



Industria y Comercio.
SUPERINTENDENCIA.

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

06-34534

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "COMPOSICIONES INMUNOGENICAS" ?

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/39

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. Y SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

DOMICILIO RIXENSART, BELGICA Y FILADELFIA, ESTADO DE PENNSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 7 ABR 2006

Completado

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-034534- -00000-0000 Fea: 2006-04-07 16:01:24
Dep. 2020 NUISCREACIONES
Tra: 11 PATENTE/VI Eje 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 140

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

13-05-06

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
S.A. Y SMITHKLINE BEECHAM CORPORATIONDirección: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart,
Bélgica y One Franklin Plaza, Filadelfia, Estado de
Pennsylvania 19101, Estados Unidos de América.
Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica y
Filadelfia, Estado de Pennsylvania, Estados
Unidos de América.Lugar de Constitución: Bélgica y Estado de
Pennsylvania, Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: BRUCK, Claudine, Elvire, Marie; GERARD, Catherine, Marie,
Ghislaine y JONAK, Zdenka, Ludmila.Dirección: GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406;
GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart y
GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Bélgica.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011621

Fecha: 11/10/04

Publicación Internacional No. WO 2005/039630 A3

Fecha: 06/05/05

⑥

Título (54)

"COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39

⑧

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

13/10/03

(31) Número de Solicitud

0323968.8

⑨

Comprobante de Pago No. 06-27,076

Fecha: 7 de Abril de 2006

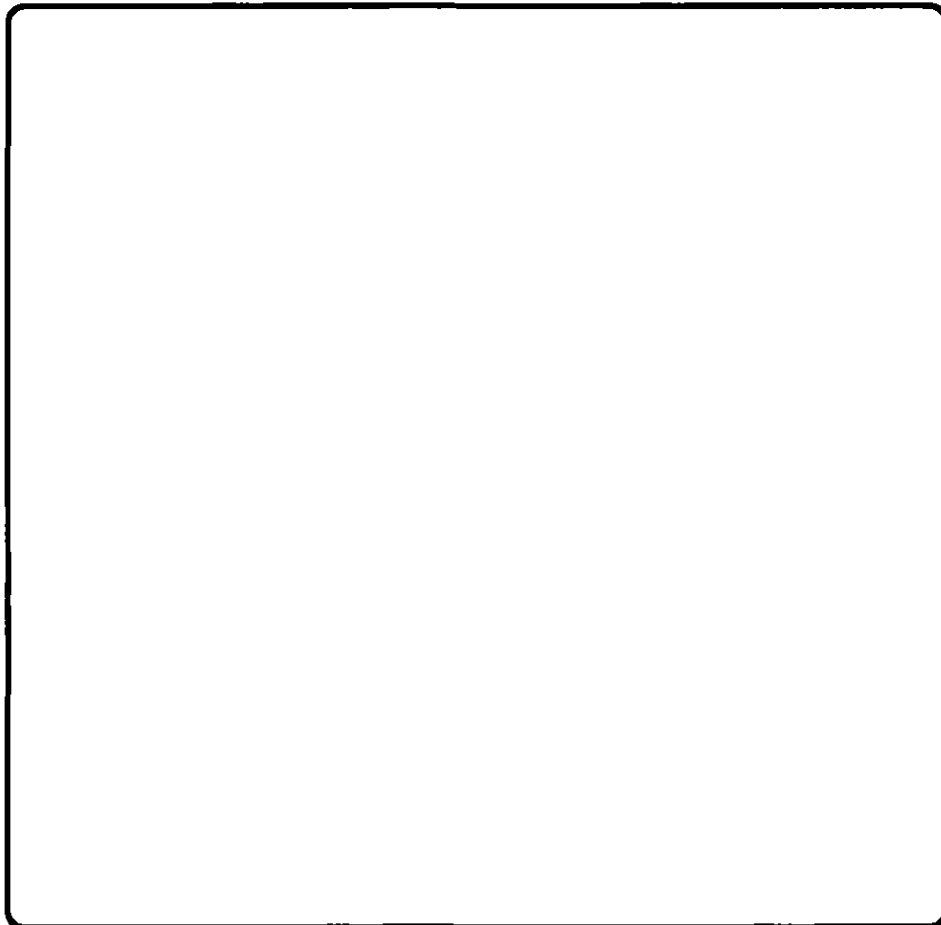
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Documentos de Representación Legal
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (resumen, descripción reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ Arte Final 12X12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción y opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA.



