

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.05.22	(73) Titular(es): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. RUE DE L'INSTITUT, 89 1330 RIXENSART BE
(30) Prioridade(s): 2007.05.24 WO PCT/EP2007/055037 2007.11.23 GB 0723044 2007.12.06 GB 0723900	(72) Inventor(es): DOMINIQUE INGRID LEMOINE BE
(43) Data de publicação do pedido: 2010.02.03	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.10.03 247/2012	

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA DE WT-1 CONTENDO CPG**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSIÇÕES LIOFILIZADAS COMPREENDENDO UM ANTIGÉNIO E UM AGONISTA DO RECEPTOR DE TIPO TOLL (TLR) 9. ESSAS COMPOSIÇÕES PODEM SER RECONSTITUÍDAS EM COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS PARA UTILIZAÇÃO EM VACINAÇÃO COM UM VEÍCULO SELECIONADO DO GRUPO DE VEÍCULOS PARTICULADOS CONSISTINDO EM LIPOSSOMAS, SAIS MINERAIS, EMULSÕES, POLÍMEROS E ISCOM. TAMBÉM SÃO AQUI PROPORCIONADOS MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES IMUNOGÉNICAS A PARTIR DAS COMPOSIÇÕES LIOFILIZADAS DA INVENÇÃO E UTILIZAÇÃO DAS MESMAS EM IMUNIZAÇÃO.

RESUMO

"COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA DE WT-1 CONTENDO CPG"

A presente invenção proporciona composições liofilizadas compreendendo um antigénio e um agonista do receptor de tipo Toll (TLR) 9. Essas composições podem ser reconstituídas em composições imunogénicas para utilização em vacinação com um veículo seleccionado do grupo de veículos particulados consistindo em lipossomas, sais minerais, emulsões, polímeros e ISCOM. Também são aqui proporcionados métodos de preparação de composições imunogénicas a partir das composições liofilizadas da invenção e utilização das mesmas em imunização.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÃO LIOFILIZADA DE WT-1 CONTENDO CPG"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se a composições antigénicas melhoradas e métodos de utilização das mesmas para preparar composições imunogénicas. Em particular, a presente invenção refere-se a composições liofilizadas compreendendo um antigénio e um agonista do receptor de tipo Toll (TLR) 9. Tais composições podem ser reconstituídas em composições imunogénicas para utilização em vacinação com um veículo seleccionado do grupo de veículos particulados consistindo em lipossomas, sais minerais, emulsões, polímeros e ISCOM. Também são parte da presente invenção métodos de preparação de composições imunogénicas a partir das composições liofilizadas da invenção e utilização das mesmas em imunização.

Antecedentes à invenção

Os adjuvantes são, por vezes, utilizados para melhorar a resposta imunitária deduzida para qualquer dado antigénio. Contudo, a inclusão de adjuvantes dentro de uma vacina ou composição imunogénica aumenta a complexidade de preparação dos componentes, assim como a complexidade de distribuição e formulação da composição vacinal. A preparação de cada dos componentes adjuvantes, assim como o componente antigénico, deve ser considerada pelos formuladores. Isto é particularmente

verdadeiro porque, por exemplo, o pH de componentes adjuvantes em solução pode ser muito diferente do pH óptimo para um dado antigénio e estas diferenças necessitam de ser cuidadosamente controladas e geridas para prevenir, por exemplo, a precipitação ou perda de propriedades desejáveis dos componentes. O pH do antigénio em água para injeção pode, por exemplo ser cerca de pH 7 ou ligeiramente maior e, quando o adjuvante é adicionado, o pH pode ser tão baixo quanto pH 6,3. A este pH, o antigénio pode, por exemplo, não ser estável quando armazenado durante períodos prolongados.

Os componentes devem ser, então, formulados e distribuídos numa forma que seja tão estável quanto possível, porque os produtos farmacêuticos para utilização humana, antes de poderem ser aprovados para comercialização, devem ser bem caracterizados, estáveis e seguros. Por esta razão, devem ser realizados estudos de estabilidade de longo prazo na formulação final, para garantir que cumpre os critérios relevantes. A informação gerada nesses estudos de longo prazo é utilizada para sustentar a submissão às autoridades reguladoras, tais como a FDA (Federal Drugs Authority - a entidade responsável pela aprovação de medicamentos nos EUA), para demonstrar que o produto é adequado para utilização em humanos.

A secagem por congelação ou liofilização é utilizada, em geral, para aumentar a estabilidade e, deste modo, o tempo de armazenamento de material incluindo materiais farmacêuticos, tal como um antigénio utilizado em vacinas.

Frequentemente, as composições antigénicas liofilizadas são proporcionadas a profissionais de cuidados de saúde para reconstituição com diluente (por exemplo, água para injeção

[WFI] ou, em alguns casos, uma formulação de adjuvante líquido) pouco antes da administração ao doente. Deste modo, o período de tempo que os diversos componentes da vacina final são mantidos em proximidade imediata é minimizado.

Quando os antigénios são liofilizados para formar lio-bolos (o produto seco da liofilização), devem ser considerados muitos factores. Por exemplo, a antigenicidade/imunogenicidade do antigénio deve ser mantida na forma liofilizada. O antigénio não deve agregar-se ou degradar-se enquanto na forma liofilizada. O lio-bolo deve estar bem formado e não colapsar. Finalmente, o antigénio deve, evidentemente, estar numa forma que se dissolva rapidamente quando reconstituído. Onde a solução para reconstituição não seja simplesmente WFI, por exemplo, quando o antigénio é reconstituído com adjuvante líquido, então, o impacto dos componentes da solução nas propriedades do produto reconstituído necessita ser considerado.

Como mencionado, os adjuvantes têm sido utilizados durante muitos anos para melhorar a resposta imune para o componente antigénico de uma vacina. Uma combinação de adjuvante particularmente potente é uma compreendendo Monofosforil-Lípido A 3-Desacilado (3D-MPL) e uma saponina, particularmente, QS21, uma fracção purificada de saponina extraída da casca de *Quillaja saponaria Monara*. Esta combinação pode ser proporcionada, por exemplo, como uma emulsão de óleo em água, formulação lipossomal ou semelhantes.

Em ensaios clínicos anteriores com antigénios, por exemplo, com antigénios de malária, tal como RTS,S, é proporcionado o antigénio liofilizado e um frasco-ampola separado de adjuvante líquido, por exemplo, uma formulação de óleo em água de MPL e

QS21 ou também é proporcionada uma formulação lipossomal de MPL e QS21 para reconstituição do antigénio. Os componentes individuais são combinados para formar a composição vacinal final pouco antes da administração.

Determinados oligonucleótidos imunoestimuladores contendo dinucleótidos CpG não metilados ("CpG") são ligandos de TLR9 e, quando administrados pelas vias sistémica e mucosal, foram identificados como sendo adjuvantes (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis *et al.*, *J.Immunol.*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie e Davis, *J.Immunol.*, 1998, 161(9):4463-6). CpG é uma abreviatura para motivos do dinucleótido citosina-guanina presentes no ADN. Historicamente, foi observado que a fracção de ADN da BCG poderia exercer um efeito antitumoral. Em estudos adicionais, mostrou-se que oligonucleótidos sintéticos derivados de sequências génicas de BCG eram capazes de induzirem efeitos imunoestimulatórios (*in vitro* e *in vivo*). Os autores destes estudos concluíram que determinadas sequências palindrómicas, incluindo um motivo CG central, transportavam esta actividade. O papel central do motivo CG na imunoestimulação foi elucidado mais tarde, numa publicação de Krieg, *Nature* 374, p. 546, 1995. A análise detalhada mostrou que o motivo CG tem que estar num determinado contexto de sequência e que essas sequências são comuns em ADN bacteriano mas são raras em ADN de vertebrado. A sequência imunoestimuladora é frequentemente: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; em que o motivo CG dinucleotídico não está metilado, mas outras sequências de CpG não metiladas são conhecidas como sendo imunoestimuladoras e podem ser utilizadas na presente invenção.

Também se mostrou que um oligonucleótido imunoestimulador pode reter actividade imunológica quando a Guanosina é mutada para um motivo 7-desazaguanosina (documento *WO 03057822*).

Considera-se que estes oligonucleótidos imunoestimuladores têm um pH ácido em solução, por exemplo, abaixo de pH 7, tais como 6,3, 6,1 ou inferior. Isto pode fazer com que seja difícil incorporá-los em formulações vacinais líquidas, devido a serem dissemelhantes de outros componentes na formulação. Como discutido, tal pode causar precipitação e/ou problemas de estabilidade de longo prazo.

Considera-se que estes oligonucleótidos imunoestimuladores são susceptíveis de ser adjuvantes muito eficazes, particularmente quando utilizados em combinação, com combinações de adjuvantes existentes, tais como 3D-MPL e QS21. Espera-se que esses adjuvantes sejam empregues em doenças para as quais foi, até agora, difícil proporcionar vacinas eficazes, tais como VIH, cancro e, possivelmente, malária.

Há um número de diferentes modos nos quais os adjuvantes podem ser incluídos em vacinas, mas devem ser incluídos num modo que não afecte a estabilidade deles mesmos ou da composição antigénica e, também, num modo que não coloque um encargo indevido no profissional de cuidados de saúde que reconstitui a vacina. O modo mais simples de alcançar isto, seria o de colocar componentes adicionais dentro de frascos-ampola adicionais, de modo a que fossem mantidos em separado até imediatamente antes da reconstituição minimizando, desse modo, o tempo durante o qual os componentes pudessem afectar-se entre si. Tal significa que o antigénio e o oligonucleótido imunoestimulador deveriam ser proporcionados, cada, em frascos-ampola separados. Depois,

se fossem empregues componentes adjuvantes adicionais, tais como MPL e QS21, estes podem ser proporcionados como uma mistura líquida numa terceiro frasco-ampola. Contudo, um número crescente de componentes num número crescente de frascos-ampola conduz a custos aumentados, desperdício e, facto importante, a um aumento na possibilidade de erros durante a constituição.

Sumário da Invenção

A presente requerente verificou que quando um ligando de TLR9, tal como o oligonucleótido imunoestimulador CpG, se destina a ser parte de uma composição imunogénica como um adjuvante, o referido ligando de TLR9 pode ser liofilizado, juntamente com o antigénio, de modo a que seja proporcionado um único frasco-ampola contendo antigénio e adjuvante de ligando de TLR9 em conjunto num lio-bolo.

