENDENDO O ANTIGÉNIO MAGE LIGADO A UM FRAGMENTO DA PROTEÍNA D"

A presente invenção refere-se a uma nova formulação compreendendo uma combinação de um antigénio de cancro ou um seu derivado e uma composição de adjuvante combinada compreendendo um oligonucleótido imunoestimulador, uma saponina e, adicionalmente, compreendendo um lipopolissacárido.

Apesar de enormes investimentos de recursos financeiros e humanos, o cancro permanece uma das principais causas de morte. Por exemplo, o cancro é a principal causa de morte em mulheres entre as idades de 35 e 74 anos. O cancro da mama é a doença maligna mais comum em mulheres e a incidência para desenvolver cancro da mama está a aumentar. Estima-se que uma em nove mulheres será diagnosticada com a doença. As abordagens convencionais para a cura do cancro da mama centraram-se à volta de uma combinação de cirurgia, radiação e quimioterapia. Estas abordagens resultaram em alguns sucessos extraordinários em algumas doenças. Contudo, o cancro da mama é, na maioria das vezes, incurável quando diagnosticado para lá de um certo estágio. São necessárias abordagens alternativas para o diagnóstico precoce e terapia.

Os oligonucleótidos imunoestimuladores contendo dinucleótidos CpG não metilados ("CpG") e são conhecidos na técnica como sendo adjuvantes quando administrados por via

sistémica e de mucosa (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160 (2): 870-876; McCluskie e Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6). CpG é uma abreviatura para motivos de dinucleótidos de citosina-guanosina presentes no ADN. Historicamente, foi observado que a fracção de ADN de BCG podia exercer um efeito anti-tumoral. Em estudos posteriores, foi demonstrado que oligonucleótidos sintéticos derivados de sequências de genes de BCG eram capazes de induzir efeitos imunoestimuladores (*in vitro* e *in vivo*). Os autores destes estudos concluíram que certas sequências palindrómicas, incluindo um motivo central CG, continham esta actividade. O papel central do motivo CG na imunoestimulação foi mais tarde elucidado numa publicação por Krieg, *Nature* 374, p546, 1995. A análise detalhada mostrou que o motivo CG tem de estar num certo contexto da sequência e que tais sequências são comuns no ADN bacteriano mas são raras em ADN de vertebrados. A sequência imunoestimuladora é frequentemente: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; em que o motivo dinucleótido CG não é metilado, mas outras sequências CpG não metiladas são conhecidas como sendo imunoestimuladoras e podem ser utilizadas na presente invenção.

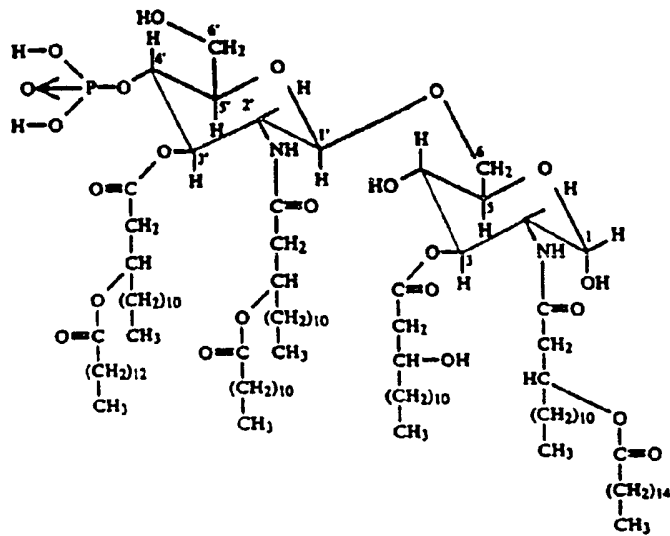
Em certas combinações dos seis nucleótidos está presente uma sequência palindrómica. Alguns destes motivos, seja como repetições de um motivo ou uma combinação de diferentes motivos, podem estar presentes no mesmo oligonucleótido. A presença de uma ou mais destas sequências imunoestimuladoras contendo oligonucleótidos pode activar vários subconjuntos imunitários, incluindo células "assassinas" naturais (que produzem interferão γ e possuem actividade citolítica) e macrófagos (Wooldrige *et al.*, Vol 89 (nº 8), 1977). Embora tenha sido verificado que outras sequências contendo CpG não metilado não possuindo esta

sequência de consenso eram imunomoduladoras.

CpG, quando formulado em vacinas, é geralmente administrado em solução livre em conjunto com antígeno livre (documento WO 96/02555; McCluskie e Davis, *supra*) ou covalentemente conjugado a um antígeno (Publicação PCT N° WO 98/16247) ou formulado com um veículo, tal como hidróxido de alumínio ((Antígeno de superfície da hepatite) Davis *et al.*, *supra*; Brazolot-Millan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1998,95 (26), 15553-8).

As combinações de adjuvante da presente invenção incluem, em formas de realização preferidas, pelo menos, um adjuvante derivado de lipopolissacárido enterobacteriano.

É sabido, desde há muito, que o lipopolissacárido enterobacteriano (LPS) é um estimulador potente do sistema imunitário, embora a sua utilização em adjuvantes tenha sido abreviada pelos seus efeitos tóxicos. Um derivado não tóxico de LPS, monofosforil-lípido A (MPL), produzido por remoção do grupo carbo-hidrato central e o fosfato da glucosamina da extremidade redutora, foi descrito por Ribí *et al.*, (1986, *Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NI, p407- 419) e possui a seguinte estrutura:



Uma outra versão destoxificada de MPL resulta da remoção da cadeia acilo da posição 3 da estrutura do dissacárido e é denominada monofosforil-lípido A 3-O-Desacilado (3D-MPL). Pode ser purificado e preparado pelos métodos ensinados no documento GB 2122204B, cuja referência divulga, também, a preparação de difosforil-lípido A e suas variantes 3-O-desaciladas. Uma forma preferida de 3D-MPL é na forma de uma emulsão, possuindo um tamanho de partículas pequeno inferior a 0,2 μm em diâmetro e o seu método de preparação é divulgado no documento WO 94/21292. As formulações aquosas compreendendo monofosforil-lípido A e um agente tensoactivo foram descritas no documento WO 98/43670A2.

Os adjuvantes derivados de lipopolissacárido bacteriano a serem formulados nas combinações de adjuvante da presente invenção podem ser purificados e processados de fontes bacterianas ou, alternativamente, estes podem ser sintéticos. Por exemplo, monofosforil-lípido A purificado é descrito em Ribi *et al.*, 1986 (*supra*) e monofosforil- ou difosforil-lípido A 3-O-desacilado derivado de *Salmonella sp.* é descrito nos documentos GB 2220211 e US 4912094. Foram descritos outros

lipopolissacáridos purificados e sintéticos (documentos WO 98/01139; US 6005099 e EP 0729473 B1; Hilgers *et al.*, 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79 (4): 392-6; Hilgers *et al.*, 1987, *Immunology*, 60(1): 141-6; e documento EP 0549074 B1). Um adjuvante de lipopolissacárido bacteriano particularmente preferido é 3-D-MPL.

As combinações de adjuvantes de 3D-MPL e saponina derivados da casca de Quillaja Saponaria molina foram descritas no documento EP 0761231B. O documento WO 95/17210 divulga um sistema de adjuvante em emulsão baseado no esqualeno, α -tocoferol e monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80), formulados com o imunoestimulante QS21, opcionalmente com 3D-MPL.

As saponinas são conhecidas como adjuvantes em vacinas para administração sistémica. A actividade adjuvante e hemolítica das saponinas individuais têm sido extensamente estudadas na técnica (Lacaille-Dubois e Wagner, *supra*). Por exemplo, Quil A (derivada da casca da árvore da América do Sul Quillaja Saponaria Molina) e suas fracções, são descritas no documento US 5057540 e "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2): 1-55; e documento EP 0362279 B1.

Estruturas particuladas, denominadas Complexos Imunoestimuladores (ISCOMS), compreendendo fracções de Quil A, são hemolíticas e foram utilizadas na preparação de vacinas (Morein, B., documento EP 0109942 B1). Estas estruturas foram reportadas como possuindo actividade adjuvante (documentos EP 0109942 B1; WO 96/11711).

As saponinas hemolíticas QS21 e QS17 (fracções de Quil A purificadas por HPLC) foram descritas como adjuvantes sistémicos potentes e o método da sua produção é divulgado na Patente US N° 5057540 e documento EP 0362279 B1. Também descrito nestas referências está a utilização de QS7 (uma fracção não hemolítica de Quil-A) que actua como um potente adjuvante para vacinas sistémicas. A utilização de QS21 é posteriormente descrita em Kensil *et al.*, (1991. *J. Immunology* vol 146, 431-437). As combinações de QS21 e polissorbato ou ciclodextrina são também conhecidas (documento WO 99/10008). Sistemas de adjuvante particulados compreendendo fracções de QuilA, tais como QS21 e QS7, são descritos nos documentos WO 96/33739 e WO 96/11711.

Outras saponinas que foram utilizadas em estudos de vacinação sistémica incluem os derivados de outras espécies de plantas, tais como *Gypsophila* e *Saponaria* (Bomford *et al.*, *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992).

As saponinas são também conhecidas por terem sido utilizadas em estudos de vacinas aplicadas em mucosas e que obtiveram sucesso variável na indução de respostas imunitárias. Foi previamente demonstrado que a saponina Quil-A não tinha efeito na indução de uma resposta imunitária quando o antigénio é administrado intranasalmente (Gizurarson *et al.*, 1994. *Vaccine Research* 3, 23-29). Ao mesmo tempo, outros autores utilizaram este adjuvante com sucesso (Maharaj *et al.*, *Can. J. Microbiol.*, 1986, 32(5):414-20; Chavali e Campbell, *Immunobiology*, 174(3): 347-59). ISCOM compreendendo saponina Quil A foram utilizados em formulações de vacina intragástrica e intranasal e exibiam actividade adjuvante (McI Mowat *et al.*, 1991, *Immunology*, 72, 317-322; McI Mowat e Donachie, *Immunology Today*, 12, 383-385).

