



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 295 229**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01987671 .3**

86 Fecha de presentación : **16.10.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1326638**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Vacunas contra cánceres.**

30 Prioridad: **18.10.2000 GB 0025573**  
**18.10.2000 GB 0025574**  
**18.10.2000 US 690921**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2008**

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 2 295 229 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

Vacunas contra cánceres.

5 La presente invención se refiere a una formulación nueva que comprende una combinación de un antígeno del cáncer o derivado del mismo y una composición combinada de adyuvantes que comprende un lipopolisacárido, un oligonucleótido inmunoestimulante y una saponina como se define en la reivindicación 1. El antígeno es de preferencia un derivado de Her 2 neu o P501S y por consiguiente las formulaciones de la invención tienen utilidad en el tratamiento y la prevención de los seres humanos que expresan tales antígenos.

10 A pesar de las enormes inversiones de recursos financieros y humanos, el cáncer sigue siendo una de las causas principales de muerte. Por ejemplo, el cáncer es la causa principal de muerte en mujeres de entre 35 y 74 años de edad. El cáncer de mama es la neoplasia más común en las mujeres y la incidencia para desarrollar el cáncer de mama está creciendo. Se estima que una de cada nueve mujeres tendrá diagnóstico de esta enfermedad. Los enfoques convencionales para curar el cáncer de mama se han centrado alrededor de una combinación de cirugía, radiación y quimioterapia. Estos enfoques han dado lugar a algunos éxitos dramáticos en ciertas neoplasias. Sin embargo, el cáncer de mama es más frecuentemente incurable, cuando se diagnostica más allá de cierto estadio. Resultan necesarios enfoques alternativos para el diagnóstico temprano y tratamiento.

20 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("CpG") son conocidos en la técnica como adyuvantes cuando se administran por vía sistémica y por vía mucosa (Documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis y col., J. Immunol, 1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-4466). CpG es una abreviatura para los motivos de dinucleótidos citosina-guanosina presentes en el ADN. Históricamente, se ha observado que la fracción de ADN de BCG podía ejercer un efecto antitumoral. En otros estudios, se ha mostrado que los oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias genéticas de BCG eran capaces de inducir efectos inmunoestimulantes (*in vitro* e *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que determinadas secuencias palíndromo, que incluyen un motivo central CG, portaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación fue aclarado más tarde en una publicación de Krieg, Nature 374, pág. 546 1995. El análisis detallado mostró que el motivo CG tiene que estar en determinado contexto de la secuencia, y que tales secuencias son comunes en el ADN bacteriano pero son raras en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimulante es frecuentemente: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo de dinucleótidos CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias CpG no metiladas son inmunoestimulantes y pueden usarse en la presente invención.

35 En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos está presente una secuencia palíndromo. En el mismo oligonucleótido pueden estar presentes varios de estos motivos, ya sea como repetición de un motivo o como combinación de diferentes motivos. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoestimulantes que contienen oligonucleótidos puede activar diversas subseries inmunes, incluyendo a las células asesinas naturales (natural killer) (que producen interferón y tienen actividad citolítica) y a los macrófagos (Wooldrige y col., Volumen 89 (Nº 8), 1977). Si bien otras secuencias que contienen CpG no metilado que no tienen esta secuencia de consenso han mostrado ahora ser inmunomoduladoras.

40 Cuando CpG está formulado en vacunas, se administra generalmente en solución libre junto con el antígeno libre (Documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, *supra*) o conjugado covalentemente a un antígeno (Publicación PCT Nº WO 98/16247), o formulado con un vehículo tal como hidróxido de aluminio ((antígeno de superficie de Hepatitis) Davis y col., *supra*; Brazolot-Millan y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EEUU, 1998, 95(26), 15553-8).

Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen, en formas de realización de preferencia, al menos un adyuvante derivado de lipopolisacáridos de enterobacterias.

50 Desde hace tiempo se sabe que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulador del sistema inmune, aunque su uso en adyuvantes ha sido restringido por sus efectos tóxicos. Ribí y col., describieron un derivado de LPS no tóxico, monofosforil lípido A (MPL), producido por medio de la eliminación del grupo hidrocarburo del núcleo y del fosfato de la glucosamina del extremo reductor (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY pág. 407-419), y tiene la siguiente estructura:

55

60

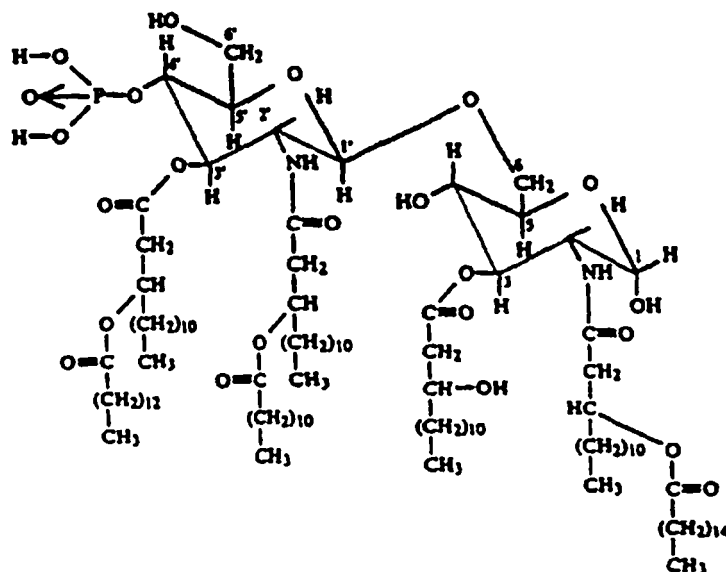
65

5

10

15

20



25

30

Otra versión destoxicada de MPL es el resultado de la eliminación de la cadena de acilo de la posición 3 del esqueleto del disacárido, y se denomina monofosforil lípido A 3-O-Desacilado (3D-MPL). Puede purificarse y prepararse por medio de los procedimientos que se enseñan en el Documento GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación del difosforil lípido A, y de las variantes 3-O-desaciladas del mismo. Una forma de preferencia de 3D-MPL está en la forma de una emulsión que tiene tamaño de partículas pequeñas inferior a 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro, y su procedimiento de fabricación está descrito en el Documento WO 94/21292. En el Documento WO 98/43670A2 se han descrito las formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo.

35

40

Los adyuvantes derivados de lipopolisacáridos bacterianos que se formularán en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención pueden purificarse y procesarse a partir de fuentes bacterianas, o como alternativa pueden ser sintéticos. Por ejemplo, en Ribi y col., 1986 (*supra*) está descrito el monofosforil lípido A purificado, y en los Documentos GB 2220211 y US 4912094 están descritos el monofosforil o difosforil lípido A 3-O-Desacilados derivados de *Salmonella sp.*. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Documentos WO 98/01139; US 6.005.099 y EP 0 729 473; Hilgers y col., 1986, Int. Arch. Allergy Immunol., 79(4): 392-396; Hilgers y col., 1987, Immunology, 60(1) 141-146; y EP 0 549 074 B1). Los adyuvantes de lipopolisacáridos bacterianos particularmente de preferencia son 3D-MPL y los disacáridos de  $\beta(1-6)$  glucosamina descritos en los Documentos US 6.005.099 y EP 0 729 473 B1.

45

Por consiguiente, los derivados de LPS que pueden usarse en la presente invención son DIFOSFORIL LÍPIDO A, MPL o 3D-MPL.

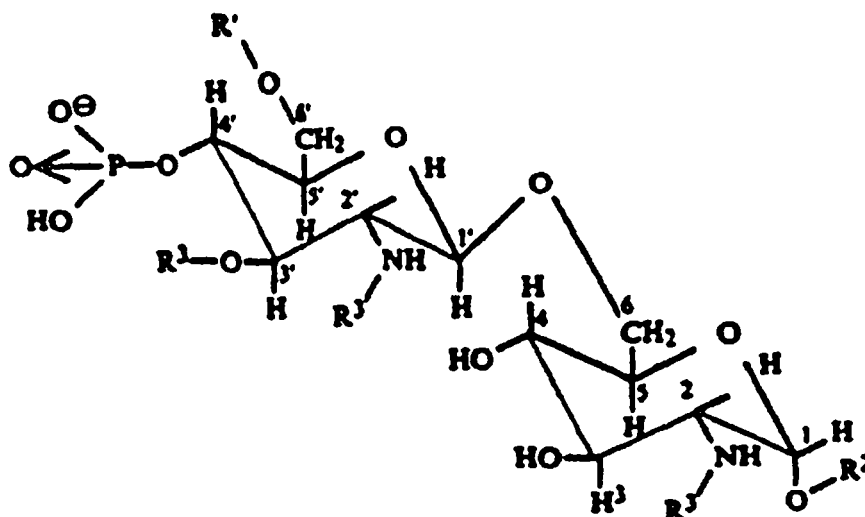
Un adyuvante de disacárido es un lípido A purificado o sintético de la siguiente fórmula:

50

55

60

65





La presente invención se refiere al sorprendente hallazgo de que las combinaciones de oligonucleótidos inmunoestimulantes (CpG) y saponina y opcionalmente un lipopolisacárido son adyuvantes extremadamente potentes. Por consiguiente, se proporciona una combinación de vacuna que comprende una combinación de saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante y un lipopolisacárido con un antígeno de cáncer o un derivado del mismo como se define en la reivindicación 1. En una forma de realización de preferencia la formulación de adyuvante comprende una saponina, de preferencia QS21, un oligonucleótido inmunoestimulante, y un 3D-MPL.

De preferencia, la vacuna de la presente invención puede comprender también un vehículo. En una forma de preferencia de la presente invención los oligonucleótidos en las composiciones de adyuvante y de vacuna actúan de forma sinérgica con la saponina/lipopolisacárido combinados en la inducción de respuestas inmunes específicas de antígeno para llevar a una mejor regresión tumoral. Las formulaciones son potentes en la inducción de respuestas inmunes convencionalmente asociadas con el sistema inmune de tipo Th1. Por consiguiente, las combinaciones de adyuvante no solo son adecuadas para inmunoprevención de enfermedades, sino también para inmunoterapia de enfermedades tales como el cáncer.

Las formulaciones contienen un antígeno antitumoral y son útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Por ejemplo, la formulación de adyuvante tiene utilidad con antígenos de rechazo tumoral tales como aquellos para cáncer de próstata, mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, renal o melanomas. Los ejemplos de antígenos incluyen MAGE 1, 3 y MAGE 4 u otros antígenos MAGE tales como los descritos en el Documento WO 99/40188, PRAME, BAGE, Lage (conocido también como NY Eos 1) SAGE y HAGE (Documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pág. 628-636; Van den Eynde y col., International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentado en 1997); Correale y col. (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, pág. 293. Por cierto, estos antígenos se expresan en una amplia variedad de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma vesical.

