



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 530**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/335 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01987673 .9**
86 Fecha de presentación : **16.10.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1326639**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Composición adyuvante que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador y un tocol.**

30 Prioridad: **18.10.2000 GB 0025577**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**
 rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

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

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 299 530 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición adyuvante que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador y un tocol.

5 La presente invención se refiere a composiciones adyuvantes novedosas para uso en vacunas. En particular, las composiciones adyuvantes de la presente invención comprenden una combinación de un oligonucleótido inmunoestimulador y un tocol. También se proporcionan en la presente invención vacunas que comprenden las composiciones adyuvantes de la presente invención y al menos un antígeno. Además se proporcionan procedimientos de fabricación de las composiciones adyuvantes y vacunas de la presente invención y su uso como medicamentos. De manera adicional, la presente invención proporciona el uso de un oligonucleótido inmunoestimulador y un tocol que contiene emulsión de aceite en agua en la fabricación de un medicamento para desplazar la calidad de una respuesta inmune contra un antígeno hacia una respuesta inmune de tipo Th1.

15 Los oligonucleótido inmunoestimuladores que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") y son adyuvantes conocidos cuando se administran mediante vías tanto sistémicas como mucosales (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, J. Immunol, 1998, 160 (2): 870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 1998, 161 (9): 4463-6). CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótidos citosinaguanosina presentes en el ADN. Históricamente, se observó que la fracción de ADN de BCG podría ejercer un efecto antitumoral. En estudios adicionales, los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias del gen de BCG se mostró que son capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, que incluyen un motivo central CG, tenían esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación se elucidó más tarde en una publicación de Krieg, Nature 374, p. 546 1995. El análisis detallado ha mostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que tales secuencias son comunes en el ADN de bacterias pero son raros en ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo de dinucleótido CG no está metilado, pero se sabe que secuencias de CpG no metilados son inmunoestimuladoras y se pueden usar en la presente invención.

20 En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos está presente una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, o bien como repeticiones de un motivo o una combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoestimuladoras que contienen oligonucleótidos puede activar diversos subconjuntos inmunes, incluyendo células asesinas naturales (que producen el interferón γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige *et al* Vol 89 (no. 8), 1977). Aunque otros CpG no metilados que contienen las secuencias que no tienen esta secuencia de consenso se ha mostrado que son inmunoestimuladores.

35 CpG cuando se formula en vacunas, se administra en general en solución libre conjuntamente con el antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugados de manera covalente a un antígeno (Publicación PCT N° WO 98/16247), o se formulan con un vehículo tal como hidróxido de aluminio ((antígeno superficial de Hepatitis) Davis *et al. supra*: Brazolot-Millan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95 (26), 15553-8). Otro CpG que contienen las formulaciones incluyen los descritos en los documentos WO 99/61056 y WO 00/09159.

40 Tocolos (vitamin E) adyuvantes en emulsión que los contienen se describen en los documentos EP 0 382 271 B1 y US5667784.

45 Los adyuvantes de emulsión en aceite se han conocido desde hace muchos años, incluyendo el trabajo sobre adyuvantes de Freund completos e incompletos de emulsión en aceite. Desde ese momento se ha realizado mucho trabajo para diseñar alternativas estables y bien toleradas a estas formulaciones de adyuvantes potentes, pero reatogénicas Las emulsiones en aceite que comprenden tocoles se describen en el documento WO 95/17210.

50 La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que las combinaciones de los oligonucleótidos inmunoestimuladores y tocoles forman formulaciones de adyuvantes extremadamente potentes. Los componentes de estas formulaciones de adyuvantes preferiblemente interactúan de manera sinérgica en la inducción de un anticuerpo específico de antígeno y son potentes en la inducción de las respuestas inmunes asociadas de manera convencional con el sistema inmune de tipo Th1. De acuerdo con lo anterior, las combinaciones de adyuvantes no son solamente adecuadas para la inmunoprolifaxis de enfermedades, pero también sorprendentemente para la inmunoterapia de las enfermedades tales como infecciones virales, bacterianas o para'sitas persistentes, y también trastornos crónicos tal como cáncer.

55 La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG dinucleótido no está metilado. Los oligonucleótidos preferidos para uso en adyuvantes o vacunas de. la presente invención preferiblemente contienen dos o más motivos CpG dinucleótidos separados por al menos tres, más preferiblemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente deoxinucleótidos. En una realización preferida el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros de internucleótido están dentro del alcance de la invención incluyendo los oligonucleótidos con enlaces de internucleótidos mixtas. Los procedimientos para la producción de oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US 5.666. 153, US 5.278.302 y WO 95/26204.

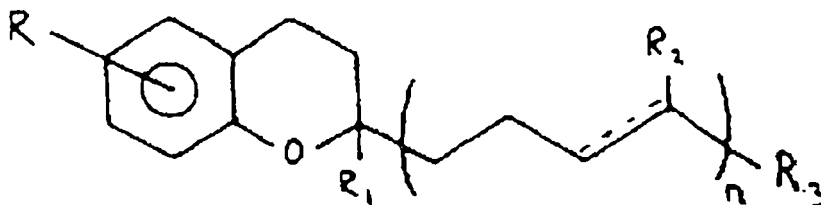
ES 2 299 530 T3

Los ejemplos de los oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias preferiblemente contienen enlaces internucleótido modificados con fosforotioato. OLIGO 1 (SEQ ID NO: 1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) OLIGO 2 (SEQ ID NO: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) OLIGO 3 (SEQ ID NO: 3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG OLIGO 4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) OLIGO 5 (SEQ ID NO: 5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668).

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores ya que tienen supresiones o adiciones de los mismos. Los Oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención se pueden sintetizar mediante un procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, en el documento EP 468520). De manera conveniente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automático.

Los oligonucleótidos utilizados en la presente invención son típicamente deoxinucleótidos. En una realización preferida el enlace internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente enlace fosforotioato, aunque los fosfodiésteres están dentro del alcance de la presente invención. El oligonucleótido que comprende diferentes enlaces internucleótido están contemplados, por ejemplo, fosforotioato fosfodiésteres mixtos. Se pueden usar otros enlaces internucleótido que estabilizan el oligonucleótido.

Los tocoles que se pueden usar de manera ventajosa en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención se describen en el documento EP 0 382 271 B1. Los tocoles descritos en el presente documento están descritos por la fórmula general:



en la que R puede ser H o uno o más sustituyentes idénticos elegidos entre el grupo que comprende grupos alquilo, alcoxi, aciloxi, hidroxilo, un sulfato y un fosfato; R1 y R3 independientemente un del otro H o alquilo; R2 es H o alquilo y puede ser diferente en cada unidad; la línea de puntos indica la presencia o ausencia de un enlace carbono-carbono adicional en una unidad; y n = el valor 1 a 10. El grupo alquilo en R, R1, R2 y R3 se puede elegir en particular entre una cadena de carbono lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, butilo o isobutilo.

Los subgrupos preferidos definidos adicionalmente se describen en el documento EP 0 382 271 B1. Un tocol particularmente preferido es D, L, α -tocoferol (CAS N° 10 191-41-0, nombre químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetiltridecil)-6-cromanol); que está comercialmente disponible en ROCHE™.

Preferiblemente el tocol está en la forma de una emulsión en aceite, y más preferiblemente una emulsión de aceite en agua. Los tocoles se pueden formular como se describe en el documento EP 0 382 271 B1, en el que los tocoles pueden ser dispersiones o gotitas de tocol, comprendiendo opcionalmente un emulsionante, de preferiblemente menos de 1 micrón de diámetro. Como alternativa, los tocoles se pueden usar en combinación con otro aceite, para formar la fase oleosa de una emulsión en aceite. Los ejemplos de emulsiones en aceite que se pueden usar en combinación con el tocol se describen más adelante.

Los adyuvantes de emulsión de aceite en agua *per se* se ha sugerido que son útiles como composiciones adyuvantes (documento EP 0 399 843B), también las combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos se han descrito como adyuvantes para vacunas (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsiones en aceite, tales como emulsiones de agua en aceite (documentos US 5.422.109; EP 0 480 982 B2) y emulsiones de agua en aceite en agua (documentos US 5.424.067; EP 0 480 981 B). Todas las cuales forman sistemas de emulsión de aceite preferidos para incorporar tocoles, y por último a combinarse con CpG, para formar adyuvantes de la presente invención.

La elección del aceite, para la combinación con el tocol, puede ser natural o sintético, y puede ser mineral u orgánico. Los ejemplos de aceites minerales y orgánicos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

La fase de aceite del sistema de emulsión preferiblemente comprende un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable se conoce bien en la técnica. Metabolizable se puede definir como "siendo capaz de transformarse por el metabolismo" (Diccionario Médico Ilustrado de Dorland, W.B. Sanders Company, 25ª edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no es tóxico para el receptor y es capaz de transformarse mediante metabolismo. Nueces (tales como aceite de cacahuete), semillas, y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos son también parte de esta invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. Escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite no saturado que se encuentra en grandes cantidades en aceite de hígado de tiburón, y en cantidades menores de aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y levadura, y es un aceite particularmente preferido para uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud del hecho que es un intermedio en la biosíntesis de colesterol (Índice Merck, 10ª Edición, entrada n° 8619).

Las emulsiones de aceite particularmente preferidas para la combinación con CpG para formar adyuvantes de la presente invención son emulsiones de aceite en agua, y en particular escualeno en emulsiones en agua, que comprenden un tocol y un emulsionante.

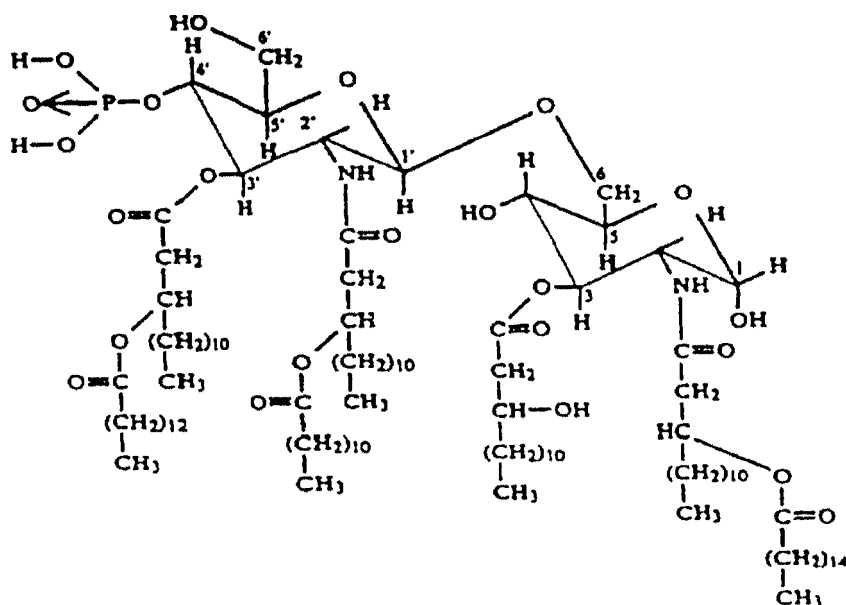
5 Los ejemplos de sistemas de emulsión preferidos se describen en los documentos WO 95/17210 y WO 99/11241 que describen adyuvantes de emulsiones basados en escualeno, α -tocoferol, y TWEEN 80, opcionalmente formulados con los inmunostimuladores QS21 y/o 3D-MPL.