QS21, a fracção não tóxica de Quil A, foi também descrita como um adjuvante oral ou intranasal (Sumino *et al.*, *J Virol.*, 1998, 72(6):4931-9; documento WO 98/56415).

As saponinas são apresentadas em: Lacaille-Dubois, M e Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, vol 2, pp 363-386). As saponinas são esteróides ou triterpenoglicósidos vastamente distribuídas nos reinos das plantas e dos animais marinhos. As saponinas são notadas por formar soluções coloidais em água que formam espuma com agitação e por precipitar colesterol. Quando as saponinas estão próximas das membranas celulares criam estruturas do tipo poro na membrana que causa o rebentamento da membrana. A hemólise de eritrócitos é um exemplo deste fenómeno, que é uma propriedade de algumas, mas não todas, as saponinas.

O documento WO 00/09159 divulga que combinações de CpG e saponina possuem efeitos imunoestimuladores.

A presente invenção refere-se à observação surpreendente de que combinações de oligonucleótidos imunoestimuladores (CpG), saponina e um lipopolissacárido são adjuvantes extremamente potentes. Consequentemente, é proporcionada uma combinação de vacina compreendendo uma combinação de saponina e um oligonucleótido imunoestimulador e um lipopolissacárido com um antigénio de cancro ou seu derivado como definido na reivindicação 1. Numa forma de realização preferida, a formulação de adjuvante compreende uma saponina, de um modo preferido, QS21, um oligonucleótido imunoestimulador e um 3D-MPL.

De um modo preferido, a vacina da presente invenção pode ainda compreender um veículo. Numa forma preferida da presente invenção, os oligonucleótidos, nas composições de adjuvante e vacina, actuam sinergicamente com o combinado saponina/lipopolissacárido na indução de respostas imunitárias específicas para antigénio que levam a uma regressão tumoral estimulada. As formulações são potentes na indução de respostas imunitárias convencionalmente associadas com o sistema imunitário do tipo Th1. Assim, as combinações de adjuvante não são apenas adequadas para imunoprofilaxia de doenças, mas, também, para imunoterapia de doenças, tal como cancro.

As formulações contêm um antigénio anti-tumoral e são úteis para o tratamento imunoterapêutico de cancros. Por exemplo, a formulação de adjuvante encontra utilidade com antigénios de rejeição tumoral, tais como os dos cancros da próstata, mama, colorrectal, pulmão, pancreático, renal ou melanoma. Antigénios exemplificativos incluem MAGE 1, 3 e MAGE 4 ou outros antigénios MAGE, tal como divulgado no documento W099/401, PRAME, BAGE, Lage (também conhecidos como NY Eos 1) SAGE e HAGE (documento WO 99/53061) ou GAGE (Robbins e Kawakami, 1996, *Current Opinions in Immunology* 8, pp 628-636;

Van den Eynde *et al.*, *International Journal of Clinical & Laboratory Research* (submetido em 1997); Correale *et al.*, (1997), *Journal of the National Cancer Institute* 89, p 293. De facto, estes antigénios são expressos numa vasta gama de tipos de tumores, tais como melanoma, carcinoma do pulmão, sarcoma e carcinoma da bexiga.

Os antigénios MAGE podem ser expressos como uma proteína de fusão com um estimulador de expressão ou um parceiro de fusão

imunológico. Na presente invenção o derivado é uma proteína de fusão compreendendo um antigénio da família da proteína MAGE ligado a um parceiro heterólogo, como definido na reivindicação 1, de um modo preferido, MAGE3. As proteínas podem ser quimicamente conjugadas, mas são, de um modo preferido, expressas como proteínas de fusão recombinantes permitindo que sejam produzidos níveis aumentados num sistema de expressão em comparação com a proteína não fundida. Deste modo, o parceiro de fusão pode auxiliar em proporcionar epitopos de T auxiliares (parceiro de fusão imunológico), de um modo preferido, os epitopos de T auxiliares reconhecidos por humanos, ou auxiliar na expressão da proteína (estimulador da expressão) com rendimentos superiores aos da proteína recombinante nativa. De um modo preferido, o parceiro de fusão será um parceiro de fusão imunológico e um parceiro estimulador de expressão.

O parceiro de fusão imunológico é derivado da proteína D, uma proteína de superfície das bactérias gram-negativas, *Haemophilus influenza* B (documento W091/18926). De um modo preferido, um derivado da proteína D compreende, aproximadamente, o primeiro 1/3 da proteína, em particular, aproximadamente os primeiros 100-110 aminoácidos N-terminais. De um modo preferido, o derivado da proteína D é lipidado. De um modo preferido, os primeiros 109 resíduos do parceiro de fusão da Lipoproteína D são incluídos no terminal N, para proporcionar o antigénio candidato a vacina com epitopos adicionais exógenos de células T e aumentar o nível de expressão em *E. coli* (actuando, assim, também, como um estimulador de expressão). A cauda de lípido assegura uma apresentação óptima do antigénio às células apresentadoras de antigénio.

Os parceiros de fusão imunológicos mencionados acima são também vantajosos no auxílio da expressão. Em particular, estas fusões são expressas com rendimentos superiores aos das proteínas MAGE nativas recombinantes. Estas construções são divulgadas no documento W099/40188.

Os oligonucleótidos preferidos para utilização em adjuvantes ou vacinas da presente invenção contêm, de um modo preferido, dois ou mais motivos de dinucleótido CpG separados por, pelo menos, três, de um modo mais preferido, pelo menos, seis ou mais nucleótidos. Os oligonucleótidos da presente invenção são, tipicamente, desoxinucleótidos. Numa forma de realização preferida, o internucleótido no oligonucleótido é fosforoditioato ou, de um modo mais preferido, uma ligação fosforotioato, embora a ligação internucleótido fosfodiéster e outras estejam no âmbito da invenção, incluindo oligonucleótidos com ligações internucleótido mistas. Os métodos para produzir oligonucleótidos fosforotioato ou fosforoditioato são descritos nos documentos US 5666153, US 5278302 e W095/26204.

Os exemplos de oligonucleótidos preferidos possuem as sequências que se seguem. As sequências contêm, de um modo preferido, ligações internucleótido modificadas com fosforotioato. OLIGO 1 (SEQ ID N°: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) OLIGO 2 (SEQ ID N°: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) OLIGO 3 (SEQ ID N°: 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG OLIGO 4 (SEQ ID N°: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) OLIGO 5 (SEQ ID N°: 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668).

Os oligonucleótidos CpG alternativos podem compreender as sequências preferidas acima na medida em que estas possuem deleções ou adições inconsequentes.

Os oligonucleótidos CpG utilizados na presente invenção podem ser sintetizados por qualquer método conhecido na técnica (e. g., documento EP 468520). Convenientemente, estes oligonucleótidos podem ser sintetizados utilizando um sintetizador automático. Estes têm, tipicamente, entre 10-50 bases de comprimento.

Os oligonucleótidos utilizados na presente invenção são tipicamente desoxinucleótidos. Numa forma de realização preferida o internucleótido ligado ao oligonucleótido é fosforoditioato ou, de um modo mais preferido, ligação fosforotioato, embora os fosfodiésteres estejam no âmbito da presente invenção. São contemplados os oligonucleótidos compreendendo diferentes ligações internucleótido, e. g., fosfodiésteres e fosforotioato misturados. Podem ser utilizadas outras ligações internucleótido que estabilizam o oligonucleótido.

As saponinas que podem ser utilizadas nas combinações de adjuvante da presente invenção incluem as derivadas da casca de Quillaja Saponaria Molina, denominada Quil A e suas fracções, descritas no documento US 5057540 e "Saponinas como adjuvantes de vacina", Kensil, C.R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55; e documento EP 0362279 B1. São particularmente preferidas as fracções de Quil A QS21, QS7 e QS17.

A β -escina é outra saponina hemolítica preferida para utilização nas composições de adjuvante da presente invenção. A escina é descrita no Merck Index (12^a ed: entrada 3737) como uma mistura de saponinas que ocorre na semente do castanheiro da Índia, Lat: *Aesculus hippocastanum*. O seu isolamento é descrito por cromatografia e purificação (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.*

4, 213 (1953)) e por resinas de troca iónica (Erbring *et al.*, documento US 3238190). As fracções de escina, □ e □, foram purificadas e mostraram ser biologicamente activas (Yoshikawa M, *et al.*, (*Chem Pharm Bull* (Tóquio) 1996 Ago.; 44 (8): 1454-1464)). A β-escina é também conhecida como aescina.

Outra saponina hemolítica preferida para utilização nas da presente invenção é a Digitonina. A digitonina é descrita no Merck index (12^a Edição, entrada 3204) como uma saponina, sendo derivada de sementes de *Digitalis purpurea* e purificada de acordo com o processo descrito Gisvold *et al*, *J. Am. Pharm Assoc.*, 1934, 23, 664; e Ruhenstroth-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621. A sua utilização é descrita como sendo um reagente clínico para a determinação de colesterol.

As combinações de adjuvante da presente invenção podem ainda compreender um veículo, tal como a saponina ou CpG, ou lipopolissacárido podem ser associados com uma entidade veículo particulada para aumentar a capacidade de adjuvante da combinação. As vacinas sistémicas particularmente preferidas compreendem, por exemplo, uma molécula veículo.

O CpG utilizado nas combinações de adjuvante da presente invenção pode estar livre em solução ou pode estar complexado com veículos particulados, tais como sais minerais (por exemplo, mas não se restringindo a sais de alumínio ou cálcio), lipossomas, ISCOM, emulsões (óleo-em-água, água-em-óleo, água-em-óleo-em-água), polímeros (tais como, mas não se restringindo a poliláctico, poliglicólico, polifosfazina, poliaminoácido, alginato, quitosano) ou micropartículas. De um modo preferido, os referidos veículos são catiónicos. As vacinas da presente invenção compreendem, ainda, um antigénio que pode

ser associado com o veículo complexo CpG-veículo ou pode não ser associado com o complexo CpG-veículo. Neste caso, o antigénio pode ser a suspensão livre ou associada com um veículo separado.