Los antígenos MAGE para uso en la presente invención pueden expresarse como una proteína de fusión con un acompañante de fusión heterólogo, que puede ser un potenciador de expresión o un acompañante de fusión inmunológico. En una forma de realización de la presente invención, el derivado es una proteína de fusión que comprende un antígeno de la familia de proteínas de MAGE unido a un acompañante heterólogo de preferencia MAGE 3. Las proteínas se expresan como proteínas recombinantes de fusión que permiten la producción de niveles aumentados en un sistema de expresión comparado con las proteínas no fusionadas. Por lo tanto el acompañante de fusión puede ayudar a proporcionar epítomos de T ayudante (acompañante de fusión inmunológico), de preferencia epítomos de T ayudante reconocidos por seres humanos, o ayudar en la expresión de la proteína (potenciador de expresión) con mayores rendimientos que la proteína recombinante nativa. De preferencia, el acompañante de fusión será tanto un acompañante de fusión inmunológico como un acompañante potenciador de expresión.

En una forma de preferencia de la invención, el acompañante de fusión inmunológico deriva de la proteína D, una proteína de superficie de las bacterias gram negativas, *Haemophilus influenza* B (Documento WO 91/18926). De preferencia, el derivado de proteína D comprende aproximadamente el primer 1/3 de la proteína, en particular aproximadamente los primeros 100-110 aminoácidos del extremo N-terminal. De preferencia, el derivado de proteína D está lipidado. De preferencia, los primeros 109 restos del acompañante de fusión de Lipoproteína D están incluidos en el extremo N-terminal para proporcionar el antígeno candidato de la vacuna con otros epítomos exógenos de células T y aumentar el nivel de expresión en *E. coli* (actuando de esta manera también como un potenciador de expresión). La cola del lípido asegura la presentación óptima del antígeno a las células de presentación de antígenos.

Otros acompañantes de fusión incluyen a la proteína no estructural del virus de influenza, NS1 (hemaglutinina). Típicamente se usan los 81 aminoácidos del extremo N terminal, aunque pueden usarse diferentes fragmentos a condición de que incluyan epítomos de T ayudantes.

En otra forma de realización el acompañante de fusión inmunológico es la proteína conocida como LYTA. De preferencia se usa la porción C terminal de la molécula. Lyta deriva de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa, amidasa LYTA, (codificada por el gen *lytA* {Gene, 43 (1986) páginas 265-272} una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en el esqueleto del peptidoglicano. El dominio C terminal de la proteína LYTA es responsable de la afinidad a la colina o a algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad ha sido explotada por el desarrollo de plásmidos de expresión de C-LYTA en *E. coli* para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LYTA como su amino terminal {Biotechnology: 10, (1992) páginas 795-798}. Como se usa en este documento una forma de realización de preferencia utiliza la porción de repetición de la molécula de Lyta que se encuentra en el extremo C terminal comenzando en el residuo 178. Una forma particularmente de preferencia incorpora los residuos 188-305.

Los acompañantes de fusión inmunológicos indicados anteriormente son también ventajosos para ayudar a la expresión. En particular, tales fusiones se expresan con rendimientos mayores que las proteínas MAGE recombinantes nativas. Tales construcciones están descritas en el Documento WO 99/40188.

Uno de los antígenos de próstata de preferencia es conocido como P501S, secuencia ID N° 13 del Documento WO 98/37814. Los fragmentos inmunogénicos y porciones de los mismos que comprenden al menos 20, de preferencia 50, de más preferencia 100 aminoácidos contiguos están descritos en la solicitud de patente citada anteriormente. Véase por ejemplo PS 108 (Documento WO 98/50567).

## ES 2 295 229 T3

Otro antígeno asociado a tumores útil en el contexto de la presente invención es Cripto (Salomon y col., Bioessays 199, 21 61-70, Patente de EEUU 5654140).

La presente invención es también útil en combinación con el antígeno de cáncer de mama Her 2 neu, los antígenos Her 2 neu están descritos entre otros, en la Patente de EEUU 5.801.005. El Her 2 neu debe estar desprovisto de una porción sustancial del dominio transmembranario y puede comprender el dominio extracelular completo (que comprende aproximadamente los aminoácidos 1-645) o fragmentos del mismo y al menos una porción inmunogénica o la totalidad del dominio intracelular aproximadamente (los 580 aminoácidos del extremo C terminal). En particular, la porción intracelular debe comprender el dominio de fosforilación o fragmentos del mismo. Tales construcciones están descritas en el Documento WO 00/44899. Se conoce a una de las construcciones de preferencia como ECD PD, se conoce a otra de ellas como ECD  $\Delta$ PD. Véase el Documento WO 00/44899.

El Her 2 neu como se usa en este documento puede derivar de rata, ratón o ser humano.

El antígeno Her 2 neu puede ser el antígeno Her 2 neu completo desprovisto de un dominio funcional transmembranario o porciones del mismo. Las porciones de preferencia comprenden el dominio extracelular. En una forma de realización de más preferencia se proporciona una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular unido a una porción del dominio intracelular como se describe en el Documento WO 00/44899.

La presente invención está dirigida a formulaciones capaces de modular, de preferencia inducir o potenciar, la inmunidad a un producto proteico de la expresión del oncogen de Her 2 neu, incluyendo neoplasias en animales de sangre caliente en los que un gen amplificado de Her 2 neu no necesita que el producto de expresión proteico del gen esté presente en el tumor. Por ejemplo, la sobreexpresión del gen puede estar involucrada en el inicio y estadios tempranos de formación de tumores, pero la expresión de proteínas puede posteriormente reducirse o estar ausente. La presente invención puede usarse para inducir o potenciar una respuesta inmune eficaz para convertir un tumor positivo para Her 2 neu en uno negativo para Her 2 neu, además de prevenir el establecimiento de tumores positivos para Her 2 neu y provocar la regresión de tumores positivos para Her 2 neu existentes.

Las siguientes abreviaturas se usan a lo largo de toda la memoria descriptiva: "ECD" se refiere al dominio extracelular, "ICD" se refiere al dominio intracelular, "PD" se refiere al dominio de fosforilación (es decir, el dominio que está fosforilado) que está dentro del dominio intracelular, " $\Delta$ PD" se refiere a un fragmento del dominio de fosforilación que está dentro del dominio de fosforilación, y "KD" se refiere al dominio de quinasa que está dentro del dominio intracelular. En este documento se denomina al producto de expresión del gen de Her 2 neu como la "proteína Her 2 neu", conocida también como "p 185" o "c-erB2".

La "proteína de fusión ECD-ICD de Her 2 neu", también denominada en este documento "ECD-ICD" o "proteína de fusión ECD-ICD", se refiere a una proteína de fusión (o fragmentos de la misma) que comprende un dominio extracelular (o fragmentos del mismo) y el dominio intracelular (o fragmentos del mismo) de la proteína Her 2 neu. Estos representan antígenos de preferencia para usar en el contexto de la presente invención. Como se usa en este documento, la proteína de fusión ECD-ICD no incluye una porción sustancial del dominio transmembranario de Her 2 neu, y de preferencia no incluye ninguno de los dominios transmembranarios de Her 2 neu.

Se entiende que los términos "proteína de fusión ECD-ICD de Her 2 neu" y "proteína de fusión ECD-PD de Her 2 neu" y sus términos relacionados se refieren a fragmentos de las mismas, homólogos de las mismas y equivalentes funcionales de las mismas (denominados en conjunto como "variantes"), tales como aquellas en las que uno o más aminoácidos, en formas de realización de preferencia de la invención, (i) aumentan la inducción o potenciación de una respuesta inmune comparados con la proteína Her 2 neu, o (ii) no afectan sustancialmente la inducción o potenciación de una respuesta inmune comparados con la proteína Her 2 neu (por ejemplo, variante que estimula una respuesta por células T ayudantes o células T citotóxicas o estimula la producción de anticuerpos). En este documento se detallan a continuación ejemplos de variantes específicos, no limitantes, que incluyen fragmentos, homólogos y equivalentes funcionales ejemplares de la proteína de fusión ECD-ICD de Her 2 neu y de la proteína de fusión ECD-PD de Her 2 neu. Las variantes pueden ser "sustancialmente idénticas" o "sustancialmente similares" a una proteína de fusión que comprende componentes del polipéptido nativo, y mantiene la capacidad de estimular la respuesta inmune.

El PD de Her 2 neu tiene una longitud de 268 aminoácidos, es intracelular, y puede ser fosforilado por la proteína tirosina quinasa. La región no comparte identidad con la parte correspondiente de otros receptores de tirosina quinasa. Por consiguiente, la especificidad y singularidad de este dominio lo hace particularmente de preferencia para uso como una vacuna de tumores. Sin embargo, la expresión de este dominio solo en células bacterianas y de mamífero es problemática. Por ejemplo, la proteína PD resultante es muy lábil y no es adecuada para la producción a gran escala. En una forma de realización, esta invención utiliza de preferencia una fusión que comprende todo o parte del dominio intracelular o el dominio de fosforilación con todo o parte del dominio extracelular de Her 2 neu. Las proteínas de fusión ECD-ICD y las proteínas de fusión ECD-PD son solubles, se secretan y son estables en medios de cultivo.

Las vacunas de la invención resultarán útiles contra cualquier cáncer caracterizado por la expresión tumoral asociada de MAGE, P501S, CRIPTO y la expresión de Her 2 neu. Además de permitir la expresión aumentada del dominio intracelular o del dominio de fosforilación, o variantes de los mismos, como una proteína de fusión con el dominio extracelular o sus variantes, las proteínas de fusión ECD-ICD y ECD-PD proporcionan una mejor formulación de vacuna.

