



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 1012890-5 B1**



**(22) Data do Depósito: 08/06/2010**

**(45) Data de Concessão: 22/03/2022**

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO ADJUVANTE AQUOSA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, KIT

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 10/06/2009 GB 0910046.2.

**(73) Titular(es):** GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A..

**(72) Inventor(es):** VERONIQUE HENDERICKX; DOMINIQUE INGRID LEMOINE.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2010058017 de 08/06/2010

**(87) Publicação PCT:** WO 2010/142685 de 16/12/2010

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 09/12/2011

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO ADJUVANTE AQUOSA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, KIT. São fornecidas composições adjuvantes e imunogênicas que compreendem um agonista de TLR-4, e uma saponina em uma formulação lipossomal, e um agente de isotonicidade não iônico, em que a concentração de cloreto de sódio ou força iônica é menor que 100 mM.

“COMPOSIÇÃO ADJUVANTE AQUOSA, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, E, KIT”

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção diz respeito a composições adjuvantes aquosas que compreendem um agente de isotonicidade não iônico e com baixas concentrações de sal, em particular, com concentrações de cloreto de sódio a 100 mM ou menos. A presente invenção também diz respeito a composições imunogênicas que compreendem um antígeno ou preparação de antígeno e as ditas composições adjuvantes aquosas.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Os adjuvantes são usados algumas vezes para melhorar a resposta imune elevada a qualquer antígeno fornecido. Entretanto, a inclusão de adjuvantes em uma vacina ou composição imunogênica aumenta a complexidade da preparação dos componentes, bem como a complexidade de distribuição e formulação da composição da vacina. A preparação de cada um dos componentes adjuvantes, bem como o componente antigênico, tem que ser considerada pelos formuladores. Em particular, a compatibilidade do componente antigênico com o componente adjuvante deve ser considerada. Este é particularmente o caso onde pretende-se que os antígenos liofilizados ou preparações antigênicas sejam reconstituídos com uma preparação adjuvante. Em uma circunstância como esta, é importante que o tampão da preparação adjuvante seja adequado para o antígeno ou preparação antigênica, e que a imunogenicidade ou a solubilidade do antígeno não seja afetada pelo adjuvante.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[003] Observou-se que alguns antígenos são particularmente sensíveis a um fenômeno conhecido como "precipitação por sal", que pode ser definido como a precipitação de uma proteína a partir de

sua solução por saturação com um sal, tal como cloreto de sódio. Observou-se que os antígenos sensíveis podem agregar e precipitar em uma concentração de cloreto de sódio tão baixa quanto 150 mM.

[004] Portanto, a presente invenção fornece uma composição adjuvante isotônica aquosa que compreende um agonista do receptor do tipo Toll (TRL) 4, e uma saponina em uma formulação lipossomal, e um agente de isotonicidade não iônico, em que a concentração de cloreto de sódio na dita composição é menos de 100 mM.

[005] A presente invenção fornece adicionalmente uma composição adjuvante isotônica aquosa que compreende um agonista de TLR-4, e uma saponina em uma formulação lipossomal, e um agente de isotonicidade não iônico, em que a força iônica na dita composição é menos de 100 mM.

[006] Além disso, a presente invenção fornece uma composição adjuvante isotônica aquosa que pode ser usada para uma faixa mais ampla de antígenos proteicos incluindo aqueles que são susceptíveis a "precipitação por sal", bem como aqueles que não são.

[007] A presente invenção também fornece uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação antigênica, e uma composição adjuvante aquosa que compreende um agonista de TLR-4, e uma saponina em uma formulação lipossomal e um agente isotônico não iônico, em que a concentração de cloreto de sódio na dita composição adjuvante é menos de 100 mM, e processos para preparar as ditas composições imunogênicas.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[008] A figura 1 descreve uma curva de atividade lítica de QS21.

[009] A figura 2 mostra o percentual de cada congênera 3D-MPL nas diferentes formulações ASA.

[010] A figura 3 mostra o ciclo de secagem por congelamento usado para a liofilização de PRAME/CpG.

[011] A figura 4 mostra uma comparação ilustrada entre PRAME e NYESO-1 reconstituídos em ASA (NaCl 150 mM) e ASA (sorbitol).

[012] A figura 5 mostra a resposta humoral de camundongos imunizados com PRAME/CpG formulado com diferentes composições adjuvantes no experimento 1.

[013] A figura 6 mostra a proteção do tumor em camundongos imunizados com PRAME/CpG formulado com diferentes composições adjuvantes no experimento 1.

[014] A figura 7 mostra a resposta humoral de camundongos imunizados com PRAME/CpG formulado com ASA (NaCl 150 mM), ASA (sorbitol) ou formulação líquida de ASA (NaCl 70 mM) no experimento 2.

[015] A figura 8 mostra a resposta de CD4+ dos camundongos imunizados com PRAME/CpG formulado com ASA (NaCl 150 mM), ASA (sorbitol) ou formulação líquida de ASA no experimento 2.

[016] A figura 9 mostra a proteção do tumor em camundongos imunizados com PRAME/CpG formulado com ASA (NaCl 150 mM), ASA (sorbitol) ou formulação líquida de ASA no experimento 2.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[017] A presente invenção descreve a substituição ou substituição parcial de um agente de isotonicidade, que é um sal tal como cloreto de sódio, em uma composição adjuvante aquosa com um agente de isotonicidade não iônico.

[018] Sabe-se bem que para a administração parenteral, as soluções podem ser fisiologicamente isotônicas (isto é, apresentam uma osmolalidade farmacologicamente aceitável) para evitar a distorção celular ou

lise. Um "agente de isotonicidade" é um composto que é fisiologicamente tolerado e transmite uma tonicidade adequada a uma formulação (por exemplo, composições imunogênicas da invenção) para prevenir o fluxo líquido de água através das membranas celulares, que estão em contato com a formulação.

[019] As composições adjuvantes aquosas que são conhecidas contêm cloreto de sódio 100 mM ou mais, por exemplo, o sistema adjuvante A (ASA) em WO 2005/112991 e WO2008/142133 ou os adjuvantes lipossomais revelados em WO2007/068907. Da maneira apresentada em WO2008/142133, tais composições adjuvantes podem ser usadas como diluente para reconstituir composições liofilizadas que compreendem antígenos ou preparações antigênicas antes da vacinação. É importante que tais composições reconstituídas sejam isotônicas, isto é, contenham uma concentração de sal substancialmente a mesma daquela encontrada nas células corporais e sanguíneas, de maneira tal que nenhum encolhimento ou expansão celular seja causado na injeção. Em geral, o cloreto de sódio é usado como um agente de isotonicidade. Observou-se que certos antígenos são particularmente sensíveis a "precipitação por sal", um processo por meio do qual as proteínas em solução se agregam ou coagulam quando em soluções contendo altas concentrações de sal.

[020] As concentrações de sal nas quais os antígenos proteicos se agregam variam de proteína para proteína. Foi identificado um grupo de antígenos que se agrega em concentrações relativamente baixas de sal, por exemplo, em cerca de 100 mM ou menos de cloreto de sódio. Isto significa que certas composições adjuvantes conhecidas não são adequadas para a reconstituição ou uso em composições que compreendem estes antígenos, uma vez que a agregação ocorre.

[021] A presente invenção fornece composições adjuvantes aquosas que podem ser usadas como com tais antígenos, isto é,

aqueles antígenos que se agregam em concentrações de sal abaixo de 100 mM de cloreto de sódio. As composições adjuvantes aquosas da invenção compreendem um agonista de TLR-4, e uma saponina em uma formulação lipossomal, e um agente de isotonicidade não iônico, em que a concentração de cloreto de sódio na composição adjuvante é abaixo de cerca de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em uma modalidade particular, a concentração de cloreto de sódio na composição adjuvante é abaixo de 10 mM ou é 5mM ou menos. Em uma modalidade específica adicional, a composição adjuvante é essencialmente livre de cloreto de sódio. Essencialmente livre significa que a concentração de cloreto de sódio é zero mM ou muito próxima a esta (isto é, 1 mM, 2 mM, ou 3 mM).

[022] Os versados na técnica podem testar facilmente a concentração tanto de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) usando técnicas e kits conhecidos. Por exemplo, o sódio pode ser determinado usando um kit, tal como o kit de ensaio enzimático de sódio (Número do catálogo: BQ011 EAEL) da Biosupply. O cloreto pode ser determinado usando um kit, tal como o kit de ensaio enzimático de cloreto (Número do catálogo: BQ006EAEL) da Biosupply.

[023] A presente invenção fornece adicionalmente uma composição adjuvante isotônica aquosa que compreende um agonista de TLR-4, e uma saponina em uma formulação lipossomal, e um agente de isotonicidade não iônico, em que a força iônica é menos de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em uma modalidade particular, a força iônica na composição adjuvante é abaixo de 10 mM ou é 5mM ou abaixo desta. Em uma modalidade específica adicional, a composição adjuvante apresenta uma força iônica que é zero mM ou muito próxima a esta.

[024] A força iônica de uma composição adjuvante ou

imunogênica da invenção pode ser medida usando técnicas conhecidas pelos versados na tecnologia, por exemplo, usando um medidor de condutividade.

[025] Um agente de isotonicidade não iônico adequado para uso em uma composição adjuvante aquosa da invenção, que deve ser combinada com uma composição antigênica, precisará ser adequado para uso em humanos, bem como ser compatível com os antígenos na composição antigênica e adicionalmente compatível com outros componentes da composição adjuvante.

[026] Em particular, a composição adjuvante aquosa tem que ser de maneira tal que os antígenos na composição antigênica, quando combinados com a composição adjuvante, sejam capazes tanto de permanecer na solução quanto manter sua imunogenicidade.

[027] Em uma modalidade da presente invenção, os agentes de isotonicidade não iônicos adequados são polióis, açúcares (em particular, sacarose, frutose, dextrose ou glicose) ou aminoácidos, tal como glicina. Em uma modalidade, o poliol é um álcool de açúcar, especialmente um álcool de açúcar C3-6. Os alcoóis de açúcar exemplares incluem glicerol, ertritol, treitol, arabitol, xilitol, ribitol, sorbitol, manitol, dulcitol e iditol. Em um exemplo específico desta modalidade, um agente de isotonicidade não iônico adequado é o sorbitol. Em uma modalidade particular da invenção, o agente de isotonicidade não iônico nas composições da invenção é sacarose e/ou sorbitol.

[028] Em uma modalidade, uma concentração adequada de poliol na composição adjuvante aquosa é entre cerca de 3 e cerca de 15 % (p/v), em particular, entre cerca de 3 e cerca de 10 % (p/v), por exemplo, entre cerca de 3 e cerca de 7 % (p/v), por exemplo, entre cerca de 4 e cerca de 6 % (p/v). Em um exemplo específico desta modalidade, o poliol é sorbitol.

[029] A composição adjuvante aquosa compreende um agonista do receptor do tipo Toll (TLR) 4, e uma saponina em uma

formulação lipossomal. Isto significa que a saponina e i agonista de TLR-4 são formulados com lipossomos.

[030] O termo "lipossomos", em geral refere-se a estruturas lipídicas uni ou multilamelares (particularmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 lamelares, dependendo do número de membranas lipídicas formadas) incluídas em um interior aquoso. Os lipossomos e as formulações com lipossomo são bem conhecidos na técnica. Os lipídeos, que são capazes de formar lipossomos incluem todas as substâncias com propriedades graxas ou do tipo gordura. Os lipídeos que podem ser os lipídeos nos lipossomos pode ser selecionados do grupo que compreende glicerídeos, glicerofosfolipídeos, glicerofosfinolipídeos, glicerofosfonolipídeos, sulfolipídeos, esfingolipídeos, fosfolipídeos, isoprenolídeos, esteróides, estearinas, esteróis, arqueolipídeos, lipídeos catiônicos sintéticos e lipídeos contendo carboidrato.