As saponinas que fazem parte da composição da presente invenção podem ser separadas na forma de micelas ou podem estar na forma de grandes estruturas ordenadas, tal como ISCOM (documento EP 0109942 B1) ou lipossomas (documento WO 96/33739) quando formuladas com colesterol e lípido, ou na forma de uma emulsão óleo em água (documento WO 95/17210). As saponinas podem, de um modo preferido, estar associadas com um sal metálico, tal como hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio (documento WO 98/15287). Alternativamente, a saponina pode ser associada com um veículo particulado, tal como quitosano. A saponina pode também estar num estado seco, tal como um pó. As formulações finais de vacina na forma em que são administrados à superfície da mucosa são, de um modo preferido, hemolíticos por natureza. A saponina pode ou não estar associada fisicamente com o antigénio através de ligação directa ou por co-interacção com a mesma molécula de veículo particulado (documentos GB9822712.7; WO 98/16247).

O CpG e saponina e lipopolissacárido nos adjuvantes ou vacinas da presente invenção podem, por si só, estar separados ou associados. Por exemplo, o CpG e saponina podem estar livres numa suspensão ou podem ser associados através de um veículo, de um modo mais preferido, um veículo particulado, tal como hidróxido de alumínio ou através de lipossoma catiónico ou ISCOM.

Uma combinação de adjuvante preferida, de acordo com a presente invenção, é composta de um ou mais oligonucleótidos CpG

contendo, pelo menos 3, de um modo preferido, pelo menos, 6 nucleótidos entre dois motivos CG adjacentes, em conjunto com QS21 e um veículo particulado seleccionado do grupo compreendendo uma emulsão óleo-em-água ou DQ. É preferido que o lipopolissacárido seja um derivado de lípido di ou monofosforilo, de um modo preferido, 3 des-O-acilado, em particular, Monofosforil-lípido A 3 des-O-acilado.

A vacina preferida da presente invenção é utilizada para produzir respostas imunitárias sistémicas, após a administração a um indivíduo através de via sistémica.

As combinações de adjuvante da presente invenção podem compreender uma emulsão com base em óleo. Os adjuvantes em emulsão de óleo foram conhecidos durante muitos anos, incluindo trabalho em adjuvantes de Freund completos e incompletos em emulsão de óleo mineral. Uma vez que, nessa altura, foi efectuado muito trabalho para conceber alternativas estáveis e bem toleradas a estas formulações de adjuvante, potentes, mas reactogénicas.

Foram descritos muitos sistemas de emulsão simples ou em multi-fase. Os adjuvantes em emulsão de óleo em água foram, *per se*, sugeridos como úteis como composições de adjuvante (documento EP 0399843B), também combinações de emulsões óleo em água e outros agentes activos foram descritos como adjuvantes para vacinas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Foram descritos outros adjuvantes em emulsão de óleo, tal como emulsões água em óleo (documentos US 5422109; EP 0480982 B2) e água em emulsões óleo em água (documentos US 5424067; EP 0480981 B).

Os adjuvantes em emulsão de óleo para utilização na presente invenção podem ser naturais ou sintéticos e podem ser minerais ou orgânicos. Os exemplos de óleos minerais e orgânicos tornar-se-ão rapidamente óbvios para o especialista da técnica.

De modo a que qualquer composição óleo em água seja adequada para administração humana, a fase óleo do sistema de emulsão compreende, de um modo preferido, um óleo metabolizável. O significado do termo metabolizável é bem conhecido na técnica. Metabolizável pode ser definido como "sendo capaz de ser transformado pelo metabolismo" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W. B. Sanders Company, 25^a edição (1974)). O óleo podem ser qualquer óleo vegetal, óleo de peixe, óleo animal ou óleo sintético, que não é tóxico para o receptor e é capaz de ser transformado pelo metabolismo. As nozes (tal como óleo de amendoim), sementes, e grãos são fontes comuns de óleos vegetais. Os óleos sintéticos são também parte desta invenção e podem incluir óleos comercialmente disponíveis, tais como NEOBEE® e outros. O esqualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosa-hexaeno) é um óleo insaturado que é encontrado em grandes quantidades em óleo de fígado de tubarão e em pequenas quantidades em azeite, óleo de germe de milho, óleo de arroz óleo de bagos de arroz e leveduras, e é um óleo particularmente preferido para utilização nesta invenção. O esqualeno é um óleo metabolizável em virtude do facto de ser um intermediário na biossíntese de colesterol (Merck Index, 10^a Edição, entrada n° 8619).

As emulsões de óleo particularmente preferidas são emulsões óleo em água e, em particular, o esqualeno em emulsões em água.

Adicionalmente, os adjuvantes em emulsão de óleo mais preferidos da presente invenção compreendem um antioxidante, que é, de um modo preferido, o óleo α -tocoferol (vitamina E, documento EP 0382271 B1).

Os documentos WO 95/17210 e WO 99/11241 divulgam adjuvantes de emulsão com base em esqualeno, α -tocoferol e TWEEN 80, opcionalmente formulados com os imunoestimulantes QS21 e/ou 3D-MPL. O documento WO 99/12565 divulga uma melhoria destas emulsões de esqualeno com a adição de um esteroide na fase de óleo. Adicionalmente, pode ser adicionado um triglicérido, tal como tricaprilina (C27H50O6) à fase de óleo, de modo a estabilizar a emulsão (documento WO 98/56414).

O tamanho das gotas de óleo encontradas na emulsão óleo em água estável é, de um modo preferido, inferior a 1 micron, pode estar no intervalo de substancialmente 30-600 nm, de um modo preferido, substancialmente cerca de 30-500 nm de diâmetro e, de um modo muito preferido, substancialmente 150-500 nm de diâmetro e, em particular, cerca de 150 nm de diâmetro, como medido por espectroscopia de correlação de fótons. A este respeito, 80% das gotas de óleo, em número, devem estar nos intervalos preferidos, de um modo mais preferido, mais do que 90% e, de modo muito preferido, mais do que 95% das gotas de óleo, em número, estão nos intervalos de tamanho definidos. As quantidades dos componentes presentes nas emulsões de óleo da presente invenção estão, convencionalmente, no intervalo de 2 a 10% em óleo, tal como o esqualeno; e quando presente, de 2 a 10% de alfa-tocoferol; e de 0,3 a 3% de tensoactivo, tal como monooleato de sorbitano de polioxietileno. De um modo preferido, a proporção de óleo:alfa-tocoferol é igual ou inferior a 1, uma vez que proporciona uma emulsão mais estável. Span 85 pode

também estar presente a um nível de cerca de 1%. Em alguns casos, pode ser vantajoso que as vacinas da presente invenção contenham, adicionalmente, um estabilizante.

O método de produção de emulsões óleo em água é bem conhecido do especialista na técnica. Normalmente, o método compreende a mistura da fase óleo com um tensioactivo, tal como uma solução PBS/TWEEN80TM, seguida pela homogeneização utilizando um homogeneizador, será óbvio para um especialista na técnica que um método compreendendo passar a mistura duas vezes através de uma agulha de seringa será adequado para homogeneizar pequenos volumes de líquido. Do mesmo modo, o processo de emulsificação em microfluidizante (máquina microfluidos M110S, máximo de 50 passos, durante um período de 2 minutos, à pressão máxima de entrada de 6 bar (pressão de saída de cerca de 850 bar)) pode ser adaptado pelo especialista na técnica para produzir volumes de emulsão mais pequenos ou maiores. Esta adaptação pode ser conseguida por experiências de rotina compreendendo a medida da emulsão resultante até ser conseguida uma preparação com gotas de óleo com o diâmetro desejado.

As combinações de adjuvante da presente invenção podem ser utilizadas como adjuvante sistémico ou de mucosa. Numa forma particular da invenção é proporcionada uma vacina sistémica para ser administrada através das vias sistémica ou parentérica, tal como a administração intramuscular, intradérmica, transdérmica, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa. Uma via preferida de administração é através da via transdérmica, por exemplo, por pensos na pele.

As preparações de vacina sistémica da presente invenção podem ser utilizadas para proteger ou tratar um mamífero

susceptível ou a sofrer de doença, através da administração da referida vacina por administração intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intravenosa ou subcutânea. Os métodos de administração sistémica das preparações de vacina podem incluir seringas e agulhas convencionais ou dispositivos concebidos para distribuição balística de vacinas sólidas (documento WO 99/27961) ou dispositivos sem agulhas de pressão de jacto de líquido (documentos US 4596556; US 5993412) ou pensos transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037). A presente invenção também pode se utilizada para aumentar a imunogenicidade de antigénios aplicados na pele (administração transdérmica ou transcutânea, documentos WO 98/20734; WO 98/28037. É divulgado um dispositivo de distribuição para administração sistémica, pré-carregado com as composições de vacina da presente invenção.

Alternativamente, as preparações de vacina da presente invenção podem ser utilizadas para proteger ou tratar um mamífero susceptível a, ou a sofrer de doença, através da administração da referida vacina através de uma via mucosa, tal como a via oral/alimentar ou nasal. As vias de mucosa alternativas são intravaginal e intra-rectal. A via de administração em mucosa preferida é a via nasal, denominada vacinação intranasal. Os métodos de vacinação intranasal são bem conhecidos na técnica, incluindo a administração de uma forma de vacina em gota, spray ou pó seco na nasofaringe do indivíduo a ser imunizado. As formulações de vacina nebulizada ou em aerossol também fazem parte desta invenção. As formulações entéricas, tais como cápsulas e grânulos gastro-resistentes para administração oral, supositórios para administração rectal ou vaginal também fazem parte desta invenção.