## ES 2 295 229 T3

Por consiguiente la presente invención proporciona una formulación de vacuna que comprende una composición adyuvante, comprendiendo dicha composición adyuvante un lipopolisacárido, como está definido en la reivindicación 1, una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulante y un antígeno Her 2 neu desprovisto de su dominio transmembranario. La molécula de Her 2 neu puede ser de rata, de ratón, de ser humano o un híbrido de las mismas. De preferencia la molécula her 2 comprende sustancialmente todo el dominio extracelular. Se entiende por sustancialmente todo que no se han delecionado más de 100 aminoácidos del dominio extracelular, de preferencia menos de 75, de más preferencia menos de 50 aminoácidos. Resulta de preferencia que esté presente el dominio extracelular completo. El dominio extracelular en la construcción Her 2 neu de ser humano de la presente invención comprende de preferencia sustancialmente la totalidad de los 600 aminoácidos del extremo N terminal, de más preferencia los 630 aminoácidos del extremo N terminal, de más preferencia aproximadamente 650 aminoácidos. El ICD humano va desde el aminoácido 686 hasta Val 1255. El dominio de fosforilación está localizado en la porción N terminal del ICD. Resulta de preferencia que las construcciones usadas en la presente invención comprendan el dominio de fosforilación, pero no incluyan un dominio funcional transmembranario. De preferencia el dominio transmembranario se deleciona todo junto.

Las construcciones que son particularmente adecuadas para uso en la presente invención se describen en el Documento WO/0044899.

Una forma de realización de preferencia es que el antígeno Her 2 neu esté formulado con 3D-MPL, QS21 y oligonucleótido CpG junto con un liposoma o un vehículo de emulsión de aceite en agua. Tales formulaciones producen tanto respuesta humoral como mediada por células. En comparación con la formulación de adyuvante que comprende sólo QS21 y 3D-MPL, la formulación de la invención evidenció, en ratones, respuesta TH1 ventajosamente más fuerte. Las formulaciones con sólo CpG no produjeron una significativa respuesta inmune mediada por células.

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

Los oligonucleótidos de preferencia para uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención contienen de preferencia dos o más motivos de dinucleótidos CpG separados por al menos tres, de más preferencia al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos son típicamente desoxinucleótidos. En una forma de realización de preferencia el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o de más preferencia un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleotídicos están dentro del alcance de la invención incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos mixtos. Los procedimientos para producir oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se describen en los Documentos US 5.666.153, US 5.278.302 y WO 95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos de preferencia tienen las siguientes secuencias. Las secuencias contienen de preferencia enlaces internucleotídicos fosforotioato modificados.

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

Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender las secuencias anteriores de preferencia ya que tienen delecciones o adiciones sin importancia en las mismas.

Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención pueden sintetizarse por medio de cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo, Documento EP 468520). Convenientemente, tales oligonucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador automatizado. Estos oligonucleótidos tienen típicamente una longitud de 10-50 bases.

Los oligonucleótidos utilizados en la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una forma de realización de preferencia el enlace internucleotídico en el oligonucleótido es fosforoditioato, o de más preferencia enlace fosforotioato, aunque los fosfodiésteres están dentro del alcance de la presente invención. Están contemplados los oligonucleótidos que comprenden diferentes enlaces internucleotídicos, por ejemplo fosforotioato/fosfodiéster mixtos. Pueden usarse otros enlaces internucleotídicos que establezcan el oligonucleótido.

Las saponinas que pueden usarse en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención incluyen aquellas derivadas de la corteza de Quillaja Saponaria Molina, denominada Quil A, y fracciones de la misma, descritas en el Documento US 5.057.540 y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 1996, 12 (1-2): 1-55; y en el Documento EP 0 362 279 B1. Las fracciones particularmente de preferencia de Quil A son QS21, QS7 y QS17.

## ES 2 295 229 T3

La  $\beta$ -escina es otra saponina hemolítica de preferencia para uso en las composiciones de adyuvantes de la presente invención. La escina está descrita en el índice de Merck (12<sup>o</sup> Edición: entrada 3737) como una mezcla de saponinas que se presentan en la semilla del castaño de indias, Latín: *Aesculus hippocastanum*. Se describió su aislamiento por cromatografía y purificación (Fiedler, *Arzneimittel-Forsch.* 4, 213 (1953)), y por medio de resinas de intercambio iónico (Erbring y col., Documento US 3.238.190). Las fracciones de escina,  $\square$  y  $\square$ , han sido purificadas y mostraron ser biológicamente activas (Yoshikawa M, y col. (*Chem Pharm Bull* (Tokio) agosto de 1996; 44(8): 1454-1464)). La  $\beta$ -escina se conoce también como aescina.

Otra saponina hemolítica de preferencia para uso en la presente invención es Digitonina. La digitonina está descrita en el índice de Merck (12<sup>o</sup> Edición, entrada 3204) como una saponina, derivada de las semillas de *Digitalis purpurea* y purificada según el procedimiento descrito por Gisvold y col., *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1934, 23, 664; y Ruhentrost-Bauer, *Physiol. Chem.*, 1955, 301, 621. Se describe su uso como reactivo clínico para la determinación de colesterol.

Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención pueden comprender además un vehículo, tal que la saponina o el CpG, o el lipopolisacárido puedan estar asociados con un vehículo particulado para mejorar la capacidad adyuvante de la combinación. Las vacunas sistémicas particularmente de preferencia, por ejemplo, comprenden una molécula vehículo.

El CpG utilizado en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención puede estar en solución libre o puede estar complejo a vehículos particulados tales como sales minerales (por ejemplo, pero no restringido a, sales de aluminio o de calcio), liposomas, ISCOM, emulsiones (aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua), polímeros (tales como, pero no restringido a polilácticos, poliglicólicos, polifosfazina, poliaminoácidos, alginato, quitosán) o micropartículas. De preferencia dichos vehículos son catiónicos. Las vacunas de la presente invención comprenden además un antígeno que puede estar asociado con el complejo CpG-vehículo, o puede no estar asociado con el complejo CpG-vehículo. En este caso, el antígeno puede ser estar en suspensión libre o asociado con un vehículo separado.

Las saponinas que forman parte de la presente invención pueden estar separadas en forma de micelas o pueden estar en forma de grandes estructuras ordenadas tales como ISCOM (Documento EP 0 109 942 B1) o liposomas (Documento WO 96/33739) cuando se formulan con colesterol y lípido, o en la forma de una emulsión de aceite en agua (Documento WO 95/17210). Las saponinas pueden de preferencia estar asociadas con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (Documento WO 98/15287). Como alternativa, la saponina puede estar asociada con un vehículo particulado tal como quitosán. La saponina puede también estar en estado seco tal como un polvo. Las formulaciones finales en la forma en que se administran a la superficie mucosa de la vacuna son de preferencia hemolíticas en la naturaleza. La saponina puede o no estar asociada físicamente con el antígeno a través de enlace directo o por interacción conjunta con la misma molécula del vehículo particulado (Documentos GB 9822712,7; WO 98/16247).

El CpG y la saponina y el lipopolisacárido en los adyuvantes o vacunas de la presente invención pueden estar separados o asociados entre sí. Por ejemplo, el CpG y la saponina pueden estar en suspensión libre o pueden estar asociados por medio de un vehículo, de más preferencia un vehículo particulado tal como hidróxido de aluminio o por medio de un liposoma catiónico o ISCOM.

Una combinación de adyuvante de preferencia según la presente invención está compuesta por uno o más oligonucleótidos CpG que contienen al menos 3, de preferencia al menos 6 nucleótidos entre dos motivos CG adyacentes, junto con QS21 y un vehículo particulado seleccionado del grupo que comprende una emulsión de aceite en agua o DQ. Resulta de preferencia que el lipopolisacárido sea un derivado de di o monofosforil lípido, de preferencia 3 de-O acilado, en particular 3 monofosforil Lípido A 3 de-O acilado. De mayor preferencia, la combinación de adyuvante comprende CpG 2006 (SEC ID N<sup>o</sup>: 4), o CpG 1758 (SEC ID N<sup>o</sup>: 2) o CpG 1826 (SEC ID N<sup>o</sup>: 1) mezclado con QS21, y un vehículo particulado seleccionado del grupo que comprende una emulsión de aceite en agua o DQ. Por consiguiente, las vacunas particularmente de preferencia, por ejemplo, comprenden tales combinaciones de adyuvante y un antígeno como se define en la reivindicación 1. La vacuna de preferencia de la presente invención se usa para generar repuestas inmunes sistémicas tras la administración a un individuo a través de la vía sistémica.

Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención pueden comprender una emulsión con base de aceite. Los adyuvantes de emulsión de aceites se han conocido durante muchos años, incluyendo los trabajos con adyuvantes de emulsión de aceite mineral de Freund completo e incompleto. Desde entonces se ha trabajado mucho para diseñar alternativas estables y bien toleradas de estas formulaciones adyuvantes potentes, pero reactogénicas.

Se han descrito muchos sistemas de emulsiones de fase única o múltiple. Se ha sugerido que los adyuvantes de emulsiones de aceite en agua *per se* son útiles como composiciones adyuvantes (Documento EP 0 399 843 B), también se han descrito combinaciones de emulsiones de aceite en agua y otros agentes activos como adyuvantes para vacunas (Documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsiones de 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).

Los adyuvantes de emulsiones de aceite para uso en la presente invención pueden ser naturales o sintéticos, y pueden ser minerales u orgánicos. Los ejemplos de aceites minerales y orgánicos resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.



Para que cualquier composición de aceite en agua sea adecuada para la administración a seres humanos, la fase oleosa del sistema de emulsión de preferencia comprende un aceite metabolizable. El significado del término aceite metabolizable es bien conocido en la técnica. Puede definirse metabolizable como “capaz de ser transformado por el metabolismo” (Dorland’s Illustrated Medical Dictionary, W. B. Sanders Company, 25° edición (1974)). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, que no sea tóxico para el receptor y sea susceptible de transformación por el metabolismo. Los frutos secos (tales como el aceite de cacahuete), las semillas, y los granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son parte de esta invención y pueden incluir aceites comercialmente disponibles tales como NEOBEE® y otros. El escualeno (2,6,10,15,19,23-Hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) es un aceite insaturado que se encuentra en grandes cantidades en el aceite de hígado de tiburón, y en cantidades más bajas en el aceite de oliva, aceite de germen de trigo, aceite de salvado de arroz, y en levadura, y es un aceite particularmente de preferencia para uso en esta invención. El escualeno es un aceite metabolizable en virtud de que es un compuesto intermedio en la biosíntesis del colesterol (índice de Merck, 10° Edición, N° de entrada: 8619).

Las emulsiones de aceite particularmente de preferencia son las emulsiones de aceite en agua, y en particular emulsiones de escualeno en agua.

Además, los adyuvantes de emulsión de aceite de más preferencia de la presente invención comprenden un antioxidante, que es de preferencia el aceite  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E, Documento EP 0 382 271 B1).