10 El tamaño de las gotitas de aceite encontrado dentro de la emulsión de aceite en agua estable es preferiblemente menor que 1 micrómetro, puede estar en el intervalo de sustancialmente 30-600 nm, preferiblemente sustancialmente aproximadamente 30-500 nm de diámetro, y lo más preferiblemente sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro medido por espectroscopía de correlación fotónica. A este respecto, el 80% de las gotitas de aceite en número debe estar dentro de los intervalos preferidos, más preferiblemente más del 90% y lo más preferiblemente más del 95% de las gotitas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño
15 definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones en aceite de la presente invención están convencionalmente en el intervalo de entre 2 y 10% de aceite, tal como escualeno; y cuando está presente, entre 2 y 10% de alfa tocoferol; y entre 0,3 y 3% de tensioactivo, tal como polioxietileno sorbitano monooleato. Preferiblemente la relación del aceite (preferiblemente escualeno): tocol (preferiblemente α -tocoferol) es igual o menor que 1 ya que proporciona una emulsión más estable. Un emulsionante, tal como Tween 80 o Span 85 también puede estar presente a un nivel de aproximadamente 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención
20 contendrán además un estabilizante.

El procedimiento que produce emulsiones de aceite en agua es bien conocido por los expertos en la técnica. De manera común, el procedimiento comprende la mezcla de la fase de aceite que contiene tocol con un tensioactivo tal como solución de PBS/TWEEN80TM, seguido de la homogenización usando un homogeneizador, será evidente para los expertos en la técnica que un procedimiento que comprende el pase de la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para la homogeneización de pequeños volúmenes de líquido. Igualmente el procedimiento de emulsión en el microfluidificador (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 pases, durante un período de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bar (600 kPa) (presión de salida de aproximadamente 850 bar (85000 kPa)) se puede adaptar por el experto en la técnica para producir volúmenes más pequeños o mayores de emulsión. Esta adaptación se puede lograr mediante experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se logra una preparación con gotitas de aceite del diámetro requerido.

25 En una realización alternativa de la presente invención, el tocol y combinación de CpG puede adicionalmente comprender inmunostimuladores adicionales, tales como LPS o sus derivados, o saponinas. Los ejemplos de inmunostimuladores adicionales se describen en "Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

40 De acuerdo con lo anterior, las combinaciones de adyuvantes CpG/tocol de la presente invención pueden de manera ventajosa incluir un adyuvante derivado de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulador del sistema inmune, aunque su uso se ha reducido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico de LPS, monofosforil lipido A (MPL), producido por la retirada del grupo carbohidrato central y el fosfato de la glucosalina de extremo reductor, se ha descrito por Ribí *et al* (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p 407-419) y tiene la siguiente estructura:



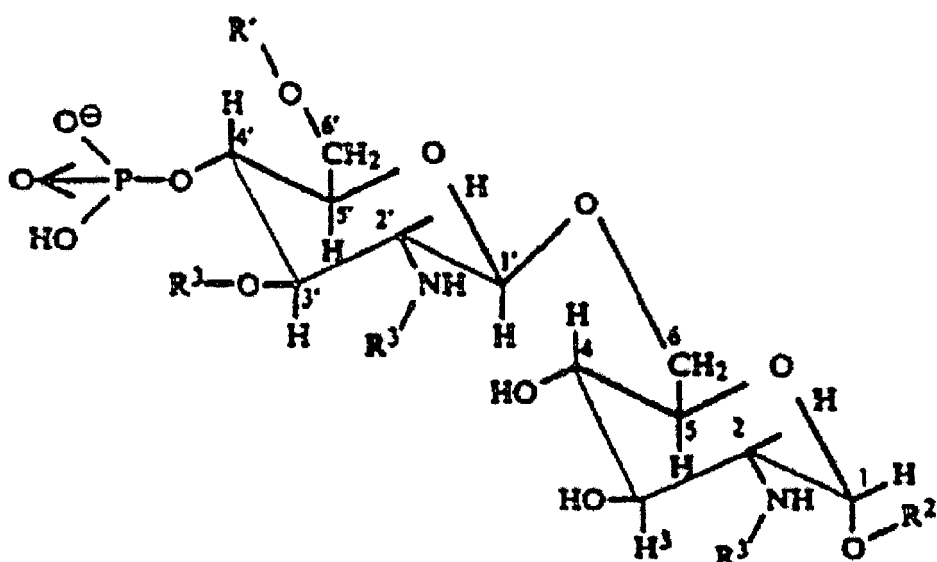
ES 2 299 530 T3

Una versión destoxicada adicional de MPL se produce a partir de la retirada de la cadena acilo de la posición 3 de la estructura central de disacárido, y se llama 3-O-Desacilated monofosforil lípido A (3D-MPL). Se puede purificar y preparar mediante los procedimientos enseñados en el documento GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación de of difosforil lípido A, y sus variantes 3-Odesaciladas. Una forma preferida de 3D-MPL está en la forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño menor de 0,2 μm de diámetro, y su procedimiento de fabricación se describe en el documento WO 94/21292. Las formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo que se ha descrito en el documento WO9843670A2.

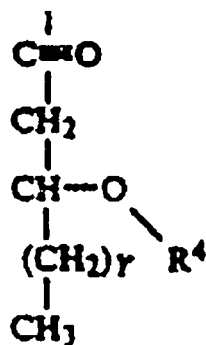
Los adyuvantes derivados de lipopolisacárido bacteriano a formular en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención se pueden purificar y procesar a partir de fuentes bacterianas, o como alternativa pueden ser sintéticos. Por ejemplo, el monofosforil lípido A purificado se describe en Ribi *et al* 1986 (*supra*), y 3-O-desacilado monofosforil o difosforil lípido A derivado de Salmonella sp. Se describe en los documentos GB 2220211 y US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (documentos WO 98/01139; US 6,005,099 y EP 0 729 473 B1; Hilgers *et al.*, 1986, Int. Arch. Allergy. Immunol., 79 (4): 392-6; Hilgers *et al.*, 1987, Immunology, 60 (1): 141-6; y EP 0 549 074 B1). Particularmente los adyuvantes de lipopolisacárido bacteriano preferidos son 3D-MPL y los β (1-6) glucosamina disacáridos descritos en el documento US 6.005.099 y EP 0 729 473 B1.

De acuerdo con lo anterior, los derivados de LPS que se pueden usar en la presente invención son los inmunoestimuladores que son similares en estructura a los de LPS o MPL o 3D-MPL. En otro aspecto de la presente invención los derivados de LPS puede ser un monosacárido acilado, que es una subporción de la estructura anterior de MPL.

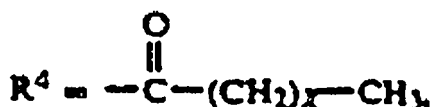
Un adyuvante de disacárido preferido es un lípido A purificado o sintético de la siguiente fórmula:



en la que R2 puede ser H o PO3H2: R3 puede ser una cadena acilo o β -hidroximiristoilo o un resto 3-acyloxiacilo que tiene la fórmula:



en la que



10 y en la que X y Y tienen un valor de entre 0 hasta aproximadamente 20.

15 Las composiciones adyuvantes también pueden además incluir una saponina. Las combinaciones de adyuvantes de 3D-MPL y saponina derivados de la corteza def *Quillaja Saponaria molina* se han descrito en el documento EP 0 761 231 B. El documento WO 95/17210 describe un sistema de emulsión de adyuvantes basado en escualeno, α -tocoferol, y polioxietilén sorbitán monooleato (TWEEN80), formulado con el inmunoestimulador QS21, opcionalmente con 3D-MPL. Las combinaciones de CpG y los sistemas de adyuvantes descritos en el documento WO 95/17210 forman un aspecto preferido de la presente invención. Los documentos WO 96/33739 y WO 98/15287 describen formulaciones de adyuvantes que comprenden saponinas y estructuras del vehículo particuladas, que comprenden opcionalmente 3D-MPL y/o emulsiones de aceite en agua; que cuando se combinan con un tocol y CpG forman los adyuvantes preferidos de la presente invención.

25 Las saponinas se conocen como adyuvantes en las vacunas para la administración sistémica. La actividad adyuvante y hemolítica de las saponinas individuales se han estudiado de manera amplia en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, anteriormente) . Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y sus fracciones, se describen en el documento US 5.057.540 y “Saponins as vaccine adjuvants”, Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y el documento EP 0 362 279 B1.

30 Las estructuras particuladas denominados Complejos de Estimulación Inmunes (ISCOMS), que comprenden las fracciones de Quil A son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., EP 0 109 942 B1). Estas estructuras se han reseñado por tener actividad adyuvante (documentos EP 0 109 942 B1; WO 96/11711).

35 Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos y el procedimiento de su producción se describen la Patente de Estados Unidos nº 5.057.540 y EP 0 362 279 B1. También se describe en esta referencia el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como un potente adyuvante para las vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe además en Kensil *et al.* (1991. J. Immunology vol 146, 431-437). También se conocen las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes particulados que comprenden las fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en los estudios de vacunación sistémica incluyen los derivados de otras especies de plantas tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford *et al.*, Vaccine, 10 (9): 572-577, 1992).