As combinações de adjuvante representam uma classe de adjuvantes de mucosa adequadas para aplicação em humanos para substituir a vacinação sistêmica por vacinação em mucosa. Numa forma preferida da presente invenção, saponinas puras, tais como Quil A ou seus derivados, incluindo as saponinas QS21; Escina; Digitonin; ou *Gypsophila* ou *Chenopodium quinoa* em combinação com oligonucleótidos imunoestimuladores e um lipopolissacárido, como definido na reivindicação 1, podem ser utilizadas como adjuvantes para a administração de antigénios na mucosa para conseguir uma resposta imunitária sistêmica.

As combinações de adjuvante da presente invenção são utilizadas na formulação de vacinas, vacinas essas que podem ser administradas através da via sistêmica ou de mucosa. De um modo preferido, quando as vacinas são utilizadas para administração em mucosa, a combinação de adjuvante compreende uma saponina hemolítica.

Para administração em mucosa, de um modo preferido, a composição da invenção compreende uma saponina hemolítica. A saponina hemolítica ou preparação de saponina, no âmbito desta invenção, é para ser determinada com referência ao seguinte ensaio.

1. Sangue fresco de cobaios é lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS), 3 vezes, numa centrífuga de bancada. Após ressuspensão no volume original o sangue é posteriormente diluído 10 vezes em PBS.
2. 50 µL desta suspensão de sangue são adicionados a 800 µL de PBS contendo diluições de duas vezes de tensioactivo ou saponina.

3. Após 8 horas a hemólise é avaliada visualmente ou através da medida da densidade óptica do sobrenadante. A presença de um sobrenadante vermelho que absorve luz a 570 nm indica a presença de hemólise.
4. Os resultados são expressos como a concentração da primeira diluição de saponina até que não ocorra mais hemólise.

Para os propósitos desta invenção, a preparação de adjuvante de saponina é hemolítica se lisar os eritrócitos a uma concentração inferior a 0,1%. Como meio de referência, amostras substancialmente puras de QuilA, QS21, QS7, Digitonina e β -escina são todas saponinas hemolíticas como definido neste ensaio. Na variabilidade experimental inerente de tal ensaio biológico, as saponinas da presente invenção têm, de um modo preferido, uma actividade hemolítica de, aproximadamente, entre 0,5-0,00001%, de um modo mais preferido, entre 0,05-0,00001%, de um modo ainda mais preferido, entre 0,005-0,00001% e de um modo muito preferido, entre 0,001-0,0004%. Idealmente, as referidas saponinas devem ter uma actividade hemolítica semelhante (*i. e.*, numa diferença de dez vezes) à de QS21.

As vacinas da presente invenção podem também ser administradas através da via oral. Nestes casos, o excipiente farmacologicamente aceitável pode, também, incluir tampões alcalinos, ou cápsulas ou microgrânulos entéricos. As vacinas da presente invenção podem também ser administradas pela via vaginal. Nestes casos, os excipientes farmacologicamente aceitáveis podem, também, incluir emulsificantes, polímeros, tal como CARBOPOL[®] e outros estabilizantes conhecidos de cremes vaginais e supositórios. As vacinas da presente invenção podem

também ser administradas pela via rectal. Nestes casos, os excipientes podem, também, incluir ceras e polímeros conhecidos na técnica para formar supositórios rectais.

As preparações com mais do que uma saponina nas combinações de adjuvante da presente invenção também fazem parte da presente invenção. Por exemplo, as combinações de, pelo menos, dois do grupo que se segue, compreendendo QS21, QS7, Quil A, β -escina, ou digitonina. Adicionalmente, as composições da presente invenção podem compreender combinações de mais do que um oligonucleótido imunoestimulador.

Alternativamente, as formulações podem ser combinadas com veículos de vacina compostos de quitosano ou outros polímeros policatiónicos, partículas polilactídeo e polilactídeo-co-glicolido, matriz de polímero com base em poli-N-acetilglucosamina, partículas compostas de polissacáridos ou polissacáridos quimicamente modificados, lipossomas e partículas baseadas em lípido, partículas compostas de monoésteres de glicerol, etc. As saponinas podem também ser formuladas na presença de colesterol para formar estruturas particuladas, tais como lipossomas ou ISCOM. Além disso, as saponinas podem ser formuladas em conjunto com um éter ou éster de polioxietileno, numa solução ou suspensão não particulada, ou numa estrutura particulada, tal como um lipossoma paucilamelar ou ISCOM. As saponinas podem, também, ser formuladas com excipientes tais como Carbopol^R para aumentar a viscosidade ou podem ser formuladas numa forma de pó seco com um excipiente em pó, tal como lactose.

Os adjuvantes particularmente preferidos são combinações de 3D-MPL e QS21 (documento EP 0671948B1), emulsões óleo em água

compreendendo 3D-MPL e QS21 (documentos WO 95/17210, WO 98/56414) ou 3D-MPL formulados com outros veículos (documento EP 0689454 B1) em combinação com os oligonucleótidos CpG como aqui descrito. A quantidade de CpG ou oligonucleótidos imunoestimuladores nos adjuvantes ou vacinas da presente invenção é geralmente pequena, mas dependente da formulação de vacina, pode estar na região de 1-1000 µg por dose, de um modo preferido, 1-500 µg por dose e, de um modo mais preferido, entre 1 a 100 µg por dose.

A quantidade de saponina para utilização nos adjuvantes da presente invenção pode estar na região de 1-1000 µg por dose, de um modo preferido, 1-500 µg por dose, de um modo mais preferido, 1-250 µg por dose e, de um modo muito preferido, entre 1 a 100 µg por dose. A proporção CpG:saponina (p/p) estará, deste modo, no intervalo de 1:1000 a 1000:1 e estará, tipicamente, no intervalo de 1:100 a 100:1 e, de um modo preferido, no intervalo de 1:10 a 1:1 ou 1:1 a 10:1 e, de um modo muito preferido, 1:1, 4:1 ou 10:1.

As formulações da presente invenção podem ser utilizadas para propósitos profiláticos e terapêuticos. Consequentemente, é proporcionada a utilização de uma combinação de uma saponina, um lipopolissacárido e uma molécula CpG em conjunto com um antigénio de cancro, na preparação de uma vacina para a profilaxia e tratamento de cancro, em particular, carcinomas da mama e da próstata. Consequentemente, a presente invenção proporciona um método de tratamento de um mamífero susceptível a ou sofrendo de uma doença infecciosa ou cancro, ou alergia ou doença autoimunitária. Num aspecto adicional da presente invenção, é proporcionada uma combinação de vacina ou adjuvante, compreendendo um lipopolissacárido, uma saponina e CpG, como

aqui descrito para utilização como um medicamento. A preparação de vacinas é geralmente descrita em *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.A., 1978.

É divulgado um método para prevenir que um indivíduo contraia uma doença seleccionada do grupo compreendendo os cancros da próstata, mama, colorrectal, pulmão, pancreático, renal, ovário ou melanoma; compreendendo a administração de uma composição como substancialmente aqui descrito através da via sistémica do referido indivíduo.

Os exemplos de excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados para utilização nas combinações da presente invenção incluem água, solução salina tamponada com fosfato, soluções tampão isotónicas.

Os exemplos que se seguem ilustram a invenção, mas estão fora do âmbito das reivindicações.

Exemplo 1:

- O ECD-PD foi produzido em células CHO, de acordo com os métodos do documento WO 00/44899. As formulações foram testadas em murganhos e coelhos.
- As formulações foram comparadas contra vários controlos.

SBAS1+SBAS7:

ECD-PD formulado com o oligonucleótido CpG 2006 3D-MPL, QS21 em lipossomas.

Formulação SBAS1

Compreendendo QS21 em lipossomas e 3D-MPL associados com os lipossomas foram preparados de acordo com os processos do documento EP 0822831.

Formulação SBAS1+SBAS7

Para a formulação acima o oligonucleótido CpG 2006 foi adicionado. O antigénio foi misturado com a formulação de adjuvante antes da utilização.

Formulações com base em SBAS7+SBAS2 (murganhos)

Para uma dose de 50 µL de vacina, a proteína ECD-PD (25 µg) foi diluída em PBS 10 vezes concentrado pH 6,8 e H₂O antes da adição consecutiva de uma emulsão óleo em água compreendendo SB62: que é preparada por e compreende 5% de esqualeno, 5% de tocoferol, 2,0% de tween 80; o tamanho de partícula foi de 180 nm.

Preparação de emulsão SB62 (2 vezes concentrada)

Tween 80 é dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) para produzir uma solução a 2% em PBS. Para proporcionar 100 mL de emulsão duas vezes concentrada, 5 g de DL alfa-tocoferol e 5 mL de esqualeno são levados ao vórtice para misturar intensamente. São adicionados 90 mL de solução PBS/Tween e mistura-se intensamente. A emulsão resultante é, então, passada através de uma seringa e, finalmente, microfluidizada utilizando uma máquina de M10S microfluidio. As gotas de óleo resultantes possuem um tamanho de, aproximadamente, 180 nm, 3D-MPL (10 µg), QS21 (10 µg). 50 µg de CpG ODN 2006 foram, então, adicionados, seguidos pela adição, 30 minutos mais tarde, de 50 µg/mL de tiomersal, como conservante. Todas as incubações foram efectuadas à temperatura ambiente com agitação.

As formulações SBAS 2 foram preparadas como acima, mas sem a adição do oligonucleótido CpG.

SBAS7 é o oligonucleótido CpG 2006.

Formulações com base em SBAS7+SBAS2 (Coelho)

Para uma dose de 500 µL de vacina, a proteína ECD-PD (100 µg) foi diluída em PBS 10 vezes concentrado a pH 6,8 e H₂O antes da adição consecutiva de SB62 250 µL, 3D-MPL (100 µg), QS21 (100 µg) e 500 µg de CpG ODN 2006 seguidos pela adição, 30 minutos mais tarde, pela adição de 50 µg/mL de tiomersal como conservante. Todas as incubações foram efectuadas à temperatura ambiente com agitação.