Los Documentos WO 95/17210 y WO 99/11241 describen adyuvantes de emulsiones basados en escualeno,  $\alpha$ -tocoferol, y TWEEN 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL. El Documento WO 99/12565 describe una mejora para estas emulsiones de escualeno con la adición de un esteroide en la fase oleosa. Además, puede adicionarse un triglicérido, tal como tricaprilina ( $C_{27}H_{50}O_6$ ), a la fase oleosa para estabilizar la emulsión (Documento WO 98/56414).

El tamaño de las gotas del aceite que se encuentran dentro de la emulsión estable de aceite en agua es de preferencia menor que 1  $\mu$ m, puede estar en el intervalo de 30-600 nm sustancialmente, de preferencia sustancialmente aproximadamente 30-500 nm de en diámetro, y de mayor preferencia sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro según la medición realizada por espectroscopía de la correlación de fotones. Al respecto, el 80% en número de las gotas de aceite deben estar dentro de los intervalos de preferencia, de más preferencia más del 90% y de mayor preferencia más del 95% en número de las gotas de aceite están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones de aceite de la presente invención están convencionalmente en el intervalo desde 2 hasta 10% de aceite, tal como escualeno; y cuando está presente, desde 2 hasta 10% de alfa tocoferol; y desde 0,3 hasta 3% de tensioactivo, tal como monooleato de polioxietileno sorbitán. De preferencia la relación aceite:alfa tocoferol es igual o menor que 1 ya que esta relación proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente Span 85 en un nivel de aproximadamente 1%. En algunos casos puede resultar ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

El procedimiento para producir emulsiones de aceite en agua es bien conocido por los expertos en la técnica. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa con un tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido por la homogeneización usando un homogeneizador, resultará evidente para un experto en la técnica que un procedimiento que comprende pasar la mezcla dos veces a través de una aguja de jeringa sería adecuado para homogeneizar pequeños volúmenes de líquido. Igualmente, el experto en la técnica podría adaptar el procedimiento de emulsiónado en microfluidificador (unidad de microfluídica MI 10S, máximo de 50 pasajes, durante un período de 2 minutos con entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar)) para producir volúmenes más pequeños o más grandes de emulsión. Esta adaptación podría conseguirse por medio de la experimentación rutinaria que comprende la medición de la emulsión resultante hasta conseguir una preparación con las gotas de aceite del diámetro necesario.

Las combinaciones inmunogénicas de la presente invención pueden usarse como adyuvante sistémico o por vía mucosa. En una forma particular de la invención se proporciona una vacuna sistémica para administrar a través de la vía sistémica o parenteral tal como la administración intramuscular, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Una vía de administración de preferencia está la vía transdérmica, por ejemplo por medio de parches para la piel.

Las preparaciones de vacunas sistémicas de la presente invención pueden usarse para proteger o para tratar a un mamífero susceptible de sufrir, o que sufre una enfermedad, por medio de la administración de dicha vacuna por vía intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intravenosa, o subcutánea. Los procedimientos de administración sistémica de las preparaciones de vacuna pueden incluir las jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para la administración balística de las vacunas sólidas (Documento WO 99/27961), o dispositivos de chorro de líquido a presión sin agujas (Documentos US 4.596.556; US 5.993.412), o parches transdérmicos (Documentos WO 97/48440; WO 98/28037). La presente invención puede también usarse para potenciar la inmunogenicidad de antígenos aplicados a la piel (administración transdérmica o transcutánea, Documentos WO 98/20734; WO 98/28037).

Como alternativa, las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden usarse para proteger o para tratar a un mamífero susceptible de sufrir, o que sufre una enfermedad, por medio de la administración de dicha vacuna por vía mucosa, tales como las vías oral/alimentaria o nasal. Otras vías mucosas alternativas son las vías vaginal e intrarrectal.

## ES 2 295 229 T3

La vía mucosa de administración de preferencia es la vía nasal, denominada vacunación intranasal. Los procedimientos de vacunación intranasal son bien conocidos en la técnica, incluyendo la administración de una forma de la vacuna en gotas, por vaporización, o como polvo seco en la nasofaringe del individuo a inmunizar. Las formulaciones de vacuna nebulizadas o aerosolizadas también forman parte de esta invención. Las formulaciones entéricas tales como cápsulas gastro resistentes y gránulos para administración oral, supositorios para la administración rectal o vaginal también forman parte de esta invención.

Las combinaciones inmunogénicas de la presente invención, representan a clase de adyuvantes de mucosa adecuados para la aplicación en seres humanos para reemplazar a la vacunación sistémica por la vacunación por vía mucosa.

Las combinaciones de adyuvantes de la presente invención se usan en la formulación de vacunas, las que pueden administrarse a través de las vías sistémica o mucosa. De preferencia, cuando las vacunas se usan para administración mucosa la combinación de adyuvantes comprende una saponina hemolítica.

Para la administración por vía mucosa la composición de la invención comprende de preferencia una saponina hemolítica. La saponina hemolítica, o la preparación de saponina, dentro del significado de esta invención debe determinarse con referencia al siguiente ensayo.

1. Se lava sangre fresca de cobayas con solución salina tamponada de fosfato (PBS) 3 veces en una centrífuga de mesa. Tras resuspender hasta el volumen original se diluye la sangre además 10 veces en PBS.
2. Se añaden 50  $\mu$ l de esta suspensión de sangre a 800  $\mu$ l de PBS que contiene diluciones al medio de tensoactivo o de saponina.
3. Tras 8 horas se evalúa la hemólisis visualmente o midiendo la densidad óptica del sobrenadante. La presencia de un sobrenadante rojo, que absorbe la luz a 570 nm indica la presencia de hemólisis.
4. Los resultados se expresan como la concentración de la primera dilución de saponina en la que no se presenta más hemólisis.

Para los fines de esta invención la preparación de adyuvante de saponina es hemolítica si lisa los eritrocitos en una concentración menor al 0,1%. Como referencia, las muestras sustancialmente puras de QuilA, QS21, QS7, Digitonina, y  $\beta$ -escina son todas saponinas hemolíticas según lo definido en este ensayo. Dentro de la propia variabilidad experimental de tal ensayo biológico, las saponinas de la presente invención tienen de preferencia una actividad hemolítica, de aproximadamente entre 0,5 y 0,00001%, de más preferencia entre 0,05 y 0,00001%, de más preferencia aún entre 0,005 y 0,00001%, y de mayor preferencia entre 0,001 y 0,0004%. Idealmente, dichas saponinas deben tener una actividad hemolítica similar (es decir, una diferencia dentro de una décima) a la de QS21.

Las vacunas de la presente invención pueden también administrarse a través de la vía oral. En tales casos el excipiente farmacéuticamente aceptable puede también incluir tampones alcalinos, o cápsulas o microgránulos entéricos. Las vacunas de la presente invención pueden también administrarse por la vía vaginal. En tales casos, los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden también incluir emulsivos, polímeros tales como CARBOPOL<sup>®</sup>, y otros estabilizadores de cremas y de supositorios vaginales conocidos. Las vacunas de la presente invención pueden también administrarse por la vía rectal. En tales casos los excipientes pueden también incluir ceras y polímeros conocidos en la técnica para formar supositorios rectales.

Las preparaciones de más de una saponina en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención también forman parte de la presente invención. Por ejemplo, combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A,  $\beta$ -escina, o digitonina. Además, las composiciones de la presente invención pueden comprender combinaciones de más de un oligonucleótido inmunoestimulante.

Como alternativa, las formulaciones pueden estar combinadas con vehículos de vacunas compuestos por quitosán u otros polímeros policatiónicos, partículas de polilactida y polilactida-co-glicólido, matriz de polímero basado en poli-N-acetil glucosamina, partículas compuestas por polisacáridos o polisacáridos químicamente modificados, liposomas y partículas basadas en lípidos, partículas compuestas por monoésteres de glicerol, etc. Las saponinas pueden también formularse en presencia de colesterol para formar estructuras particuladas tales como liposomas o ISCOM. Además, las saponinas pueden formularse junto con un éter o un éster de polioxietileno, en una solución o suspensión no particulada, o en una estructura particulada tal como un liposoma paucilamelar o ISCOM. Las saponinas pueden también formularse con excipientes tales como Carbopol<sup>®</sup> para aumentar la viscosidad, o pueden formularse en una forma de polvo seco con un excipiente en polvo tal como lactosa.

Los adyuvantes particularmente de preferencia son combinaciones de 3D-MPL y QS21 (Documento EP 0 671 948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (Documentos WO 95/17210, WO 98/56414), o 3D-MPL formulado con otros vehículos (Documento EP 0 689 454 B1) en combinación con los oligonucleótidos CpG que se describen en este documento. La cantidad de CpG o de oligonucleótidos inmunoestimulantes en los adyuvantes o vacunas de la presente invención es generalmente pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna puede estar en la región de 1-1000  $\mu$ g por dosis, de preferencia 1-500  $\mu$ g por dosis, y de más preferencia desde 1 hasta 100  $\mu$ g por dosis.

## ES 2 295 229 T3

La cantidad de saponina para uso en los adyuvantes de la presente invención puede estar en la región de 1-1000  $\mu\text{g}$  por dosis, de preferencia 1-500  $\mu\text{g}$  por dosis, de más preferencia 1-250  $\mu\text{g}$  por dosis, y de mayor preferencia desde 1 hasta 100  $\mu\text{g}$  por dosis. La relación CpG:saponina (p/p) estará, por consiguiente, en el intervalo desde 1:1000 hasta 1000:1, y estará típicamente en el intervalo desde 1:100 hasta 100:1, y de preferencia en el intervalo desde 1:10 hasta 1:1 o 1:1 hasta 10:1, y de mayor preferencia 1:1, 4:1 o 10:1.

Las formulaciones de la presente invención pueden usarse para fines profilácticos y terapéuticos. Por consiguiente, se proporciona el uso de una combinación de una saponina, un lipopolisacárido y una molécula de CpG junto con un antígeno de cáncer, como se define en la reivindicación 1 en la fabricación de una vacuna para la prevención y el tratamiento del cáncer, en particular carcinomas de mama y de próstata. En otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna o combinación de adyuvantes, que comprende un lipopolisacárido, una saponina y CpG, como se describe en este documento para uso como un medicamento. La preparación de la vacuna se describe en general en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, EEUU 1978.

La invención proporciona por consiguiente un procedimiento para prevenir que un individuo contraiga una enfermedad seleccionada del grupo que comprende cánceres de próstata, de mama, colorrectal, de pulmón, pancreático, renal, ovárico o melanomas; que comprende la administración de una composición como se describe sustancialmente en este documento a través de la vía sistémica de dicho individuo.

Los ejemplos de excipientes aceptables farmacéuticamente adecuados para uso en las combinaciones de la presente invención incluyen agua, solución salina tamponada de fosfato, soluciones tampón isotónicas.