A presente invenção proporciona, por conseguinte, uma composição liofilizada, compreendendo um ou mais antigénios não carregados positivamente e oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG, em que o(s) referido(s) um ou mais antigénio(s) é (são) WT-1, ou um seu derivado ou fragmento, em que o derivado é suficientemente semelhante aos antigénios nativos para reter propriedades antigénicas e permanecer capaz de permitir que uma resposta imunitária seja deduzida contra o WT-1 e em que o fragmento tem, pelo menos, 8 aminoácidos de comprimento e é capaz de induzir uma resposta imunitária que reage de modo cruzado com o WT-1 de ocorrência natural. Num aspecto, o referido oligonucleótido contendo CpG compreende uma sequência de purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina. Noutro aspecto, o referido oligonucleótido imunoestimulador é seleccionado do

grupo consistindo em: SEQ ID N°: 1; SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 3; SEQ ID N°: 4; e SEQ ID N°: 5.

Embora não se desejando o vínculo a uma teoria, considera-se que proporcionando o antigénio e o oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG em conjunto, se proporciona um componente que é mais estável do que a simples adição do oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG a uma formulação líquida de MPL e QS21.

A presente invenção proporciona a vantagem de que, onde o antigénio e oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG são reconstituídos com WFI, pode proporcionar-se apenas um frasco-ampola com formulação liofilizada dentro do mesmo. Além disso, onde o WT-1, ou um seu derivado ou fragmento, e o oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG se destinem a ser reconstituídos com uma formulação líquida, tal como uma formulação de adjuvante líquido, então, é vantajoso poder ser-se capaz de proporcionar apenas dois frascos-ampola de componentes (em vez de três). Isto, por sua vez, tem benefícios de custo proporcionando, simultaneamente, um produto adequado para utilização de uma vacina uma vez reconstituída.

Além disso, a presente requerente verificou que a co-liofilização de CpG com antigénios que não tenham uma carga global positiva no tampão de reconstituição pode aumentar a solubilidade desses antigénios, após reconstituição com água para injeção ou adjuvante líquido. Por conseguinte, a presente invenção também proporciona um método para aumentar a solubilidade de um antigénio liofilizado após reconstituição, onde o antigénio não tenha uma carga líquida positiva no tampão de reconstituição, compreendendo a etapa de co-liofilização de

um oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG com o antigénio, em que o antigénio é WT-1 ou um seu derivado ou fragmento. A presente invenção também proporciona a utilização de um oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG, para aumentar a solubilidade de um antigénio liofilizado não carregado positivamente após reconstituição, em que o antigénio é WT-1 ou um seu derivado ou fragmento. Por “não carregado positivamente” significa-se que a carga global da proteína não é positiva. A proteína pode conter cargas positivas e negativas, mas a carga global da proteína é neutra ou negativa.

- A presente invenção também proporciona um método de preparação de uma composição imunogénica, compreendendo as etapas de reconstituição de uma composição liofilizada, como aqui descrito, com um veículo adequado. Numa forma de realização, o referido veículo é uma solução lipossomal ou uma emulsão de óleo em água. O referido veículo pode, opcionalmente, conter um ou mais imunoestimulantes que podem ser seleccionados do grupo consistindo em agonistas de TLR4, antagonistas de TLR4, saponinas, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8, agonistas de TLR9. Numa forma de realização, o referido veículo contém dois ou mais imunoestimulantes e, num aspecto, estes podem ser MPL 3-desacilado e QS21.

A presente invenção também proporciona um método de preparação de uma composição liofilizada da invenção, compreendendo a combinação de um ou mais antigénios desejados, um ligando de TLR9 e excipientes adequados e a liofilização da mistura resultante.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente requerente verificou que os ligandos de TLR9, tais como oligonucleótidos de CpG, podem ser liofilizados com um antigénio de interesse, sem afectar a antigenicidade ou estabilidade desse antigénio. Por ligando de TLR9 significa-se um composto que pode interagir com o receptor de TLR9. Mostrou-se que os membros da família do Receptor de Tipo Toll (TLR), em primeiro lugar descobertos em *Drosophila*, são receptores de reconhecimento de padrão, cada membro reconhecendo e respondendo a diferentes componentes microbianos para limitar/erradicar micróbios invasores. A ligação de padrões moleculares associados a patogénios (PAMP) a TLR induz a produção de intermediários reactivos de oxigénio e azoto, iniciação da rede de citocinas pró-inflamatórias e regulação positiva de moléculas co-estimulatórias ligando a rápida resposta inata à imunidade adaptativa. Muitos ligandos de TLR são conhecidos como sendo úteis como adjuvantes. Mostrou-se que o TLR9 responde a agonistas oligonucleotídicos. Por conseguinte, os ligandos de TLR9, aqui descritos a título exemplificativo, são oligonucleótidos imunoestimuladores. Num exemplo, esses ligandos de TLR9 contêm um motivo CpG. Os oligonucleótidos imunoestimuladores contendo CpG da invenção podem compreender modificações nos nucleótidos. Por exemplo, os documentos W00226757 e W003057822 divulgam modificações na porção C e G de um oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG.

Numa forma de realização, um oligonucleótido de CpG contém dois ou mais motivos CpG dinucleotídicos separados por, pelo menos, três, possivelmente, pelo menos, seis ou mais nucleótidos. Os oligonucleótidos da presente invenção são, tipicamente, desoxinucleótidos. Numa forma de realização, a

ligação internucleotídica no oligonucleótido é fosforoditioato ou, possivelmente, uma ligação fosforotioato, embora também possam ser utilizadas ligações fosfodiéster e outras ligações internucleotídicas, incluindo oligonucleótidos com ligações internucleotídicas mistas. Os métodos para a produção de oligonucleótidos de fosforotioato ou fosforoditioato são descritos nos documentos US5666153, US5278302 e WO95/26204. Os oligonucleótidos compreendendo diferentes ligações internucleotídicas estão contemplados, e. g., fosfodiósteres de fosforotioato mistos. Podem ser utilizadas outras ligações internucleotídicas que estabilizam o oligonucleótido.

Os exemplos de oligonucleótidos de CpG têm as seguintes sequências. Numa forma de realização, estas sequências contêm ligações internucleotídicas modificadas por fosforotioato.

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

OLIGO 2 (SEQ ID N°: 2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

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

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

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

Os oligonucleótidos de CpG alternativos podem compreender as sequências acima, em que têm deleções ou adições inconsequentes às mesmas.

Os oligonucleótidos de CpG, utilizados na presente invenção, podem ser sintetizados por qualquer método conhecido

na técnica (e. g., documento EP 468520). Convenientemente, esses oligonucleótidos podem ser sintetizados utilizando um sintetizador automatizado.

No contexto da presente descrição, pretende-se que o termo "antigénio" se refira a um componente imunogénico adequado para a dedução de uma resposta imunitária específica e adequado para inclusão dentro de uma vacina ou composição imunogénica. O antigénio pode compreender ou consistir em WT-1, expresso pelo gene do tumor de Wilm ou seu fragmento N-terminal WT-1F, compreendendo cerca de, ou aproximadamente, aminoácidos 1-249. O WT1 é uma proteína que se verificou ser, originalmente, superexpressa no cancro do rim pediátrico, Tumor de Wilm. Um antigénio que pode ser utilizado compreende a proteína de comprimento quase completo como antigénio. Numa forma de realização, o antigénio pode compreender ou consistir na proteína WT1-A10, que é uma proteína de fusão recombinante, de 292 AA, consistindo numa sequência tat truncada, de 12 mer, e nos aminoácidos número 2 - 281 da sequência de WT1. Barrett eL, *Clin. Experim. Immunol.* 2007, 148: 189-198, divulgam vacinas de WT1 com montanida como adjuvante.

Numa forma de realização, o antigénio tem um ponto isoelétrico de 9,6 ou inferior. Numa forma de realização, o antigénio tem ponto isoelétrico de 9 ou inferior. Numa forma de realização, o antigénio tem um ponto isoelétrico de 8,5 ou inferior. Numa forma de realização, o antigénio tem um ponto isoelétrico de 8,0 ou inferior. Numa forma de realização, o antigénio tem um ponto isoelétrico de 7,5. Numa forma de realização, o antigénio tem um ponto isoelétrico na gama de 7 a 8.

A carga líquida de uma proteína, quando reconstituída em tampão, depende do número de cargas positivas versus o número de cargas negativas na proteína, esta carga irá, evidentemente, variar, dependendo do pH do tampão de reconstituição. O ponto isoelétrico é o pH a que a carga líquida de uma proteína é neutra. Se o pH do tampão de reconstituição for abaixo do ponto isoelétrico do antigénio, a proteína tende a transportar uma carga líquida positiva. Se o pH do tampão de reconstituição for acima do ponto isoelétrico do antigénio, a proteína tende a transportar uma carga líquida negativa. A presente invenção é particularmente útil quando se liofilizam e reconstituem antigénios que tenham um ponto isoelétrico de modo a que, no tampão de reconstituição pretendido, a proteína transporte uma carga líquida negativa. Em tais circunstâncias (ver o exemplo 3), a presença de CpG na composição liofilizada pode melhorar a solubilidade do antigénio no tampão de reconstituição.

Numa forma de realização, o antigénio liofilizado e o oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG é proporcionado com uma dose, por exemplo, num frasco-ampola.

Numa forma de realização, o antigénio liofilizado está presente numa quantidade para proporcionar uma concentração de antigénio na gama de 10 a 250 µg, quando reconstituído.

Numa forma de realização, o oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG está presente numa quantidade para proporcionar uma concentração na gama de 10 a 1000 µg, tal como 500 µg, quando reconstituído.

O antigénio que é combinado numa composição liofilizada com um oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG é um antigénio

antitumoral. Por conseguinte, as composições imunogénicas preparadas utilizando a composição antigénica liofilizada da invenção são úteis para o tratamento imunoterapêutico de cancros. Por exemplo, a composição liofilizada pode ser preparada com antigénios de cancro, antigénios tumorais ou antigénios de rejeição tumoral, como aqui descrito, tal como as proteínas expressas no cancro da próstata, cancro da mama, cancros colorrectais, cancro do pulmão, cancro do rim, cancro ovariano, cancro do fígado e cancro da cabeça e pescoço, entre outros.

A invenção também se estende à utilização dos antigénios, derivados imunogénicos e fragmentos imunogénicos e proteínas de fusão acima compreendendo os mesmos em aspectos da presente invenção.

Derivados, fragmentos e proteínas de fusão

Os antigénios associados a tumores da presente invenção podem ser empregues na forma dos seus derivados ou fragmentos, em vez do antigénio de ocorrência natural.

Como aqui utilizado, o termo "derivado" refere-se a um antigénio que é modificado relativamente à sua forma de ocorrência natural. O derivado pode incluir uma mutação, por exemplo, uma mutação pontual. Num exemplo, o derivado pode alterar as propriedades da proteína, por exemplo, pelo melhoramento da expressão em sistemas procarióticos ou pela remoção de actividade indesejável, e. g., actividade enzimática. Os derivados da presente invenção são suficientemente semelhantes aos antigénios nativos para reterem as propriedades

antigénicas e permanecerem capazes de permitir que uma resposta imunitária seja deduzida contra o antigénio nativo. Se um dado derivado deduz ou não essa resposta imunitária pode ser medido por um ensaio adequadamente imunológico, tais como um ELISA ou citometria de fluxo.