Exemplo 2: Experiências de exposição de tumor

Grupos de murganhos F1 (C57 x Balbc) (8 murganhos/grupo) foram injectados com 1/10 da dose humana de antigénio (25 µg) nos dias 0-14-28-42 e desafiados no dia 56 com células TC1 que expressam Her2 próximo de 2 x 10e6 células TC1 Her2/animal administradas subcutaneamente.

As células TC1 para ½ dos baços animais foram recolhidas ao dia 56 e os animais foram sangrados.

Como apresentado na figura 1, a adição de um oligonucleótido CpG para uma formulação 3D-MPL/QS21 aumenta sinergeticamente a regressão de tumor e apenas estas formulações apresentaram regressão completa de tumores nos murganhos.

Exemplo 3: Imunogenicidade de ECD-PD em diferentes adjuvantes em coelhos

6 grupos de 4 coelhos foram imunizados nos dias 0, 21 e 42, respectivamente, com 100 µg de ECD-PD em AS02, AS01, AS05, AS06 (CpG 2006 absorvido em alúmen), AS07 e AS02B+AS07.

A serologia foi analisada 14 dias pós III e a tabela 1 mostra que as formulações da presente invenção foram superiores a outras formulações testadas no aumento de respostas com um elevado título de anticorpos.

Tabela 1

	pré	14 pós III
AS02B	50	96923
AS01B	173	196637
AS5	144	76221
AS6	142	74180
AS07A	480	3904
AS02B+AS07A	94	362713

Exemplo 4: Imunogenicidade de Her 2 neu, ECD-PD em macacos Rhesus adultos

Os macacos Rhesus adultos foram imunizados com ECD-PD em várias formulações de adjuvante:

- AS02 B - QS21,3DMPL, em emulsão óleo água
- AS01 - QS21 3D-MPL em lipossomas
- AS05 - QS21 em lipossomas
- AS06 - CpG 2006 alum
- AS07 - CpG 2006
- AS02B+AS07 - ver exemplo 1 para detalhes.

A vacinação estimulou uma resposta elevada de anticorpos nas formulações da presente invenção (AS)2 + AS07). Ver figura 1.

A análise posterior mostrou que a resposta de anticorpos era policlonal e demonstrou uma actividade inibidora no crescimento *in vitro* de uma linha celular humana de cancro da mama (SKBR3) que sobre-expressam a molécula Her 2 neu.

Herceptina, um anticorpo monoclonal para o tratamento de tumores que expressam Her 2 neu é capaz de inibir o crescimento desta linha celular.

Verificou-se, assim, que os anticorpos produzidos após vacinação activa com a formulação eram funcionais.

Exemplo 5: Imunização de murganhos com o antigénio ECD-PD

Esta experiência foi concebida para investigar um intervalo de formulações de adjuvante com o antigénio que é uma fusão do domínio extracelular de Her 2 neu ligado ao domínio de fosforilação (ECD-PD), que foi produzido em células CHO de acordo com os métodos do documento WO 00/44899.

Grupo	Antigénio(25 µg)	Adjuvante
1	ECD-PD	nenhum (Solução Salina Tamponado com Fosfato (PBS))
2	ECD-PD	Lipossomas com QS21 e 3D-MPL na membrana
3	ECD-PD	tocol contendo emulsão óleo em água com QS21 e 3D-MPL
4	ECD-PD	CpG
5	ECD-PD	Lipossomas com QS21 e 3D-MPL na membrana + CpG
6	ECD-PD	tocol contendo emulsão óleo em água com QS21 e 3D-MPL + CpG
7	ECD-PD	3D-MPL + CpG
8	ECD-PD	QS21 + CpG
9	ECD-PD	tocol contendo emulsão óleo em água + CpG

(continuação)

Grupo	Antigénio(25 µg)	Adjuvante
10	ECD-PD	Lipossomas com QS21 na membrana + CpG
11	ECD-PD	Lipossomas com 3D-MPL na membrana + CpG

O tocol contendo emulsões óleo em água utilizado nos grupos acima utilizaram grupos D, L-tocoferol (CAS N° 10191-41-0; nome químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-cromanol)); que está comercialmente disponível da ROCHE™. Se presente, o tocol estava presente numa emulsão óleo em água compreendendo 2,5% em volume, em combinação com esqualeno a 2,5% em volume. Ambos os óleos foram misturados, e foi adicionado monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80™), antes da microfluidização (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 passos, por um período de 2 minutos, a uma pressão máxima de entrada de 6 bar (pressão de saída de cerca de 850 bar) como descrito no documento WO 95/17210). Consequentemente, os grupos 3, 6 e 9 foram baseados na emulsão de tocol acima com a adição de QS21,3D-MPL ou CpG aquoso.

QS21 e 3D-MPL, se presentes em qualquer dos grupos de vacina, acima foram incluídos a 5 µg/dose; foi adicionado CpG (OLIGO 4 (SEQ ID N°:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) a dose de 50 µg.

Os adjuvantes como utilizados para o grupo 2, 5, 10 foram preparados de acordo com técnicas, como descrito no documento EP 0822831 B1 (cujos conteúdos são aqui incorporados por referência). O Grupo 11 compreendeu 3D-MPL na membrana de um lipossoma. Resumidamente, a 3D-MPL, dioleoil fosfatidilcolina e colesterol foram misturados em conjunto e microfluidizados em

lipossomas unilamelares (como descrito no documento EP 0822831 B1- com a omissão de QS21).

Os adjuvantes utilizados nos grupos 4, 7 e 8 foram em suspensão aquosa ou solução.

Processo de vacinação

Grupos de murganhos B6F1 foram vacinados em quatro ocasiões (em volumes de 50 µL), intramuscularmente, a 14 dias de distância. 14 dias após a 4ª dose de vacina, os murganhos foram desafiados subcutaneamente com células tumorais 2X10⁶ TC1 que expressam o Her 2 neu.

As linhas das células tumorais de Her 2 neu-TC1 foram produzidas por transdução de células TC1 por vectores retrovirais codificando para Her 2 neu. Após um período de selecção com blastocidina, foram isolados e rastreados clones resistentes por FACS para expressão de Her 2 neu. O clone com a expressão mais elevada de Her 2 neu foi seleccionado e uma dose de desafio de 2X10⁶ foi identificada como possuindo uma Cinética de crescimento semelhante como as células de TC1 selvagens e para dar origem a um tumor em desenvolvimento em 100% dos animais de controlo.

O tamanho dos tumores individuais foi medido duas vezes por semana e expressos como uma média do grupo.

Resultados

A Figura 3 apresenta os resultados do crescimento do tumor

para os grupos 1, 2, 4, 5 e 6. A Figura 4 apresenta os resultados do crescimento do tumor para os grupos 1, 5, 6, 7 e 11. A Figura 5 apresenta os resultados do crescimento do tumor para os grupos 1, 5, 6, 8, 9 e 10. As únicas vacinas que induziram uma regressão completa do tumor foram vacinas contendo ambos, o oligonucleótido imunoestimulador e uma saponina.

As Figuras 6 e 7 apresentam a linfoproliferação de esplenócitos *in vitro* após incubação com os 5 µg/mL de imunogénio (ECD-PD) ou domínio extracelular (ECD) ou domínio intracelular (ICD) ou Her 2 neu.

As Figuras 8 e 9 apresentam a resposta imunitária humoral para o imunogénio (ECD-PD) em termos de Ig total como medido por ELISA (FIG. 8) ou distribuição do isotipo IgG nestas respostas (FIG. 9).

Conclusão:

Após 3 injeções, a indução por anticorpo é

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

Conclusão geral

O adjuvante testado (AS1, AS2, AS7) tem efeito semelhante. Contudo, a combinação de AS1 e AS7 ou AS2 e AS7 são adjuvantes mais eficazes.

A CMI é claramente apresentada após 4 vacinações em animais

que receberam o adjuvante combinado na molécula total de ECD-PD, mas, também, em cada parte separadamente (ECD e ICD). As formulações da presente invenção são muito eficazes na indução da regressão do tumor.

Exemplo 6: Imunização de murganhos com antígeno P703P

Esta experiência foi concebida para investigar uma gama de formulações de adjuvante com o antígeno que é uma fusão do antígeno Prostase (Ferguson, *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 3114-3119)) e o fragmento N-terminal 1-81 de NS1 do vírus Influenza (P703P-NS1).

Grupo	Antígeno (25 µg)	Adjuvante
1	P703P-NS1	nenhum (Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS))
2	P703P-NS1	CpG
3	P703P-NS1	Lipossomas com QS21 na membrana + CpG
4	P703P-NS1	Lipossomas com QS21 e 3D-MPL na membrana + CpG
5	P703P-NS1	tocol contendo emulsão óleo em água com QS21 e 3D-MPL + CpG
6	P703P-NS1	tocol contendo emulsão óleo em água + CpG

O tocol contendo emulsões óleo em água utilizado nos grupos acima utilizaram D,L, α -tocoferol (CAS N° 10191-41-0; nome químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-cromanol)); que está comercialmente

disponível da ROCHE™. Se presente, o tocol estava presente numa emulsão óleo em água compreendendo 2,5% em volume, em combinação com esqualeno a 2,5% em volume. Ambos os óleos foram misturados, e foi adicionado monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80™), antes da microfluidização (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 passos, por um período de 2 minutos, a pressão máxima de entrada de 6 bar (pressão de saída de cerca de 850 bar) como descrito no documento WO 95/17210). Consequentemente, os grupos 5 e 6 foram baseados na emulsão de tocol acima com a adição de QS21, 3D-MPL e/ou CpG aquoso.

QS21 e 3D-MPL se presente em qualquer dos grupos de vacina acima foram incluídos a 5 µg/dose; CpG (OLIGO 4 (SEQ ID N°: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) foi adicionado a 5 µg por dose.

Os adjuvantes, como utilizados para o grupo 3 e 4, foram preparados de acordo com técnicas como descrito no documento EP 0822831 B1.