45 Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención pueden además opcionalmente comprender un vehículo adicional, tal como el CpG puede estar asociado a una entidad de vehículo particulado para potenciar la capacidad de adyuvante de la combinación. El CpG usado en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención pueden, por lo tanto, estar en solución libre puede formar complejos con vehículos particulados tales como sales minerales (por ejemplo, pero sin restricción, sales de aluminio o calcio), liposomas, ISCOMs, polímeros (tales como, pero no se restringen a, poliláctico, polifosfazina, poliaminoácido, alginato, quitosán) o micropartículas. Preferiblemente dichos vehículos son catiónicos. El CpG también se puede formular de tal forma que se asocie al tocol, o emulsión de aceite que contiene tocol. Esto se puede lograr mediante la formulación de la emulsión de tal forma que sea catiónica. Como alternativa el CpG puede estar conjugado a un lípido que se asocia a la fase de aceite de la emulsión (documento WO 00/15256).

55 Las vacunas de la presente invención comprenden además un antígeno que pueden, o no pueden, estar asociadas al complejo CpG-vehículo, tal como CpG_tocol/gotita de aceite o el complejo CpG/sal metálica. El antígeno puede estar en solución libre o asociado a un vehículo separado. En un aspecto preferido de la presente invención el antígeno está asociado a al complejo CpG/vehículo.

60 Una combinación de adyuvantes preferida de acuerdo con la presente invención se compone de uno o más oligonucleótidos CpG que contienen al menos 3, preferiblemente al menos 6 nucleótidos entre dos motivos adyacentes CG, conjuntamente con un tocol tal como D, L α -tocoferol. Esta combinación comprende además preferiblemente un derivado activo adyuvante de LPS y un vehículo particulado seleccionado entre el grupo que contiene una sal metálica o una emulsión aceite en agua. Los más preferiblemente, la combinación de adyuvantes comprende CpG 2006 (SEQ ID NO: 4), o CpG 1758 (SEQ ID NO: 2) o CpG 1826 (SEQ ID NO: 1) y una emulsión escualeno/D, L α -tocoferol; este adyuvante preferido opcionalmente además comprende 3-O-desacilado mono o difosforil lípido A y/o QS21, o ambos. Un sistema adyuvante preferido comprende la combinación de QS21, 3D-MPL y el tocol y CpG.

ES 2 299 530 T3

Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención se puede usar tanto como adyuvante sistémico o mucosal. La vacunación de pacientes se ha realizado mediante muchas vías de administración, la más común de las cuales es la administración de la vacuna en el músculo profundo del individuo (inyección intramuscular). Otras vías bien conocidas de vacunación incluyen la administración subcutánea, intranasal, oral, rectal e intraperitoneal e intradérmica. Aunque las vacunas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier vía, la administración de las vacunas descritas en la piel forma una realización preferida de la presente invención.

La piel humana comprende una cutícula "córnea", llamada córnea estriada, que cubre la epidermis. Debajo de esta epidermis está una capa llamada la dermis, que a su vez cubre el tejido subcutáneo. Los investigadores han mostrado que la inyección de una vacuna en la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmune, que puede estar también asociada a un número de ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento forma una característica preferida de la presente invención.

La técnica convencional de la inyección intradérmica, el "procedimiento de Mantoux", comprende las etapas de limpieza de la piel, y el estiramiento con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) que se dirige hacia arriba de la aguja se inserta en un ángulo de entre 10-15°. Una vez que se inserta el bisel de la aguja, el cilindro de la aguja se reduce y además se avanza mientras se proporciona una ligera presión para elevarla sobre la piel. Después el líquido se inyecta muy lentamente formando por lo tanto, una burbuja o abolladura sobre la superficie de la piel, seguido de una lenta retirada de la aguja.

Más recientemente, se han descrito dispositivos que se diseñan específicamente para administrar los agentes líquidos en o a través de la piel, por ejemplo, los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección por chorro descritos por ejemplo en los documentos WO 01/13977; US 5.480.381, US 5.599.302, US 5.334.144, US 5.993.412, US 5.649.912, US 5.569.189, US 5.704.911, US 5.383.851, US 5.893.397, US 5.466.220, US 5.339.163, US 5.312.335, US 5.503.627, US 5.064.413, US 5.520.639, US 4.596.556, US 4.790.824, US 4.941.880, US 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales diseñadas para la distribución balística de las vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037); o se aplican a la superficie de la piel (administración transdérmica o transcutánea documento WO 98/20734; WO 98/28037).

Cuando las vacunas de la presente invención se van a administrar a la piel, más específicamente en la dermis, la vacuna está en un bajo volumen de líquido, particularmente un volumen entre aproximadamente 0,05 ml y 0,2 ml.

Como se usa en el presente documento, el término "administración intradérmica" significa la administración de la vacuna a la región de la dermis en la piel. Sin embargo, la vacuna no necesariamente se localizará exclusivamente en la dermis. La dermis es la capa en la piel localizada entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,0 mm desde la superficie en la piel humana, pero existe una cierta cantidad de variación entre los individuos y en diferentes partes del cuerpo. En general, se puede esperar que alcance la dermis llegando a 1,5 mm por debajo de la superficie de la piel. La dermis se localiza entre el estrato córneo y la epidermis en la superficie y la capa subcutánea debajo. Dependiendo de la moda administración, la vacuna por último se puede localizar únicamente o principalmente dentro de la dermis, o se puede por último distribuir dentro de la epidermis y la dermis.

El desarrollo de la dosificación adecuada y regímenes de tratamiento para uso de las composiciones particulares descritas en el presente documento en una diversidad de regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, la administración oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, transdérmica, intranasal, intradérmica, e intramuscular y formulación, se conoce bien en la técnica, alguno de los cuales se describen en resumen más adelante para los propósitos generales de ilustración.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar mediante la administración oral a un animal. Como tal, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o se pueden incluir en una cápsula fr gelatina dura o blanda, o se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta.

Los compuestos activos se pueden incluso incorporar con excipientes y se usan en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, galletas, y similares (véase, por ejemplo, Mathiowitz *et al.*, Nature 1997 Mar 27; 386 (6623): 410-4; Hwang *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1998; 15 (3): 243-84; Patente de Estados Unidos N° 5,641.515 Patente de Estados Unidos N° 5.580.579 y Patente de Estados Unidos N° 5.792.451). Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener cualquiera de una diversidad de componentes adicionales, por ejemplo, un aglutinante, tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tales como almidón, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina se puede añadir o un agente aromatizante, tal como pipermin, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Otros diversos materiales pueden estar presentes como revestimiento o de otra manera modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas, se pueden revestir con goma laca, azúcar; o ambos. De hecho, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación debe ser farmacéuticamente pura y sustancialmente no tóxico

ES 2 299 530 T3

en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en la preparación de liberación sostenida. Típicamente, estas formulaciones contendrán al menos aproximadamente 0,1% de los ingredientes activos o más, aunque el porcentaje del(de los) ingrediente(s) activo(s) puede, de hecho, variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 1 o 2% y aproximadamente 60% o 70% o más del peso o volumen de la formulación.

5 Naturalmente, la cantidad del(de los) compuesto(s) activo(s) en cada composición útil terapéuticamente se puede preparar de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria del compuesto. Los factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas estarán contempladas por los expertos en la técnica de preparación de tales composiciones farmacéuticas, y como tal, pueden ser deseables una diversidad de regímenes de tratamiento.

10 Para la administración oral las composiciones de la presente invención se pueden incorporar de manera alternativa con uno o más excipientes en la forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, pulverización oral, o formulación administrada por vía oral sublingual. Como alternativa, el ingrediente activo se puede incorporar en una solución oral tal como una que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio, o se dispersa en un dentífrico, o se añade en una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes, y humectantes. Como alternativa las composiciones se pueden modelar en una forma de comprimido o solución que se pueden colocar bajo la lengua o de otra manera disolverse en la boca.

20 En ciertas circunstancias sería deseable administrar las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, o incluso intraperitoneal. Tales planteamientos son bien conocidos por los expertos en la técnica, alguno de los cuales además se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.543.158; la Patente de Estados Unidos N° 5.641.515 y la Patente de Estados Unidos N° 5.399.363. En ciertas realizaciones, las soluciones de los compuestos activos como base libre o o las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar en agua mezclados de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar las dispersiones en glicerol, polietilén glicoles, y sus mezclas y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones en general contendrán un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

30 Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso por inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista de manera que se pueda inyectar fácilmente por inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilén glicol, y propilén glicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas, y/o aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se pueden facilitar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso de las composiciones de los agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

45 En una realización, para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución debe tamponarse de manera adecuada si es necesario y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, un medio acuoso estéril que se puede emplear es bien conocido por los expertos en la técnica a la luz e la presente descripción. Por ejemplo, se puede disolver una dosificación en 1 ml de solución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclinis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones preferiblemente reunirán los patrones de esterilidad, pirogenicidad, y seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de FDA se patrones biológicos. Los vehículos además comprenden cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, tampones, soluciones vehículo, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tal medio y agentes para las sustancias activas farmacéuticas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéutica. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen un compuesto alérgico o reacción similar adversa cuando se administra a un ser humano.

65 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante pulverizaciones intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de administración de aerosol. Se han descrito los procedimientos para la administración de composiciones de genes, ácidos nucleicos, y péptidos directamente a los pulmones mediante pulverizaciones nasales de aerosol, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 5.756.353 y la patente de Estados Unidos N° 5.804.212. Del mismo modo, la administración de fármacos que usan resinas de micropartículas intranas-

les (Takenaga *et al.*, J Controlled Release 1998 Mar 2; 52 (1-2): 81-7) y compuestos de lipofosfatidil-glicerol (patente de Estados Unidos N° 5.725,871) se conocen bien en la técnica farmacéutica. Del mismo modo, la distribución de fármacos transmucosal ilustrativa en la forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.780.045.

5

Los procedimientos de administración sistémica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o los dispositivos diseñados para la administración balística de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o dispositivo de inyección líquida a presión sin aguja (documentos US 4.596,556; US 5.993,412), o parches transdérmicos (documentos WO 97/48440; WO 98/28037). La presente invención también se puede usar para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos aplicados a la piel (administración transdérmica o transcutánea documentos WO 98/20734 ; WO 98/28037). La presente invención por lo tanto proporciona un dispositivo de administración para la administración sistémica, cargada previamente con la vacuna o las composiciones adyuvantes de la presente invención.

Por lo tanto la presente invención proporciona un dispositivo de administración para la administración sistémica, cargado previamente con las composiciones de vacuna o de adyuvantes de la presente invención. De acuerdo con lo anterior se proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune en un individuo, que comprende la administración de una vacuna de la presente invención, al individuo, en el que la vacuna se administra mediante la vía parenteral o sistémica.