Numa forma de realização da presente invenção, o derivado do antigénio associado a tumor da presente invenção é uma proteína de fusão, compreendendo um antigénio associado a tumor ligado a uma proteína parceira de fusão heteróloga. Por "heterólogo", com respeito a um antigénio associado a tumor, significa-se uma sequência proteica ou polipeptídica que não esteja ligada ao antigénio associado a tumor na natureza, *i. e.*, está ligada ao antigénio associado a tumor por intervenção humana deliberada.

O antigénio e proteína parceira de fusão heteróloga podem ser quimicamente conjugados ou podem ser expressos como proteínas de fusão recombinantes. Numa forma de realização, uma proteína de fusão da presente invenção pode permitir que sejam produzidos níveis aumentados da proteína de fusão num sistema de expressão, em comparação com proteína não fundida. Deste modo, a proteína parceira de fusão pode auxiliar a proporcionar epitopos auxiliares T, por exemplo, epitopos auxiliares T reconhecidos por humanos (*i. e.*, a proteína parceira de fusão está actuando como um parceiro de fusão imunológico). O parceiro de fusão pode auxiliar na expressão da proteína com rendimentos mais elevados do que a proteína recombinante nativa (*i. e.*, a proteína parceira de fusão actuando como um estimulador de expressão). Numa forma de realização, a proteína parceira de fusão pode actuar como um parceiro de fusão imunológico e parceiro estimulador de expressão.

As proteínas parceiras de fusão podem, por exemplo, ser derivadas da proteína D. A proteína D é uma lipoproteína (uma proteína de ligação à imunoglobulina D, de 42 kDa, exposta na superfície da bactéria Gram-negativa *Haemophilus influenzae*). A proteína é sintetizada como um precursor, com uma sequência sinal de 18 resíduos de aminoácidos, contendo uma sequência consenso para lipoproteína bacteriana (ver o documento WO 91/18926). A proteína da Proteína D precursora nativa é processada durante a secreção e a sequência sinal é clivada. A Cys da Proteína D processada (na posição 19 na molécula precursora) torna-se no resíduo N-terminal da proteína processada e é concomitantemente modificada por conjugação covalente de ácidos gordos ligados a éster e ligados a amida. Os ácidos gordos ligados ao resíduo de Cisteína amino-terminal funcionam, então, como âncora de membrana.

Numa forma de realização, o derivado de antigénio associado a tumor para utilização na presente invenção pode compreender Proteína D, ou um seu derivado, como uma proteína parceira de fusão.

A proteína D, ou um seu derivado, como aqui descrito, pode compreender, por exemplo: o primeiro terço ou terço N-terminal da proteína D processada ou, aproximadamente, ou cerca, do primeiro terço ou terço ou N-terminal da proteína D processada. Numa forma de realização, a proteína D, ou um seu derivado, pode compreender os primeiros 100 a 115 aminoácidos ou N-terminais de proteína D processada; ou os primeiros 109 aminoácidos ou N-terminais de proteína D processada. Numa forma de realização, os aminoácidos 2-Lys e 2-Leu de Proteína D processada nativa podem ser substituídos com os aminoácidos 2-Asp e 3-Pro.

Numa forma de realização, a proteína D ou seu derivado pode, ainda, incluir os 18 ou 19 aminoácidos da sequência sinal da proteína D precursora. Numa forma de realização, a proteína parceira de fusão derivada de proteína D compreende ou consiste nos aminoácidos 20 a 127 da proteína D precursora. Numa forma de realização da presente invenção, os dois aminoácidos 21-Lys e 22-Leu da proteína parceira de fusão da proteína D precursora podem ser substituídos com os aminoácidos 21-Asp e 22-Pro.

A proteína parceira de fusão da proteína D, como aqui descrita, pode ainda ou, alternativamente, conter deleções, substituições ou inserções dentro da sequência de aminoácidos, quando comparada com a sequência do precursor de tipo selvagem ou proteína D processada. Numa forma de realização, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais aminoácidos podem ser inseridos, substituídos ou delecionados. Os aminoácidos podem ser substituídos com substituições conservativas, como aqui definido, ou podem ser utilizados outros aminoácidos.

Numa forma de realização, a proteína parceira de fusão pode compreender ou consistir numa sequência de proteína D, como mostrado na SEQ ID N°: 1. Numa forma de realização, a proteína parceira de fusão pode compreender ou consistir nos aminoácidos sublinhados na Figura 1, *i. e.*, resíduos de aminoácidos 20 até 127 da SEQ ID N°: 12. Numa forma de realização, o antigénio para utilização na presente invenção pode ser proteína-D-MAGE-3, no qual o antigénio de MAGE-3 consiste nos aminoácidos 3 a 314 de MAGE-3 e no qual a proteína parceira de fusão da proteína D consiste na sequência de aminoácidos mostrada na Figura 1.

Noutra forma de realização da presente invenção, as proteínas parceiras de fusão podem ser seleccionadas de NS1 ou LytA ou seus derivados, como descrito abaixo.

NS1 é uma proteína não estrutural do vírus influenza. Numa forma de realização, o derivado de antigénio associado a tumor da presente invenção pode compreender NS1, ou um seu derivado, como uma proteína parceira de fusão. A NS1 ou seu derivado pode compreender os seus aminoácidos N terminais 1 a 81.

LytA é um derivado de *Streptococcus pneumoniae*. O domínio C-terminal da proteína LytA é responsável pela afinidade para a colina ou para alguns análogos de colina, tal como DEAE. Numa forma de realização, o derivado de antigénio associado a tumor da presente invenção pode compreender LytA, ou um seu derivado, como uma proteína parceira de fusão. A LytA ou seu derivado pode compreender a porção de repetição da molécula LytA verificada na extremidade C terminal, começando no resíduo 178. Numa forma de realização, a LytA ou seu derivado compreende os resíduos 188 - 305 de C-LytA.

Os polipéptidos imunogénicos para utilização na presente invenção serão, tipicamente, proteínas recombinantes produzidas, e. g., por expressão num hospedeiro heterólogo, tal como um hospedeiro bacteriano, na levedura ou em células de mamífero cultivadas.

O termo "derivado de antigénio associado a tumor" significa um polipéptido que contém, parcialmente ou totalmente, sequências que ocorrem naturalmente num antigénio associado a tumor ou que contém um elevado grau de identidade de sequência com o mesmo (e. g., mais de 95% de identidade ao longo de um

segmento de, pelo menos, 10, e. g., pelo menos, 20 aminoácidos). Os derivados também incluem sequências tendo substituições conservativas. As substituições conservativas são bem conhecidas e são, em geral, implementadas como as matrizes de pontuação predefinidas em programas de computador de alinhamento de sequências.

Em termos gerais, substituição, dentro dos seguintes grupos, são substituições conservativas, mas as substituições entre os grupos seguintes são consideradas não conservadas. Os grupos são:

- i) Aspartato/asparagina/glutamato/glutamina
- ii) Serina/treonina
- iii) Lisina/arginina
- iv) Fenilalanina/tirosina/triptofano
- v) Leucina/isoleucina/valina/metionina
- vi) Glicina/alanina

Os derivados da presente invenção também podem incluir sequências quimicamente tratadas, tais como tratamento com um aldeído (tais como formaldeído ou glutaraldeído), carboximetilação, carboxiamidação, acetilação e outros tratamentos químicos de rotina. As construções da presente invenção tendo resíduos tiol livres derivatizados também podem ser utilizadas na presente invenção. Em particular, podem ser utilizados derivados tiol carboxiamidados ou carboximetilados.

Como aqui descrito a título de exemplo, o derivado de antigénio associado a tumor pode ser um antigénio de MAGE, como aqui descrito, tendo resíduos tiol livres derivatizados. Os

resíduos tiol livres derivatizados podem ser derivados de carboxiamida ou carboximetilados.

Como aqui descrito a título de exemplo, o derivado de antigénio associado a tumor pode, alternativamente, compreender uma construção compreendendo mais de um antigénio associado a tumor. Num exemplo, o derivado de antigénio associado a tumor pode compreender dois ou mais antigénios associados a tumor.

O termo "fragmento", como aqui utilizado, refere-se a fragmentos de um antigénio associado a tumor ou derivado do antigénio que contém, pelo menos, um epitopo, por exemplo, um epitopo de CTL, tipicamente, um péptido 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 comprimento são considerados como encontrando-se abrangidos pelo âmbito da invenção, desde que o fragmento demonstre antigenicidade, ou seja, que os principais epitopos (e. g., epitopos de CTL) sejam retidos pelo fragmento e o fragmento seja capaz da indução de uma resposta imunitária que reaja de modo cruzado com o antigénio associado a tumor de ocorrência natural. Os fragmentos exemplificativos podem ter 8-10, 10-20, 20-50, 50-60, 60-70, 70-100, 100-150, 150-200 resíduos de aminoácidos em comprimento (inclusive de qualquer valor dentro destas gamas).

Como aqui descrito a título de exemplo, a composição liofilizada compreendendo o antigénio Her 2 neu e oligonucleótido de CpG é reconstituída com um lipossoma ou veículo de emulsão de óleo em água contendo 3D-MPL e QS21. Essas formulações reconstituídas produzem uma resposta de mediação humoral e celular.

Como aqui descrito a título de exemplo, as composições liofilizadas podem conter antigénios associados a mecanismos de suporte tumoral (e. g. angiogénese, invasão tumoral) por exemplo, tie 2, VEGF.

Noutro exemplo, o antigénio dentro da composição liofilizada da invenção é um antigénio seleccionado de antigénios derivados de VIH, particularmente antigénios derivados de VIH-1.

Numa forma de realização específica da invenção, uma composição liofilizada contém mais de um polipéptido imunogénico.

A composição liofilizada pode conter um antigénio ou pode conter mais de um antigénio.

Num aspecto da invenção, o oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG é utilizado para melhorar a solubilidade de antigénios não carregados positivamente.

A presente requerente verificou que, particularmente com antigénios que são carregados negativamente, a co-liofilização de CpG pode melhorar a sua solubilidade após reconstituição. O oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG será uma molécula com uma carga líquida negativa. Onde este ligando seja co-liofilizado com um antigénio com uma carga líquida positiva, há uma possibilidade de que o ligando de oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG interaja com o antigénio, após reconstituição da composição liofilizada causando, possivelmente, precipitação do antigénio. Tal não é desejável, mas pode ser evitado por um especialista na técnica, pela

inclusão de excipientes de liofilização na composição que são conhecidos como aumentando a solubilidade nessas situações, tal como, por exemplo, L-arginina.

O oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG e um ou mais antigénios são combinados com excipientes adequados para formar a formulação em bruto final que será liofilizada. De modo óptimo, os excipientes irão conter um crioprotector, para proteger a proteína da desnaturação durante os estádios iniciais da liofilização e um lioprotector, para prevenir a inactivação da proteína durante a secagem. Podem ser utilizadas duas moléculas diferentes, ou pode ser utilizada uma molécula que tenha ambas as propriedades, tal como um dissacárido. Opcionalmente, também pode ser adicionado um agente de volume cristalino, tais como manitol ou glicina. Também pode ser adicionado um surfactante não iónico, tais como polissorbato ou Tween®, para auxiliar a prevenir a agregação da proteína. Os excipientes também poderiam incluir sais de tampão para modificar o pH do volume final.

Os excipientes adequados incluem os seguintes: açúcares, tais como sacarose, trealose, rafinose e maltodextrinas, tais como maltotriose, maltotetraose, maltopentaose ou malto-hexose; polióis, tais como manitol ou sorbitol; polímeros, tais como dextrano, polietilenoglicol (PEG) ou polivinilpirrolidona (PVP); aminoácidos, tais como glicina, alanina ou arginina.

Os excipientes também podem ser combinados de modo a que dois ou mais, por exemplo três ou quatro, excipientes possam ser utilizados em conjunto. As combinações possíveis incluem açúcar e dextrano, por exemplo, sacarose e dextrano ou trealose e dextrano; açúcar e PEG, por exemplo PEG8000 e sacáridos; açúcar

e PVP, por exemplo, sacarose e PVP; açúcar e aminoácidos, por exemplo, glicina e sacarose; dois açúcares em conjunto, por exemplo, sacarose e glucose ou sacarose e rafinose; sacarose e polióis, por exemplo, sacarose e sorbitol ou sacarose e manitol; polióis e aminoácidos, tais como manitol e glicina.

Surfactantes, tais como polissorbatos ou Tween[®], podem ser adicionados a qualquer combinação de excipientes.

De modo a formar uma composição imunogénica que possa ser utilizada para vacinação, a composição liofilizada contendo o antigénio e o ligando de TLR9 é reconstituída com um diluente farmacologicamente aceitável. É um aspecto preferido da invenção que esse diluente deve ser um diluente particulado, por exemplo, uma solução de partículas de sal de metal, ou lipossomas ou uma emulsão de óleo em água.

Numa forma de realização, o diluente contém imunostimulantes adicionais. Isto significa que, além do oligonucleótido imunostimulador contendo CpG, a composição imunogénica reconstituída final conterá outros imunostimulantes verificados na composição liofilizada.

Há um número de imunostimulantes conhecidos que são conhecidos como sendo adjuvantes, isoladamente ou em combinação. O sistema imunitário inato ou natural reconhece um vasto espectro de patógenos, sem uma necessidade de exposição anterior. As principais células responsáveis pela imunidade inata, monócitos/macrófagos e neutrófilos, fagocitam patógenos microbianos e provocam as respostas imunitárias inatas, inflamatórias e específicas.

Os lipopolissacáridos (LPS) são a principal molécula de superfície e ocorrem exclusivamente na bainha externa da membrana exterior de bactérias gram-negativas. Mostrou-se que os LPS são ligandos de TLR4. Os LPS impedem a destruição das bactérias por complementos séricos e células fagocíticas e estão envolvidos na aderência para colonização. Os LPS são um grupo de moléculas complexas estruturalmente relacionadas de, aproximadamente, 10000 Daltons em tamanho e consistem em três regiões ligadas covalentemente:

- (i) uma cadeia de polissacárido específico de O (antigénio O) na região exterior
- (ii) uma região central de oligossacárido nuclear
- (iii) lípido A - a região mais interna que serve como a âncora hidrófoba, compreende unidades do dissacárido glucosamina que transportam ácidos gordos de cadeia longa.

Mostrou-se que as actividades biológicas dos LPS, tais como toxicidade letal, pirogenicidade e adjuvanticidade, estão relacionadas com a fracção de lípido A. Em contraste, a imunogenicidade está associada ao componente de polissacárido específico de O (antigénio O). Os LPS e o lípido A são há muito conhecidos pelos seus fortes efeitos adjuvantes, mas a elevada toxicidade destas moléculas excluiu a sua utilização em formulações vacinais. Foi, por conseguinte, realizado um esforço significativo com vista à redução da toxicidade dos LPS ou lípido A mantendo, simultaneamente, a sua adjuvanticidade.

O mutante R595 da *Salmonella minnesota* foi isolado em 1966 de uma cultura da estirpe parental (*liso*) (Luderitz et al., 1966 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 133:349-374). As colónias seleccionadas

foram rastreadas para a sua susceptibilidade à lise por um painel de fagos e apenas as colónias que exibiram uma estrita gama de sensibilidade (susceptível apenas a um ou dois fagos) foram seleccionadas para estudo posterior. Este esforço conduziu ao isolamento de uma estirpe mutante, *rugosa profunda*, que é anómala na biossíntese dos LPS e referida como *S. Minnesota* R595.

Em comparação com outros LPS, os produzidos pelo mutante *S. minnesota* R595 têm uma estrutura relativamente simples.

- (i) não contêm a região específica de O - uma característica que é responsável pela mudança do fenótipo liso de tipo selvagem para o fenótipo rugoso mutante e resulta numa perda de virulência
- (ii) a região nuclear é muito curta - esta característica aumenta a susceptibilidade da estirpe a uma variedade de substâncias químicas
- (iii) a fracção de lípido A está altamente acilada, com até 7 ácidos gordos.

4'-monofosporil-lípido A (MPL), que pode ser obtido pela hidrólise de ácido dos LPS extraídos de uma estirpe mutante *rugosa profunda* de bactérias gram-negativas, retém as propriedades de adjuvante dos LPS demonstrando, simultaneamente, uma toxicidade que é reduzida por um factor de mais de 1000 (como medido pela dose letal em ovos de embrião de pinto) (Johnson *et al.*, 1987 *Rev. Infect. Dis.* 9 Sup: S512-S516). O LPS é, tipicamente, refluído em soluções de ácido mineral de título moderado (e. g., HCl a 0,1 M) durante um período de, aproximadamente, 30 minutos. Este processo resulta em

desfosforilação na posição 1 e descarbo-hidratação na posição 6', produzindo MPL.

Monofosforil-lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL), que pode ser obtido por hidrólise alcalina moderada de MPL, tem uma toxicidade mais reduzida mantendo, simultaneamente, de novo, a adjuvanticidade, ver o documento US4912094 (Ribi Immunochemicals). A hidrólise alcalina é, tipicamente, realizada em solvente orgânico, tal como uma mistura de clorofórmio/metanol, por saturação com uma solução aquosa de base fraca, tal como carbonato de sódio a 0,5 M, a pH 10,5.

Informação adicional sobre a preparação de 3D-MPL está disponível, por exemplo, nos documentos US4912094 e WO02/078637 (Corixa Corporation).

Mostrou-se que algumas moléculas que não são ligandos de TLR têm actividade de adjuvante. As saponinas de Quillaja são uma mistura de glicósidos de triterpeno, extraídos da casca da árvore *Quillaja saponaria*. As saponinas em bruto foram extensamente empregues como adjuvantes veterinários. O Quil-A é um extracto aquoso parcialmente purificado do material de saponina de Quillaja. O QS21 é uma fracção não tóxica, purificada por HPLC, de Quil A e o seu método de produção está divulgado (como QA21) na patente US N° 5057540.

Num aspecto da invenção, o diluente contém um imunoestimulante adicional. Noutro aspecto da invenção, o diluente contém mais de um imunoestimulante adicional. Tais imunoestimulantes podem ser ligandos de TLR4, saponinas, ligandos de TLR7, ligandos de TLR8 ou ligandos de TLR9. Numa forma de realização da invenção, o imunoestimulante adicional é

um ligando de TLR4, tal como 3D-MPL, como aqui descrito. Numa forma de realização adicional da invenção, o imunoestimulante adicional é QS21, como aqui descrito. Ainda numa forma de realização adicional da invenção, o diluente contém QS21 e 3D-MPL. Num aspecto desta forma de realização, o diluente é uma emulsão de óleo em água contendo QS21 e 3D-MPL. Noutro aspecto desta forma de realização, o diluente é uma solução de lipossomas contendo QS21 e 3D-MPL.

Exemplos

Exemplo 1: Liofilização de um oligonucleótido de CpG e CPC-P501S como antigénio

O antigénio utilizado foi CPC - P501S. Este antigénio é mostrado na figura 1, esquematicamente, no qual a secção mostrando TM2 a TM12 representa o antigénio P501S; as formas ovais no lado esquerdo representam os parceiros de fusão de CPC e a cauda de His é mostrada no lado direito.

O antigénio foi produzido com uma cauda de His, como mostrado em *S. cerevisiae* e, depois, preparado a uma concentração de 700 µg/mL, utilizando um tampão de Tris (5 mM, pH 7,5) e Tween80 (0,3%).

Para preparar o volume final, sacarose (35%) foi adicionada a água para injeção, para se atingir uma concentração final de 6,3%. Tris (1 M, pH 8,8) foi, depois, adicionado, seguido de Tween 80 (25%), para se atingir uma concentração final de 0,2%. Esta mistura foi magneticamente agitada, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Foi adicionado CPC-P501 S e a mistura foi

magneticamente agitada, durante 4 minutos, à temperatura ambiente. Um CpG oligo da SEQ ID N°: 4 foi, depois, adicionado e a mistura resultante magneticamente agitada, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, para proporcionar o volume final. A composição foi analisada como se segue:

	Volume Final (500 µL)	Recipiente final (500 µL) Dose humana
Bolos		<i>Após reconstituição com 625 µL de AS01B</i>
CPC-P501	125 µg	100 µg
CpG	625 µg	500 µg
Tris	50 mM	40 mM
Tween 80	0,50%	0,40%
Sacarose	6,3%	5,0%
pH	9,1 +/- 0,1	7,4 +/- 0,1

	Volume Final (500 µL)	Recipiente final (500 µL) Dose humana
Bolos		<i>Após reconstituição com 625 µL de AS01B</i>
CPC-P501	25 µg	20 µg
CpG	625 µg	500 µg
Tris	50 mM	40 mM
Tween 80	0,20%	0,16%
Sacarose	6,3%	5,0%
pH	9,1 +/- 0,1	7,4 +/- 0,1

0,5 mL de uma composição foram vertidos para dentro de um frasco-ampola de vidro, que foi submetido ao ciclo de liofilização, como mostrado na figura 2.