Processo de vacinação

Grupos de murganhos B6F1 foram vacinados em quatro ocasiões (em volumes de 50 µL), intramuscularmente, com 14 dias de distância.

Resultados

As Figuras 10 e 11 apresentam a linfoproliferação *in vitro* de esplenócitos após a segunda e 14 dias após a quarta vacinação, após incubação *in vitro* com os 3 µg/mL de imunogénio

(NS1-P703P) ou P703P expresso em *Pichia* (15 µg/mL) ou uma proteína de fusão não-específica NS1-OspA.

As Figuras 12 e 13 apresentam a resposta imunitária humoral contra o imunogénio (NS1-P703P) em termos de Ig total como medido por ELISA de título de ponto médio (FIG. 10) ou distribuição de isotipo de IgG nestas respostas (FIG. 11).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> GlaxoSmithKline Biologicals sa

<120> vacinas

<130> B45245

<140> PCT/EP01/11984

<141> 2001-10-16

<150> GB0025573.7

<151> 2000-10-18

<150> GB0025574.5

<151> 2000-10-18

<150> US09/690,921

<151> 2000-10-18

<160> 5

<170> FatstSEQ para Windows versão 4.0

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> "Sequência Artificial"

<400> 1
tccatgacgt tcctgacggt 20

<210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> "Sequência Artificial"

<400> 2
tctcccagcg tgcgcat 18

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> "Sequência Artificial"

<400> 3
accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> "Sequência Artificial"

<400> 4
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> "Sequência Artificial"

<400> 5

tccatgacgt tcctgatgct 20

Lisboa, 16 de Fevereiro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogénica compreendendo

i) um antigénio MAGE ligado a um parceiro de fusão heterólogo, derivado da proteína D, em que o parceiro de fusão compreende, aproximadamente, o primeiro 1/3 da sequência proteína D ou, aproximadamente, os primeiros 100-110 aminoácidos N-terminais da sequência da proteína D;

(ii) uma composição de adjuvante compreendendo uma saponina, em conjunto com um oligonucleótido imunoestimulador; e

(iii) um lipopolissacárido seleccionado do grupo de

i Monofosforil-lípido A

ii Monofosforil-lípido A 3-O-desacilado

iii Difosforil-lípido A.

2. Composição como reivindicado na reivindicação 1, em que a saponina é QS21.

3. Composição imunogénica como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 ou 2, em que o oligonucleótido imunoestimulador contém, pelo menos, dois motivos CpG.

4. Composição imunogénica como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o oligonucleótido imunoestimulador é seleccionado do grupo:

SEQ ID N° 1 - TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
SEQ ID N° 2 - TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
SEQ ID N° 3 - ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
SEQ ID N° 4 - TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
SEQ ID N° 5 - TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

5. Composição como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 4, em que a saponina é formulada para formar ISCOMS ou lipossomas.
6. Composição como reivindicado em qualquer das reivindicações 1 a 5, em que a saponina está presente numa emulsão óleo em água.
7. Utilização de uma combinação de uma saponina, um oligonucleótido imunoestimulador, um lipopolissacárido seleccionado do grupo de (i) Monofosforil-Lípido A; (ii) Monofosforil-Lípido A 3-O-Desacilado; e (iii) Disfosforil-Lípido A e um antigénio MAGE ligado ao parceiro de fusão heterólogo derivado da proteína D, em que o parceiro de fusão compreende, aproximadamente, o primeiro 1/3 da sequência da proteína D ou, aproximadamente, os primeiros 100-110 aminoácidos N-terminais da sequência da proteína D na preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de tumores.

Lisboa, 16 de Fevereiro de 2012

FIGURA 1

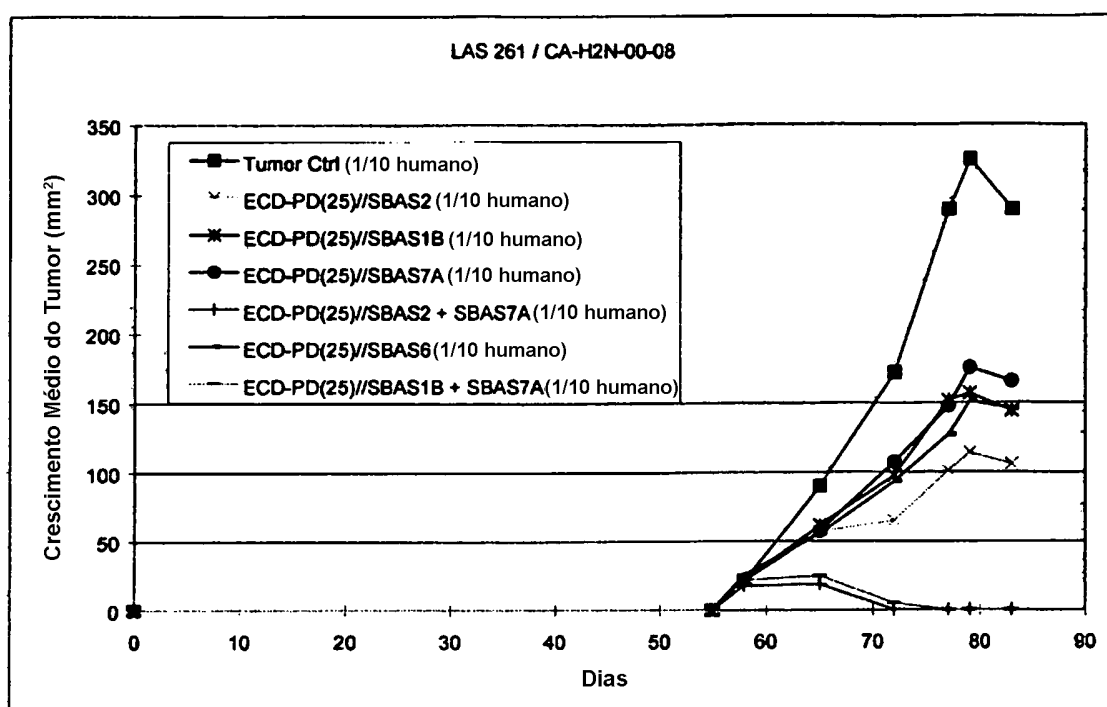


FIGURA 2

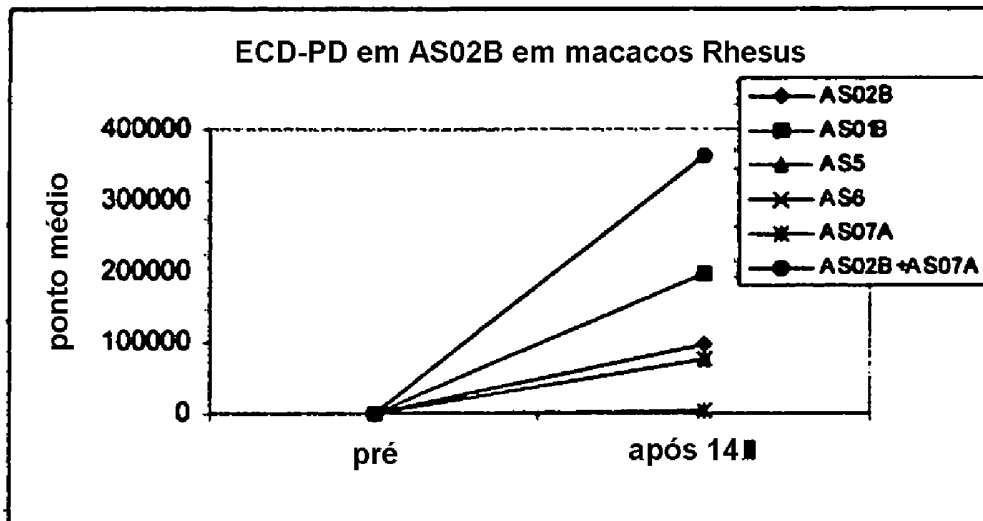


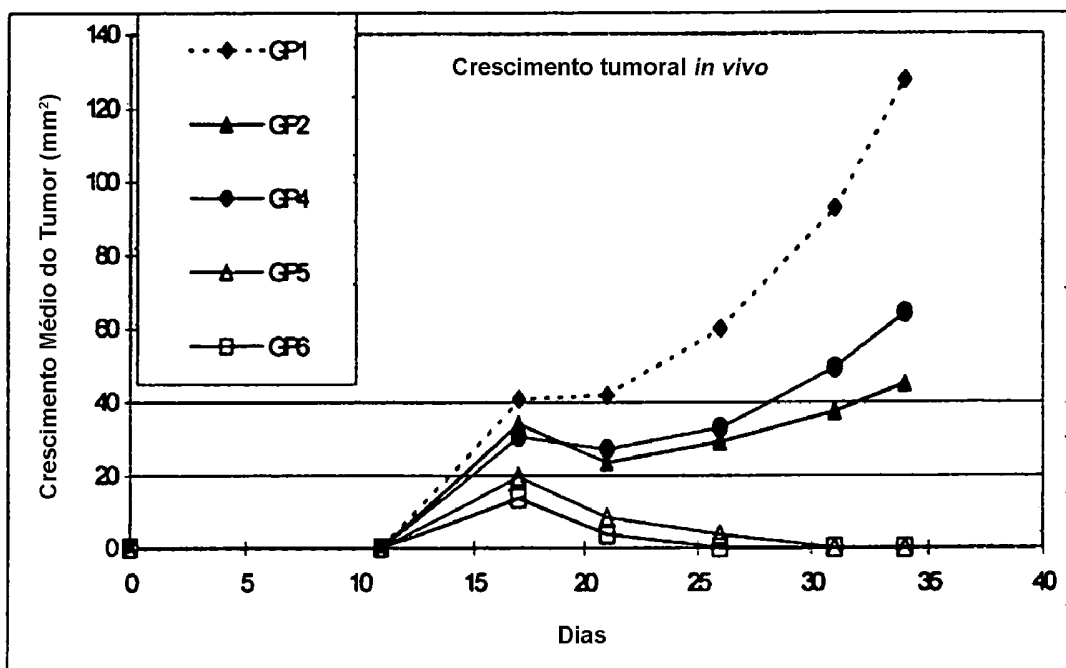
FIGURA 3 - Crescimento tumoral *in vivo* após vacinação