### Ejemplo 1

- Se produjo ECD-PD en células CHO según los procedimientos del Documento WO 00/44899. Las formulaciones se probaron en ratones y conejos
- Se compararon las formulaciones frente a un número de controles.

### *SBAS1+SBAS7*

ECD-PD formulado con el oligonucleótido CpG 2006 3D-MPL, QS21 en liposomas.

### *Formulación SBAS1*

Comprende QS21 en liposomas y 3D-MPL asociado con los liposomas, se preparó según los procedimientos del Documento EP 0822831.

### *Formulación SBAS1+SBAS7*

A la formulación anterior se le adicionó el oligonucleótido CpG 2006. Se mezcló el antígeno con la formulación de adyuvante previo al uso.

### *Formulaciones basadas en SBAS7 + SBAS2 (ratones)*

Para una dosis de 50  $\mu\text{l}$  de vacuna, se diluyó la proteína ECD-PD (25  $\mu\text{g}$ ) en PBS concentrado diez veces pH 6,8 y H<sub>2</sub>O previo a la adición consecutiva de una emulsión de aceite en agua que comprendía SB62: que se preparó y comprende escualeno al 5%, tocoferol al 5%, tween 80 al 2,0%; el tamaño de partícula era de 180 nm.

### *Preparación de la emulsión SB62 (concentrada al doble)*

Se disuelve Tween 80 en solución salina tamponada de fosfato (PBS) para dar una solución al 2% en PBS. Para proporcionar 100 ml de emulsión concentrados al doble se mezclan bien con vórtex 5 g de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno. Se añaden 90 ml de solución de PBS/Tween y se mezcla bien. A continuación se pasa la emulsión resultante a través de una jeringa y finalmente se microfluidifica usando una unidad de microfluídica M110S. Las gotas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm, a continuación se adiciona 3D-MPL (10  $\mu\text{g}$ ), QS21 (10  $\mu\text{g}$ ), 50  $\mu\text{g}$  de CpG ODN 2006 seguidos 30 minutos más tarde por la adición de timerosal 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  como conservante. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

Las formulaciones SBAS 2 se prepararon como anteriormente, pero sin la adición del oligonucleótido CpG.

SBAS7 es oligonucleótido CpG 2006.

## ES 2 295 229 T3

### *Formulaciones basadas en SBAS7 + SBAS2 (Conejo)*

Para una dosis de 500  $\mu$ l de vacuna, se diluyó la proteína ECD-PD (100  $\mu$ g) en PBS concentrado 10 veces pH 6,8 y H<sub>2</sub>O previo a la adición consecutiva de 250  $\mu$ l de SB62, 3D-MPL (100  $\mu$ g), QS21 (100  $\mu$ g) y 500  $\mu$ g de CpG ODN 2006 seguidos 30 minutos más tarde por la adición de timerosal 50  $\mu$ g/ml como conservante. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

### Ejemplo 2

#### 10 *Experimentos de desafío tumoral*

Se inyectaron grupos de ratones F1 (C57 x Balb c) (8 ratones/grupo) con 1/10 de la dosis de antígeno usada para seres humanos (25  $\mu$ g) en los días 0-14-28-42 y se desafiaron en el día 56 con células TC1 que expresan Her 2 con aproximadamente 2 x 10<sup>6</sup> células TC 1 Her2/animal administradas por vía subcutánea.

15 Se recogieron células TC1 de 1/2 de los bazos de los animales en el día 56 y se sacó sangre a los animales.

Como se muestra en la figura 1, la adición de un oligonucleótido CpG a una formulación de 3D-MPL/QS21 potencia de manera sinérgica la regresión tumoral y sólo estas formulaciones dieron lugar a una regresión tumoral completa en los ratones.

20

### Ejemplo 3

#### 25 *Inmunogenicidad de ECD-PD en diferentes adyuvantes en ratones*

Se inmunizaron 6 grupos de 4 conejos en los días 0, 21 y 42 respectivamente con 100  $\mu$ g de ECD-PD en AS02, AS01, AS05, AS06 (CpG 2006 absorbido en alumbre), AS07 y AS02B+AS07.

30 Se analizó la serología 14 días post III y la tabla 1 muestra que las formulaciones de la presente invención fueron superiores para elevar el valor de la respuesta de anticuerpos frente a otras formulaciones probadas.

TABLA 1

35

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

40

45

### Ejemplo 4

#### 50 *Inmunogenicidad de Her 2 neu, ECD-PD en monos Rhesus adultos*

Se inmunizaron monos Rhesus adultos con ECD-PD en diversas formulaciones de adyuvantes:

55 AS02 B - QS21, 3D-MPL, en emulsión de aceite en agua

AS01 - QS21, 3D-MPL, en liposoma

AS05 - QS21 en liposoma

60 AS06 - CpG 2006 alumbre

AS07 - CpG 2006

65 AS02B + AS07 - véase ejemplo 1 para detalles.

La vacunación indujo una respuesta de anticuerpos más elevada en las formulaciones de la presente invención (AS 2 - AS07). Véase figura 1.

## ES 2 295 229 T3

Otros análisis mostraron que la respuesta de anticuerpos fue monoclonal y demostraron una actividad inhibidora sobre el crecimiento *in vitro* de una línea celular de cáncer de mama humano (SKBR3) que sobreexpresa la molécula Her 2 neu. La herceptina, un anticuerpo monoclonal para el tratamiento de tumores que expresan Her 2 neu es capaz de inhibir el crecimiento de esta línea celular.

Se vio que los anticuerpos generados tras la vacunación activa con la formulación eran por consiguiente funcionales.

### Ejemplo 5

#### *Inmunización de ratones con antígeno ECD-PG*

Este experimento se diseñó para investigar una variedad de formulaciones de adyuvantes con el antígeno que es una fusión del dominio extracelular de Her 2 neu unido al dominio de fosforilación (ECD-PD), que se produjo en células CHO según los procedimientos del Documento WO 00/44899.

Grupo	Antígeno (25 µg)	Adyuvante
1	ECD-PD	ninguno (solución salina tamponada de 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 usadas en los grupos anteriores usaron D, L,  $\alpha$ -tocoferol (CAS N° 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 disponible comercialmente en ROCHE<sup>TM</sup>. Si estaba presente el tocol, lo estaba en una emulsión de aceite en agua que comprendía 2,5% en volumen, en combinación con escualeno al 2,5% en volumen. Se mezclaron ambos aceites, y se añadió monooleato de polioxitilen sorbitán (Tween 80<sup>TM</sup>), previo a microfluidificar (unidad de microfluidica M110S, máximo de 50 pasajes, durante un período de 2 minutos con entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar) como se describe en el Documento WO 95/17210). Por consiguiente, los grupos 3, 6 y 9 se basaron en la emulsión de tocol anterior con la adición de QS21, 3D-MPL o CpG acuosos.

Si en alguno de los grupos de vacuna anteriores estaban presentes QS21 y 3D-PML, se incluyeron a razón de 5 µg/dosis; CpG (OLIGO 4 (SEC ID N°:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se añadió a razón de 50 µg por dosis.

Los adyuvantes tal como se usaron para los grupos 2, 5, 10 se prepararon según las técnicas descritas en el Documento EP 0 822 831 B1 (cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia). El grupo 11 comprendió 3D-MPL en la membrana de un liposoma. Brevemente, se mezclaron juntos el 3D-MPL, dioleoil fosfatidil colina y colesterol y se microfluidificó formando liposomas unilamelares (como se describe en el Documento EP 0 822 0831 B1 - con omisión de QS21).

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

#### *Procedimiento de vacunación*

Se vacunaron grupos de ratones B6F1 en cuatro ocasiones (con volúmenes de 50 µl), por vía intramuscular, separados por 14 días. 14 días tras la 4ª dosis de vacuna, se desafió a los ratones por vía subcutánea con 2 x10<sup>6</sup> células tumorales TC1 que expresan Her 2 neu.

## ES 2 295 229 T3

Las líneas celulares tumorales Her 2 neu-TC1 se produjeron por transducción de células TC1 por medio de vectores retrovirales que codifican Her 2 neu. Tras un período de selección con blastocidina, se aislaron los clones resistentes y se seleccionaron por expresión de Her 2 neu por FACS. Se seleccionó el clon con la expresión de Her 2 neu más elevada, y se identificó una dosis de desafío de  $2 \times 10^6$  para que tuviera una cinética de crecimiento similar a las células TC1 de tipo salvaje y para dar lugar a un desarrollo tumoral en el 100% de los animales de control.

Se midió el tamaño de los tumores individuales dos veces por semana y se expresó como una media de grupo.

### 10 *Resultados*

La Figura 3 muestra los resultados de crecimiento tumoral para los grupos 1, 2, 4, 5 y 6. La Figura 4 muestra los resultados de crecimiento tumoral para los grupos 1, 5, 6, 7 y 11. La Figura 5 muestra los resultados de crecimiento tumoral para los grupos 1, 5, 6, 8, 9 y 10. Las únicas vacunas que indujeron una regresión completa del tumor fueron las vacunas que contenían un oligonucleótido inmunoestimulante y una saponina.

Las Figuras 6 y 7 muestran la linfoproliferación de esplenocitos *in vitro* tras la incubación con  $5 \mu\text{g/ml}$  de inmunógeno (ECD-PD) o dominio extracelular (ECD) o dominio intracelular (ICD) o Her 2 neu.

20 Las Figuras 8 y 9 muestran la respuesta inmune humoral al inmunógeno (ECD-PD) en términos de Ig total medido por ELISA (Fig. 8) o la distribución de isotipos de IgG dentro de estas respuestas (Fig. 9).

### 25 *Conclusión*

Posteriormente a 3 inyecciones, la inducción de anticuerpos es

$$\text{AS02B+AS07A} > \text{AS01B} > \text{AS02B} = \text{AS06} = \text{AS05} \text{ AS07A}$$

### 30 *Conclusión general*

35 El adyuvante probado (AS1, AS2, AS7) tuvo efecto similar. Sin embargo, la combinación de AS1 y AS7 o AS2 y AS7 fueron adyuvantes más eficaces. Se muestra claramente CMI tras 4 vacunaciones en animales que recibieron el adyuvante combinado en la molécula completa ECD-PD, pero también en cada parte por separado (ECD e ICD). Las formulaciones de la presente invención son muy eficaces para inducir la regresión tumoral.