A caracterização do bolo foi efectuada por inspecção visual e a medição do diâmetro a T0, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas, a 37 °C, em três frascos-ampola da composição (ver a figura 3). O teor de humidade residual foi medido nos mesmos intervalos de tempo e temperatura, utilizando termogravimetria (TG) ou Karl Fischer (KF). Como pode ser verificado abaixo, os bolos eram estáveis durante até duas semanas.

Bolo liofilizado

Timing de estabilidade	Aspecto visual	Diâmetro de bolo (mm)	Teor de humidade (% de peso de H ₂ O/peso de bolo)	
			KF	TG
T0	OK	12,6 ± 0,1	0,3% (1,5 meses, a 4 °C)	0,8% (5 meses, a 4 °C)
1 semana a 37 °C	OK	nd	0,59%	nd
2 semanas a 37 °C	Retracção +	9,8 ± 0,8	nd	1,4%
3 semanas a 37 °C	Retracção ++	7,7 ± 1,0	nd	1,2%
4 semanas a 37 °C	Retracção ++	8,7 ± 1,5	Não mensurável	1,3%

KF: Método de Karl Fischer

TG: Método de termogravimetria

nd: não realizado

OK: nem agregação nem degradação

Especificações: 3% (Termogravimetria)

A humidade num recipiente final, armazenado a 37 °C (para acelerar a análise de estabilidade), aumenta durante o tempo. Após 1 mês, a 37 °C, os bolos contêm 1,3% de H₂O e estão retraídos. Nesta experiência, o aumento em humidade deve-se ao facto de que o pó higroscópico absorve água das tampas. A substituição das tampas com novos tipos de tampas pode auxiliar a prevenir esta retracção.

Os bolos foram, depois, reconstituídos com água para injeção ou com os seguintes líquidos veículo: Sistema Adjuvante A (um adjuvante lipossomal, preparado como exposto no documento W02005/112991), sistema Adjuvante E (um adjuvante de emulsão de

óleo em água, preparado como exposto no documento WO2005/112991) ou sistema adjuvante F (um adjuvante de emulsão óleo em água, preparado como exposto no documento WO2005/112991).

Não se verificou agregação ou degradação de proteína com água para injeção, sistema adjuvante E ou sistema adjuvante F. Verificou-se alguma agregação e degradação com o sistema adjuvante A. Concluiu-se que tal se deveu à diminuição do pH abaixo do ponto isoelétrico de CPC-P501S. Um aumento na concentração do excipiente Tris para 50 mM resolveu o problema e, então, não se verificou agregação com o sistema adjuvante A. Também se verificou que a presença de CpG no lio-bolo (*i. e.*, co-lioofilização de antigénio e oligonucleótido de CpG) auxiliou a prevenir a agregação do antigénio, quando reconstituído com sistema adjuvante A. Uma comparação da reconstituição de lio-bolos com e sem CpG, utilizando o sistema adjuvante A mostrou que, após co-lioofilização, a agregação foi reduzida (dados não mostrados).

O impacto dos excipientes do tamanho dos lipossomas no sistema adjuvante A também foi estudado e verificou-se que não houve diferença em tamanho entre lipossomas verificados num frasco-ampola de sistema adjuvante A isoladamente e lipossomas verificados num frasco-ampola de sistema adjuvante A após reconstituição de um lio-bolo contendo antigénio, CpG, Tris e Tween. Por conseguinte, pode concluir-se que os componentes do lio-bolo não afectam o sistema adjuvante (figura 4).

Finalmente, foi estudada a antigenicidade da formulação e verificou-se que, em termos de linfoproliferação e produção de citocina (IFN γ) intracelular, não houve diferença entre uma formulação líquida *versus* uma lio-formulação de CPC-P501S

(dados não mostrados). Por conseguinte, pode concluir-se que a imunogenicidade do antigénio não é afectada pela co-liofilização com CpG.

Exemplo 2: Liofilização de um oligonucleótido de CpG e Mage-3 como antigénio

O antigénio utilizado foi uma porção da proteína da proteína D ligada a MAGE-3 que, por sua vez, foi ligada a uma cauda de His, para facilidade de purificação de PD-Mage3-His (ver a Figura 5: SEQ ID N°: 13).

O antigénio em bruto purificado foi produzido com uma cauda de His em *E. coli* e, depois, preparado a uma concentração de 750 µg/mL, utilizando um tampão de NaH₂PO₄.2H₂O/K₂HPO₄.2H₂O (2 mM) e Tween80 a, aproximadamente, 0,2% v/v (teórico) pH 7,5.

Para preparar o volume final, sacarose (30%) foi adicionada a água para injeção, para proporcionar uma concentração final de 3,15%. NaH₂PO₄.2H₂O/K₂HPO₄.2H₂O (100 mM, pH 7,5) foi, depois, adicionado para proporcionar uma concentração final de PO₄ de 5 mM, tendo em conta o fosfato verificado no tampão de antigénio. Também foi adicionado Tween 80 (3%), para proporcionar uma concentração final de 0,15%, tendo em conta o Tween verificado no tampão de antigénio. Esta mistura foi magneticamente agitada, durante 5 e 15 minutos, à temperatura ambiente. Foi adicionado PD-Mage3-His (750 µg/mL) e a mistura foi magneticamente agitada, durante 5 - 15 minutos, à temperatura ambiente. Um CpG oligo da SEQ ID N°: 4 foi, depois, adicionado e a mistura resultante magneticamente agitada, durante 15 minutos (+/- 5 minutos), à temperatura ambiente, para

proporcionar o volume final. O pH foi ajustado a pH 7,5 +/- 0,1, com NaOH a 0,05 M ou 0,5 M, ou HCl a 0,03 M ou 0,3 M.

A composição foi analisada como se segue:

N°	Ingredientes			Antes de liofilização		Por HD (após reconstituição com 0,625 mL de diluente)	
	Nome	Componente	Src	CC	Peso (em 0,5 mL)	Concentrado	Peso (em 0,5 mL)
1	PD-Mage3-His	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O-K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O 2mM/Tween 80 ~0,2%, v/v, teórico, pH 7,5		750 µg/mL	375 µg	600 µg/mL	300 µg
2	CpG			1250 µg/mL	625 µg	1000 µg/mL	500 µg
3	Sacarose			3,15%, p/v	15,75 mg	2,52%, p/v	12,6 mg
4	Tween 80		1	0,15% p/v		0,12% p/v	
5	PO4		1	5 mM		4 mM	
6	WFI					adicion. 0,5 mL	
7	pH					7,5±0,1	

0,5 mL desta composição foram vertidos para dentro de um frasco-ampola de vidro, que foi submetido ao ciclo de liofilização mostrado na Figura 6.

O Impacto dos excipientes e ciclo de liofilização na composição do bolo foi analisado após entre 7 a 9 dias de armazenamento do bolo a 37 °C.

aspecto e humidade residual do bolo

Aspecto do bolo	Sem colapso (T0)	Sem retracção (T7d 37 °C)
Humidade residual	-	0,59% (T8d 37 °C)

Pode constatar-se que o bolo não apresenta qualquer colapso aos 7 dias e não se altera ao longo de 8 dias de estabilidade sob stress.

A humidade residual de bolos armazenados durante entre 7 a 9 dias, a 37 °C, situa-se abaixo da especificação de 3%.

Não houve evolução no diâmetro após armazenamento durante entre 7 a 9 dias, a 37 °C.

Os bolos foram, depois, reconstituídos com sistema Adjuvante A (um adjuvante lipossomal preparado como exposto no documento W02005/112991). Não se verificou agregação ou degradação de proteína confirmando, desse modo, que o antigénio pode ser co-liofilizado com CpG, sem afectar a sua capacidade para ser reconstituído.

A antigenicidade da formulação foi estudada. Verificou-se que, após reconstituição no sistema Adjuvante A, houve uma diminuição na antigenicidade com o tempo, após 24 horas. Considera-se que tal se deve ao pH ácido (6,2 +/- 0,1) verificado após reconstituição. Isto foi confirmado quando se verificou que a queda de antigenicidade poderia ser diminuída pelo aumento do pH. Contudo, havia ainda alguma diminuição na antigenicidade ao longo do tempo. Por conseguinte, as formulações foram testadas para verificar se esta diminuição

tinha um efeito no teste de potência *in vivo*. Diluições de 3/10, 1/10 e 1/30^a de uma dose humana foram administradas a grupos de murganhos, 10 murganhos por grupo, como mostrado na Figura 7. Os murganhos foram sangrados no dia 28.

T0, 4 h e 24 h são os tempos após reconstituição do bolo com sistema adjuvante A. Como pode ser verificado na Figura 7, não houve efeito na potência.

Exemplo 3: Impacto de CpG na solubilidade de antígeno após reconstituição.

1. A WT1 é uma proteína que se verificou ser, originalmente, superexpressa no cancro do rim pediátrico, Tumor de Wilm. O antígeno candidato utilizado no presente caso utiliza a proteína de comprimento quase completo como antígeno. A proteína WT1-A10 é uma proteína de fusão recombinante de 292 AA, expressa em *E. coli*, consistindo numa sequência *tat* truncada de 12 mer (sequência líder) e aminoácidos número 2 - 281 da sequência de WT1. Somente após liofilização, este antígeno precipita se reconstituído com sistema adjuvante A, devido ao seu ponto isoelétrico (5,85 a 7,5) que é próximo do pH do sistema adjuvante A (6,1) e a presença de cloreto de sódio no sistema adjuvante A.

Foram preparadas duas formulações de WT1-A10. A dose reconstituída continha 400 µg/mL de antígeno WT1-A10, sacarose a 10%, Tris a 100 mM e Tween 80 a 0,2%, mais ou menos 840 µg/mL de CpG.

Ambas as formulações foram reconstituídas com 500 µL de sistema adjuvante A. O líquido resultante foi centrifugado e uma transferência de Western realizada no líquido não centrifugado (NC), no sobrenadante (SN) e no sedimento (P). Os resultados são mostrados na Figura 8.

Como pode ser verificado na Figura 8, na presença de CpG, a solubilidade do antigénio após reconstituição é melhorada, como evidenciado pela ausência de antigénio no sedimento precipitado. O antigénio precipitado pode ser verificado no sedimento da composição liofilizada reconstituída, onde o lio-bolo não continha CpG. Esta é uma evidência de que, no caso de um antigénio não carregado positivamente, a co-liofilização de CpG melhora a solubilidade do antigénio após reconstituição.

2. PRAME

Foram preparadas duas formulações de PRAME. A dose reconstituída continha 1000 µg/mL do antigénio PRAME, sacarose a 3,15%, Borato a 5 mM, Cloreto de Sódio a 150 mM, mais ou menos 840 µg/mL de CpG. Ambas as formulações foram reconstituídas com 500 µL de sistema adjuvante A. O líquido resultante foi centrifugado e uma transferência de Western realizada no líquido não centrifugado (NC), no sobrenadante (SN) e no sedimento (P). Os resultados são mostrados na Figura 9, onde NC = não centrifugado, SN = sobrenadante e P = sedimento.