FIGURA 4

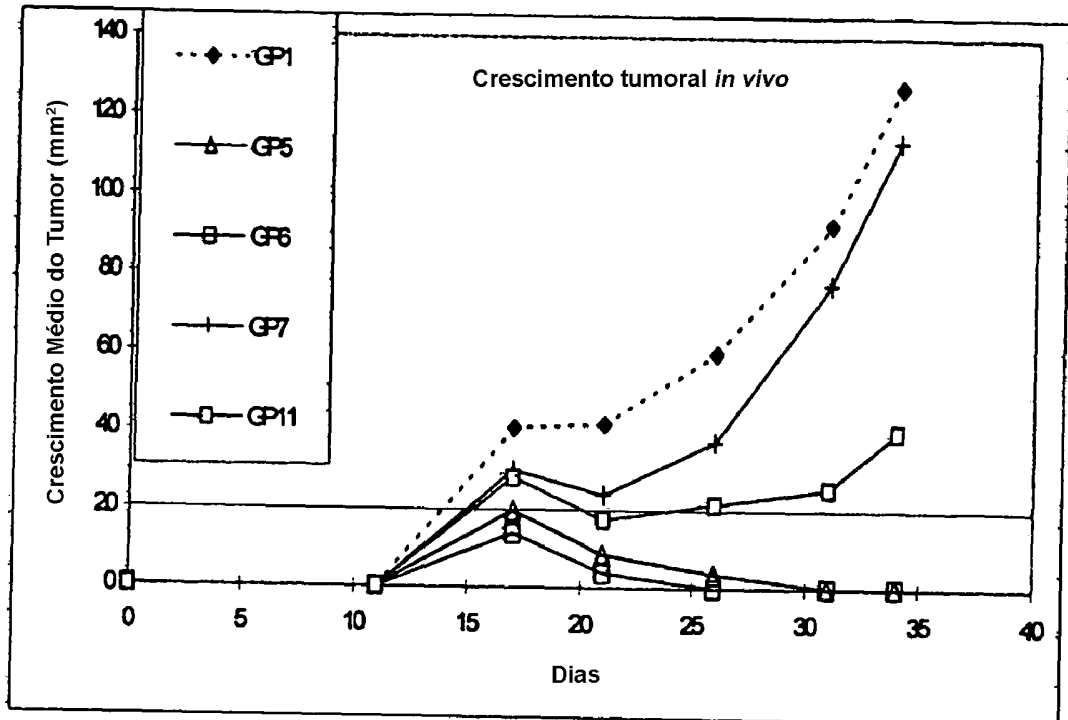


FIGURA 5

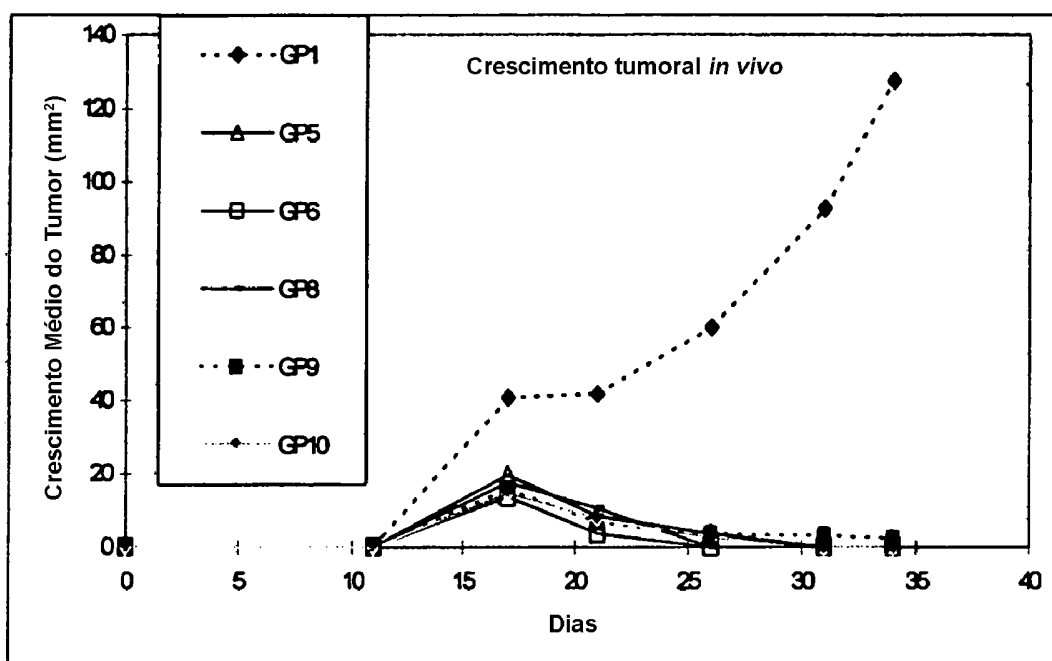


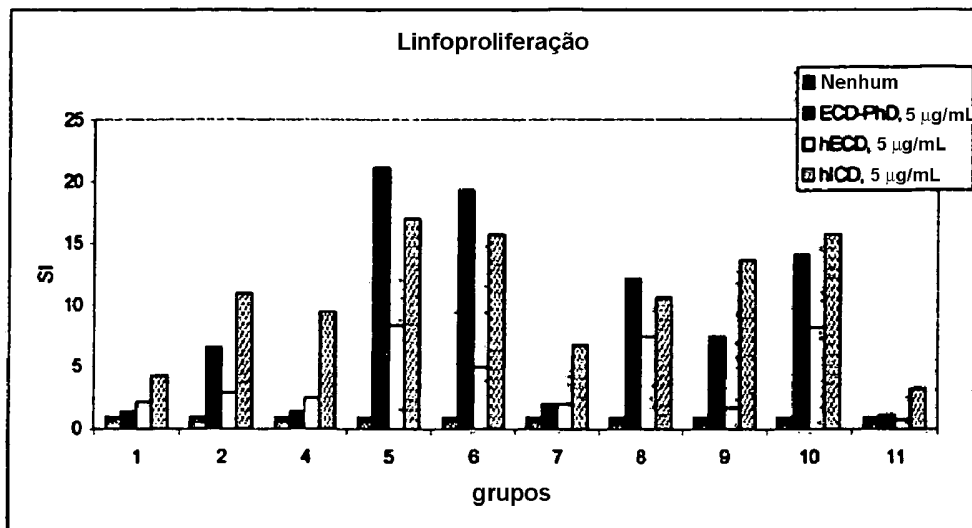
FIGURA 6 - Linfoproliferação (após vacinação, desafio pré-tumoral)

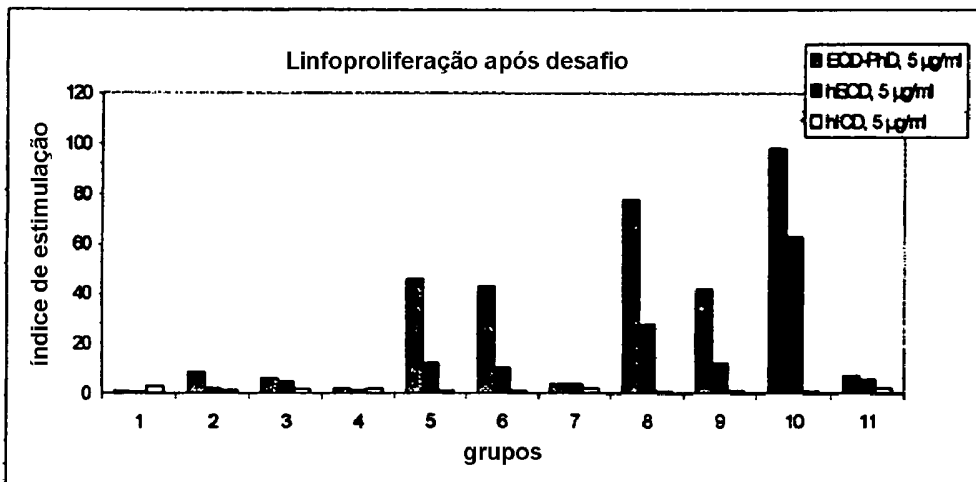
FIGURA 7- Linfoproliferação (após desafio tumoral)

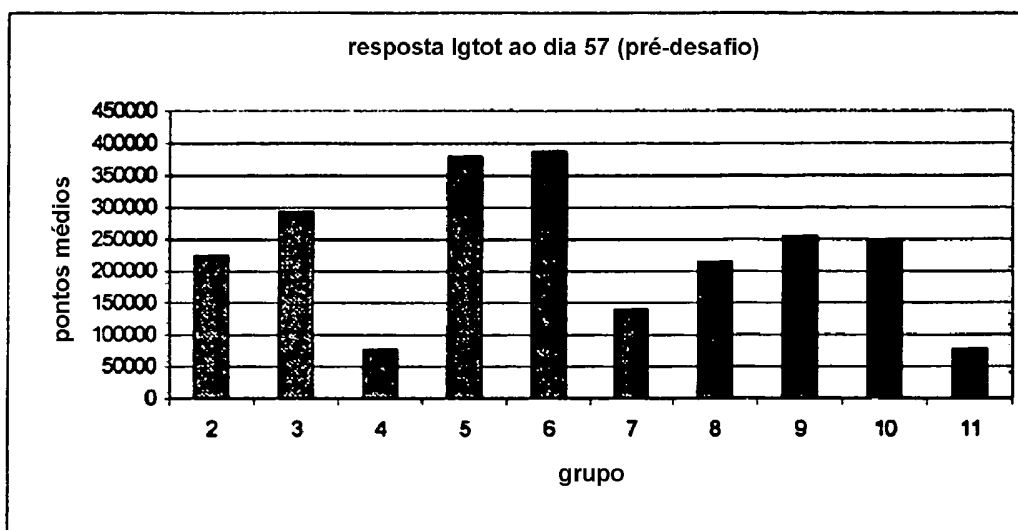
FIGURA 8 - Resposta anti-ECD Ig total após vacinação