20

Preferiblemente las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen una composición de antígenos o antigénica de inducción de una respuesta inmune contra un patógeno humano, dicha composición de antígenos o antigénica se deriva de VIH-1, (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus herpes humanos, tales como gD o sus derivados o Proteína Temprana Inmediata tal como ICP27 de HSV 1 o HSV2, citomegalovirus ((esp Human) (tal como gB o sus derivados), Rotavirus (incluyendo los virus atenuados vivos), virus Epstein Barr (tal como gp350 o sus derivados), virus de Varicella Zoster (tal como gpI, II y IE63), o de un virus de hepatitis virus tal como virus de hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de Hepatitis B o uno de sus derivados), virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como paramixovirus: Virus Sincitial Respiratorio (tal como proteínas F y G o sus derivados), virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de las paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18,..), flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis vector garrapata, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (virus enteros vivos o inactivados, virus de la gripe dividido, desarrollados en huevos o células MDCK, o virosomas de la gripe enteros (como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o sus proteínas recombinantes o purificadas, tales como las proteínas HA, NP, NA, o M, o sus combinaciones), o derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y sus conjugados, proteínas de unión de transferrina, proteínas de unión de lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, proteínas M o sus fragmentos, C5A proteasa, ácidos lipoproteicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo adhesinas e invaginas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis o sus derivados, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrios), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina lábil al calor o sus derivados, toxina estable al calor o sus derivados), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo, toxina del tipo toxina shiga o sus derivados); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina de cólera o sus derivados); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina de vacuolación); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina tetánica y sus derivados), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica y su derivado), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridium A o B y sus derivados); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica y sus derivados); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina diftérica y sus derivados); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de Ehrlichiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, las proteínas de la membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*: o derivados de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levadura tal como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

65

Otros antígenos específicos preferidos para *M. tuberculosis* son por ejemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC 1 (documento WO 99/51748). Las proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen sus variantes donde al menos dos, preferiblemente tres polipéptidos de *M. tuberculosis* se condensan en una proteína mayor. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTTC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTTC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748).

Los antígenos más preferidos para *Chlamydia* incluyen por ejemplo, la Proteína de Alto Peso Molecular (HWMP) (documento WO 99/17741), ORF3 (documento EP 366 412), y las proteínas de membrana supuestas (Pmps). Otros antígenos de *Chlamydia* de la formulación de vacunas se pueden seleccionar entre el grupo descrito en el documento WO 99/28475.

Las vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo polisacáridos conjugados y sus derivados, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y la Pneumolisina de antígeno de proteína (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins *et al.*, Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y sus derivados destoxificados mutantes (documentos WO 90/06951; WO 99/03884). Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae tipo B* (por ejemplo, PRP y sus conjugados), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (documento US 5.843.464) o variantes de copias múltiples o sus proteínas de fusión.

Los derivados del antígeno de superficie de Hepatitis B se conocen bien en la técnica e incluyen, entre otros, los antígenos de PreS1, PreS2 S establecidos descritos en las Solicitudes de Patentes Europeas EP-A-414 374; EP-A-0304 578, y EP 198-474. En un aspecto preferido la formulación de vacunas de la invención comprende el antígeno VIH-1, gp120, especialmente cuando se expresa en las células CHO. En una realización adicional, la formulación de vacunas de la invención comprende gD2t como se ha definido en el presente documento anteriormente.

En una realización preferida de la presente invención las vacunas que contienen el adyuvante reivindicado comprenden antígeno derivado del Virus de Papiloma Humano (HPV) considerado que es responsable de las verrugas genitales (HPV 6 o HPV 11 y otros), y los virus HPV responsables del cáncer cervical (HPV16, HPV18 y otros).

Las formas particularmente preferidas de vacuna profiláctica o terapéutica de verrugas genitales comprende partículas L 1 o capsómeros, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados entre las proteínas E6, E7, L1, y L2, de HPV 6 y HPV 11.

Las formas más preferidas de las proteínas de fusión son: L2E7 como se describe en el documento WO 96/26277, y proteína D(1/3)-E7 descrita en el documento GB 9717953.5 (PCT/EP98/05285).

Una composición preferida de vacuna de profilaxis o terapéutica de infección o cáncer cervical de HPV puede comprender los antígenos de HPV16 ó 18. Por ejemplo, monómeros de los antígenos L1 o L2, o los antígenos L 1 o L2 presentados conjuntamente como una partícula de tipo virus (VLP) o la proteína sola de L1 presentada sola en una estructura de VLP o de capsómeros. Tales antígenos, partículas de tipo virus y capsómeros son *per se* conocidas. Véanse por ejemplo, los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792, y WO93/02184.

Se pueden incluir proteínas tempranas adicionales solas o como proteínas de fusión tales como E7, E2 o preferiblemente E5 por ejemplo: las realizaciones particularmente preferidas de los antígenos de esto incluye una VLP que comprende las proteínas de fusión L1E7 (documento WO 96/11272).

Los antígenos de HPV 16 particularmente preferidas comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 en fusión con un vehículo de la proteína D de las fusiones de la Proteína D-E6 o E7 de HPV 16, o sus combinaciones; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO 96/26277).

Como alternativa las proteínas tempranas E6 y E7 de HPV 16 ó 18 se pueden presentar en una molécula individual, preferiblemente una fusión Proteína D-E6/E7. Tal vacuna puede opcionalmente cualquiera o ambas de las proteínas E6 y E7 de HPV 18, preferiblemente in en la forma de una proteína de fusión Proteína D-E6 o Proteína D-E7 o proteína de fusión Proteína D E6/E7.

La vacuna de la presente invención puede adicionalmente comprender antígenos de otras cepas de HPV, preferiblemente de las cepas HPV 31 ó 33.

Las vacunas de la presente invención además comprenden antígenos derivados de parásitos que provocan Malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS.S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la parte C-terminal de la proteína del circunsporozoito (CS) de *P.falciparum* unida mediante cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno de superficie de la Hepatitis B al antígeno de superficie(s) del virus de hepatitis B virus. Su estructura completa se describe en la Solicitud de patente Internacional N° PCT/EP92/02591, publicada bajo el número WO 93/10152 que reivindica prioridad de la solicitud de patente del Reino Unido N° 9124390.7. Cuando se expresa en levaduras RTS se produce como una partícula de lipoproteína, y cuando se coexpresa con el antígeno S de HBV produce una partícula mixta conocida como RTS, S. Los antígenos TRAP se describen en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/GB89/00895, publicada bajo el documento

WO 90/01496. Una realización preferida de la presente invención es una vacuna de Malaria en la que la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodia que son probables candidatos para ser componentes de una vacuna de Malaria de fases múltiples son MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45. Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en *Plasmodium spp.*

Las formulaciones también pueden contener un antígeno antitumoral y pueden ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico y cánceres. Por ejemplo, la formulaciones de adyuvante encuentra utilidad con los antígenos de rechazo de tumores tales como aquellos para los cánceres de próstata, mama, colorrectal, pulmón, pancreático, renal o melanoma. Los antígenos ejemplares incluyen MAGE 1 3 y MAGE 4 u otros antígenos de MAGE tales como los descritos en el documento WO99/40188, PRAME, BAGE, Lage (también conocidos como NY Eos 1) SAGE y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, páginas 628-636; Van den Eynde *et al.*, International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentada en 1997); Correale *et al.* (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p. 293. De hecho estos antígenos se expresan en un amplio intervalo de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga.

Los antígenos MAGE para uso en la presente invención se pueden expresar como una proteína de fusión con un potenciador de expresión o una pareja de fusión inmunológica. En particular, la proteína Mage se puede condensar a la Proteína D de Heamophilus influenzae B o su derivado lipídico. En particular, la pareja de fusión puede comprender el primer 1/3 de la Proteína D. Tales construcciones se describen en el documento WO 99/40188.

Otros antígenos específicos de tumor son adecuados para uso con los adyuvantes de la presente invención e incluyen, pro no se restringen a los gangliósidos específicos de tumor tales como GM 2, y GM3 o sus conjugados a las proteínas vehículo; o dicho antígeno puede ser una misma hormona peptídica tal como la hormona Gonadotropina que libera la hormona (GnRH, documento WO 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres, o una inmunocastración.

En una realización preferida se utilizan los antígenos de próstata, tal como el antígeno específico de próstata (PSA), PAP, PSCA (PNAS 95 (4) 1735-1740 1998), o antígeno PSMA conocido como Prostase.

La Prostase es una serina proteasa específica de próstata (tipo tripsina), de 254 aminoácidos de longitud, con una triada catalítica de la serina proteasa conservada H-D-S y una secuencia pre-propéptido amino terminal, que indica una función secretora potencial (P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Gelinas, L. Hood & K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression, en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 3114-3119). Se ha descrito un sitio supuesto de glicosilación. La estructura prevista es muy similar a otras serina proteasas conocidas, que muestran que el polipéptido maduro se pliega en un dominio individual. La proteína madura es de 224 aminoácidos de longitud, con un epítipo A2 mostrado que se procesa de manera natural.

La secuencia de nucleótidos de la Prostase y secuencia de polipéptidos deducida y homólogos se describen en Ferguson, *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119) y en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 98/12302 (y también la correspondiente patente de Estados Unidos concedida n° 5.955.306). El documento WO 98/20117 (y también las correspondientes patentes de Estados Unidos concedidas 5.840.871 y 5.756.145) (kallikrein específica de próstata) y documento WO 00/04149 (P703P).

La presente invención proporciona formulaciones que comprenden fusiones de proteína de próstata basadas en la proteína de próstata y los fragmentos y sus homólogos ("derivados"). Tales derivados son adecuados para uso en las formulaciones de vacunas terapéuticas que son adecuadas para el tratamiento de un tumor de próstata. Típicamente el fragmento contendrá al menos 20, preferiblemente 50, más preferiblemente 100 aminoácidos contiguos como se describe en las anteriores patentes y solicitudes de patentes mencionadas.

Un antígeno de próstata preferido adicional se conoce como P501S, Secuencia ID n° 113 del documento WO 98/37814. Los fragmentos inmunogénicos y sus partes que comprenden al menos 20, preferiblemente 50, más preferiblemente 100 aminoácidos contiguos como se describe en la solicitud de patente mencionada anteriormente. Véase, por ejemplo, PS 108 (documento WO 98/50567).

Otros antígenos específicos de próstata se conocen a partir de los documentos WO98/37418, y WO/004149. Otro es STEAP PNAS 96 14523 14528 7-12 1999.