### 40 *Ejemplo 6*

#### *Inmunización de ratones con antígeno P703P*

45 Este experimento se diseñó para investigar una variedad de formulaciones de adyuvantes con el antígeno que es una fusión del antígeno de Próstata (Ferguson, y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 1999, 96, 3114-3119)) y el fragmento 1-81 N terminal de NS 1 del virus de Influenza (P703P-NS 1).

Grupo	Antígeno (25 $\mu\text{g/ml}$ )	Adyuvante
50 1	P703P-NS 1	ninguno (solución salina tamponada de fosfato (PBS))
2	P703P-NS 1	CpG
55 3	P703P-NS 1	Liposomas con QS21 en membrana + CpG
4	P703P-NS 1	Liposomas con QS21 y 3D-MPL en membrana + CpG
60 5	P703P-NS 1	emulsión de aceite en agua que contiene tocol con QS21 y 3D-MPL + CpG
65 6	P703P-NS 1	emulsión de aceite en agua que contiene tocol + CpG

## ES 2 295 229 T3

Las emulsiones de aceite en agua que contienen tocol usadas en los grupos anteriores usaron D, L,  $\alpha$ -tocoferol (CAS N° 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 disponible comercialmente en ROCHE™. Si estaba presente el tocol, lo estaba en una emulsión de aceite en agua que comprendía 2,5% en volumen, en combinación con escualeno al 2,5% en volumen. Se mezclaron ambos aceites, y se añadió monooleato de polioxietilén sorbitán (Tween 80™), previo a microfluidificar (unidad de microfluídica M110S, máximo de 50 pasajes, durante un período de 2 minutos con entrada de presión máxima de 6 bar (presión de salida de aproximadamente 850 bar) como se describe en el Documento WO 95/17210). Por consiguiente, los grupos 5 y 6 se basaron en la emulsión de tocol anterior con la adición de QS21, 3D-MPL o CpG acuosos.

Si en alguno de los grupos de vacuna anteriores estaban presentes QS21 y 3D-PML, se incluyeron a razón de 5  $\mu$ g/dosis; CpG (OLIGO 4 (SEC ID N°:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT) se añadió a razón de 50  $\mu$ g por dosis.

Los adyuvantes tal como se usaron para los grupos 3 y 4 se prepararon según las técnicas descritas en el Documento EP 0 822 831 B1 (cuyo contenido se incorpora en este documento por referencia).

### *Procedimiento de vacunación*

Se vacunaron grupos de ratones B6F1 en cuatro ocasiones (con volúmenes de 50  $\mu$ l), por vía intramuscular, separados por 14 días.

### *Resultados*

Las Figuras 10 y 11 muestran la linfoproliferación *in vitro* de esplenocitos posteriormente a la segunda vacunación y a los 14 días posteriores a la cuarta vacunación, tras la incubación *in vitro* con 3  $\mu$ g/ml de inmunógeno (NS1-P703O) o P703P expresado por pichia (15  $\mu$ g/ml) o una proteína de fusión NS1-OspA no específica.

Las Figuras 12 y 13 muestran la respuesta inmune humoral al inmunógeno (NS1-P703P) en términos de Ig total medida por valoración de punto medio por ELISA (Fig. 10) o la distribución de isotipos de IgG dentro de estas respuestas (Fig. 11).

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende un antígeno de cáncer seleccionado del grupo:

- i) un antígeno de la familia de proteínas MAGE unido a un acompañante de fusión heterólogo;
- ii) P501A;
- iii) Cripto;
- iv) derivado del antígeno Her-2/neu desprovisto de una porción sustancial del dominio transmembranario de Her-2/neu,

un lipopolisacárido seleccionado del grupo:

- a) Monofosforil Lípido A
- b) Monofosforil Lípido A 3-O-Desacilado
- c) Difosforil Lípido A, y

una composición adyuvante que comprende una saponina, junto con un oligonucleótido inmunoestimulante.

2. Una composición según la reivindicación 1 en la que la saponina es QS21.

3. Una composición inmunogénica según la reivindicación 1 ó 2 en la que el oligonucleótido inmunoestimulante contiene al menos dos motivos de CpG.

4. Una composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el oligonucleótido inmunoestimulante se selecciona del grupo:

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

5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que la saponina está formulada para formar ISCOM o liposomas.

6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que la saponina está presente en una emulsión de aceite ó agua.

7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de Her-2/neu.

8. Una composición según la reivindicación 7 en la que la molécula de Her-2/neu está desprovista de un dominio transmembranario funcional.

9. Una composición según las reivindicaciones 7 u 8 que además comprende el dominio de fosforilación de Her-2/neu.

10. El uso de una combinación de una saponina, un oligonucleótido inmunoestimulante, un lipopolisacárido seleccionado del grupo:

- a) Monofosforil Lípido A
- b) Monofosforil Lípido A 3-O-Desacilado
- c) Difosforil Lípido A, y



## ES 2 295 229 T3

y un antígeno de cáncer seleccionado del grupo:

i) un antígeno de la familia de proteínas MAGE unido a un acompañante de fusión heterólogo;

5 ii) P501S;

iii) Cripto;

10 iv) derivado del antígeno Her-2/neu desprovisto de una porción sustancial del dominio transmembranario de Her-2/neu,

en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de tumores.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