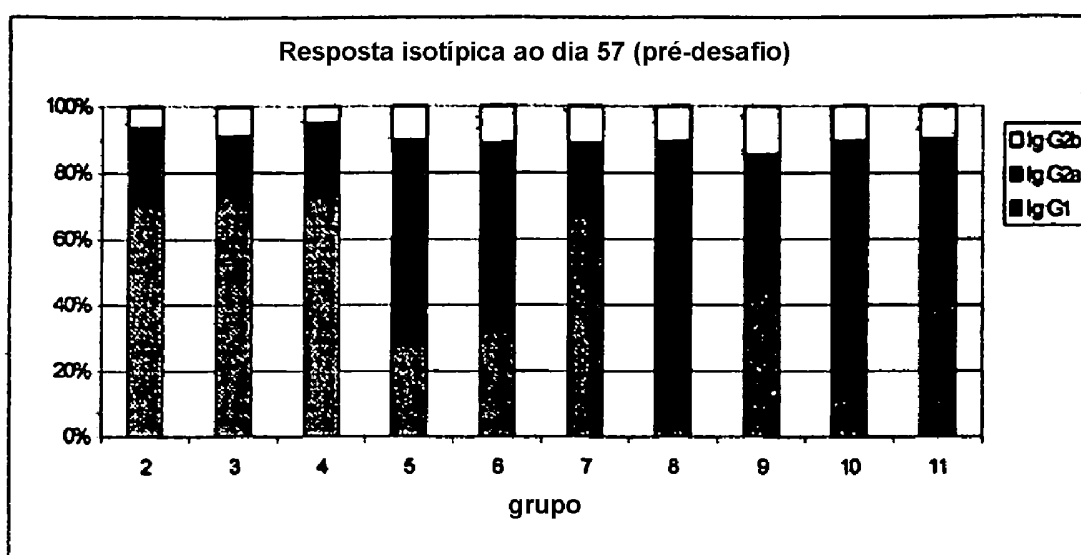
FIGURA 9 - Distribuição isotípica induzida por vacinas

FIGURA 10 - Linfoproliferação após a segunda vacinação com P703

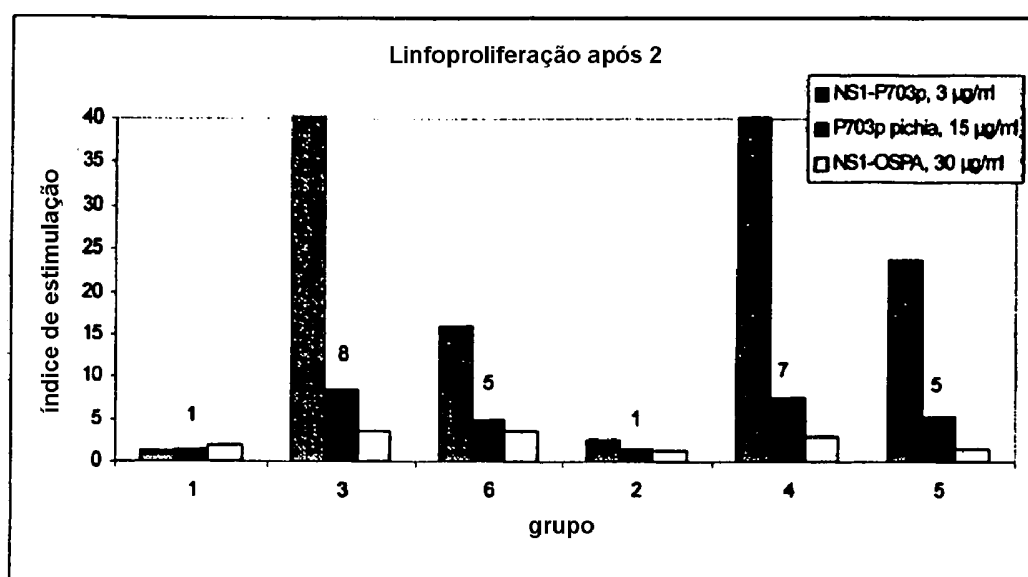


FIGURA 11 - Linfoproliferação após a quarta vacinação com P703

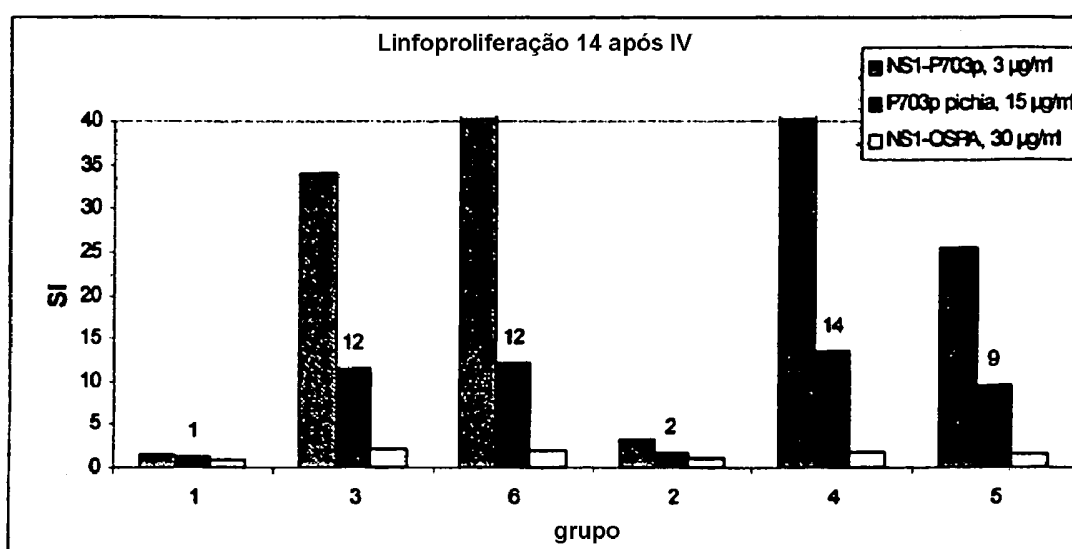


FIGURA 12

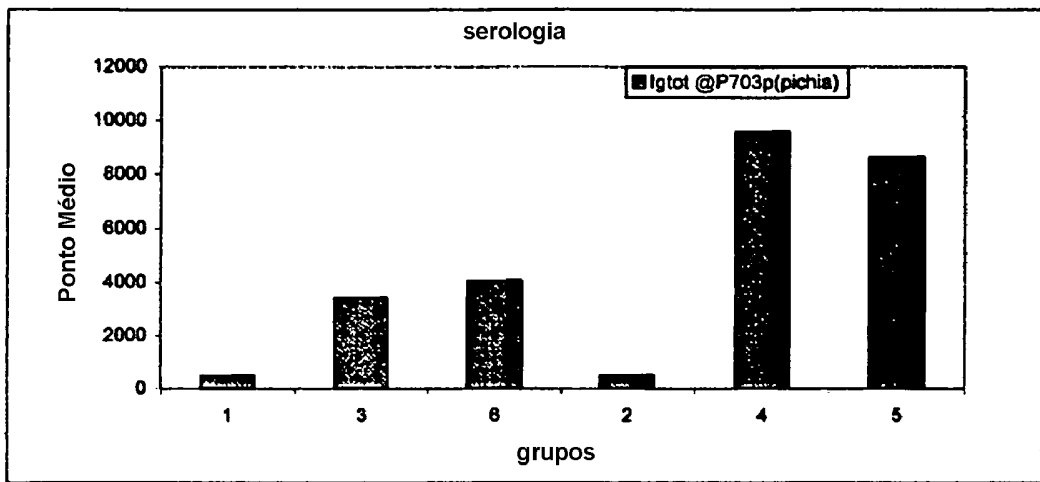


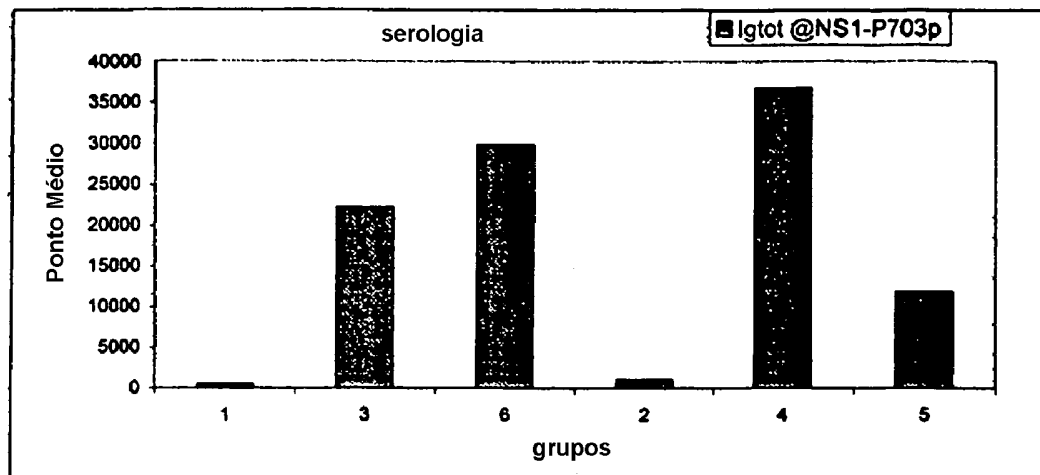
FIGURA 13 - Títulos de Anticorpo Anti-NS1-P703 induzidos por vacinação

FIGURA 14 - Distribuição Isotípica Anti-NS1-PT03P induzida por vacinas