[031] Em uma modalidade, os lipossomos compreendem um fosfolipídeo. Os fosfolipídeos adequados incluem (mas sem limitação): fosfocolina (PC) que é um intermediário na síntese de fosfatidilcolina; derivados naturais de fosfolipídeo: fosfocolina de ovo, fosfocolina de soja, fosfocolina de soja hidrogenada, esfingomiéline como fosfolipídeos naturais e derivados sintéticos de fosfolipídeo: fosfocolina (didecanoil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina [DDPC], dilauroilfosfatidilcolina [DLPC], dimiristoilfosfatidilcolina [DMPC], dipalmitoil fosfatidilcolina [DPPC], distearoil fosfatidilcolina [DSPC], dioleoil fosfatidilcolina [DOPC], 1-palmitoil, 2-oleoilfosfatidilcolina [POPC], dielaidoil fosfatidilcolina [DEPC]), fosfoglicerol (1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DMPG], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DPPG], 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DSPG], 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [POPG]), ácido fosfatídico (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-ácido fosfatídico [DMPA], ácido dipalmitoil fosfatídico [DPPA], ácido distearoil-fosfatídico [DSPA]), fosfoetanolaminae (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

[DMPE], 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DPPE], 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina DSPE, 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina [DOPE]), fosfoerina, polietileno glicol [PEG], fosfolípido (mPEG-fosfolípido, poliglicerina-fosfolípido, fosfolípido funcionalizado, fosfolípido terminal ativado). Em uma modalidade, os lipossomos compreendem 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina. Em uma modalidade, a fosfatidilcolina altamente purificada é usada e pode ser selecionada do grupo que compreende fosfatidilcolina (ovo), fosfatidilcolina hidrogenada (ovo), fosfatidilcolina (soja), fosfatidilcolina hidrogenada (soja). Em uma modalidade adicional, os lipossomos compreendem fosfatidiletanolamina [POPE] ou um derivado desta.

[032] O tamanho do lipossomo pode variar de 30 nm a vários  $\mu\text{m}$ , dependendo da composição do fosfolípido e do método usado para sua preparação. Em modalidades particulares da invenção, o tamanho do lipossomo estará na faixa de 50 nm a 500 nm e, em modalidades adicionais, 50 nm a 200 nm. O espalhamento dinâmico da luz laser é um método usado para medir o tamanho dos lipossomos bem conhecidos pelos versados na técnica.

[033] Os lipossomos contêm adequadamente um lipídeo neutro, por exemplo, fosfatidilcolina, que é adequadamente não cristalina em temperatura ambiente, por exemplo, fosfatidilcolina de gema de ovo, dioleoil fosfatidilcolina (DOPC) ou dilauril fosfatidilcolina. Em uma modalidade particular, os lipossomos da presente invenção contêm DOPC. Os lipossomos também podem conter um lipídeo carregado que aumenta a estabilidade da estrutura lipossomo-saponina para lipossomos compostos de lipídeos saturados. Nestes casos, a quantidade de lipídeo carregado é adequadamente 1 a 20 % p/p, preferivelmente 5 a 10 %. A razão de esterol para fosfolípido é 1 para 50 % (mol/mol), adequadamente 20 para 25 %.

[034] Uma saponina particularmente adequada para uso na

presente invenção é Quil A e seus derivados. Quil A é uma preparação de saponina isolada da árvore da América do Sul *Quillaja saponaria Molina* e foi descrita primeiro por Dalsgaard et al. em 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. fur die gesamte Virusforschung, Vol. 44, Springer Verlag, Berlin, p243-254) por apresentar atividade adjuvante. Os fragmentos purificados de Quil A foram isolados por HPLC, que mantém a atividade adjuvante sem a toxicidade associada à Quil A (EP 0 362 278), por exemplo, QS7 e QS21 (também conhecida como QA7 e QA21 ). A QS-21 é uma saponina natural derivada da casca de *Quillaja saponaria Molina*, que induz as células T citotóxicas CD8+ (CTLs), as células Th1 e uma resposta de anticorpo IgG2a predominante. A QS21 é uma saponina preferida no contexto da presente invenção.

[035] Em uma forma adequada da presente invenção, o adjuvante de saponina na composição imunogênica é um derivado de Quil A de *Saponaria molina*, preferivelmente uma fração imunologicamente ativa de Quil A, tal como QS-17 ou QS-21, adequadamente QS-21.

[036] Em uma modalidade específica, a QS21 é fornecida em sua composição menos reatogênica, onde é finalizada com um esterol exógeno, tal como colesterol, por exemplo. Existem várias formas particulares de composições menos reatogênicas em que a QS21 é finalizada com um colesterol exógeno. A saponina/esterol está em uma estrutura de formulação lipossomal (WO 96/33739, Exemplo 1).

[037] Os esteróis adequados incluem  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol e colesterol. Em uma modalidade particular, a composição adjuvante compreende colesterol como esterol. Estes esteróis são bem conhecidos na técnica, por exemplo, colesterol é revelado no índice Merck, 11<sup>a</sup> Edn., página 341, como um esterol de ocorrência natural encontrado em gordura animal.

[038] Onde a fração ativa da saponina é QS21, a razão de

QS21:esterol estará tipicamente na ordem de 1:100 a 1:1 (p/p), adequadamente entre 1:10 a 1:1 (p/p), e preferivelmente 1:5 a 1:1 (p/p). Adequadamente, o esteroi em excesso está presente, a razão de QS21:esterol sendo pelo menos 1:2 (p/p). Em uma modalidade, a razão de QS21:esterol é 1:5 (p/p). O esteroi é adequadamente colesterol.

[039] A composição adjuvante aquosa compreende um agonista do receptor do tipo Toll 4 (TLR-4). "Agonista de TLR" significa um componente que é capaz de causar uma resposta de sinalização por meio de uma via de sinalização de TLR, tanto como um ligante direto quanto indiretamente por meio da geração de ligante endógeno ou exógeno (Sabroe et al, J1 2003 p1630-5). Um agonista de TLR4 é capaz de causar uma resposta de sinalização por meio de uma via de sinalização de TLR-4. Um exemplo adequado de um agonista de TLR-4 é um lipopolissacarídeo, adequadamente um derivado não tóxico de lipídeo A, particularmente monofosforil lipídeo A ou, mais particularmente, monofosforil lipídeo A 3-desacilado (3D- MPL).

[040] O 3D-MPL é vendido com o nome MPL pela GlaxoSmithKline Biologicals N.A. e é referido em todo o documento como MPL ou 3D-MPL. Ver, por exemplo, patentes U.S. 4.436.727, 4.877.611, 4.866.034 e 4.912.094. O 3D-MPL promove principalmente as respostas da célula T CD4+ T com um fenótipo de IFN-g (Th1). O 3D-MPL pode ser produzido de acordo com os métodos revelados em GB 2 220 211 A. Quimicamente, é uma mistura de monofosforil lipídeo A 3-desacilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Nas composições da presente invenção, pequenas partículas de 3D-MPL podem ser usadas para preparar a composição adjuvante aquosa. 3D-MPL de partícula pequena apresenta um tamanho de partícula de maneira tal que possa ser esterilizado por filtração por meio de um filtro de 0,22 µm. Tais preparações são descritas em WO 94/21292. Preferivelmente, o 3D-MPL em pó é usado para preparar as composições adjuvantes aquosas da presente invenção.

[041] Outros agonistas de TLR-4 que podem ser usados são alquil glucosaminida fosfatos (AGPs), tais como aqueles revelados em WO98/50399 ou patente U.S. 6.303.347 (os processos para a preparação de AGPs são também revelados), adequadamente RC527 ou RC529, ou sais farmacologicamente aceitáveis de AGPs, da maneira revelada na patente U.S. 6.764.840.

[042] Outros agonistas de TLR-4 adequados são descritos em WO2003/011223 e em WO 2003/099195, tais como composto I, composto II e composto III revelados nas páginas 4-5 de WO2003/011223 ou nas páginas 3 a 4 de WO2003/099195 e, em particular, aqueles compostos revelados em WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057m ER804058, ER804059, ER804442, ER804680 e ER804764. Por exemplo, um agonista de TLR-4 adequado é ER804057.

[043] As composições adjuvantes aquosas da invenção compreendem tanto uma saponina quanto um agonista de TLR-4. Em uma modalidade particular, a composição adjuvante aquosa compreende QS21 e 3D-MPL.

[044] Um agonista de TLR-4 tal como um lipopolissacarídeo, tal como 3D-MPL, pode ser usado em quantidades entre 1 e 100 µg por dose em humanos da composição adjuvante. O 3D-MPL pode ser usado em um nível de cerca de 50 µg, por exemplo, entre 40 a 60 µg, adequadamente entre 45 a 55 µg, ou entre 49 a 51 µg ou 50 µg. Em uma modalidade adicional, a dose em humanos da composição adjuvante compreende 3D-MPL em um nível de cerca de 25 µg, por exemplo, entre 20 a 30 µg, adequadamente entre 21 a 29 µg, ou entre 22 a 28 µg, ou entre 28 a 27 µg, ou entre 24 a 26 µg, ou 25 µg.

[045] Uma saponina, tal como QS21, pode ser usada em quantidades entre 1 e 100 µg por dose em humanos da composição adjuvante. A QS21 pode ser usada em um nível de cerca de 50 µg, por exemplo, entre 40

a 60 µg, adequadamente entre 45 a 55 µg, ou entre 49 e 51 µg, ou 50 µg. Em uma modalidade adicional, a dose em humanos da composição adjuvante compreende QS21 em um nível de cerca de 25 µg, por exemplo, entre 20 a 30 µg, adequadamente entre 21 a 29 µg, ou entre 22 a 28 µg, ou entre 28 e 27 µg, ou entre 24 e 26 µg, ou 25 µg.

[046] Tanto o agonista de TLR4 quanto a saponina estão presentes na composição adjuvante aquosa, a razão de peso de agonista de TLR4 para saponina é adequadamente entre 1:5 a 5:1, adequadamente 1:1. Por exemplo, onde 3D-MPL está presente em uma quantidade de 50 µg ou 25 µg, então, adequadamente, QS21 também pode estar presente em uma quantidade de 50 µg ou 25 µg, respectivamente, por dose em humanos da composição adjuvante aquosa.

[047] Quando o adjuvante deve ser combinado com uma forma líquida de uma composição antigênica, a composição adjuvante estará em um volume adequado de dose para humanos que é aproximadamente a metade do volume final pretendido da dose de humanos. Por exemplo, um volume de 500 µL de adjuvante para uma dose em humanos final pretendida de 1 mL, ou um volume de 250 µL para uma dose em humanos final pretendida de 0,5 mL. A composição adjuvante é diluída quando combinada com a composição de antígeno para fornecer a dose final de vacina em humanos. O volume final de tal dose variará, certamente, dependendo do volume inicial da composição adjuvante e do volume da composição de antígeno adicionado à composição adjuvante. Em uma modalidade alternativa, o adjuvante aquoso é usado para reconstituir uma composição liofilizada de antígeno. Nesta modalidade, O volume adequado de dose em humanos da composição adjuvante é aproximadamente igual ao volume final da dose em humanos. A composição adjuvante líquida é adicionada ao frasco que contém a composição liofilizada de antígeno e usada para reconstituir a composição liofilizada de antígeno.

[048] A presente invenção, portanto, fornece um processo para preparar uma composição imunogênica que compreende as etapas de reconstituir uma composição liofilizada, que compreende pelo menos um antígeno ou preparação antigênica da maneira aqui descrita com uma composição adjuvante aquosa da maneira aqui definida.

[049] Em uma modalidade adicional da invenção, é fornecido um kit que compreende (i) uma composição liofilizada compreendendo um antígeno ou preparação antigênica, e (ii) uma composição adjuvante aquosa da maneira aqui descrita.