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE

ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA

C C 39 690 713 Usaquén T P 53 215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-024534- -00000-0000 Fea: 2005-04-07 18:01:24
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII Eje 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 140

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 27,076
FECHA : ABRIL 7 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	49930954	07/04/2006	5,968,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

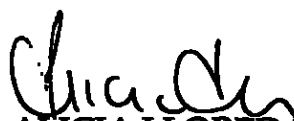
SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

Los documentos que acreditan la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de las sociedades peticionarias, que facultan a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se están presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

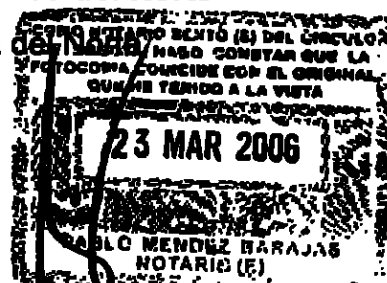
Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público
3. ha sido firmado James Kerr Milligan
4. actuando como Notario Público
5. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico



CERTIFICADO

6. en Londres
7. el 01 de septiembre de 2004
8. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
9. Número: G 749037
10. Sello/Estampilla: Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 3177
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

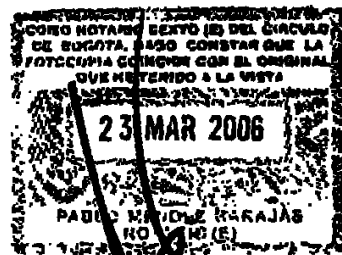
260567

Ante Escobar
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
las funciones indicadas

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

UES
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

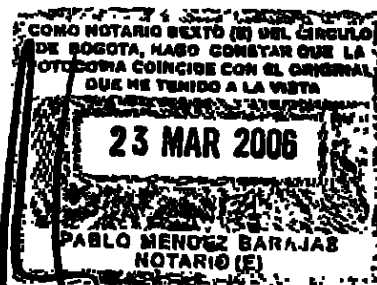
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

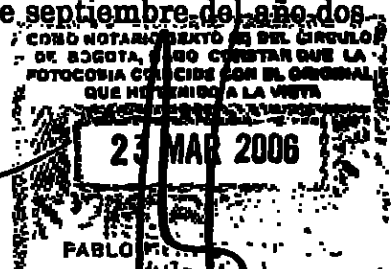
C E R T I F I C O:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada **"GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A."** (anteriormente denominada **"Smithkline Beecham Biologicals s.a."**), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.



JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by / a été signé par James Keef Milligan
3. acting in the capacity of / agissant en qualité de Notary Public
4. bears the seal/stamp of / est revêtu du sceau/timbre de Notary Public

Certified/Attesté

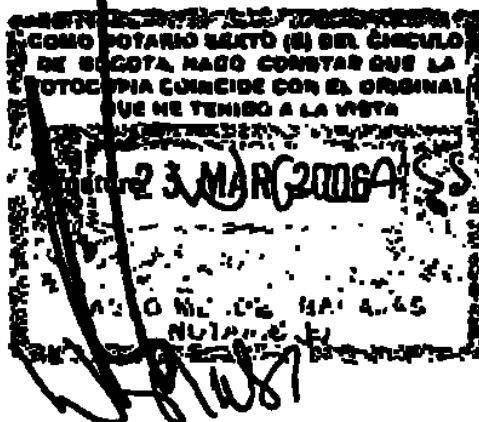
5. at London/à Londres 6. the/le 01-07-2004
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp:
timbre



10.