Como pode ser verificado na Figura 9, na presença de CpG, a solubilidade do antigénio após reconstituição é melhorada, como evidenciado pela ausência de antigénio no sedimento precipitado. O antigénio precipitado pode ser verificado no sedimento da

composição liofilizada reconstituída, onde o lio-bolo não continha CpG. Esta é uma evidência adicional de que, no caso de um antigénio não carregado positivamente, a co-liofilização de CpG melhora a solubilidade do antigénio após reconstituição.

SEQ ID N°: 1

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT

SEQ ID N°: 2

TCT CCC AGC GTG CGC CAT

SEQ ID N°: 3

ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

SEQ ID N°: 4

TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT

SEQ ID N°: 5

TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT

SEQ ID N°: 6

MKVKETRKNY	QHLWRWGTM	LGMLMICSAA	EQLWVTVYYG	VPVWKEATTT	50
LFCASDAKAY	DTEVHNVWAT	HACVPTDNP	QEVVLGNVTE	YFNMWKNMV	100
DQMHEDIISL	WDQSLKFCVK	LTPLCVTLDC	DDVNTTNSTT	TTSNGWTGEI	150
RKGEIKNCSE	NITTSIRDKV	QKEYALFYNL	DVVPIDDDNA	TTKNKTTRNF	200
RLIHCNSSVM	TQACPKVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	TFDGKGLCTN	250
VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL	NGSLAEEVV	IRSDNEMDNT	KTIIVQLNES	300
VAINCTRPNN	NTRKGIHIGP	GRAFYAARKI	IGDIRQAHCN	LSRAQWNNTL	350
KQIVIKLREH	FGNKTIKFNQ	SSGGDPEIVR	HSFNCGGEFF	YCDTTQLFNS	400
TWNGTEGNNT	EGNSTITLPC	RIKQIINMWQ	EVGKAMYAPP	IGGQIRCSSN	450
ITGLLLTRDG	GTEGNGTENE	TEIFRPGGGD	MRDNWRSELY	KYKVVKVEPI	500
GVAPTRAKRR	VVQR				514

SEQ ID N°: 7

1 MRVMEIQRNC QHLLRWGIMI LGMIIICSTA DNLWVTVYYG VPVWRDAETT
 51 LFCASDAKAY STEKHNVWAT HACVPTDNP QEIPLDNVTE EFNMWKNNMV
 101 DQMHEDIISL WDQSLKPCVQ LTPLCVTLNC SNARVNATFN STEDREGMKN
 151 CSFNMTTELK DKKQQVYSLF YRLDIEKINS SNNNSEYRLV NCNTSAITQA
 201 CPKVTFEPIP IHYCAPAGFA ILKCNDETFN GTGPKKNVST VQCTHGKIPV
 251 VSTQLLNGS LAEREVRIRS ENIANNAKNI IVQFASPVKI NCIRPNNTR
 301 KSYRIGPGOT FYATDIVGDI ROAHCNVSRT DWNNTLRLVA NQLRKYFSNK
 351 TIIFTNSSGG DLEITTHSFN CGGEFFYCNT SGLFNSTWTT NNMQESNDTS
 401 NGTITLPCRI KQIIRMWQRV GQAMYAPPIE GVIRCESNIT GLILTRDGGN
 451 NNSANETFRP GGGDIRDNWR SELYKYKVVK IEPLGVAPTR AKRRVVEREK
 501 RAVGIGAVFL GFLGAAGSTM GAASITLVQ ARQLLSGIVQ QSNLLRAIE
 551 AQQQLLKLTV WGIKQLQARV LAVERYLRDQ QLLGIWCSG KLICTTNVW
 601 NSSWSNKSVD DIWQNMWLQ WDKEISNYTD IISLIEESQ NQEQKNEQDL
 651 LALDKWANLW NWFDISKWLW YIRS

SEQ ID N°: 8

1 MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 51 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 101 LDKIEEQNK SKKKAQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAISPR
 151 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMTLNT VGGHQAAMQM
 201 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMRG PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 251 TNNPPIPVGE IYKRWILLGL NKIVRMYSPT SILDIRQGP K EPFRDYVDRF
 301 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTIKALGPA ATLEEMTAC
 351 QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETVPVKLKEG MDGPKVKQWP LTEEKIKALV
 401 EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNRKTQ
 451 DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 501 NNETPGIRYQ YNVLPQGWKG SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIIVIQYMD
 551 DLYVGSLEI GQHRTKIEEL RQHLRWGLT TPKKKHQKEP PFLKMGYELH
 601 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGK VRQLCKLLRG
 651 TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IAEIQKQGG
 701 QWTYQIYQEP FKNLKTCKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIVIWGK
 751 TPKFKLPIQK ETWETWTEY WQATWIPEWE FVNTPLVLK WYQLEKEPIV
 801 GAETPYVDGA ANRETKLGKA GYVTRGRQK VVTLTDTTNO KTELQAIYLA
 851 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAQPDQSES ELVNSQIEQL IKKEKVYLA
 901 VPAHKGIGGN EQVDKLVSAQ IRKVLVGFV VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 951 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDQWNYT GPGVRYPLTF
 1001 GWCYKLVPE PDKVEEANKG ENTSLLHPSV LHGMDDPERE VLEWRFSRL
 1051 AFHHVARELH PEYFKNC

SEQ ID N°: 9

atgggtatcgtgcagaacatccaggggcaaaatggtacatcaggccatcacctagaactttaaatgcatggg
 taaaagtagtagaagagaaggctttcagcccagaagtaatacccatggtttcagcattatcagaaggagccac
 cccacaagatttaaacaccatgctaaacacagtggggggacatcaagcagccatgcaaaatggtaaaagagacc
 atcaatgaggaagctgcagaatggga tagagtacatccagtgcagggcctattgcaccagggcagatga
 gagaaccaaggggaagtgacatagcaggaactactagtacccttcaggaacaaataggaatggaacaaataa
 tccacctatccagtaggagaaaatttaaaaagatggataaactcctgggatataataaaaatagtaagaatggtat
 agcccctaccagattctggacataagacaaggacccaaaagaaccttttagagactatgtagaccggtctata
 aaactctaagagccgagcaagcttcacaggaggtaaaaaattggatgacagaaaacctgttggtccaaaatgc
 gaaccagattgtaagactattttaaaagcattgggaccagcggctacactagaagaaatgatgacagcagtg
 cagggagtaggaggaccggccataaggcaagagttttgcatatggccccattagccctattgagactgtgt
 cagtaaaatataagccaggaatggatggccccaaaagtttaaaatggccattgacagaagaaaaataaaagc

at tagtagaaaattt gtagacagagatggaaaaggaagggaaaatttcaaaaaattgggcctgaaaaaccatacaaat
 actccagatatttgcataaaagaaaaagacagtagtaaatggagaaaattagtagatttcagagaacttaata
 agagaactcaagacttctgggaagttcaatttaggaataccacatccccaggggttaaaaaagaaaaaatcagt
 aacagtagctggatgtgggtgtagcataatttttcagttcccttagatgaagacttcaggaataatactgcattt
 accatacctagtagtaaaacaatgagacaccagggattagatatacagtagcaatgtgcttccacagggatggaaag
 gatcaccagcaatattccaaagtagcatgacaaaaatcttagagccttttagaaaacaaaaatccagacatagt
 tatctatcaatacatggatgattt gtagtaggactctgacttagaaaatagggcagcatagaacaaaaatagag
 gagctgagacaacatctgttaggggtgggacttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaaacctccattcc
 ttaaaatgggttatgaactccatcctgataaaatggacagtagcctataqtctqccagaaaaagacagctg
 gactgtcaatgacatacagaagtttagtggggaat tgaattgggcaagtcagatttaccagggattaaagta
 aggaacttatgtaaactccttagaggaacccaaagcactaacagaagtaataccactaacagaagagcagc
 tagaactggcagaaaacagagagatcttaaaagaaccagtagcatggagtgattatgacccatcaaaagactt
 aatagcagaaatcagagaagcaggggcaaggccaatggacatacaaaatttatcaagagccatttaaaaaatctg
 aaaacaggaaaaatgcaagaatgaggggtgcccacactaatgatgtaaaacaataacagagggcagtgcaaa
 aataaccacagaaagcatalgtaatatggggaagactcctaaatttaaaactgccatacaaaaggaacatg
 ggaaacatgggtggacagagtagttggcaagccctggattcctgagtgaggattt gtaataccccctccttta
 gtgaaattatggtaccagttagagaaagaacccatagtaggagcagaaacctctatgtagatggggcagcta
 acagggagactaaatagggaaaagcaggtatgttactaatagaggaagacaaaagttgtcaccctaacgta
 cacaacaaatcagaagactgagttacaagcaatttatctagctttgcaggatccgggattagaagtaaacata
 gtaacagactcaaatatgcattaggaatcattcaagcacaaccagatcaaaagtgaatcagagtttagtcaatc
 aaataatagagcagttataaaaaaggaagggtctatctggcatgggtaccagcacacaaaggaattggagg
 aatgaacaagtagataaaatagtcagtgctggatcaggaagtgctactatggtggcagtggtcaaaa
agtagtggttggatggcctactgtaagggaaagaatgagcagctgagccagcagcagatgggtggggag
cagcatctcagagcctggaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgctgtg
ctggctagaagcacaagaggaggaggagggttttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgact
tacaagcagctgtagatcttagcccttttaaaagaaaaggggggactggaaaggctaatcactcccaac
gaagacaagatacctttagctctgtggatctacacacacaaaggctacttccctgattggcagaactacacacc
agggccaggggtcagataccactgacctttggatggtgctacaagctagtagcagttgagccagataaggtg
gaagagggcaataaaagagagagaacaccagctgttacacctgtgagcctgcatggaatggatgacctgaga
gagaaggttagagtgagggtttgacagccgctagcatctcatcagtgggcccgagagctgcatccggagta
cttcaagaactgtaggcttatgggtgcgagagcgtcagttatagcgggggagaaatagatcgatgggaaaaa
 attcgttaaggccaggggaaagaaaaataaataaaacataatagtagggcaagcagggagctagaac
 gattccagttaaatcctggcctgttagaaacatcagaaggtgttagacaaatactgggacagctacaaccatc
 ccttcagacaggtcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacctctattgtgtgcatcaaagg
 atagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaaaaagcac
 agcaagcagcagctgacacaggacacagcaatcaggtcagccaaaattactaa