[050] Em uma modalidade particular da invenção, é fornecido um kit que compreende (i) uma composição liofilizada compreendendo um antígeno ou preparação antigênica da maneira aqui descrita, e (ii) uma composição adjuvante aquosa da maneira aqui descrita.

[051] Em uma modalidade, a composição liofilizada compreende adicionalmente um agonista de TLR-9, por exemplo, da maneira apresentada em WO 2008/142133.

[052] Em uma modalidade alternativa, é fornecido um kit em que o CpG não é co-liofilizado com o antígeno. O CpG pode ser tanto misturado com a composição adjuvante aquosa, quanto estar em um frasco separado na forma aquosa ou liofilizada. Dessa maneira, em uma modalidade alternativa, é fornecido um kit que compreende (i) uma composição liofilizada compreendendo um antígeno da maneira aqui descrita; (ii) uma composição adjuvante aquosa; e (iii) um agonista de TLR9 (por exemplo, um oligonucleotídeo de CpG imunoestimulatório).

[053] O agonista de TLR-9 para uso em kits da invenção é um oligonucleotídeo imunoestimulatório, em particular, um oligonucleotídeo que contém um motivo de CpG não metilado. Tais oligonucleotídeos são bem conhecidos e são descritos, por exemplo, em WO 96/02555, WO 99/33488 e U.S. 5.865.462. Os agonistas de TLR9 adequados para uso nas composições

imunogênicas aqui descritas são oligonucleotídeos que contêm CpG, contendo opcionalmente dois ou mais motivos CpG dinucleotídeos separados em pelo menos três, adequadamente pelo menos seis ou mais nucleotídeos. Um motivo de CpG é um nucleotídeo citosina seguido por um nucleotídeo guanina.

[054] Em uma modalidade, a ligação entre os nucleotídeos no oligonucleotídeo é fosforoditioato, ou possivelmente uma ligação fosforotioato, embora o fosfodiéster e outras ligações entre nucleotídeos também possam ser usadas, incluindo oligonucleotídeos com ligações entre nucleotídeos mistas. Os métodos para produzir fosforotioato de oligonucleotídeos ou fosforoditioato são descritos em U.S. 5,666.153, U.S. 5.278.302 e WO95/26204. O oligonucleotídeo que compreende diferentes ligações entre nucleotídeos é contemplado, por exemplo, fosforotioato fosfodiésteres mistos. Outras ligações entre nucleotídeos que estabilizam o oligonucleotídeo podem ser usadas.

[055] Exemplos de oligonucleotídeos CpG adequados para a inclusão nas composições imunogênicas aqui descritas apresentam as sequências a seguir. Em uma modalidade, estas sequências contêm ligações entre nucleotídeos modificados por 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)

[056] Os oligonucleotídeos CpG alternativos podem compreender as sequências anteriores, nas quais apresentam deleções ou adições sem consequência nestas.

[057] A presente invenção fornece adicionalmente uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação

antigênica, e uma composição adjuvante aquosa da maneira aqui descrita, em que a dita composição imunogênica apresenta uma concentração de cloreto de sódio abaixo de cerca de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em uma modalidade particular, a concentração de cloreto de sódio na composição imunogênica é abaixo de 10 mM ou é 5mM ou abaixo de cerca desta. Em uma modalidade específica adicional, a composição imunogênica é essencialmente livre de cloreto de sódio. Essencialmente livre significa que a concentração de cloreto de sódio é zero mM ou muito próxima desta.

[058] A presente invenção fornece adicionalmente uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação antigênica, e uma composição adjuvante aquosa da maneira aqui descrita, em que a força iônica da composição imunogênica é menos de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em uma modalidade particular, a força iônica na composição imunogênica é abaixo de 10 mM, ou é 5mM ou abaixo desta. Em uma modalidade específica adicional, a composição imunogênica apresenta uma força iônica que é zero mM, ou muito próxima desta.

[059] Será evidente que, se a composição imunogênica for preparada usando uma composição liofilizada antigênica que compreende um agonista de TLR-9, então a composição imunogênica também compreenderá um agonista de TLR-9. Portanto, em uma modalidade, é fornecida uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação antigênica, um agonista de TLR9, e um agonista de TLR-4 e uma saponina em uma formulação lipossomal, em que a composição imunogênica apresenta uma concentração de sal abaixo de cerca de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em um exemplo específico desta modalidade, a concentração de cloreto de sódio na composição imunogênica é abaixo de 10 mM, ou é 5mM ou

abaixo desta.

[060] Em uma modalidade adicional, é fornecida uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação antigênica, um agonista de TLR9, e um agonista de TLR-4 e uma saponina em uma formulação lipossomal, em que a força iônica é menos de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em uma modalidade particular, a força iônica na composição imunogênica é abaixo de 10 mM ou é 5mM ou abaixo desta. Em uma modalidade específica adicional, a composição imunogênica apresenta uma força iônica que é zero mM ou muito próximo a esta.

[061] Em uma modalidade adicional, é fornecida uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação antigênica, um agonista de TLR9 e um 3D-MPL e QS21 em uma formulação lipossomal, em que a composição imunogênica apresenta uma concentração de sal abaixo de cerca de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em um exemplo específico desta modalidade, a concentração de cloreto de sódio na composição imunogênica é abaixo de 10 mM, ou é 5 mM ou abaixo desta.

[062] Em uma modalidade adicional, é fornecida uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação antigênica, um agonista de TLR9 e um 3D-MPL e QS21 em uma formulação lipossomal, em que a força iônica é menos de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em uma modalidade particular, a força iônica na composição imunogênica é abaixo de 10 mM, ou é 5mM ou abaixo desta. Em uma modalidade específica adicional, a composição imunogênica apresenta uma força iônica que é zero mM, ou muito próximo a esta.

[063] Em uma modalidade adicional, é fornecida uma composição imunogênica que compreende um antígeno ou preparação

antigênica e 3D-MPL e QS21 em uma formulação lipossomal, e um oligonucleotídeo CpG, em que a composição imunogênica apresenta uma concentração de sal abaixo de cerca de 50 mM, por exemplo, abaixo de cerca de 40 mM, 30 mM, 20 mM ou 15 mM. Em um exemplo específico desta modalidade, a concentração de cloreto de sódio na composição imunogênica é abaixo de 10 mM, ou é 5mM ou abaixo desta.

[064] Em uma modalidade, o antígeno ou preparação antigênica usada nas composições imunogênicas da invenção é qualquer antígeno que precipita, coagula ou se agrega após ser misturado e/ou dissolvido com uma solução que compreende uma concentração de cloreto de sódio maior que 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ou 100 mM.

[065] Em uma modalidade, o antígeno ou preparação antigênica usada nas composições imunogênicas da invenção é qualquer antígeno que precipita, coagula ou se agrega após ser misturado e/ou dissolvido em uma solução em que a força iônica é menos de 100 mM, por exemplo, abaixo de 90 mM, 80 mM, 70 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 15 mM ou 10 mM. Em uma modalidade particular, os antígenos da invenção precipitam, coagulam ou se agregam em soluções com uma força iônica a 5mM ou abaixo desta.

[066] Os versados na técnica podem determinar se um antígeno adequa-se a esta definição, misturando o antígeno em uma solução como esta. Um antígeno que não se adequa a esta definição estará em solução, isto é, o líquido será claro sem nenhuma precipitação 24 horas após ser dissolvido. Um antígeno que precipita, coagula ou se agrega, após ser misturado e/ou dissolvido em uma solução, pode ser observado por inspeção visual para ser precipitado pela nebulosidade da solução. Além disso, a agregação que não é detectável visualmente pode ser observada usando os métodos conhecidos pelos versados na técnica que incluem, mas sem limitação, SEC-HPLC.

[067] Em uma modalidade adicional, o antígeno ou preparação antigênica é derivada de HIV, *Neisseria meningitidis*, ou é um antígeno associado a tumor. Em uma modalidade particular, o antígeno associado a tumor é selecionado tanto de PRAME quanto de NYESO-1, ou um fragmento ou derivado do mesmos.

[068] PRAME (também conhecido como DAGE) é um antígeno que pode ser usado como o antígeno associado a tumor da presente invenção. O antígeno e sua preparação são descritos na patente U.S. 5.830.753. O PRAME é observado na base de dados Annotated Human Gene H-Inv DB com os números de acesso: U65011.1, BC022008.1, AK129783.1, BC014974.2, CR608334.1, AF025440.1, CR591755.1, BC039731.1, CR623010.1, CR61 1321.1, CR618501.1, CR604772.1, CR456549.1, e CR620272.1.

[069] As proteínas de fusão que compreendem o antígeno PRAME também podem ser usadas. O PRAME, ou um fragmento ou derivado do mesmo, pode ser empregado opcionalmente na forma de uma proteína de fusão com um parceiro de fusão heterólogo. Em particular, o antígeno PRAME pode ser adequadamente empregado na forma de uma proteína de fusão com a proteína D de *Haemophilus influenzae* B, ou uma porção desta, ou derivado desta. A porção de proteína D que pode ser empregada adequadamente não inclui a sequência de secreção ou a sequência sinal.

[070] Adequadamente, a proteína parceira de fusão compreende aminoácidos Met-Asp-Pro na terminação N, ou próxima a esta, da sequência de proteína de fusão, e na qual a proteína parceira de fusão não inclui a sequência de secreção ou a sequência sinal de proteína D. Por exemplo, a proteína parceira de fusão pode compreender ou consistir em aproximadamente, ou exatamente, aminoácidos 17 a 127, 18 a 127, 19 a 127 ou 20 a 127 de proteína D. Os antígenos PRAME adequados que baseiam-se

em proteínas de fusão com proteína D são descritos em WO2008/087102, cujo documento é aqui incorporado pela referência na sua íntegra.

[071] NY-ESO-1 é um outro antígeno que pode ser usado como o antígeno associado a tumor da presente invenção. NY-ESO-1, ou um fragmento ou derivado do mesmo, pode ser empregado opcionalmente na forma de uma proteína de fusão com um parceiro de fusão heterólogo. NY-ESO-1 é descrito em U.S. 5804381, cujo documento é aqui incorporado pela referência na sua íntegra. A proteína NY-ESO-1 apresenta aproximadamente 180 aminoácidos em tamanho e pode ser descrita como sendo composta de três regiões: (a) uma região N-terminal tendo cerca de aminoácidos 1-70 (b) uma região central tendo cerca de aminoácidos 71-134 e (c) uma região C terminal tendo cerca de aminoácidos 135-180. O NY-ESO-1 pode ser empregado como uma proteína de fusão, por exemplo, como uma fusão com LAGE-1, que é um antígeno CT adicional, ou um fragmento deste, ver WO2008/089074 cujo documento é aqui incorporado pela referência na sua íntegra. Onde os fragmentos de NY-ESO-1 são empregados, estes incluem adequadamente um ou mais epítomos MHC de classe 1 ou classe 2, por exemplo, aqueles conhecidos como A31, DR1, DR2, DR4, DR7, DP4, B35, B51, Cw3, Cw6 e A2 (ver WO2008/089074).

[072] Embora não seja sensível ao NaCl como tal, um antígeno adicional que pode ser empregado de acordo com a presente invenção, é um antígeno MAGE, ou um fragmento ou derivado do mesmo, por exemplo, da família MAGE-3, tal como MAGE-A3. Os antígenos MAGE-3, por exemplo, foram descritos como adequados para serem formulados em combinação com NY-ESO-1, ver WO2005/105139, cujo documento é aqui incorporado pela referência na sua íntegra.