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistirse, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium**

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

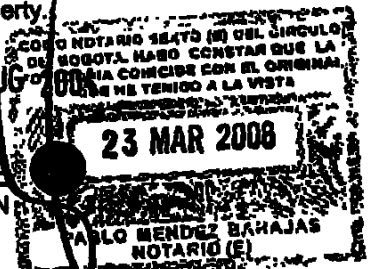
Given and signed this

Marcus Jonathan William DALTON
Marcus Jonathan William DALTON
 Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

31 AUG 2008

23 MAR 2008



8

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Bélgica, domiciliada en la ciudad de Rixensart, Bélgica, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

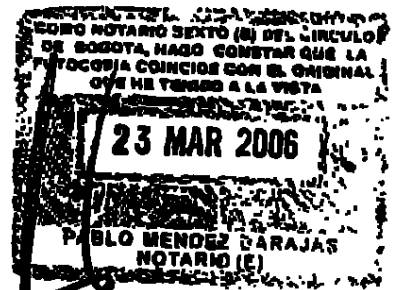
Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the of GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Belgium, domiciled at the City of Rixensart, Belgium, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company. The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-438
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.

Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado por Martin E Buchner

3. actuando como Notario Público

4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres

6. el 26 de agosto de 2004

7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para los Asuntos Exteriores y del Commonwealth

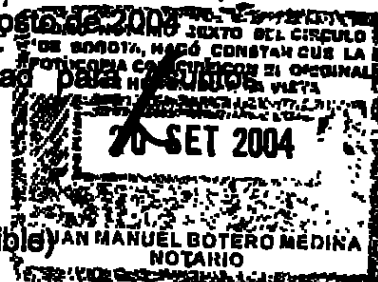
8. Número G499867

9. Sello/Estampilla

Sello de la Oficina de Asuntos

10. Firma: (ilegible)

M. Monaghan



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET -3 P 12:11

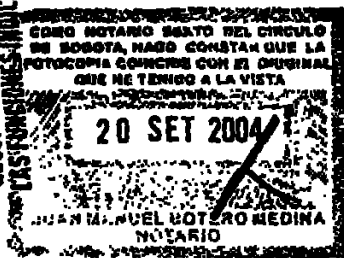
UCC
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258647

Pronto Escobal

BOYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS



Exteriores y del Commonwealth

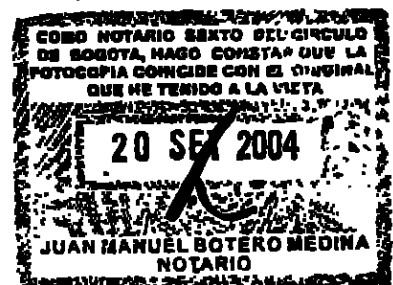
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



AA

Yo, el infrascrito, Martin Emil BUCHNER, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don Peter John GIDDINGS, cuya identidad me consta; Apoderado de la corporación denominada "SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION", corporación legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Pensilvania, Estados Unidos de América, con domicilio social en 1, Franklin Plaza, Philadelphia, Pensilvania 19101, Estados Unidos de América;

QUE el citado Señor Don Peter John GIDDINGS está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 24 de noviembre de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga, y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.

Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martin E. Buchner**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le 26 August 2004

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.