Otros antígenos asociados a tumores útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu-1 J Biol. Chem 274 (22) 15633-15645, 1999, HASH-1, HasH-2, Cripto (Salomon *et al* Bioessays 199, 21 61-70, patente de Estados Unidos 5654140) Criptin patente de Estados Unidos 5 981 215, Adicionalmente, los antígenos particularmente relevantes para las vacunas en la terapia de cáncer también comprenden tirosinasa y survivina.

Los péptidos derivados de mucina tal como Muc1 véanse por ejemplo el documento de Estados Unidos n° 5.744.144 documento de Estados Unidos n° 5827. 666 documento WO 8805054, documento de Estados Unidos n° 4.963,484. Se contemplan específicamente los péptidos derivados de Muc 1 que comprenden al menos una unidad de repetición del péptido Muc 1, preferiblemente al menos dos de tales repeticiones y que es reconocible por el anticuerpo SM3 (documento de Estados Unidos 6 054 438). Otros péptidos derivados de mucina incluyen el péptido de Muc 5.

ES 2 299 530 T3

La presente invención también es útil en combinación con cáncer de mama tal como her 2/Neu, mamoglobina (patente de Estados Unidos n° 5668267) o los descritos en los documentos WO/00 52165, WO99/33869, WO99/19479, WO 98/45328. Los antígenos Her 2 neu se describen entre otros en la patente de Estados Unidos n° 5.801.005. Preferiblemente el Her 2 neu comprende el dominio extracelular entero (que comprende aproximadamente 1-645 aminoácidos) o sus fragmentos y al menos una parte inmunogénica de o dominio intracelular entero aproximadamente los 580 aminoácidos C terminales. En particular, la parte intracelular debe comprender el dominio de fosforilación o sus fragmentos. Tales construcciones se describen en el documento WO00/44899. Una construcción particularmente preferida se conoce como ECD PD una segunda se conoce como ECD PD Véase el documento WO/00/44899. El her 2 neu as como se usa en el presente documento se puede derivar de rata, ratón o ser humano.

Las formulaciones pueden contener antígenos asociados a mecanismos de soporte de tumores (por ejemplo, angiogénesis, invasión tumoral) por ejemplo, tie 2, VEGF.

Se prevé que las composiciones de la presente invención se usarán para formular vacunas que contienen antígenos derivados de *Borrelia sp.*. Por ejemplo, los antígenos pueden incluir ácido nucleico, antígeno derivado de patógeno o preparaciones antigénicas, proteína o péptidos producidos de manera recombinante, y proteínas de fusión quiméricas. En particular el antígeno es OspA. El OspA puede ser a una proteína madura completa de una forma lipídica en virtud de la células huésped (*E. Coli*) denominada (Lipo-OspA) o un derivado no lipídico. Tales derivados no lipídicos incluyen la proteína de fusión de NS1-OspA no lipídica que tiene los primeros 81 aminoácidos N terminales de la proteína no estructural (NS1) del virus de la gripe, y la proteína completa OspA, y otros, MDP-OspA es una forma no lipídica de OspA que lleva 3 aminoácidos adicionales N terminal.

Las vacunas de la presente invención se pueden usar para la profilaxis o terapia de alergia. Tales vacunas deben comprender antígenos específicos de alergenos (por ejemplo, Der p1) y no específicos de alergeno (por ejemplo, derivados de IgE humana, incluyendo pero que no se restringe al decapeptido stanworth (documento EP 0 477 231 B1)).

Las vacunas de la presente invención también se pueden usar para la profilaxis o terapia de trastornos crónicos diferentes de alergia, cáncer o enfermedades infecciosas. Tales trastornos crónicos son enfermedades tales como aterosclerosis, y Alzheimer.

Las vacunas de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de enfermedades, tales como afecciones crónicas y cánceres, pero también para la terapia de infecciones persistentes. De acuerdo con lo anterior las vacunas de la presente invención son particularmente adecuadas para la inmunoterapia de enfermedades infecciosas, tal como infecciones por virus de Tuberculosis (TB), SIDA y Hepatitis B (HepB).

De acuerdo con lo anterior se proporcionan vacunas y adyuvantes de la presente invención para la inmunoterapia de enfermedades infecciosas tales como TB, AIDS y HepB; y el uso de tales adyuvantes y las vacunas en la fabricación de medicamentos para la inmunoterapia de enfermedades infecciosas tales como TB, SIDA y HepB. En el contexto de TB, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo que sufre la infección TB, que comprende la administración de una vacuna de la presente invención al individuo, reduciendo por lo tanto la carga bacteriana de ese individuo. La reducción de carga bacteriana, que consta de una reducción de la cantidad de TB encontrada en el esputo de pulmón, que conduce a la mejora o cura de la enfermedad de TB.

También, en el contexto del SIDA, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo susceptible de o que sufre SIDA. El procedimiento que comprende la administración de una vacuna de la presente invención al individuo, reduciendo por lo tanto la cantidad de disminución de células CD4+ T provocada por la infección de VIH posterior, o que ralentiza o detiene la disminución de las células CD4+ T en un individuo ya infectado con VIH.

De manera adicional, en el contexto de la infección por virus de la Hepatitis B persistente, se proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo susceptible a o que padece de infección por HepB. De acuerdo con lo anterior, se proporciona un procedimiento que comprende la administración de una reduciendo por lo tanto el nivel de carga de HepB en el suero (como se mide mediante la eliminación de ADN) y reduciendo también la cantidad de daño en el hígado (como se detecta por la reducción o estabilización de los niveles en suero en la enzima Alanina Transferasa (ALT)).

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios significativos, adversos en las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué dosis específica se emplea y cómo se presenta. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-1000 µg de proteína, preferiblemente 1-500 µg, preferiblemente 1-100 µg, lo más preferiblemente 1 a 50 µg. Una cantidad óptima de una vacuna particular se puede determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos vacunados.

La cantidad de oligonucleótidos CpG o inmunoestimuladores de la presente invención es en general pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacunas puede estar en la región de 1-1000 µg por dosis, preferiblemente 1-500 µg por dosis, y más preferiblemente entre 1 y 100 µg por dosis.

ES 2 299 530 T3

Si está presente la cantidad de derivado de LPS para uso en los adyuvantes de la presente invención puede estar en la región de 1-1000 μg por dosis, preferiblemente 1-500 μg por dosis, más preferiblemente 1-250 μg por dosis, y lo más preferiblemente entre 1 y 100 μg por dosis. La relación de CpG : derivado de LPS (p/p) estará, por lo tanto, en el intervalo de entre 1:1000 y 1000:1, y típicamente estará en el intervalo entre 1:100 y 100:1, y preferiblemente en el intervalo entre 1:10 y 1:1 o entre 1:1 y 10:1, y lo más preferiblemente 1:1, 4:1 ó 10:1.

Las formulaciones de la presente invención se pueden usar para tanto propósitos profilácticos como terapéuticos. De acuerdo con lo anterior, se proporciona el uso de una combinación de una saponina y una molécula de CpG en la fabricación de una vacuna para la profilaxis y el tratamiento de infecciones virales, bacterianas, parásitas, alergia, cáncer y otros trastornos no crónicos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un mamífero susceptible o que padece una enfermedad infecciosa o cáncer, o alergia, o enfermedad autoinmune. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una vacuna o combinación de adyuvantes, que comprende saponina y CpG, como se describe en el presente documento para uso como un medicamento. Las preparaciones de vacuna se describe en general en *New Trends y Developments in Vaccines*, editado por Voller *et al.*, University Park Press. Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978.

Se prevé que las composiciones de la presente invención se usarán para formular vacunas que contienen antígenos derivados de una amplia diversidad de fuentes. Por ejemplo, los antígenos pueden incluir preparaciones de antígenos o antigénicas derivadas de patógenos humanos, bacterianos, o de ácido nucleico viral, preparaciones de antígenos o antigénicas derivadas de tumores, antígenos derivados de huésped, incluyendo los péptidos derivados de IgE, tal como el decapéptido que libera histamina de IgE (conocido como el decapéptido Stanworth), proteína o péptidos producidos de manera recombinante, y proteínas de fusión quimérica.

También la presente invención proporciona un procedimiento de desplazamiento de la calidad de una respuesta inmune contra un antígeno generado por una vacuna que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador, hacia una respuesta inmune de tipo Th1, comprendiendo el procedimiento la formulación de la vacuna con un oligonucleótido inmunoestimulador y un tocol que contiene emulsión de aceite en agua. De manera específica, el procedimiento de desplazamiento de la calidad de una respuesta inmune da como resultado la generación de una respuesta inmune de tipo Th1 como se ensaya en un modelo de ratón en el que los isótopos de IgG específicos de antígeno inducidos por la vacuna se caracterizan porque IgG constituye menos de un 50% de la IgG específica de antígeno como se determina por las valoraciones de punto medio mediadas por ELISA específico. Preferiblemente menos de 40% de la IgG total específica de antígeno como se determina por las valoraciones de punto medio medidas mediante ELISA específico de isótopos.

También se proporciona un procedimiento de fabricación de una composición de vacuna que comprende la formulación de una emulsión de aceite en agua que comprende tocol, mezclando dicha emulsión de tocol con un oligonucleótido inmunoestimulador para formar un adyuvante, la formulación de dicho adyuvante con una composición de antígenos o antigénica.

También se proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo susceptible a, o que padece, una enfermedad que comprende la administración a dicho individuo de una composición de vacunas que comprende una combinación de un oligonucleótido inmunoestimulador y un tocol. También se proporciona el uso de las vacunas como se describe en el presente documento en medicina.

Además se proporciona también un procedimiento de fabricación de una vacuna o adyuvante, que comprende tomar un derivado de LPS, y tomar una molécula de CpG y mezclarlos con un antígeno en un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la ausencia de una saponina. Los ejemplos de los excipientes farmacéuticamente aceptables para uso en las combinaciones de la presente invención incluyen agua, solución salina tamponada con fosfato, soluciones tamponadas isotónicas.

Preferiblemente los adyuvantes de la presente invención constan o constan esencialmente de un tocol y emulsión de aceite metabolizable y un oligonucleótido inmunoestimulador. Más preferiblemente las composiciones adyuvantes constan esencialmente de un tocol y una emulsión de aceite metabolizable, un oligonucleótido inmunoestimulador y una saponina. En ambas de estas dos realizaciones anteriores es tocol es preferiblemente α -tocoferol, el aceite metabolizable es preferiblemente escualeno y el oligonucleótido inmunoestimulador es preferiblemente CpG 2006 (SEQ ID NO. 4); todas las variaciones y combinaciones dentro de estas realizaciones estarán claramente contempladas por la presente invención. Lo más preferiblemente las composiciones adyuvantes constan o constan esencialmente de un α -tocoferol y emulsión de escualeno, CpG 2006 (SEQ ID NO. 4 y QS21).