[073] Os antígenos MAGE, tal como MAGE-A3, podem ser usados como tal ou na forma de um derivado, por exemplo, um derivado quimicamente modificado e/ou na forma de uma proteína de fusão com um

parceiro de fusão heterólogo. Por exemplo, o antígeno MAGE pode conter pontes de dissulfeto reduzidas para formar tióis livres que foram derivados, por exemplo, com grupos de carboxamida ou carboximetil, ver WO99/40188, cujo documento é aqui incorporado pela referência na sua íntegra. Em particular, os antígenos MAGE podem ser adequadamente empregados na forma de uma proteína de fusão com a proteína D de *Haemophilus influenzae* B, ou uma porção desta ou derivado desta. Por exemplo, aproximadamente o primeiro terço da proteína D ou os aminoácidos 100 a 110 N-terminal da proteína D podem ser empregados como o parceiro de fusão, ver WO99/40188.

[074] Em uma modalidade adicional, o antígeno ou composição antigênica pode ser um derivado de qualquer dos antígenos aqui descritos. Da maneira aqui usada, o termo "derivado" refere-se a um antígeno que é modificado com relação à sua forma de ocorrência natural. Os derivados da presente invenção são suficientemente similares aos antígenos naturais para manter as propriedades antigênicas, e permanecerem capazes de permitir uma resposta imune maior contra o antígeno natural. Se um dado derivado aumenta ou não, uma resposta imune como esta pode ser medida por um ensaio imunológico adequado, tal como um ELISA ou citometria de fluxo.

[075] O termo "fragmento", da maneira aqui usada, refere-se aos fragmentos de um antígeno associado a tumor, ou derivado do antígeno que contém pelo menos um epítipo, por exemplo, um epítipo CTL, tipicamente um peptídeo de pelo menos 8 aminoácidos. Os fragmentos de pelo menos 8, por exemplo, 8-10 aminoácidos ou até 20, 50, 60, 70, 100, 150 ou 200 aminoácidos em tamanho são considerados no escopo da invenção, contanto que o fragmento demonstre antigenicidade, isto quer dizer que os principais epítipos (por exemplo, epítipos CTL) são mantidos pelo fragmento, e o fragmento é capaz de induzir uma resposta imune que reage de maneira cruzada com o antígeno associado ao tumor de ocorrência natural. Os

fragmentos exemplares podem apresentar 8-10, 10- 20, 20-50, 50-60, 60-70, 70-100, 100-150, 150-200 resíduos de aminoácido em tamanho (inclusive de qualquer valor nestas faixas).

[076] A presente invenção fornece uma composição imunogênica da maneira aqui descrita para uso na medicina, em particular no tratamento e/ou na prevenção de doença. A presente invenção fornece adicionalmente uma composição imunogênica da maneira aqui descrita para uso no tratamento imunoterapêutico do câncer.

[077] Em exemplos específicos desta modalidade, a invenção fornece uma composição imunogênica da maneira aqui descrita para uso no tratamento imunogênico de um ou mais cânceres selecionados do grupo que consiste em cânceres de próstata, mama, colorretal, pulmão, pancreático, renal, ovariano ou melanoma.

[078] A presente invenção fornece adicionalmente um método de terapia ou profilaxia de câncer em um individual que precisa deste, compreendendo a etapa de fornecer ao dito individuo uma quantidade efetiva de uma composição imunogênica da maneira aqui descrita.

[079] Em exemplos específicos desta modalidade, a invenção fornece um método de terapia ou profilaxia de um câncer selecionado do grupo que consiste em cânceres de próstata, mama, colorretal, pulmão, pancreático, renal, ovariano ou melanoma.

[080] A presente invenção será agora descrita adicionalmente por meio dos exemplos não limitantes a seguir.

### **Exemplos**

#### **Exemplo 1: Preparação de composição adjuvante ASA (sorbitol)**

[081] Foi preparada uma composição adjuvante que compreendeu MPL 3-desacilado e QS21 em uma formulação lipossomal. Esta foi preparada da maneira a seguir:

#### **A. Método da preparação de lipossomos:**

[082] Uma mistura de lipídeo (tal como fosfatidilcolina sintética), colesterol e MPL 3-O-desacilado em solvente orgânico foi seca a vácuo. Uma solução aquosa (tal como salina tamponada com fosfato [NaCl 100 mM, fosfato 20 mM, pH 6,1]) foi então adicionada e o vaso foi agitado até que todo o lipídeo estivesse em suspensão. Esta suspensão foi então pré-homogeneizada com misturador de alto cisalhamento, e a seguir homogeneizado em alta pressão até que os tamanhos dos lipossomos fossem reduzidos em torno de 90 nm +/- 10 nm, medidos por DLS. Os lipossomos foram então esterilizados por filtração.

## **B. Formulação de ASA:**

### **Etapa 1: Diluição de lipossomos concentrados**

O tampão de Na<sub>2</sub>/K fosfato 100 mM pH6,1, quando diluído 10 vezes, foi adicionado à água para injeção para atingir uma concentração de tampão fosfato 10 mM na formulação final. Uma solução de sorbitol 30 % (p/v) em água para injeção (WFI) foi então adicionada para atingir uma concentração de 4,7 % na formulação final, esta foi agitada por 15 a 45 minutos em temperatura ambiente.

[083] Os lipossomos concentrados (preparados a partir de DOPC, colesterol e MPL a 40mg/mL, 10mg/mL e 2mg/mL, respectivamente) foram então adicionados à mistura para atingir uma concentração de 100 µg/mL de MPL na formulação final.

[084] A mistura foi agitada subsequentemente por 15 a 45 minutos em temperatura ambiente.

### **Etapa 2: Adição de QS21**

[085] Usando uma bomba peristáltica, uma carga volumétrica de QS21 (descongelado por 24 horas em RT ou 2 dias a 4 °C para 200 mL) foi adicionado com uma bomba peristáltica em uma taxa de 200 mL/min aos lipossomos diluídos em agitação magnética para atingir uma concentração de 100 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada por 15

a 45 minutos.

[086] A formulação final de ASA continha 100 µg de MPL/mL e 100 µg de QS21/mL.

### **Etapa 3: pH conferido para ser 6,1+/-0,3**

### **Etapa 4: Esterilização por filtração**

[087] A esterilização por filtração foi realizada em uma taxa constante de 400 mL/min em um filtro de polietersulfona (PES) da PALL Corporation.

### **Etapa 5: Armazenamento a +2 °C a +8 °C.**

[088] A composição adjuvante obtida, a qual compreendeu MPL 3-O-desacilado e QS21 em uma formulação lipossomal, e continha sorbitol (determinado ASA (sorbitol)), foi então armazenada a 4 °C.

### Exemplo 2: Preparação de composição adjuvante ASA (NaCl 150 mM)

#### **A. Método da preparação de lipossomos:**

[089] Uma mistura de lipídeo (tal como fosfatidilcolina sintética), colesterol e MPL 3-desacilado (3D-MPL) em solvente orgânico foi seca a vácuo, a salina tamponada com fosfato foi então adicionada e o vaso foi agitado até que todo o lipídeo estivesse em suspensão. Esta suspensão foi então pré-homogeneizada com misturador de alto cisalhamento e então homogeneizado em alta pressão até que os tamanhos de lipossomos fossem reduzidos em torno de 90 nm +/- 10 nm medido por DLS. Os lipossomos foram então filtrados por esterilização em membrana PES 0,22µm.

#### **B. Formulação de ASA:**

Etapa 1: Diluição de lipossomos concentrados

[090] O tampão Na<sub>2</sub>/K fosfato 100 mM pH 6,45, quando diluído 10 vezes, e NaCl 1,5 M foram adicionados à água para injeção para atingir respectivamente as concentrações de fosfato 10 mM e NaCl 150 mM na formulação final. Esta mistura foi agitada por 5 minutos em temperatura

ambiente. Os lipossomos concentrados (preparados a partir de DOPC, colesterol e MPL a 40 mg/mL, 10 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente) foram então adicionados à mistura para atingir uma concentração de 100 µg/mL de MPL na formulação final. A mistura foi agitada subsequentemente por 5 a 15 minutos em temperatura ambiente.

#### Etapa 2: Adição de QS21

[091] A carga volumétrica de QS21 (descongelada por 24 horas em RT ou 2 dias a 4 °C para 200 mL) foi adicionado aos lipossomos diluídos em agitação magnética para atingir uma concentração de 100 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada em RT.

Etapa 3: O pH foi conferido para ser 6,1 +/- 0,1.

#### Etapa 4: Esterilização por filtração

[092] A esterilização por filtração foi realizada em um filtro de polietersulfona (PES) da PALL Corporation.

#### Etapa 5: Armazenamento +2 °C a +8 °C

[093] A composição final de ASA tinha 2 mg de DOPC, 500 µg de colesterol, 100 µg de MPL 3-O-desacilado, 100 µg de QS21 por 1 mL.

#### Exemplo 3. Atividade lítica de QS21

[094] QS21 é conhecida por lisar as células vermelhas do sangue (RBC). A composição adjuvante de ASA (sorbitol) preparada no exemplo 1 foi testada para garantir que a atividade lítica de QS21 fosse finalizada da mesma maneira observada na composição adjuvante equivalente que compreende NaCl 150 mM (ASA (NaCl 150 mM)).

[095] A atividade lítica de QS21 foi medida por um ensaio de hemólise usando células vermelhas do sangue de galinha (RBC). As RBC foram centrifugadas a 550 g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi cuidadosamente ressuspenso em tampão PBS para atingir o volume inicial, e a mesma operação foi repetida até que o sobrenadante não

fosse mais vermelho (em geral 3 vezes). O precipitado foi armazenado a 4 °C por 3 a 4 dias no máximo, se não for usado diretamente (e lavado novamente no dia que é usada), ou foi diluído em torno de 10 vezes em tampão se for usado no mesmo dia.

[096] Uma curva de faixa de dose de QS21 foi preparada em tampão ASA (em tampão de sal ou sorbitol após a amostra de ASA ser testada) extemporaneamente e as amostras adjuvantes (contendo um equivalente de 50 µg ou 90 µg de QS21, o que significa o equivalente de 500 µL ou 900 µL de ASA) foram preparadas. O volume final foi ajustado a 900 µL em padrões e amostras com tampão adequado (contendo ou não sorbitol em função do tampão da amostra testada). Em virtude de sua opalescência, ASA interfere na densidade ótica (OD). Os “brancos” de ASA foram assim preparados e sua OD foi subtraída da OD das amostras de ASA testadas. Estes brancos corresponderam ao mesmo volume de ASA do volume testado nas amostras, mas foram ajustados em 1 mL com tampão. Nenhuma RBC foi adicionada a estes brancos. Os padrões e amostras foram então incubados com RBC (100 µL de RBC diluídas adicionadas a 900 µL de padrões e amostras) por 30 minutos em temperatura ambiente (RT). As amostras foram então centrifugadas 5 minutos a 900 g. A densidade ótica a 540 nm foi medida após a centrifugação.

[097] A determinação da atividade lítica foi realizada por um teste limite.

[098] 1. Limite de detecção (LOD) foi definido como a menor concentração de QS21, levando a uma OD:

- Maior que o nível base (OD>0,1),
- Em torno de três vezes maior que a OD do tampão (o "0 µg" de QS21),
- Na parte ascendente da curva,
- Determinado para cada teste.

[099] 2. A atividade lítica de QS21 foi mantida para ser positiva nas amostras adjuvantes se a OD para a amostra adjuvante for maior que a OD<sub>LOD</sub>.

Exemplo da curva de QS21:

ug QS21	OD	QS21 finalizada
0	0,029	NA
0,5	0,052	< LOD
0,6	0,073	< LOD
0,7	0,091	< LOD
0,8	0,096	< LOD
0,9	0,12	> 98,2%
1	0,195	> 98%
1,1	0,212	> 97,8%
1,2	0,348	> 97,6%
1,3	0,479	> 97,4%
1,4	0,612	> 97,2%
1,5	0,669	> 97%
2	1,139	> 96%
2,5	1,294	> 95%
3	1,391	> 94%
5	1,416	> 90%
Adjuvante *	0,03	> 98,2 %

\*50ug de QS21 equivalente testadas. Tampão de cloreto de sódio 150 mM.