SEQ ID N°: 10

MVIVQNIQGMVHQAI	SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEV	IPMFSALSEGATP	50		
QDINTMLNTVGGHQAMQMLKET	INEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGMREP		100		
RGSDIAGTSTLQEQIGWMTNPP	IPVGEIYKRWII	LGLNKI	VRMYSPTS	150	
ILDIRQPKPEFRDYVDRFYKTL	LRAEQASQEVKNWMTET	LLVQ	NANPDCK	200	
TILKALGPAATLEEMMTACQGV	GGPGHKARVL	HM	GPISPIETVSVKLPK	250	
MDGPKVKQWPLTEEKIKALVEIC	TEMEKEGKISKIGPENPYNTP	VFAIKK		300	
KDSTKWRKLVDFRELNKRTQDF	WEVQLGIPHPAGLKKKKS	SVTVL	DVGDAY	350	
FSVPLDEDFRKYTAFTI	PSINNETPGIRYQYNVLPQGW	KGSPAIFQSSMT		400	
KILEPFRKQNPDIVIYQYMD	DLYVGSDEIGQHRTKIEELRQ	HLLRWGLT		450	
TPDKKHOKEPFLKMGYELHPDK	WTVQPIVLPKEDSWTVNDI	OKLVGKLN		500	
WASQIYPGIKVRQLCKLLRG	TALTEVIPLTEEALELEAENRE	ILKEPVH		550	
GVYYDPSKDLIAEIQKQGGQ	WYQIYQEPFKNLKTGKYAR	MARGAHTNDV		600	
KQLTEAVQKITTESIVW	GKTPKFKLPQKETWETW	WTEYWQATW	PEWE	650	
FVNTPLVKLWYQLEKEPI	VGAETFYVDGAANRETKL	GAGYVTNRGRQK		700	
VVTLTDTNQTTELQAIYLAL	QDSGLEVNIVTDSQYALGI	IQAOPDQSES		750	
ELVNQIIEQLIKKEKVYLAW	VPAHKGIGGNEQVDKLV	SAGIRKV	LAMGGK	800	
WSKSSVVGWPTVRERMRAE	PAADGVGAASRDLEKHGA	ITSNTAATNAA		850	
CAWLEAQEEBEVGFVTPQ	VPLRPMTYKAAVDLSHFL	KEKGGLEGLIHSQ		900	
RRQDILDWLYHTQGYFPD	WQNYTPGPGVRYPLTFG	WCYKLVVPEPDKVE		950	
EANKGENTSLHPVSLHGM	DDPEREVLEWRFD	SRLAFHHVARELHPEYFK		1000	
NC	RFMGARASVLSGGELDR	WEKIRLRP	GGKKYK	KHIVWASRELERFAV	1050
NPGLLETSECCRQILGQL	QPSLQGTGSEEL	RSLYNTVATLY	CVHORIEIKD		1100
TKEALDKIEEEQNKS	SKKAQQAADTGH	SNQVSQNY		1136	

SEQ ID N°: 11

1 MAARASILSG GKLDWEKIR LRPGGKKKYR LKHLVWASRE LDRFALNPSL
51 LETTEGCQQI MNQLQPAVKT GTEEIKSLFN TVATLYCVHQ RIDVKDTKEA
101 LDKIEEIQNK SKQKTQAAAA DTGDSSKVSQ NYPIIQNAQG QMIHQNLSPR
151 TLNAWVKVIE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNVMLNI VGGHQAAAMQM
201 LKDTINEEAA EWDRLEHPVQA GPIPPGQIRE PRGSDIAGTT STPQEQLOWM
251 TGNPPIPVGN IYKRWII LGL NKIVRMYSV SILDIKQGP EPFRDYVDRF
301 FKALRAEQAT QDVKGWMTET LLVQANPDC KSILKALGSG ATLEEMMTAC
351 QGVGGPGHKA RVLAEAMSQA QQTNIIMQRG NFRGQKRIKC FNCGKEGHLA
401 RNCRAPRKKG CWKCGKEGHQ MKDCTERQAN FLGKIWPSSK GRPGNFQPSR
451 PEPTAPPAEL FGMGEGIASL PKQEQKDREQ VPPLVSLKSL FGNDPLSQGS
501 PISPIETVPV TLKPGMDGPK VKQWPLTEEK IKALTEICTE MEKECKISKI
551 GPENFYNTPI FAIKKKDSTK WRKLVDFREL NKRTQDFWEV QLGIPHPAGL
601 KKKKSVTVLD VGDAYFSVPL DENFRKYTAF TIPSTNNETP GVRVYQYNVLP
651 QGWKGSPIAF QSSMTKILEP FRSKNPEIII YQYMAALYVG SDLEIGQHRT
701 KIEELRAHLL SWGFETTPDKK HQKEPPFLWM CYELHPDKWT VQPIMLPDKE
751 SWTVNDIQKL VGKLNWASQI YAGIKVKQLC RLLRGAKALT DIVTLTEEAE
801 LELAENREIL KDPVHGVYYD PSKDLVAEIQ KQGQDQWTYQ IYQEPFKNLK
851 TGKYARKRSA HTNDVRQLAE VVQKVAMEST VIWGKTPKFK LPIQKETWET
901 WWMQYQATW IPEWEFVNTP PLVKLWYQLE KDPILGAETF YVDGAANRET
951 KLGKAGYVTD RGRQKVVSILT ETTNQKTELH AILLALQDSG SEVNIVTDSQ
1001 YALGIIQAQP DRSESELVNO IIEKLGKDK IYLSWVPAHK GIGNEQVVDK
1051 LVSSGIRKVL FLDGIDKAQE DHERYHONWR TMAADFNLFP IVAKEIVASC
1101 DKCQLKGEAM HGQVDCSPGI WQLACTHLEG KVILVAVHVA SGYIEAEVIP
1151 AETGQETAYF LLKLAGRWPV KVVHTANGSN FTSAAVKAAC WWANIQQEPG
1201 IPYNPQSQGV VASMNKELKK IIGQVRDQAE HLKTAVQMAV FIHNEFKRGG
1251 IGGYSAGERI IDIIATDIQT KELQKQITKI QNFRVYYRDS RDPWKGPAP
1301 LLWKGEGAVV IQDNNDIKVV PRRKAKILRD YGKQMGDDC VAGRQDEDRS
1351 MGGKWSKGI VGWPEIRERM RRAPAAAPGV GAVSQDLDKH GAITSSNINN
1401 PSCVWLEAQE EEEVGFVVRP QVPLRPMTYK GAFDLSHFLK EKGGLDGLIY
1451 SRKRQEILDL WVYHTQGYFP DWQNYTPGPG VRYPLTEGWC FKLVPMEPDE
1501 VEKATEGENN SLLHPICQHG MDDEEREVLI WKFDSRLALK HRAQELHPEF
1551 YKDC

SEQ ID N°: 12

Proteína D_H. *influenzae* (1) MKLTALSLAAGVLACSSHSNMANTQMSDKIIAHRGASGYLPEII

51) TLESKALAFQAQADYLEQQLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRH(101) RKDGRYVIDFTLKEIQSLEMTENFET

Lisboa, 6 de Dezembro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Composição liofilizada, compreendendo um ou mais antigénios não carregados positivamente e um oligonucleótido imunoestimulador contendo CpG, em que o(s) referido(s) um ou mais antigénio(s) é(são) WT-1, ou um seu derivado ou fragmento, em que o derivado é suficientemente semelhante aos antigénios nativos para reter propriedades antigénicas e permanecer capaz de permitir que uma resposta imunitária seja deduzida contra o WT-1 e em que o fragmento tem, pelo menos, 8 aminoácidos de comprimento e é capaz de induzir uma resposta imunitária que reage de modo cruzado com o WT-1 de ocorrência natural.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que o referido oligonucleótido imunoestimulador compreende uma sequência de purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina.

3. Composição como reivindicada nas reivindicações 1 a 2, em que o referido oligonucleótido imunoestimulador é seleccionado do grupo compreendendo:

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

4. Composição de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, em que o oligonucleótido imunoestimulador contém, pelo

menos, duas repetições CG não metiladas estando separadas por, pelo menos, 3 nucleótidos.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, em que o oligonucleótido imunoestimulador contém, pelo menos, duas repetições CG não metiladas estando separadas por 6 nucleótidos.
6. Método de preparação de uma composição liofilizada de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, compreendendo as etapas de misturar o antigénio desejado e oligonucleótido imunoestimulador com excipientes adequados e submeter a formulação resultante a um ciclo de liofilização.
7. Método de preparação de uma composição imunogénica, compreendendo as etapas de reconstituição da composição liofilizada de qualquer das reivindicações 1 a 5 com um veículo adequado.
8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o referido veículo é um veículo particulado, seleccionado do grupo compreendendo sais minerais, emulsões, polímeros, lipossomas, ISCOM.
9. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o referido veículo é uma solução lipossomal ou uma emulsão de óleo em água.
10. Método de acordo com qualquer das reivindicações 7 a 9, em que o referido veículo compreende, ainda, um ou mais imunoestimulantes.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o referido um ou mais imunoestimulantes são seleccionados do grupo consistindo em agonistas do receptor de tipo Toll 4 (TLR 4), antagonistas de TLR 4, saponinas, agonistas de TLR7, agonistas de TLR8, agonistas de TLR9.
12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o referido antagonista de TLR 4 é MPL 3-desacilado.
13. Método de acordo com a reivindicação 11, em que a referida saponina é QS21.
14. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o referido veículo compreende dois imunoestimulantes.
15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que os referidos imunoestimulantes são MPL 3-desacilado e QS21.