Las vacunas más preferidas de la presente invención contienen un antígeno Her2Neu, preferiblemente una fusión del dominio extracelular de Her2Neu unido al dominio de fosforilación (ECD-PD (producido como se describe en el documento WO 00/44899)). De acuerdo con lo anterior la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un individuo que padece un cáncer que comprende la administración a dicho individuo de una composición de vacuna que comprende una combinación de un oligonucleótido inmunoestimulador, un tocol, y ECD-PD. Todas las características preferidas del oligonucleótido inmunoestimulador y tocol que se han descrito anteriormente también se contemplan en este procedimiento de tratamiento.

La presente invención se ejemplifica, pero no se limita a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Inmunización de ratones con antígeno de ECD-PD

- 5 Este experimento se diseña para investigar un intervalo de formulaciones de adyuvantes con el antígeno que es una fusión del dominio extracelular de Her2Neu unido al dominio de fosforilación (ECD-PD), que se produce en las células CHO de acuerdo con los procedimientos del documento WO 00/44899.

Grupo	Antígeno (25 µg)	Adyuvante
1	ECD-PD	Ninguno (Solución salina tamponada con fosfato (PBS))
2	ECD-PD	Liposomas con QS21 y 3D-MPL en membrana
3	ECD-PD	Emulsión de aceite en agua que contiene tocol con QS21 y 3D-MPL
4	ECD-PD	CpG
5	ECD-PD	Liposomas con QS21 y 3D-MPL en membrana + CpG
6	ECD-PD	Emulsión de aceite en agua que contiene tocol con QS21 y 3D-MPL + CpG
7	ECD-PD	3D-MPL + CpG
8	ECD-PD	QS21 + CpG
9	ECD-PD	Emulsión de aceite en agua que contiene tocol + CpG
10	ECD-PD	Liposomas con QS21 en membrana + CpG
11	ECD-PD	Liposomas con 3D-MPL en membrana + CpG

Las emulsiones de aceite en agua que contienen tocol usados en los grupos anteriores usaban D, L. α -tocoferol (CAS No. 10191-41-0; nombre químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-cromanol); que está comercialmente disponible de ROCHE™. Si está presente el tocol estaba presente en una emulsión de aceite en agua que comprende 2,5% en volumen, en combinación con escualeno 2,5% en volumen. Ambos aceites se mezclaron, y se añadió y polioxietilén sorbitán monooleato (Tween 80™), antes de la microfluidificación (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 pases, durante un período de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bar (600 kPa) (presión de salida de aproximadamente 850 bar (85000 kPa) como se describe en el documento WO 95/17210). De acuerdo con lo anterior, los grupos 3,6, y 9 se basaban en la emulsión anterior de tocol con la adición de QS21, 3D-MPL o CpG acuosos.

QS21 y 3D-MPL si están presentes en cualquiera de los grupos de vacuna anteriores se incluyeron a 5 µg/dosis; CpG (OLIGO 4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se añadió a una dosis de 50 µg.

Los adyuvantes usados para los grupos 2, 5, 10 se prepararon de acuerdo con las técnicas descritas en el documento EP 0 822 831 B1 Group 11 que comprenden 3D-MPL en la membrana de un liposoma. En resumen, el 3D-MPL, dioleoil fosfatidil colina y colesterol se mezclaron conjuntamente y se microfluidificaron en liposomas unilamelares (como se describe en el documento EP 0 822 831 B 1 - con la omisión de QS21).

Los adyuvantes usados en los grupos 4, 7 y 8 eran una solución o suspensión acuosa.

Procedimiento de vacunación

Los grupos de ratones B6F se vacunaron en cuatro ocasiones (en volúmenes de 50 µl), por vía intramuscular, con una separación de 14 días. 14 Días después de la cuarta dosis de vacunación, los ratones se expusieron por vía subcutánea con 2 X 10⁶ TC 1 de células tumorales que expresan el Her2Neu.

Línea celular de tumores TC1

Células epiteliales de pulmón primario de ratones C57BL.6 se inmortalizaron mediante HPV 16 E6 y E7 y después se transformaron con un oncogen ras activado, produciendo una línea celular tumorigénica que expresa E6 y E7 (Lin KY Cancer Res 1996 Jan 1; 56 (1): 21-61). Se ha verificado la expresión de E7 mediante análisis de FACS de células TC1 fijadas y permeabilizadas usando el y anti-HPV 16 E7 Mab de ratón (Triton Corp. Alameda, CA). Las líneas celulares de tumores Her2Neu-TC 1 se produjeron mediante la transducción de estas células TC 1 mediante vectores retrovirales que codifican Her2Neu. Después de un período de selección con blastocidina, clones resistentes se aislaron y se seleccionaron mediante FACS para la expresión de Her2Neu. El clon con la mayor expresión de Her2Neu se seleccionó, y se identificó una dosis de exposición de 2×10^6 de células que tenía una cinética similar de crecimiento que las células TC 1 de tipo salvaje y que dan lugar al desarrollo de un tumor en un 100% de los animales de control.

El tamaño de los tumores individuales se midió dos veces a la semana y se expresaron como una media del grupo.

15 *Resultados*

La Figura 1 muestra los resultados del crecimiento tumoral de los grupos 1, 2, 4, 5 y 6. La Figura 2 muestra los resultados del crecimiento tumoral para los grupos 1, 5, 6, 7 y 11. La Figura 3 muestra los resultados del crecimiento tumoral para los grupos 1, 5, 6, 8, 9 y 10. Las formulaciones que comprenden un tocol y CpG inducían una regresión completa del tumor.

Las Figuras 4 y 5 muestra la linfoproliferación de esplenocitos *in vitro* después de la incubación con los 5 µg/ml de inmunógeno (ECD-PD) o dominio extracelular (ECD) o dominio intracelular (ICD) o Her2Neu.

25 Las Figuras 6 y 7 muestran la respuesta inmune humoral al inmunógeno (ECD-PD) en términos de Ig total como se mide por ELISA (Fig. 6) o distribución de isotipo de IgG dentro de estas respuestas (Fig. 7).

Ejemplo 2

30

Inmunización de ratones con antígeno P703P

Este experimento se diseñó para investigar un intervalo de formulaciones de adyuvantes con al antígeno que es una fusión de la Prostase antigénica (Ferguson, *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114-3119) y el fragmento N-terminal 1-81 de f NS1 del virus de la gripe (P703P-NS1).

35

Grupo	Antígeno (25 µg)	Adyuvante
1	P703P-NS1	Ninguno (Solución salina tamponada con fosfato (PBS))
2	P703P-NS1	CpG
3	P703P-NS1	Liposomas con QS21 en membrana + CpG
4	P703P-NS1	Liposomas con QS21 y 3D-MPL en membrana + CpG
5	P703P-NS1	Emulsión de aceite en agua que contiene tocol con QS21 y 3D-MPL + CpG
6	P703P-NS1	Emulsión de aceite en agua que contiene tocol L + CpG

40

45

50

55

Las emulsiones de aceite en agua que contienen tocol usados en los grupos anteriores usaban D, L. α -tocoferol (CAS No. 10191-41-0; nombre químico: (2RS,4'RS,8'RS)-2,5,7,8-tetrametil-2-(4',8',12'-trimetil-tridecil)-6-cromanol); que está comercialmente disponible de ROCHE™. Si está presente el tocol estaba presente en una emulsión de aceite en agua que comprende 2,5% en volumen, en combinación con escualeno 2,5% en volumen. Ambos aceites se mezclaron, y se añadió y polioxietilén sorbitán monooleato (Tween 80™), antes de la microfluidificación (máquina de microfluidos M110S, máximo de 50 pases, durante un período de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 6 bar (600 kPa) (presión de salida de aproximadamente 850 bar (85000 kPa) como se describe en el documento WO 95/17210). De acuerdo con lo anterior, los grupos 5 y 6 se basaban en la emulsión anterior de tocol emulsión con la adición de QS21, 3D-MPL y/o CpG acuosos.

65

ES 2 299 530 T3

QS21 y 3D-MPL si están presentes en cualquiera de los grupos de vacuna anteriores se incluyeron a 5 µg/dosis; CpG (OLIGO 4 (SEQ ID NO: 4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se añadió a dosis de 50 µg.

5 Los adyuvantes usados para los grupos 3 y 4 se prepararon de acuerdo con las técnicas descritas en el documento EP 0 822 831 B1.

Procedimiento de vacunación

10 Los grupos de ratones B6F 1 se vacunaron en cuatro ocasiones (en volúmenes de 50 µl), por vía intramuscular, con una separación de 14 días.

Resultados

15 Las Figuras 8 y 9 muestran la linfoproliferación *in vitro* de esplenocitos después de la segunda vacunación y 14 días después de la cuarta vacunación, después de la incubación *in vitro* incubación con 3 µg/ml de inmunógeno (NS1-P703P) o P703P expresado de pichia (15 µg/ml) o una proteína de fusión NS1-OspA.

20 Las Figuras 10 y 11 muestran la respuesta inmune humoral al inmunógeno (NS1-P703P) en términos de Ig total como se mide por ELISA de valoración de punto medio (Fig. 10) o distribución de isotipo de IgG dentro de estas respuestas (Fig. 11).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición adyuvante que comprende una combinación de un oligodeoxinucleótido inmunoestimulador y un tocol.

2. Una composición adyuvante según la reivindicación 1 en la que el tocol está en la forma de una emulsión de aceite en agua.

3. Una composición adyuvante según la reivindicación 2 en la que la emulsión de aceite en agua comprende además escualeno.

4. Una composición adyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho oligodeoxinucleótido inmunoestimulador comprende una secuencia de Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina, en la que C y G están sin metilar.