[0100] O limite de detecção neste ensaio é em 0,9ug de QS21, e OD de 0,12.

[0101] A finalização de QS21 em uma composição adjuvante que compreende cloreto de sódio 150 mM foi estimada sendo mais que 98,2 % para o equivalente de 50 µg de QS21 testada. No caso de um equivalente de 90 µg testado, a conclusão é mais de 99 %.

[0102] A finalização de QS21 foi então comparada com uma composição adjuvante equivalente que compreende sorbitol e apenas cloreto de sódio 5mM. Os dados foram gerados após armazenamento do ASA a 4 °C, ou após a estabilidade acelerada (7 dias a 37 °C). Para o ASA em sorbitol, a curva padrão de QS21 foi realizada em um tampão contendo sorbitol.

Amostra	Ponto de tempo	LOD	QS21 finalizada
Composição adjuvante (ASA) NaCl 150 mM	T0	< 1,4	> 97,2%
	7d 37°C	< 0,9	> 98,2%
Composição adjuvante (ASA) sorbitol, NaCl 5 mM	T0	< 2	> 97,8%

	7D 37°C	<1	> 96%
	11M 4°C	<2	> 97,8%*

Equivalente de 50 µg de QS21 testada, exceto \*, que é equivalente de 90 µg de QS21 testada.

[0103] Concluiu-se QS21 foi finalizada adequadamente em um tampão com pouco cloreto de sódio.

Exemplo 4: Congêneres de MPL.

[0104] Quimicamente, 3D-MPL é uma mistura de monofosforil lipídeo A 3-desacilado com 4, 5 ou 6 cadeias aciladas. Cada molécula separada de 3D-MPL é denominada um congênere. É importante que a composição de congênere permaneça constante, sem nenhuma mudança entre a proporção de congêneres. Também é importante que qualquer tampão usado possibilite que a composição de congênere seja a mesma nos lipossomos concentrados usados para preparar a composição adjuvante.

[0105] Da maneira mostrada na figura 2, a composição de congênere foi examinada em lipossomos concentrados 3D-MPL (Lipossomos concentrados LIP07-217, primeira coluna da figura 2), uma composição adjuvante que compreende lipossomos 3D-MPL e QS21 em um tampão de NaCl 150 mM (NaCl adjuvante 150 mM, ou ASA (NaCl 150 mM), segunda coluna), e uma composição adjuvante que compreende lipossomos 3D-MPL e QS21 em um tampão de sorbitol e NaCl 5mM (Sorbitol adjuvante, ou ASA (sorbitol), colunas 3-7).

[0106] A composição de congênere também foi examinada em dois lotes de ASA (sorbitol) adjuvante no dia 0 e 7 dias após a preparação e manutenção a 37 °C, para garantir que não haveria nenhuma evolução com o tempo (ver as quatro colunas finais da figura 2).

[0107] A distribuição relativa de congêneres de MPL tetra, penta e hexa-acilados em amostras de lipossomos concentrados ou ASA (sorbitol) foi determinada por detecção de IP-HPLC-Fluo (ARD). Tanto os padrões quanto as amostras foram derivados com dansil-hidrazina, que

introduz um cromóforo flúor-ativo na parte principal do dissacarídeo. As amostras derivadas foram analisadas em uma coluna de fase reversa C18 usando hidróxido de tetrabutilamônio (TBAOH) como um reagente de par de íon. Os congêneres que contêm os mesmos números de grupos de acila graxa foram eluídos em grupos distintos (tetracila, pentacila e hexacila). A distribuição de congêneres é deduzida comparando a área do pico de cada grupo com a área do pico total de todos os congêneres de MPL.

[0108] A figura 2 mostra o percentual de cada congêneres. Nenhuma diferença significativa na composição de congêneres foi observada entre os tampões adjuvantes, e a composição de congêneres foi consistente com o tempo no tampão de sorbitol.

Exemplo 5: Preparação de composições e usos no exemplos 6 e 7.

### **5.1 Preparação de PRAME com CpG (CpG 2006 é usado em todos os exemplos)**

5.1.1 Preparação de PRAME com CpG com ASA (NaCl 150 mM) usado no exemplo 6 e exemplo 7, experimento 1 e experimento 2

[0109] Uma solução de sacarose a 30 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi adicionada à água para injeção para atingir uma concentração de sacarose de 5 %. O tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão 75 mM. O tampão borato 100 mM pH 9,8 foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão borato 5 mM. Uma solução de poloxamer 188 a 10 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 0,313 %. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. A solução de CpG em concentração de cerca de 20 mg/mL (em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 1.050 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. O antígeno PRAME foi então adicionado para atingir uma

concentração proteica de 1.250 µg/mL. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 15 minutos em RT. O pH foi conferido (9,51). A mistura obtida foi preenchida por 0,5 mL em frascos de vidro de 3 mL e então seca por congelamento.

[0110] A figura 3 ilustra o ciclo de secagem por congelamento usado para PRAME (duração= 40 h).

[0111] A torta de liofilização resultante foi reconstituída com 625 µL de composição adjuvante aquosa preparada no exemplo 2, compreendendo NaCl 150 mM. A torta de liofilização continha um excesso de 1,25 vezes de dose de antígeno para apresentar a razão correta de antígeno/adjuvante após a reconstituição com uma composição final de Tris 16 mM, borato 4 mM, sacarose a 4 %, Poloxamer 188 a 0,24 %, 840 µg/mL de CpG e 1.000 µg/mL de PRAME.

5.1.2 Preparação de PRAME com CpG para "formulação líquida" (NaCl 70 mM) no experimento 1 do exemplo 7.

Preparação de adjuvante concentrado

[0112] O PBS Mod concentrado 10 vezes, pH 6,1, quando diluído 10 vezes, foi adicionado à água para injeção para atingir um tampão concentrado 1 vez na formulação final. Uma solução pré-misturada feita de lipossomos e QS21 pré-diluída em 400 µg/mL foi preparada separadamente. A pré-mistura foi misturada magneticamente por 15 minutos em temperatura ambiente. Os lipossomos concentrados usados na pré-mistura são feitos de 40mg/mL de DOPC, 10mg/mL de colesterol e 2mg/mL de MPL 3-desacilado. A pré-mistura foi adicionada ao PBS para atingir uma concentração de MPL de 200 µg/mL e uma QS21 concentração de 200 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente por 15 a 30 minutos em RT. O CpG em torno de 23mg/mL foi então adicionado para atingir uma concentração final de 1.680 µg/mL. A mistura foi agitada magneticamente por 15 a 30 minutos em RT. O pH foi conferido de maneira que seja 6,1 +/- 0,1. O AS foi filtrado

em filtro PES de 0,22 µm e armazenado a 4 °C até o uso.

#### Formulação final

[0113] Sacarose 25 %, borato 25 mM pH 9,8 e Lutrol 10 % foram adicionados à WFI para atingir respectivamente 9,25 %, 5 mM e 0,24 % na formulação final. A preparação AS + CpG concentrada 2 vezes foi adicionada, resultando na formulação final concentrada 1 vez. A mistura foi agitada por 5 minutos em RT. O antígeno PRAME em sacarose 3,15 %, borato 5 mM, foi então adicionado e a mistura foi agitada por 5 minutos em RT.

#### 5.1.3 Preparação de PRAME com CpG para "formulação líquida" no experimento 2 de Exemplo 7.

##### Preparação de adjuvante concentrado

[0114] O ASA para a formulação líquida foi preparado da maneira a seguir. O tampão fosfato 1 M (pH 6,1, quando diluído 100 vezes) foi adicionado em agitação magnética à WFI para atingir uma concentração final de 45mM, levando-se em consideração a concentração de fosfato 50 mM nos lipossomos concentrados. O sorbitol 35 % foi então adicionado para atingir uma concentração final de 21,15 %. Os lipossomos concentrados preparados a partir de 40mg/mL de DOPC, 10mg/mL de colesterol e 2mg/mL de MPL 3-desacilado foram adicionados à mistura para atingir uma concentração final de MPL de 450 µg/mL. O volume de QS21 (em torno de 5.000 µg/mL) foi adicionado para atingir uma concentração final de QS21 de 450 µg/mL. A mistura é agitada por 15 minutos em RT. O pH foi conferido e ajustado para pH 6,1 +/- 0,1. A concentração final desta ASA foi respectivamente 450 µg/mL para MPL, 450 µg/mL para QS21, fosfato 45 mM, NaCl 22,5 mM, 21,15 % de sorbitol.

##### Formulação final

[0115] Uma solução de sacarose a 30 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi adicionada à água para injeção para atingir uma

concentração de sacarose de 4 % em formulação final. O tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0 foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão Tris 16 mM na formulação final. O tampão borato 100 mM pH 9,8 foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão borato 4 mM na formulação final. Uma solução de poloxamer 188 a 10 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 0,24 % na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. A solução de CpG em concentração de cerca de 20 mg/mL (em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 840 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. O tampão do antígeno PRAME (Borato 5 mM, sacarose 3,15 %, pH 9,8) foi então adicionado para ajustar a concentração do antígeno PRAME em 1.000 µg/mL. O antígeno PRAME foi então adicionado para atingir uma concentração proteica de 8 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 15 minutos em RT. Um AS concentrado 4,5 vezes em sorbitol foi adicionado para atingir concentrações finais de 100 µg/mL de MPL e QS21. O pH foi conferido (+/- 8,0).

#### 5.1.4 Preparação de PRAME com CpG para ASA (sorbitol) e ASA (sacarose) no experimento 1 do exemplo 7

[0116] Uma solução de sacarose a 30 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi adicionada à água para injeção para atingir uma concentração de sacarose de 5 % em formulação, o tampão borato 100 mM pH 9,8 foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão borato 5 mM nesta formulação, o tampão Tris-HCl 100 mM pH 9,0 diluído 20 vezes foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão Tris 5 mM nesta formulação. Uma solução de poloxamer 188 a 10 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 0,3 % na formulação. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5

minutos em RT. A solução de CpG em concentração de cerca de 20 mg/mL (em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 1.050 µg/mL na formulação. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. O antígeno PRAME foi então adicionado para atingir uma concentração proteica de 1.250 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 15 minutos em RT. O pH foi medido em 9,4. A mistura obtida foi preenchida por 0,5 mL em frascos de vidro de 3 mL e então seca por congelamento.

[0117] O ASA (sorbitol) foi preparado da maneira mencionada no exemplo 1 com muito pouca diferença: a concentração de sorbitol foi 4,6 % e QS21 foi pré-diluída em 400 µg/mL antes da adição dos lipossomos concentrados diluídos.

[0118] O ASA (sacarose) foi preparado da maneira mencionada no exemplo 1 com as diferenças as seguir: o sorbitol é substituído por sacarose (uma solução estoque de solução de sacarose 30 % p/v é usada e a concentração final de sacarose é 8,3 %) e a QS21 foi pré-diluída em 400 µg/mL antes da adição nos lipossomos concentrados diluídos.

[0119] A torta de liofilização resultante foi reconstituída com 625 µL de composição adjuvante aquosa e a composição final compreendeu Tris 4 mM, borato 4 mM, sacarose 4 %, Poloxamer 188 0,24 %, CpG 840 µg/mL e 1.000 µg/mL de PRAME.