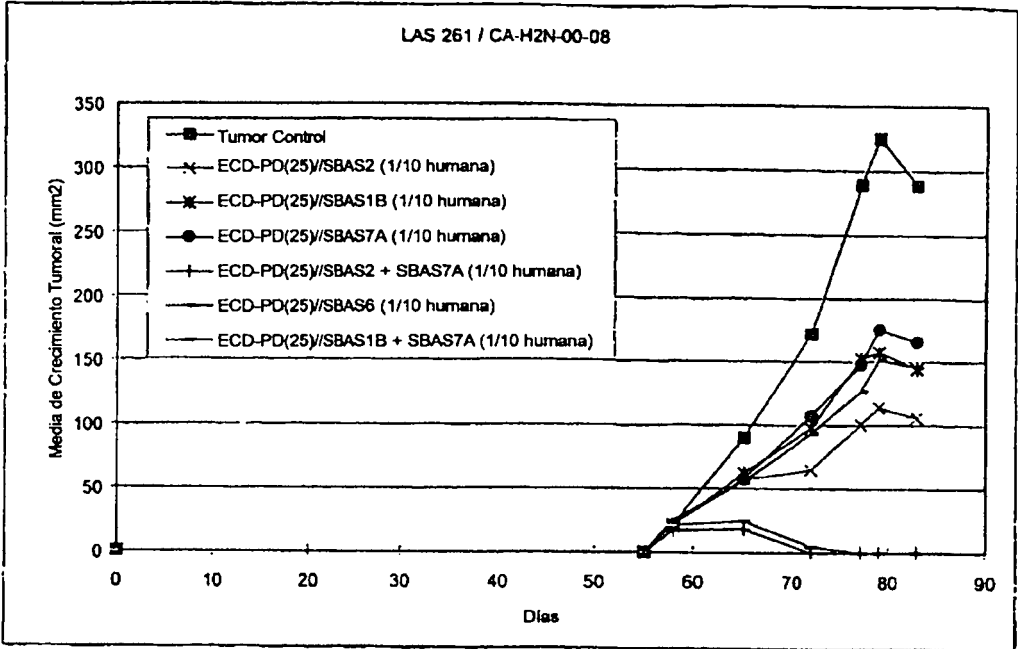


FIGURA 2

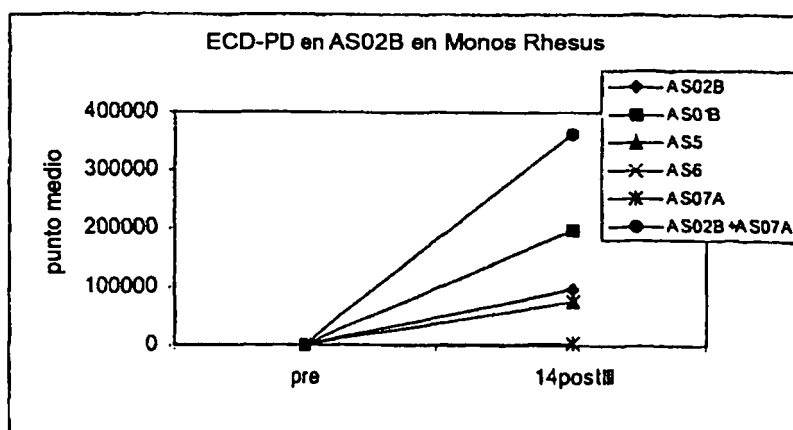


FIGURA 3 - Crecimiento tumoral in vivo posterior a la vacunación

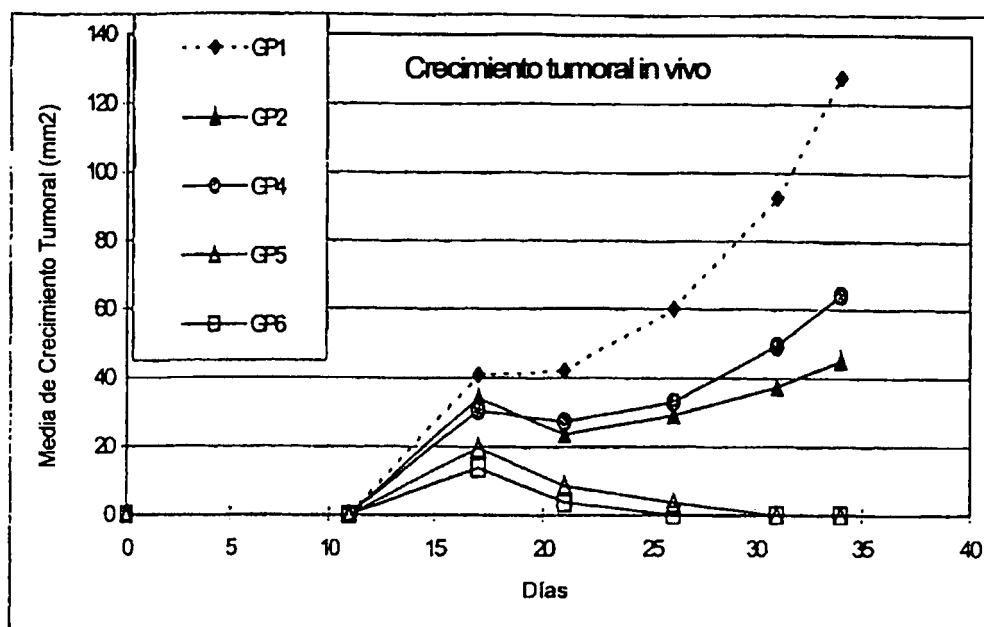


FIGURA 4

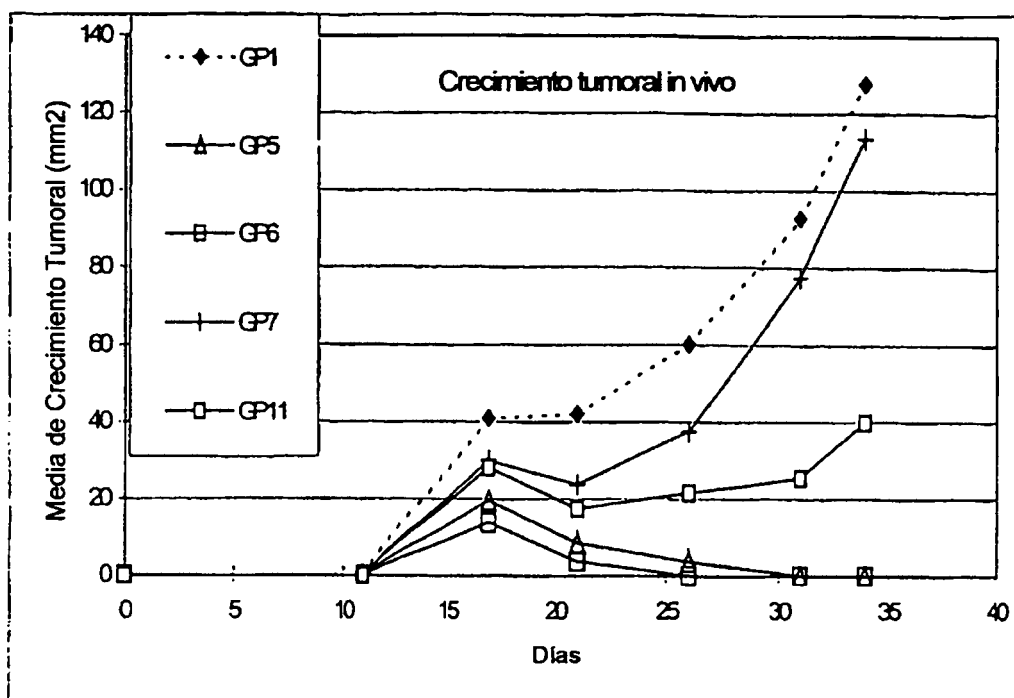


FIGURA 5

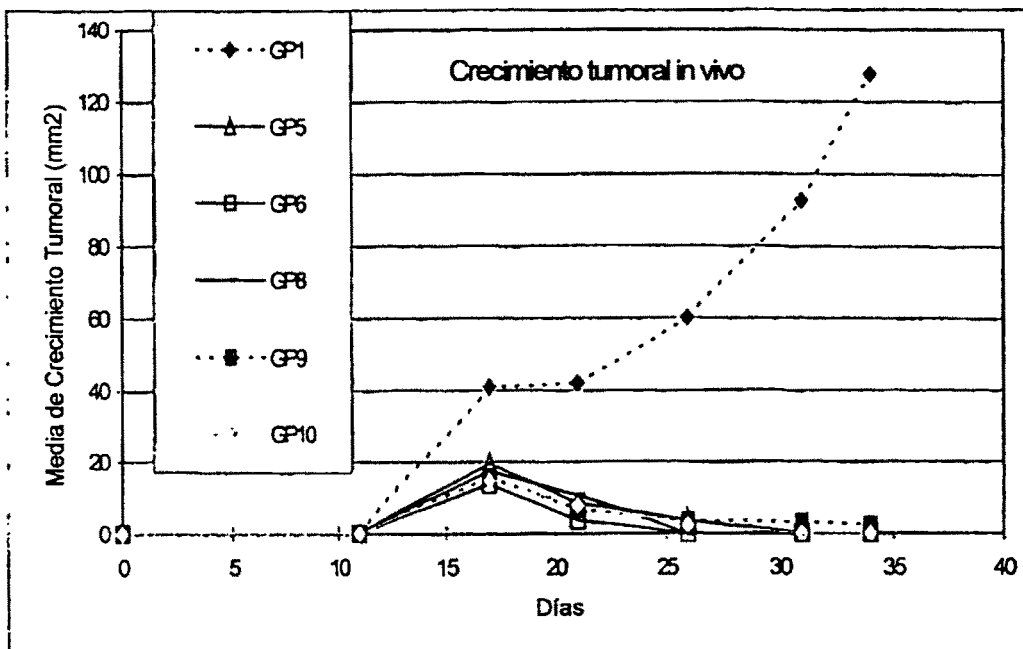


FIGURA 6 - Linfoproliferación (posterior a la vacunación, previa al desafío tumoral)

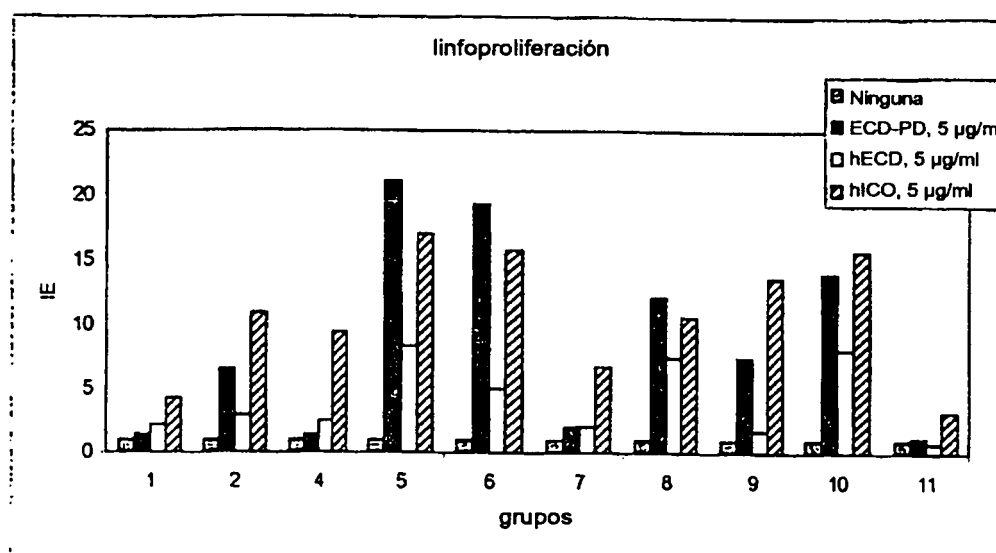


FIGURA 7 - Linfoproliferación (posterior al desafío tumoral)