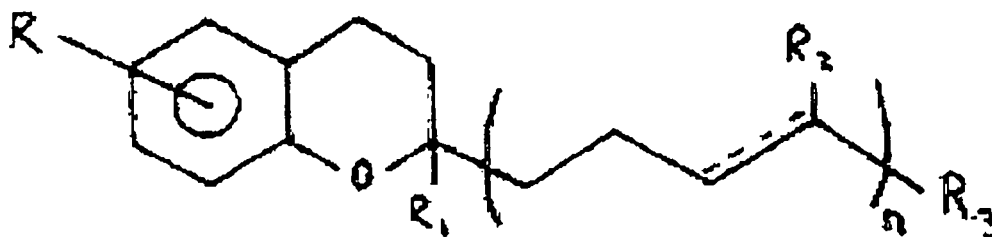
5. Una composición adyuvante según las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho oligodeoxinucleótido inmunoestimulador se selecciona entre el grupo que comprende:

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEQ ID NO: 1); TCT CCC AGC GTG CGC CAT (SEQ ID NO: 2); ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO: 3); TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (SEQ ID NO: 4); TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (SEQ ID NO: 5).

6. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, en la que oligodeoxinucleótido inmunoestimulador contiene al menos dos repeticiones CG no metiladas que están separadas por al menos 3 nucleótidos.

7. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el oligodeoxinucleótido inmunoestimulador contiene al menos dos repeticiones CG sin metilar que están separadas por 6 nucleótidos.

8. Una composición adyuvante según la reivindicación 1 en la que el tocol se describe por la fórmula general:



en la que R puede ser H o uno o más sustituyentes idénticos o diferentes elegidos entre el grupo que comprende alquilo, alcoxi, aciloxi, hidroxilo, un sulfato y un grupo fosfato; R1 y R3 independientemente uno del otro son H o alquilo; R2 es H o alquilo y puede ser diferente en cada unidad; la línea de puntos indica la presencia o ausencia de un enlace carbono-carbono adicional en una unidad; y n = al valor de 1 a 10, en el que el grupo alquilo en R, R1, R2 y R3 se puede elegir en particular entre una cadena de carbono lineal o ramificada que tiene 1-4 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, butilo o isobutilo

9. Una composición adyuvante según la reivindicación 8, en la que el tocol es D, L, α -tocoferol.

10. Una composición adyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho adyuvante comprende además un inmunoestimulador adicional.

11. Una composición adyuvante según la reivindicación 10 en la que el inmunoestimulador adicional se selecciona entre LPS o su derivado, 3D-MPL, una saponina, o QS21.

12. Una composición de vacunas que comprende una composición adyuvante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y una composición de antígeno o antigénica.

13. Una vacuna según la reivindicación 12, en la que el antígeno es ECD-PD.

14. Uso de un oligodeoxinucleótido inmunoestimulador y una emulsión de aceite en agua que contiene tocol en la fabricación de un medicamento para desplazar la calidad de una respuesta inmune contra un antígeno hacia una respuesta inmune de tipo Th1.

ES 2 299 530 T3

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la combinación del oligodeoxinucleótido inmunoestimulador con una emulsión de aceite en agua que contiene tocol genera una respuesta inmune de tipo Th1, tal como cuando se miden los isotipos de IgG específicos de antígeno inducidos por la vacuna después de la vacunación de un ratón, IgG1 constituye menos del 50% de la IgG específica de antígeno total como se determina mediante las valoraciones de punto medio medidas por ELISA específico de isotipo.

16. Un procedimiento de fabricación de una composición de vacuna que comprende la formulación de una emulsión de aceite en agua que comprende un tocol, mezclar dicha emulsión de tocol con un oligodeoxinucleótido inmunoestimulador para formar un adyuvante, y formular dicho adyuvante con una composición de antígeno o antigénica.

17. A Una vacuna según la reivindicación 12 para uso en medicina.

FIG. 1. Crecimiento de tumor in vivo después de la vacunación

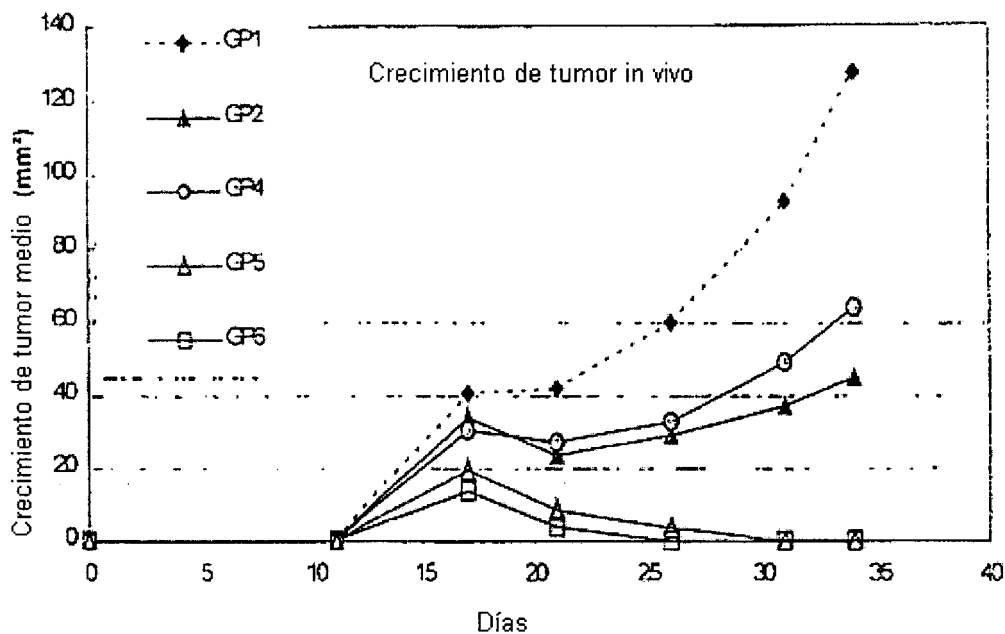


FIG. 2

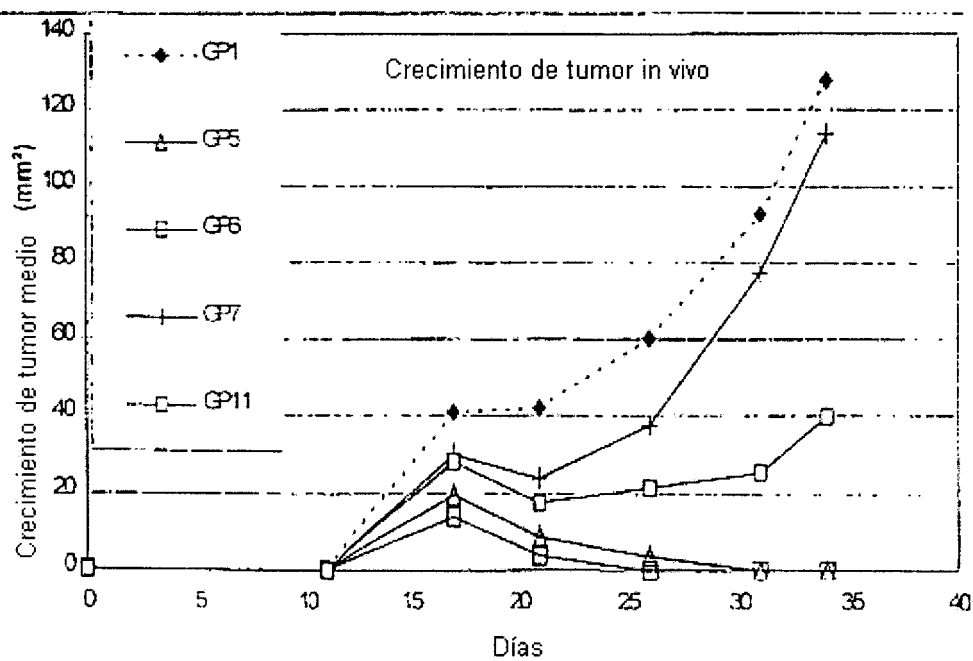


FIG. 3

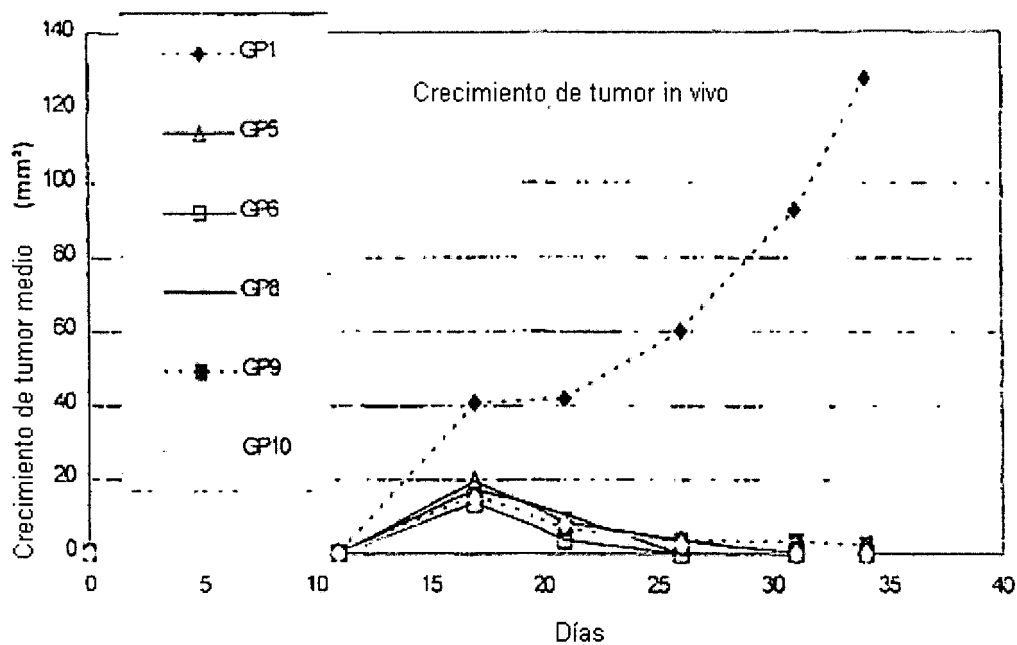


FIG. 4. Linfoproliferación (después de vacunación, exposición antes de tumor)