#### 5.1.5 Preparação de PRAME com CpG para ASA (sorbitol) no experimento 2 do exemplo 7

[0120] Uma solução de sacarose a 30 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi adicionada à água para injeção para atingir uma concentração de sacarose de 5 % na formulação. O tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0 diluído 59 vezes foi então adicionado para atingir uma concentração de tampão Tris 20 mM nesta formulação, o tampão borato 100 mM pH 9,8 diluído 20 vezes foi então adicionado para atingir uma concentração de

tampão borato 5 mM nesta formulação. Uma solução de poloxamer 188 a 10 % (p/v) (preparada em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 0,3 % na formulação. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. A solução de CpG em concentração de cerca de 20 mg/mL (em água para injeção) foi então adicionada para atingir uma concentração de 1.050 µg/mL na formulação. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 5 minutos em RT. O antígeno PRAME foi então adicionado para atingir uma concentração proteica de 1.250 µg/mL na formulação final. A mistura foi agitada magneticamente (150 rpm) por 15 minutos em RT. O pH foi medido em 9,1. A mistura obtida foi preenchida por 0,5 mL em frascos de vidro de 3 mL e então seca por congelamento.

[0121] O ASA sorbitol foi preparado da maneira descrita no exemplo 1. A torta de liofilização resultante foi reconstituída com 625 µL de composição adjuvante aquosa e a composição final compreendeu Tris 16 mM, borato 4mM, sacarose 4 %, Poloxamer 188 0,24 %, 840 µg/mL de CpG e 1.000 µg/mL de PRAME.

## **5.2 Preparação de NY-ESO1 com CpG**

### **5.2.1 Preparação de NY-ESO1 com CpG no exemplo 6.**

[0122] O tampão Na/K<sub>2</sub> fosfato 200 mM pH 6,3 diluído 20 vezes foi adicionado em agitação magnética à água para injeção para atingir 12,5 mM na formulação final. Os excipientes a seguir foram então adicionados à mistura e na seguinte ordem: monotioglicerol a 10 % p/v para atingir 0,3125 % no final, Poloxamer 188 a 5 % p/v para atingir 0,0625 %, sacarose a 25 % para atingir 5 % no final e base L-Arginina 287 mM para atingir 6,25mM. O volume de CpG em torno de 20mg/mL foi então adicionado a esta mistura para atingir uma concentração de 1.050 µg/mL na formulação final. A mistura foi mantida em agitação magnética (em torno de 150 rpm) em temperatura ambiente por 10 minutos. O pH foi conferido e,

dessa maneira, foi 7,1 +/- 0,3. A agitação magnética aumentou para criar um vortex. NY-ESO1 foi então adicionado para atingir uma concentração final de 750 µg/mL. A agitação magnética foi então diminuída em torno de 150 rpm e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota foi obtida para checar o pH final (que deve ser 7,02). O volume final foi então seco por congelamento.

[0123] A torta de liofilização resultante foi reconstituída com 625 µL de tampões de ASA (NaCl 150 mM e sorbitol).

Exemplo 6. Prevenção de "precipitação por sal" na composição adjuvante que compreende sorbitol como tampão.

[0124] A figura 4 demonstra que reduzir a concentração de sal para 5mM e incluir o sorbitol na composição adjuvante previne a "precipitação por sal" tanto de PRAME quanto de NY-ESO-1 nas composições imunogênicas (da maneira preparada no exemplo 5.1.1 e 5.2.1, respectivamente). Na figura 4:

[0125] 1. O antígeno PRAME reconstituído em tampão de ASA NaCl 150 mM.

[0126] 2. O antígeno PRAME reconstituído em tampão de ASA sorbitol.

[0127] 3. O antígeno NYESO-1 reconstituído em tampão de ASA NaCl 150 mM.

[0128] 4. O antígeno NYESO-1 reconstituído em tampão de ASA sorbitol.

[0129] A figura 4 é uma comparação fotográfica entre PRAME e NYESO-1 reconstituídos em ASA (NaCl 150 mM) e ASA (sorbitol). Como pode ser observado, PRAME reconstituído em ASA (NaCl 150 mM) aparece embaçado comparado ao PRAME reconstituído em ASA (sorbitol). Similarmente, o NY-ESO reconstituído em ASA (NaCl 150 mM) aparece embaçado comparado ao antígeno de NY-ESO reconstituído em ASA

(sorbitol).

Exemplo 7. Modelo de camundongo *in vivo*

Experimento 1:

[0130] Sete grupos de vinte camundongos CBF1 fêmeas (híbridos de camundongos C57BL/6 e Balb/C) de 6 a 8 semanas foram imunizados duas vezes intra-muscularmente (a cada duas semanas, em injeções alternadas nos músculo gastrocnêmio esquerdo e direito) com a proteína de PRAME formulada em uma dose fixa de ASA + CpG, o que corresponde a 1/10 de uma dose humana (50 µL que contêm 5 µg de MPL, 5 µg de QS21 e 42 µg de CpG7909). 14 dias após a última imunização, quatro grupos de camundongos (n=8 cada grupo) foram desafiados subcutaneamente com células tumorais 10e5 CT26-PRAME, da maneira descrita a seguir. Os sete grupos de camundongos foram:

- grp1: tampão,
- grp2: PRAME co-liofilizado + CpG ressuspenso no ASA "clássico" (NaCl 150 mM), em que a proteína PRAME precipita,
- grp3: PRAME co-liofilizado + CpG ressuspenso em ASA (sacarose),
- grp4: PRAME co-liofilizado + CpG resuspenso em ASA (sacarose, incubação por 48 horas a 25 °C),
- grp5: PRAME co-liofilizado + CpG ressuspenso em ASA (sorbitol),
- Grp6: PRAME + ASA – formulação "líquida" contendo NaCl 70 mM + CpG,
- grp7: PRAME + ASA - formulação "líquida" contendo NaCl 70 mM + CpG (+ poloxamer).

[0131] 7 dias após a última imunização, a resposta celular pela capacidade da célula T secretar citocinas (n=4 grupos de 3 camundongos) foi analisada.

[0132] Todos os camundongos receberam 0,4 µg de PRAME em 1/10 de dose em humanos de ASA + sistema adjuvante CpG (5 µg de MPL, 5 µg de QS21 e 42 µg de CpG).

### **Resultados:**

#### **Crescimento do tumor**

[0133] O crescimento médio do tumor com o tempo, medido pela superfície (mm<sup>2</sup>) (+SD), por grupo é representado na figura 6. O PRAME formulado em ASA (NaCl 150 mM) + CpG e o PRAME na formulação líquida de ASA induzem uma menor proteção do tumor (maior crescimento do tumor) que o PRAME ASA (sorbitol) + CpG.

[0134] **Resposta celular** (7 dias após 2 imunizações, n=4 grupos de 3 camundongos por grupo de tratamento):

[0135] A frequência de células T CD4 e CD8 capazes de produzir citocinas do tipo IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , após a imunização de camundongos com o antígeno de tumor PRAME ASA-CpG, é usada para refletir a capacidade das diferentes formulações induzirem uma resposta celular funcional. 7 dias após a segunda imunização, os percentuais de células T CD4 e CD8 que produzem citocinas (IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ) foram medidos por coloração de citocina intracelular (ICS) em células de baço de camundongos imunizados.

[0136] O % de CD4 que produz IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (média +/- desvio padrão) é conhecido na figura 5.

[0137] Nenhuma resposta de CD8 mensurável foi observada neste experimento.

[0138] A proteína de PRAME formulada em ASA (NaCl 150 mM) + CpG mostrou precipitar e induzir uma resposta de célula T menos específica comparada ao PRAME formulado em ASA (sorbitol) + CpG. Uma resposta de CD4 específica de PRAME similarmente boa foi obtida quando a proteína de PRAME foi formulada em ASA (sorbitol) + CpG e na formulação

“líquida” de ASA (NaCl 70 mM) + CpG (nenhuma diferença estatística). A resposta imune humoral também foi testada, mas os dados após as 2 injeções não foram interpretáveis.

#### Experimento 2:

[0139] Quatro grupos de vinte e quatro camundongos CBF1 fêmeas (híbridos de camundongos C57BL/6 e Balb/C) 6 a 8 semanas foram imunizados quatro vezes intra-muscularmente (a cada duas semanas, em injeções alternativas no músculo gastrocnêmio esquerdo e direito) com a proteína de PRAME formulada em uma dose fixa de ASA + CpG, o que corresponde a 1/10 de uma dose humana (50µL que contêm 5 µg de MPL, 5 µg de QS21 e 42 µg de CpG7909). 14 dias após a última imunização, quatro grupos de camundongos (n=12 em cada grupo) foram desafiados subcutaneamente com células tumorais 10e5 CT26-PRAME, da maneira descrita a seguir. Os quatro grupos de camundongos foram:

- grp1: tampão,
- grp2: PRAME co-lioofilizado + CpG ressuspenso no ASA "clássico" (NaCl 150 mM), em que a proteína de PRAME precipitada,
- grp3: PRAME co-lioofilizado + CpG ressuspenso em ASA (sorbitol),
- grp4: PRAME + ASA, formulação "líquida" + CpG (+ poloxamer).

[0140] 14 dias após a última imunização, a resposta imune foi analisada usando diferentes leitores da maneira a seguir:

- Resposta humoral (n=12),
- Resposta celular pela capacidade da célula T secretar citocinas (n=4 grupos de 3 camundongos),
- Efeito protetor contra um desafio de tumor (n=12).

[0141] Todos os camundongos receberam 0,4 µg de PRAME em 1/10 de dose humana de ASA + sistema adjuvante CpG (5

µg de MPL, 5 µg de QS21 e 42 µg de CpG).

### **Resultados:**

#### **Crescimento do tumor**

[0142] O crescimento médio do tumor com o tempo, medido pela superfície (mm<sup>2</sup>) (+SD), por grupo é representado na figura 9. O PRAME formulado em ASA (NaCl 150 mM) + CpG induz uma menor proteção do tumor (maior crescimento do tumor) que o PRAME ASA (sorbitol) + CpG. Uma proteção similar foi observada para PRAME ASA (sorbitol) + CpG e PRAME na formulação líquida ASA + CpG).

#### **Análise de amostra: Resposta humoral:**

[0143] Os soros de camundongos (n=12) foram testados por ELISA com relação à presença de anticorpos específicos de PRAME 14 dias após a última das 4 imunizações, da maneira descrita a seguir. A resposta de anticorpo (Ig total) foi avaliada por ELISA usando a proteína de PRAME recombinante purificada como antígeno de revestimento. Os soros dos animais imunizados foram analisados com relação à presença de anticorpos específicos de PRAME. A média geométrica dos títulos padrões (n=12 camundongos), intervalos de confiança de +/- 95 %, obtida após as 4 imunizações é mostrada na figura 7. O PRAME/ASA +CpG contendo a ASA clássica (NaCl 150 mM) induz uma resposta de anticorpo muito pequena, enquanto o PRAME/ASA + CpG contendo ASA (sorbitol) induz titulação de anticorpo muito elevada. Esta resposta é similar àquela induzida pela formulação líquida de ASA.

[0144] **Resposta celular** (14 dias após a 4<sup>a</sup> imunização, n=4 grupos de 3 camundongos por grupo de tratamento):

[0145] A frequência de células T CD4 e CD8 capazes de produzir citocinas do tipo IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , após a imunização de camundongos com o antígeno de tumor PRAME ASA-CpG, é usada para refletir a capacidade das diferentes formulações induzirem uma resposta celular

funcional. 14 dias após a quarta imunização, os percentuais de células T CD4 e CD8 que produzem citocinas (IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ) foram medidos por coloração de citocina intracelular (ICS) em células de baço de camundongos imunizados.

[0146] O % de CD4 que produz IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (média +/- desvio padrão) é mostrado na figura 8. Os valores p são amplamente inferiores a 0,05, demonstrando uma diferença significativa entre o grupo 2 e os grupos 3 e 4.

[0147] Nenhuma resposta de CD8 mensurável foi observada neste experimento.