Lisboa, 6 de Dezembro de 2012

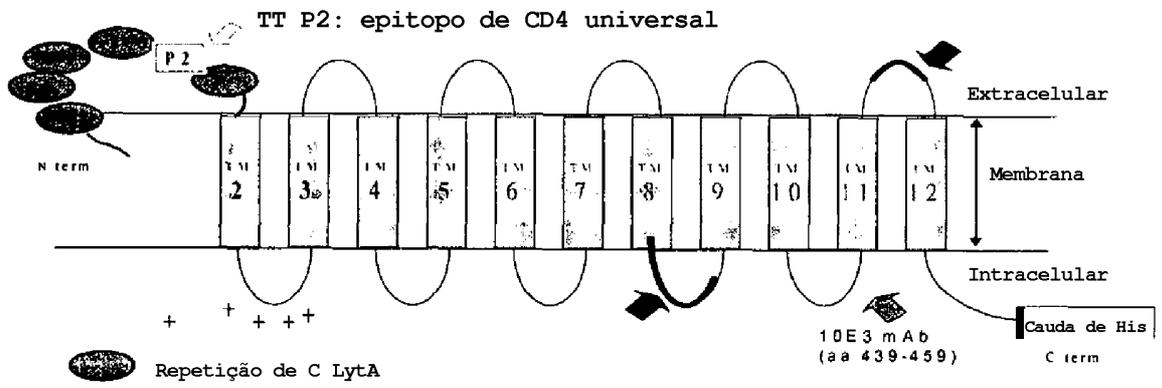


Figura 2

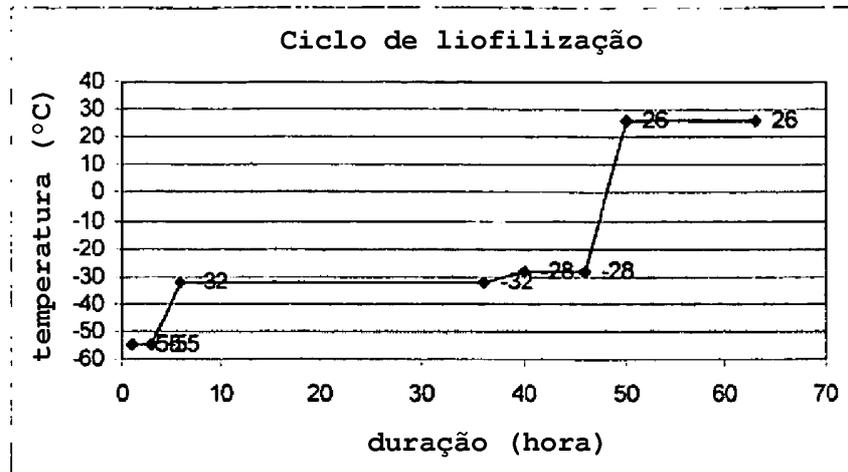


Figura 3

Frasco-ampolla |

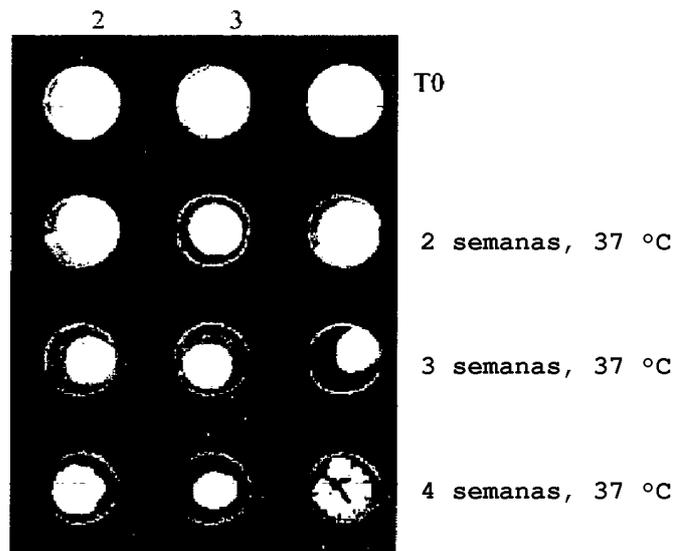


Figura 4

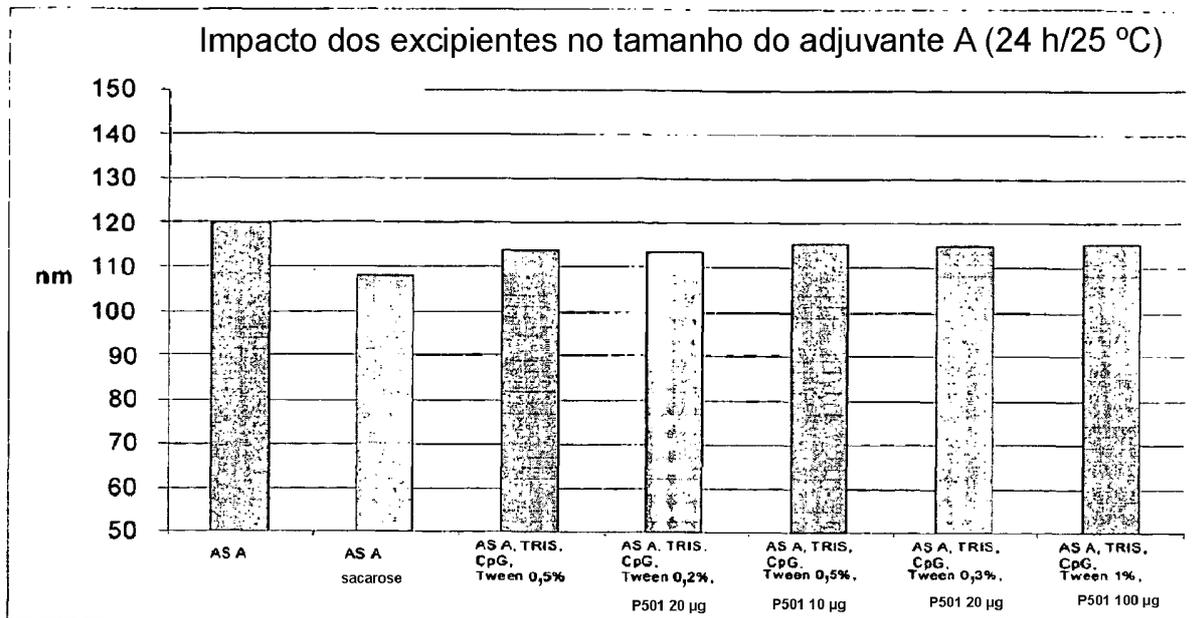


Figura 5**Proteína LipoD1/3 - MAGE3 - HIS:**

N term MDP	protD 1/3	Met ASP	Mage 3	GlyGly 7xHis	C term
	2	124	3	314	

SEQ ID Nº: 13

MDPKTLALSLLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIIAH 40
 RGASGYLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRIVV 80
 IHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE 120
 MTENFETMDLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAFAT 160
 EEQEAASSSSSTLVEVTLGEVFAAESPDPPQSPQGASSLPT 200
 TMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKV 240
 AELVHFLLLKYRAREPVTKAENLGSVVGWQYFFPVIFSK 280
 ASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLGDN 320
 QINPKAGLLIIVLAIAREGDCAPEEKIWEELSVLEVFEG 360
 REDSELGDPKKILTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW 400
 GPRALVETSIVKVLHMHVRISSGPHYSYPPILHEWVLRGE 440
 EGGHRRHRL 451

VERMELHO = sequência sinal de 15 aa**Azul = primeiros 109 aminoácidos da Proteína D****Cor-de-rosa = aminoácidos não relacionados**

* (primeiros aa de MDP de influenza)

* (Met-Asp nos aa 128-129 para criar um sítio de clonagem)

* (Gly-Gly em 442-443).

Verde = fragmento de MAGE3; aminoácidos 3-314 de MAGE3 (total de 312 aa)**Cor de laranja = cauda de 7 his**

Figura 6

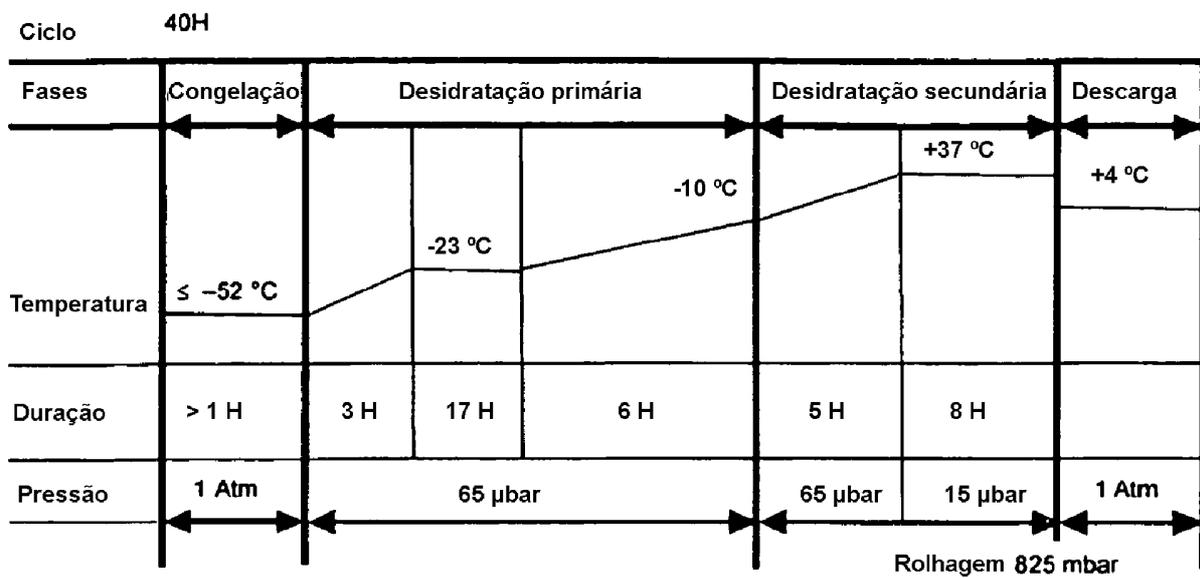


Figura 7

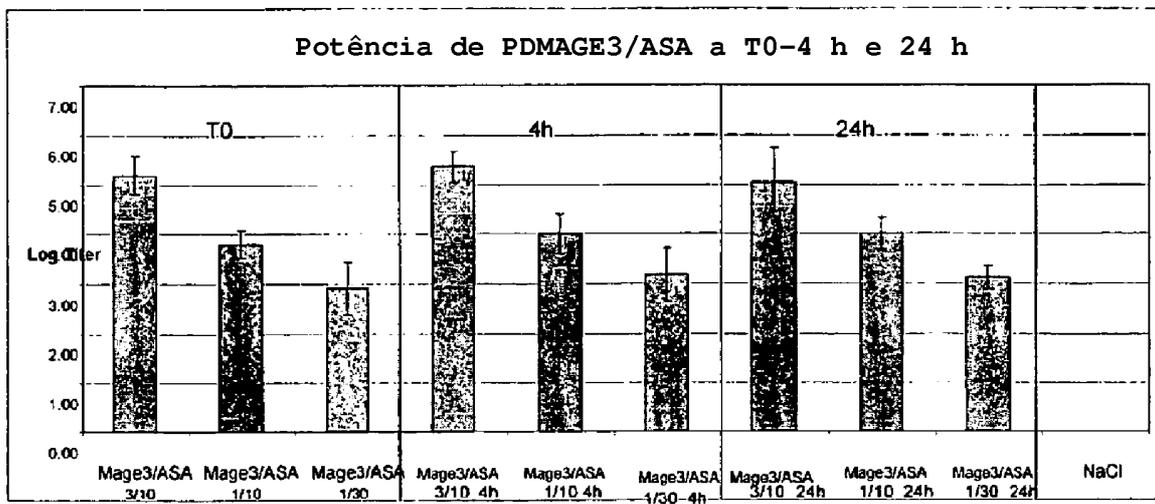


Figura 8



Figura 9

14	15	16	17	18	19
NC	SN	P	NC	SN	P
PRA0806-05 Compat. NaCl			PRA0806-16 CpG + NaCl		
Quase branco			Limp+part		

- CpG + CpG