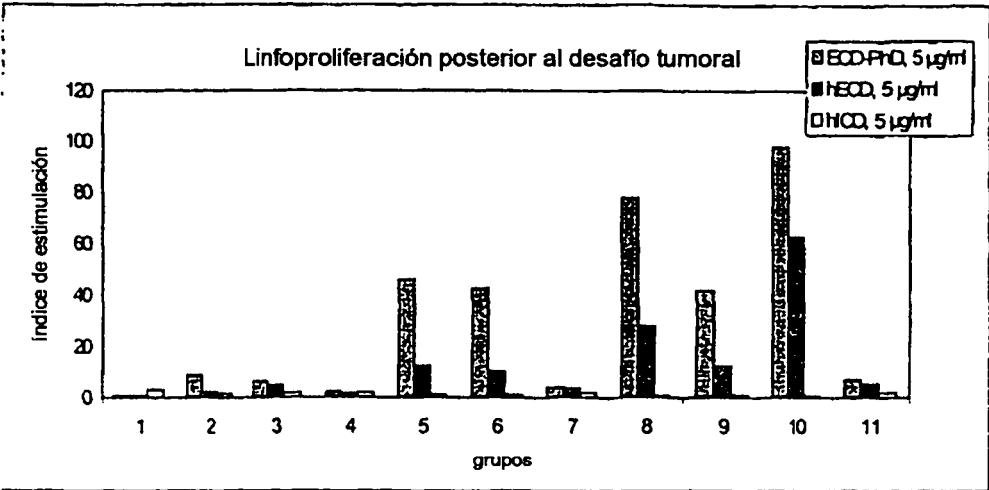




FIGURA 8 - Respuesta de Ig anti-ECD total posterior a la vacunación

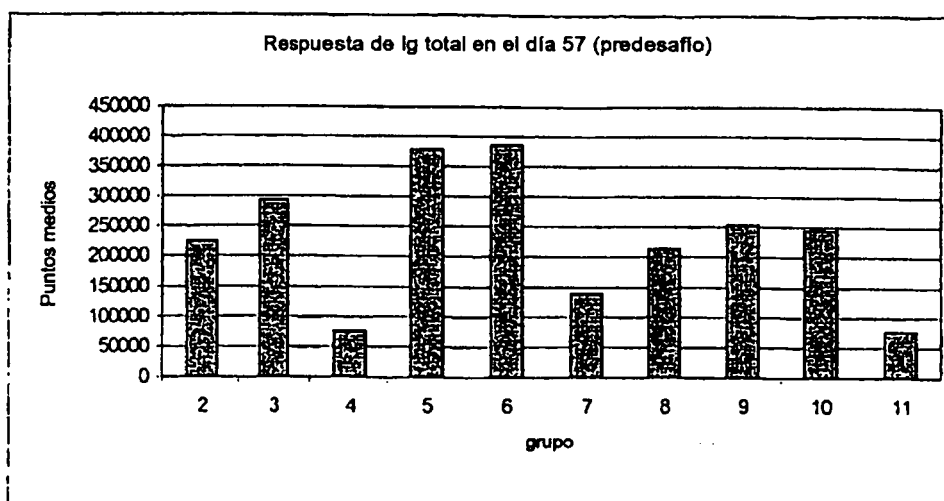


FIGURA 9 - Distribución de isotipos inducidos por las vacunas

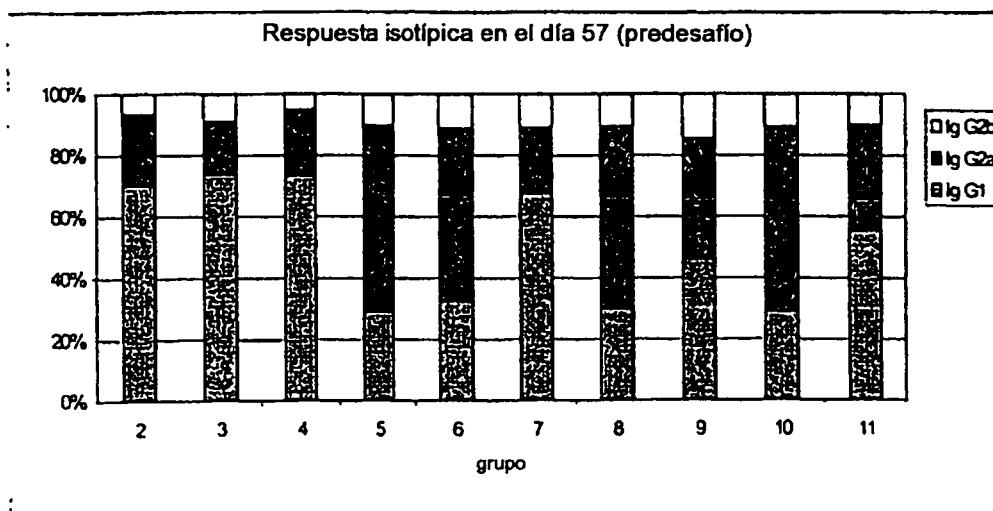


FIGURA 10 - Linfoproliferación posterior a la segunda vacunación con P703

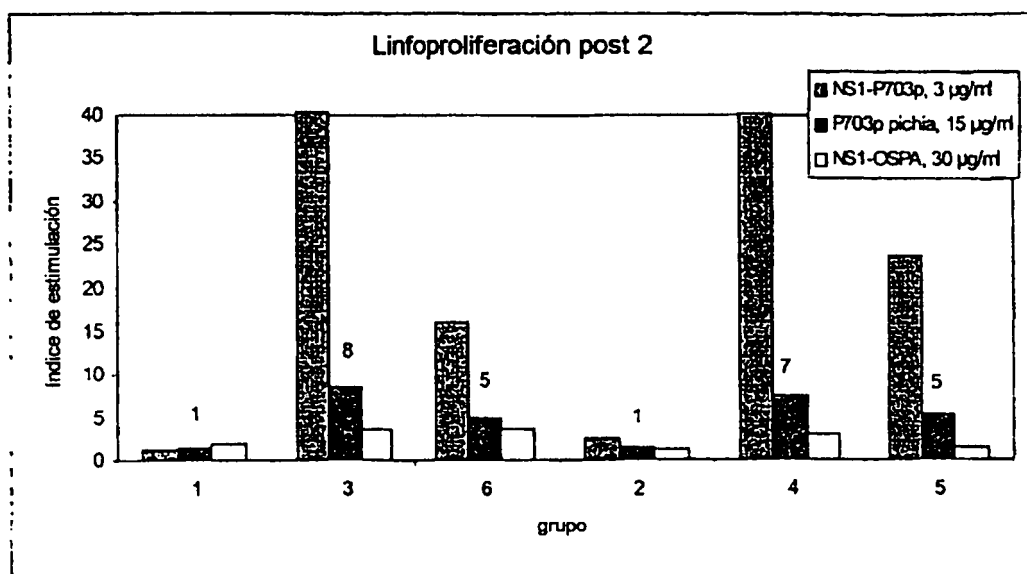


FIGURA 11 - Linfoproliferación posterior a la cuarta vacunación con P703

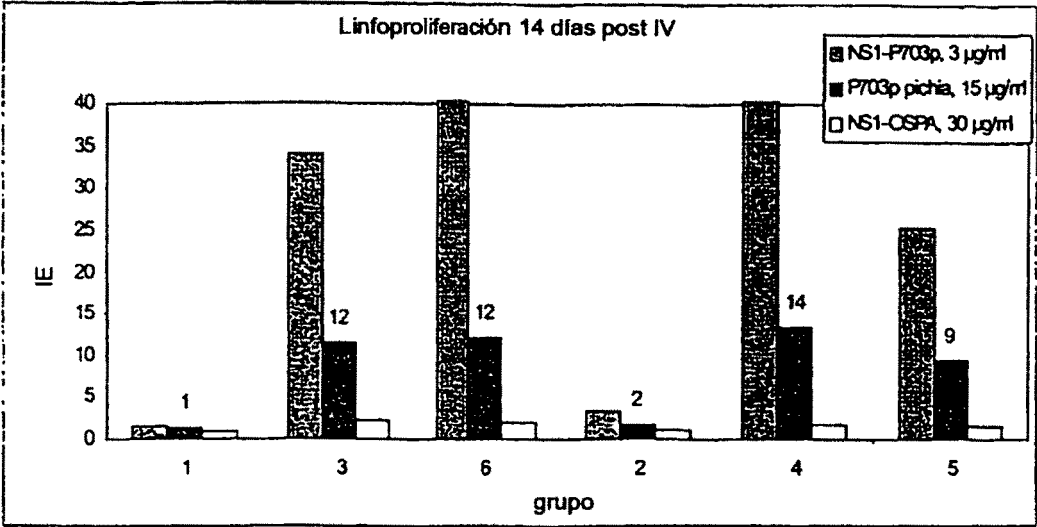


FIGURA 12

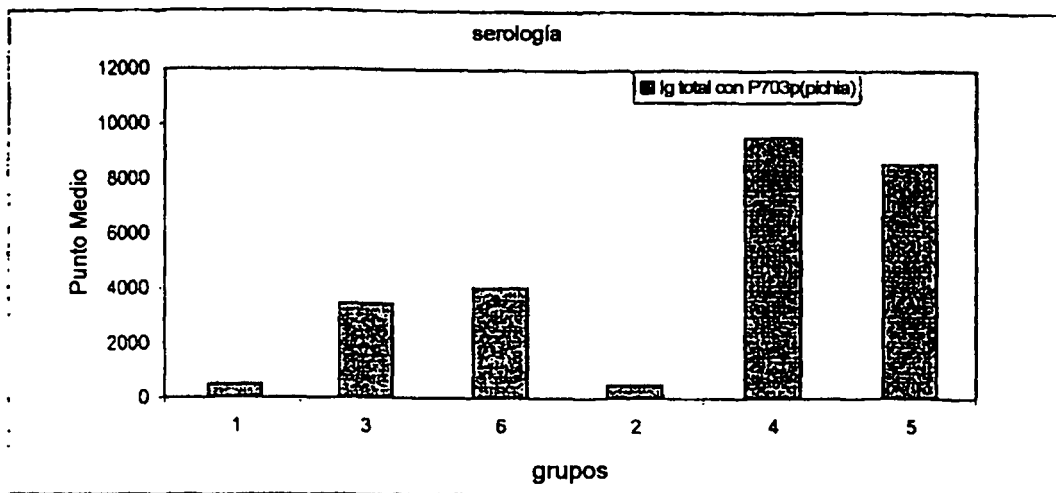


FIGURA 13 - Valores de anticuerpos anti-NS1-P703 inducidos por la vacunación

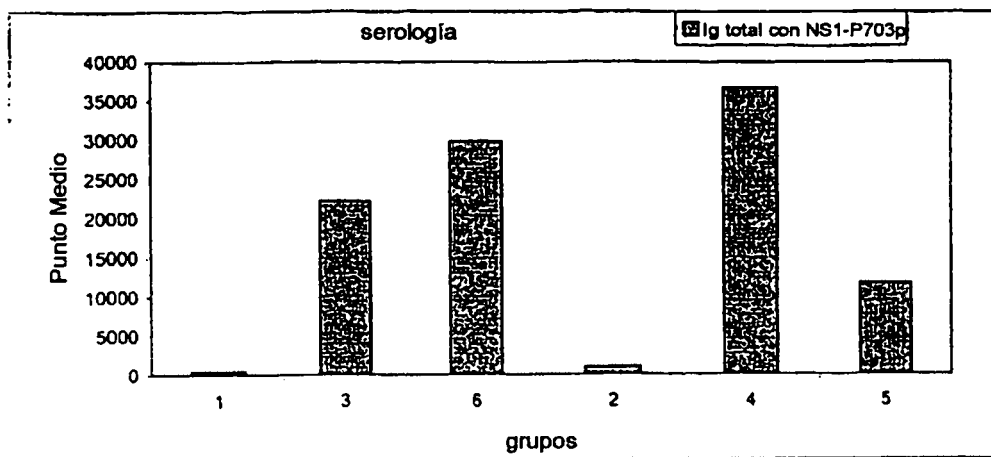
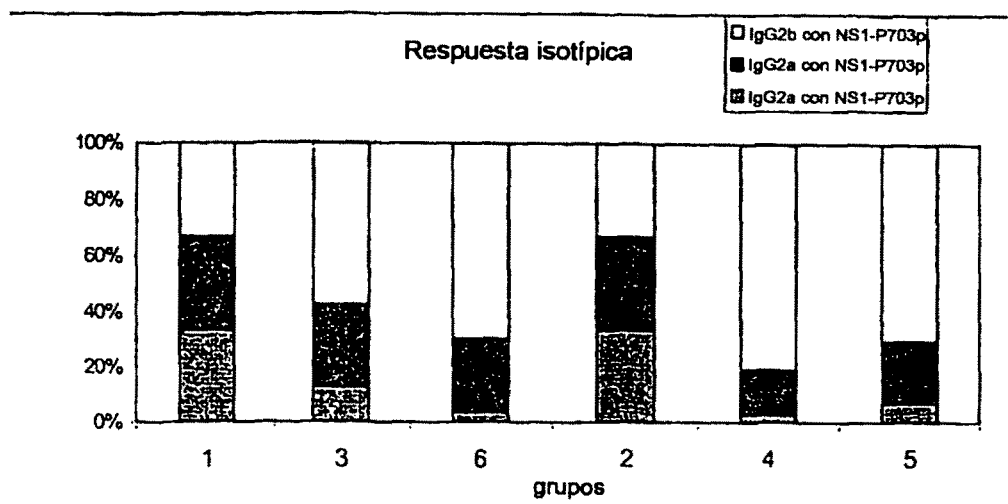


FIGURA 14 - Distribución de isotipos anti-NS1-P703P inducidos por las vacunas



# ES 2 295 229 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> SmithKline Beecham Biologicals sa	
5 <120> Vacunas	
<130> B45245	
10 <160> 5	
<170> FasSEQ para Windows Versión 4.0	
15 <210> 1	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
20 <220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
<400> 1	
25 tccatgacgt tcctgacgt	20
<210> 2	
30 <211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
35 <220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
<400> 2	
40 tctcccagcg tgcgcat	18
<210> 3	
45 <211> 30	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
50 <223> Oligonucleótido sintético	
<400> 3	
55 accgatgacg tcgccgtga cggcaccag	30
<210> 4	
<211> 24	
60 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
65 <223> Oligonucleótido sintético	



## ES 2 295 229 T3

<400> 4

tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt

24

5

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 5

tccatgacgt tctgatgct

20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65