[0148] A proteína de PRAME formulada em ASA (NaCl 150 mM) + CpG mostrou precipitar e induzir uma resposta de célula T estatisticamente menos específica, comparado ao PRAME formulado em ASA (sorbitol) + CpG. Ao contrário, uma resposta de CD4 específica de PRAME similarmente boa foi obtida quando a proteína de PRAME foi formulada em ASA (sorbitol) + CpG, e na formulação "líquida" de ASA + CpG.

### **Método**

#### **Modelo de tumor CT26-PRAME e crescimento do tumor**

[0149] A linhagem celular CT26-PRAME foi gerada transfectando a linhagem celular de carcinoma do cólon CT26 com o plasmídeo de expressão de mamífero, pCDNA3, que codifica o DNAc para PRAME (Invitrogen, Carlsbad, CA). A seleção com G418 (200  $\mu$ g/mL) e clonagem de limite-diluição rendeu um clone que expressa PRAME (CT26-PRAME), da maneira determinada por PCR em tempo real quantitativa (cópias de RNAm  $10e^{-3}$  PRAME/cópia de  $\beta$ -actina de camundongo que está na faixa do nível da expressão de PRAME para tumores humanos)

[0150] As células CT26 PRAME foram crescidas *in vitro* a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> em meio RPMI com soro fetal bovino a 10 %, L-

glutamina 1 %, penicilina-esteptomicina 1 %, aminoácidos não essenciais 1 %, piruvato de sódio 1 % e  $\beta$ -mercaptoetanol a 0,1 %. As células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes em meio sem soro e injetadas em 200 $\mu$ L de meio RPMI subcutaneamente no flanco direito de quatro grupos de camundongos CB6F1 14 dias após a última imunização com PRAME, da maneira descrita anteriormente. O crescimento individual do tumor foi medido duas vezes por semana. O produto dos 2 diâmetros principais de cada tumor foi registrado com o tempo e os dados são mostrados como a superfície média do tumor (mm<sup>2</sup>) em cada grupo de animais.

#### **Análise de amostra: Resposta humoral**

[0151] Antes da adição dos soros, a imunoplaça foi revestida com o antígeno PRAME por toda a noite a 4 °C. Após a reação com os soros por 90 minutos a 37 °C, um anticorpo completo de coelho biotilado contra as imunoglobulinas de camundongo foi adicionado por 90 minutos a 37 °C. O complexo antígeno-anticorpo foi revelado por incubação com um complexo de peroxidase biotilada com estreptavidina por 30 minutos a 37 °C. Este complexo foi então revelado pela adição de tetrametil benzidina (TMB) por 10 minutos em temperatura ambiente, e a reação parou com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M. As densidades óticas foram registradas em 450 nm.

#### **Método de análise de amostra: resposta celular (produção de IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ )**

[0152] A produção de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  por células T CD4 e CD8 foi medida por citometria de fluxo (LSR2 da Becton Dickinson) usando coloração de citocina intracelular (ICS) em células de baço de camundongos imunizados (4 grupos de 3 camundongos por grupo) após 2 horas de estímulo com um agrupamento de peptídeos 15mer que se sobrepõem cobrindo toda a sequência de proteína de PRAME.

#### Estímulo de células T:

- As células do baço de animais imunizados foram re-

estimuladas com um agrupamento de 123 peptídeos 15mer que se sobrepõem em 11 aminoácidos, cobrindo a sequência total de PRAME. Os peptídeos (1 µg/mL/peptídeo) são misturados com células T 10e6 (células do baço) 2 horas a 37 °C em uma placa de 96 poços (U) em um volume final de 200 µL de RPMI 5 % FCS, contendo 2 µg/mL de anti CD49d e 2 µg/mL de anti CD28,

- após a incubação, 50 µL de brefeldin (1/1.000) foram adicionados em RPMI 5 % FCS

Coloração intracelular:

• Coloração de CD4/CD8:

- Células foram transferidas em uma placa de 96 poços (poços cônicos).

- Centrifugação a 1.000 rpm 5' a 4 °C.

- Lavagem com 250µL de tampão FACS (PBS 1 % FCS).

- Precipitados celulares foram incubados com 50 µL de 2,4 G2 1/50 em tampão FACS durante 10' a 4 °C.

- 50 µL de mistura principal CD4-PE (diluição Mab: 1/200) e CD8PerCP (diluição Mab: 1/200) em tampão FACS foram adicionados durante 30' a 4 °C.

- Lavagem em tampão FACS (1200 RPM-10')

• Permeabilização de células:

- Precipitados foram incubados com 200 µL de solução cytoFix-cytoPerm durante 20' a 4 °C.

- Lavado com permWASH 1x (1200 RPM-10'), a solução de permWASH é concentrada 10x, com diluição em água estéril.

• Coloração intracelular de I IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ :

- Precipitados foram incubados 2 horas a 4 °C com 50 µL de mistura de IFN $\gamma$  APC (diluição Mab: 1/50) e TNF $\alpha$  FITC (diluição Mab: 1/50) na solução de permWASH 1x.

- Lavados com permWASH 1X (1200 RPM-101), os

precipitados foram ressuspensos em tampão FACS.

- Análise FACS.

Brefeldin (Gologi Plug): BD cat.555029

Cytofix/cytoperm: Pharmingen (BD) Cat n° 554722

Perm/tampão de lavagem: Pharmingen(BD) Cat n° 554723

CD49d de rato anti-camundongo purificada NA LE: BD Cat n°

553154

CD28 de rato anti-camundongo purificada NA LE: BD Cat n°

553295

CD8a perCp de rato anti-camundongo: BD Cat n° 553036

CD4 PE de rato anti-camundongo: BD Cat n° 556616

IFN $\gamma$  APC de rato anti-camundongo: BD Cat n° 554413

TNF $\alpha$  FITC de rato anti-camundongo: BD Cat n°554418

CD16/CD32 anti-camundongo (2.4G2) Becton Dickinson cat  
n° 553142 (0,5 mg/mL).

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição adjuvante aquosa, caracterizada pelo fato de que: (a) um agonista de TLR-4 e uma saponina em uma formulação lipossomal; e (b) um agente de isotonicidade não iônico, em que a concentração de cloreto de sódio ou a força iônica na composição adjuvante é menor de 100 mM.

2. Composição adjuvante aquosa de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o agente de isotonicidade não iônico é um poliol.

3. Composição adjuvante aquosa de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o poliol é sorbitol.

4. Composição adjuvante aquosa de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a concentração de sorbitol é entre 4 % e 10 % (p/v).

5. Composição adjuvante aquosa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o dito agonista de TLR-4 é 3D- MPL.

6. Composição adjuvante aquosa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a dita saponina é QuilA ou um derivado da mesma.

7. Composição adjuvante aquosa de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o derivado de QuilA é QS21.

8. Composição adjuvante aquosa de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que compreende cloreto de sódio em 5 mM e entre 5 % e 6 % p/v de sorbitol.

9. Composição imunogênica, caracterizada pelo fato de que compreende um antígeno ou preparação antigênica e uma composição adjuvante aquosa como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

10. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação

9, caracterizada pelo fato de que o dito antígeno ou preparação antigênica não é solúvel em concentrações de sal ou em soluções em que a força iônica é maior que 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ou 100 mM.

11. Processo para preparar uma composição imunogênica como definida na reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a etapa de reconstituir uma composição liofilizada que compreende pelo menos um antígeno ou preparação antigênica com uma composição adjuvante aquosa como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

12. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende (i) uma composição liofilizada compreendendo um antígeno ou preparação antigênica, e (ii) uma composição adjuvante aquosa como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8.

13. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o antígeno ou preparação antigênica não é solúvel em concentrações de sal ou em soluções em que a força iônica é maior que 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ou 100 mM.

14. Kit de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o antígeno ou preparação antigênica não é solúvel em concentrações de sal ou em soluções em que a força iônica é maior que 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM, 90 mM ou 100 mM.