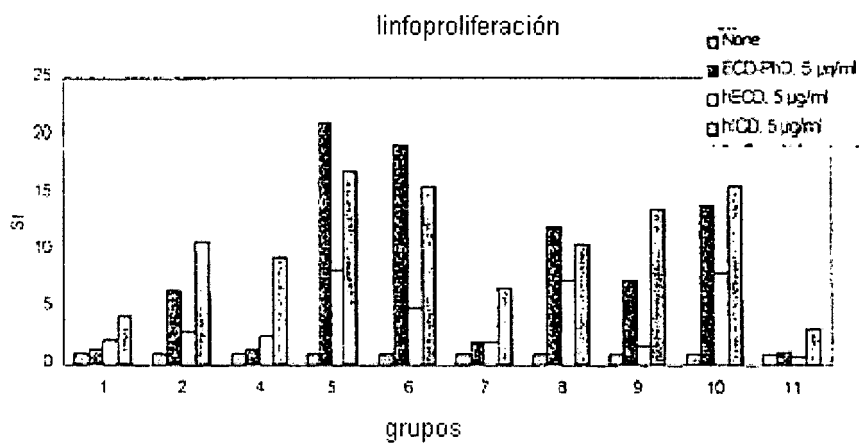


FIG. 5. Linfoproliferación (después de vacunación, exposición después de tumor)

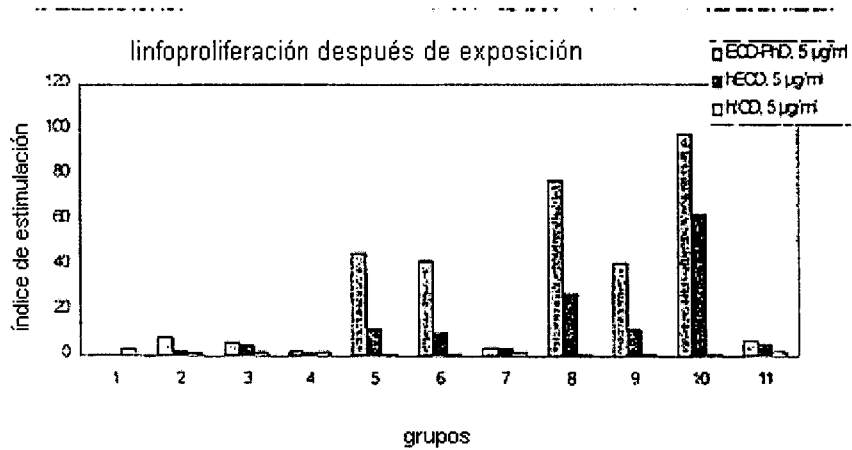


FIG. 6. Respuestas de anti-ECD Ig total después de la vacunación

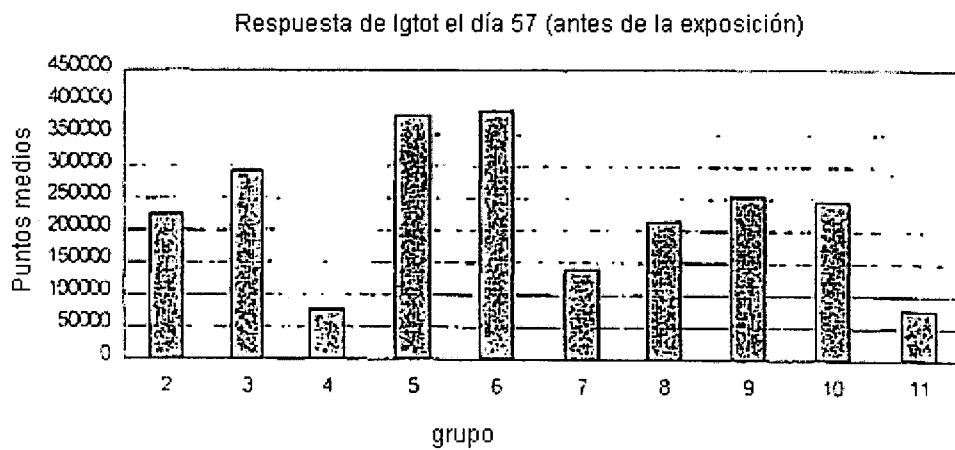


FIG. 7. I. Distribución de isotipo inducida por vacunas

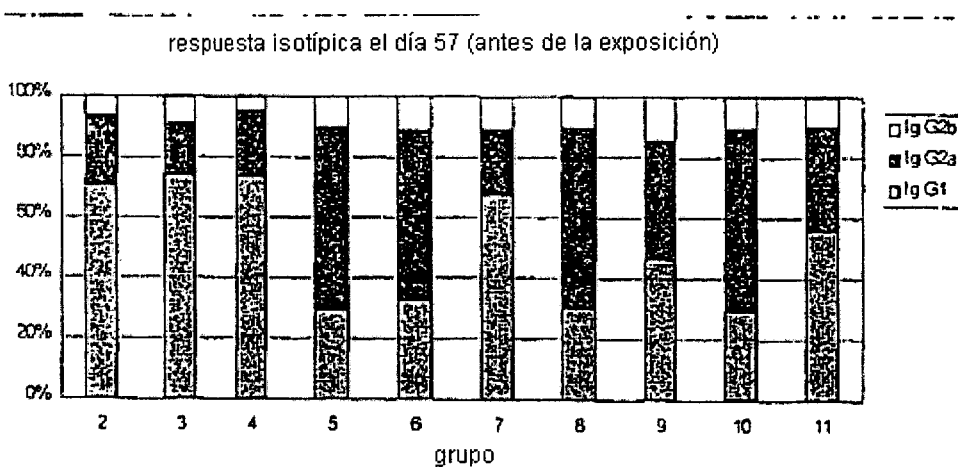


FIG. 8. Linfoproliferación después de la segunda vacunación de P703

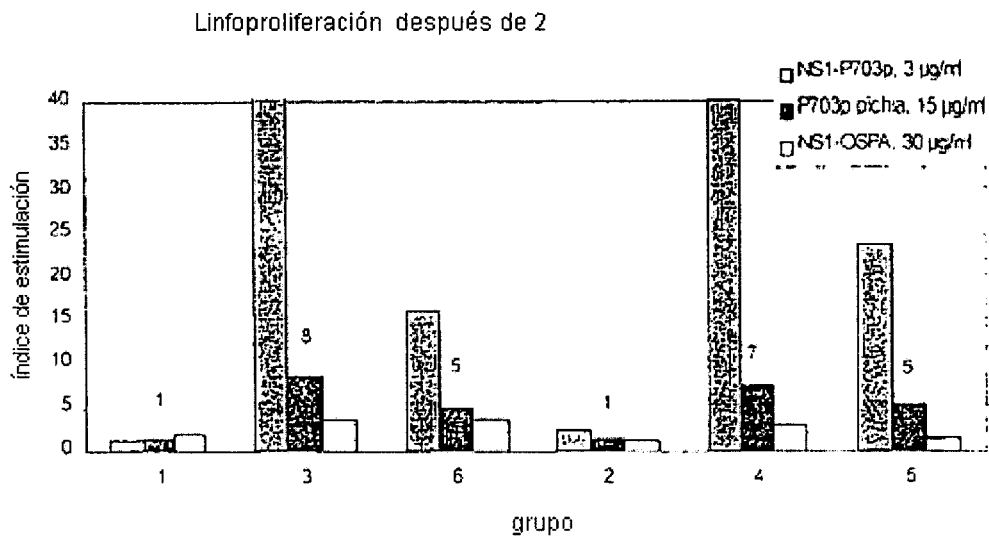


FIG. 9. Linfoproliferación después de la cuarta vacunación de P703

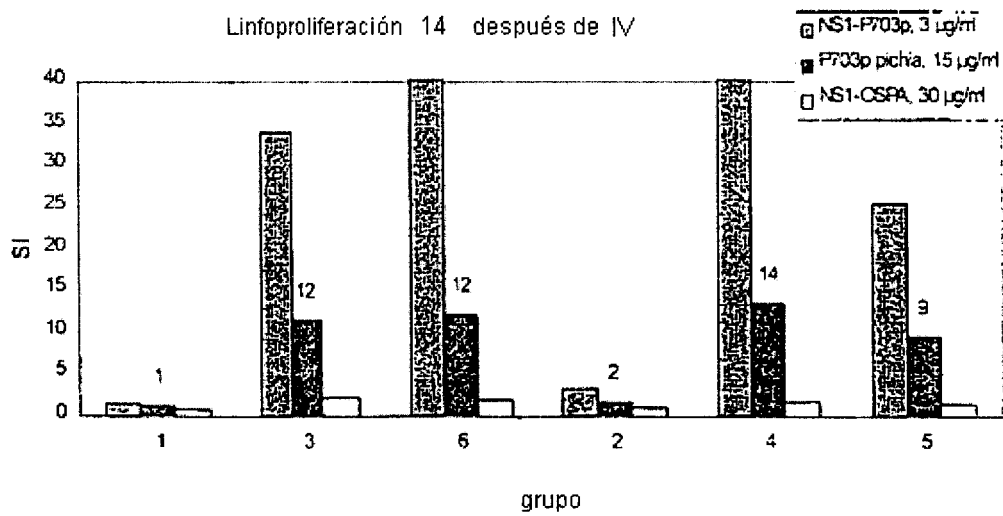


FIG. 10. Titulaciones de anticuerpos anti - NS1-P703 inducidos por la vacunación

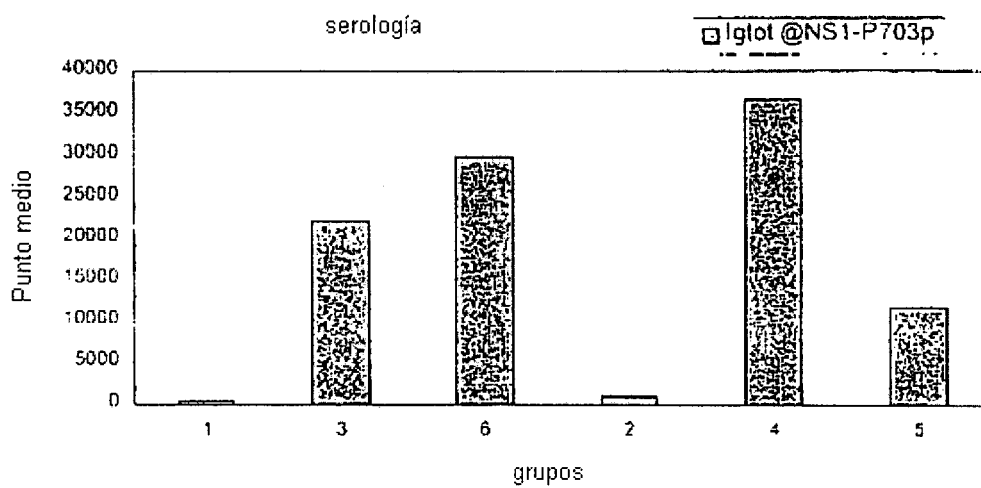


FIG. 11. Distribución de isotipos anti-NS1-P703 inducida por vacunas