15. Composição imunogênica de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de ser para uso na medicina.

Figura 1

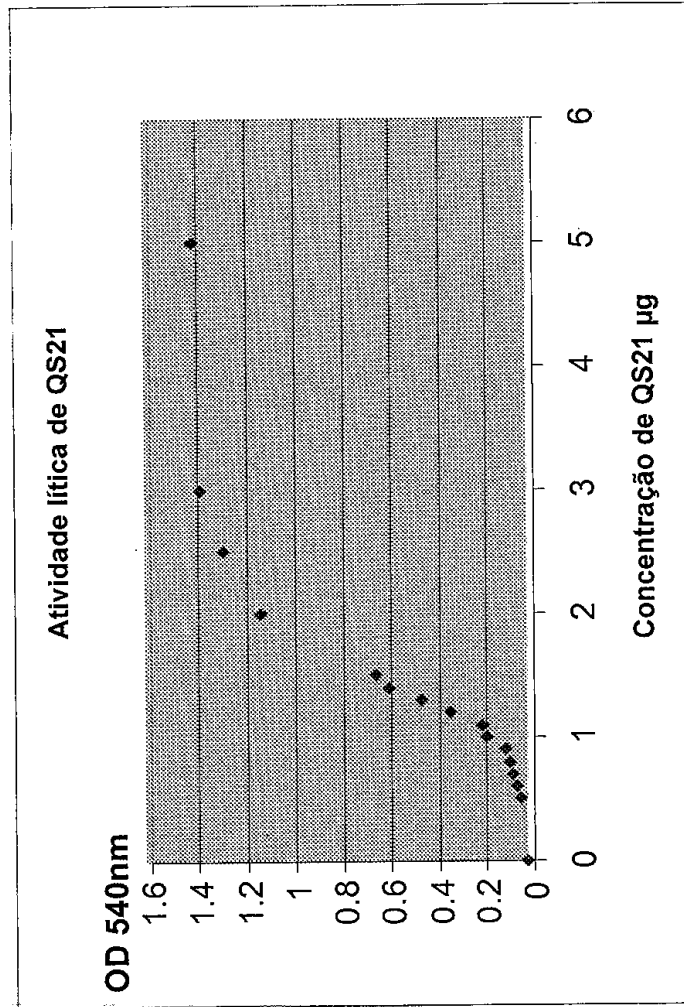


Figura 2

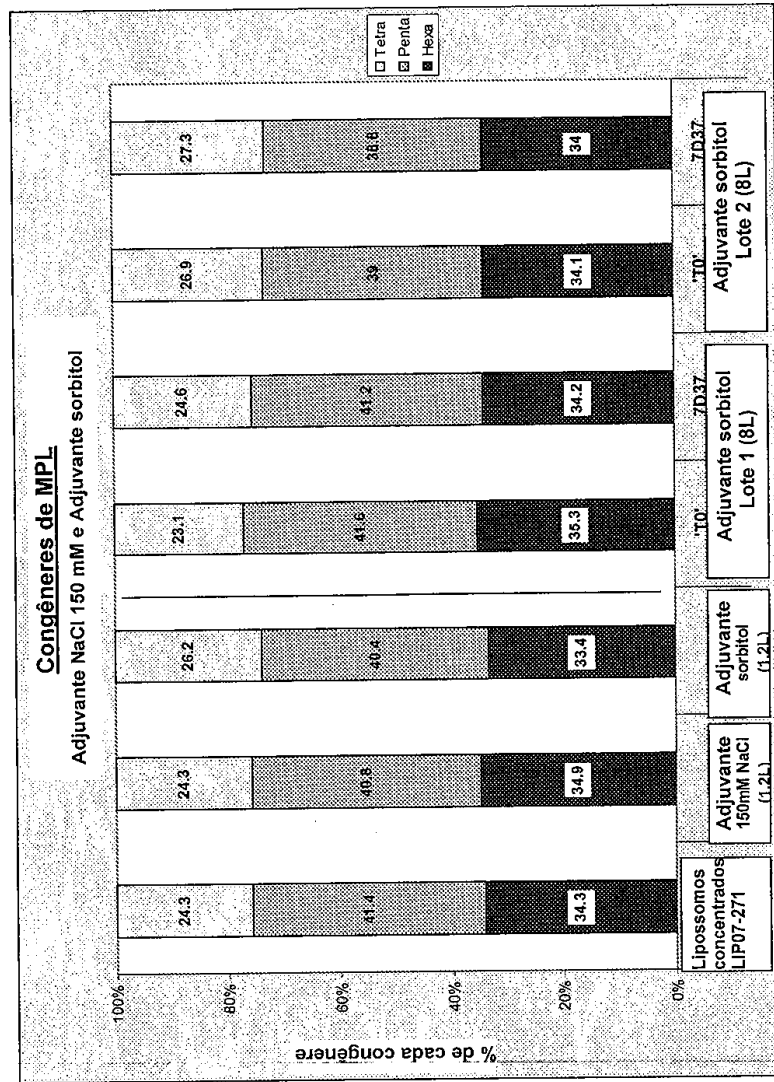




Figura 4

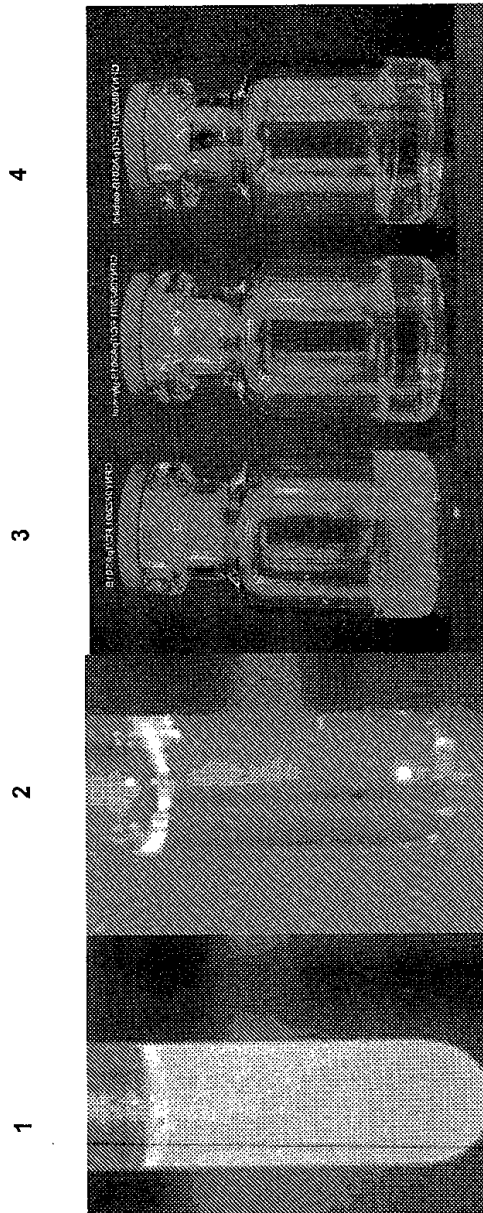


Figura 5

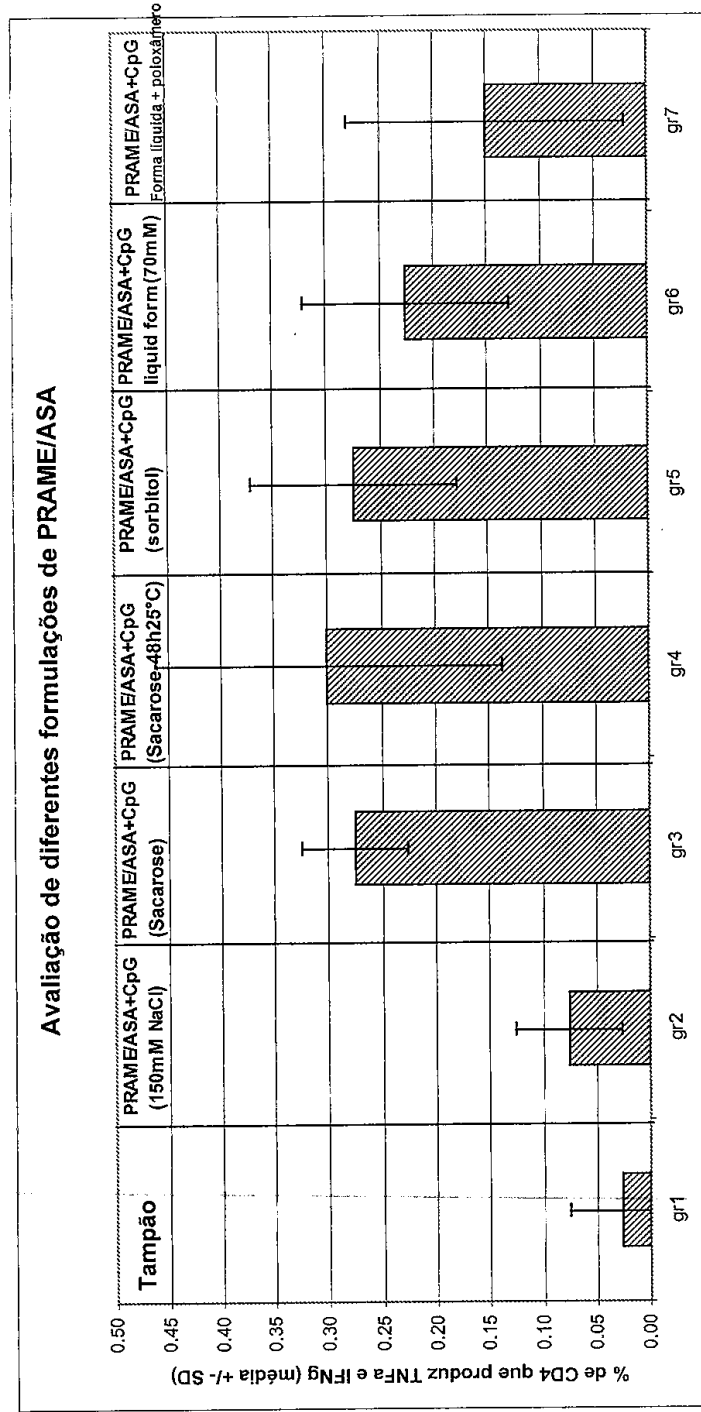




Figura 7

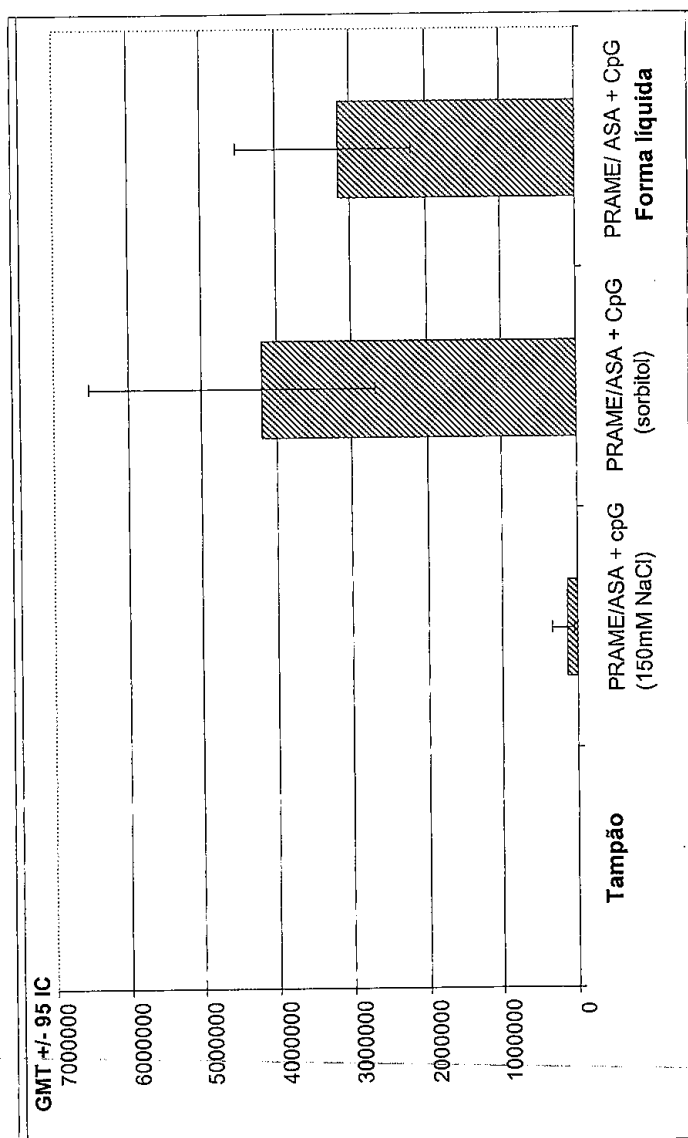


Figura 8

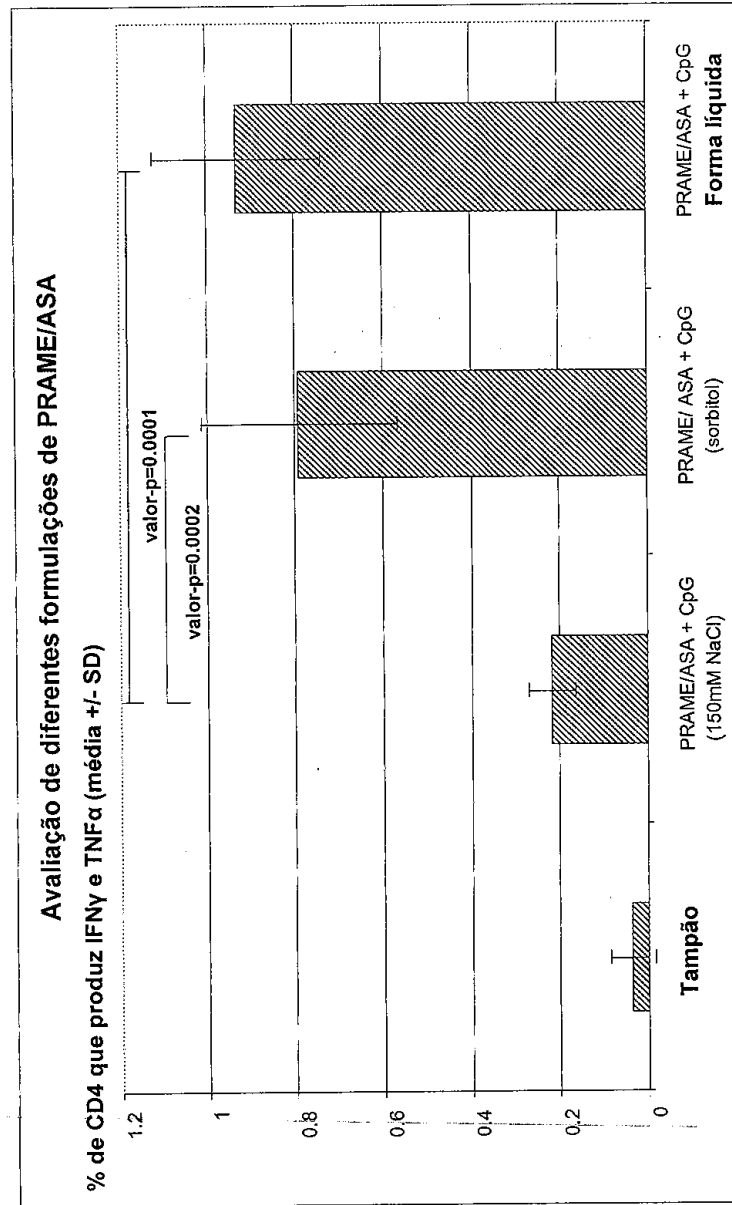


Figura 9