10. Signature: **M. Monaghan**

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

Los abajo firmados, SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Pennsylvania, Estados Unidos de América.

con domicilio en One Franklin Plaza, Filadelfia, Estado de Pennsylvania 19101, Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, perdir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

13
The undersigned, SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION, a corporation organized and existing under the laws of State of Pennsylvania, United States of America.

domiciled at One Franklin Plaza, Philadelphia, State of Pennsylvania 19101, United States of America

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as our true and legal representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

20 SET 2004
We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

23 AUG 2004
Peter John GIDDINGS as Attorney and Authorized Official

Folio 14 extraído
15 y 16 torjetas
②

14

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente VJR/VB60529	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP2004/011621	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 11/10/2004	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 13/10/2003
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 7 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ La búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Casilla No. I Secuencia(s) de ácido nucleótido y/o aminoácido (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de aminoácido revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se realizó sobre la base de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. formato del material
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en una forma legible para computadora
 - c. momento de presentación/suministro
 - ☐ contenido en la solicitud internacional tal como se presentó
 - ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible para computadora
 - ☒ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
2. ☒ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla en relación con aquello haya sido presentada o suministrada, o se suministraron, tal como es apropiado, las afirmaciones requeridas de que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud tal como se presentó o no va más allá de la solicitud tal como se presentó.
3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011621

16

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber: Aunque las reivindicaciones 1-12, y 29 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados de la composición.

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

A4

Casilla No. IV Texto del resumen (Continuación del ítem 5 de la primera hoja)

La invención se refiere a una terapia de combinación que encuentra utilidad en el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas, cánceres, enfermedades autoinmunes y condiciones relacionadas.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011621

18

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO
IPC 7 A61K39/39 A61P35/00

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 A61K A61P

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional, WPI Dato, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 01/68896 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 20 de Septiembre de 2001 (2001-09-20) página 3, línea 32 - página 4, línea 6 página 6, línea 4 - página 7, línea 26 página 9, línea 14 - línea 31 página 14, línea 17 - línea 22 -----	1-35
Y	WO 99/51259 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 14 de Octubre de 1999 (1999-10-14) página 3, línea 25 - página 4, línea 14 página 5, línea 8 - línea 20 página 7, línea 25 - página 26, línea 30 página 30, línea 32 - página 32, línea 2 página 35, línea 12 - página 36, línea 5 página 41, línea 29 - página 44, línea 13 ----- -/-	1-35

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

20 de Mayo de 2005

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

02/06/2005

Nombre y dirección de correo de la ISA
Oficina de Patentes Europea, P. B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Montero Lopez, B

21

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011621

19

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.) 11 de Noviembre de 1999 (1999-11-11) citado en la solicitud el documento completo	1-35
A	WO 98/16247 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 de Abril de 1998 (1998-04-23) citado en la solicitud página 10, línea 3 - página 12, línea 14 página 14, línea 21 - página 18, línea 18 página 19, línea 1 - página 21, línea 14	1-35
P, X	Y LI Y COL.: "La terapia del gen IL-18 desarrolla respuestas inmunes tipo Th1 en ratones BALB/c infectados mayormente con Leishmania: es el efecto mediado por la señalización CpG de TLR9?" GENE THERAPY, vol. 11, 2004, páginas 941-948, XP002328862 resumen página 943, columna a mano derecha, párrafo 4 - página 946, columna a mano derecha, párrafo 3	1, 5-14, 17-25, 28-31, 33-35

22

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011621

20

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 0168896 A	20-09-2001	AU	4541401 A	24-09-2001
		WO	0168896 A1	20-09-2001
		US	2001044418 A1	22-11-2001
WO 9951259 A	14-10-1999	AU	760549 B2	15-05-2003
		AU	3467899 A	25-10-1999
		CA	2323929 A1	14-10-1999
		EP	1067956 A2	17-01-2001
		JP	2002510644 T	09-04-2002
		WO	9951259 A2	14-10-1999
		US	6218371 B1	17-04-2001
		US	2002064515 A1	30-05-2002
WO 9956775 A	11-11-1999	AU	3827699 A	23-11-1999
		CA	2328059 A1	11-11-1999
		WO	9956775 A1	11-11-1999
		EP	1075275 A1	14-02-2001
		JP	2002513547 T	14-05-2002
WO 9816247 A	23-04-1998	AT	292980 T	15-04-2005
		AU	4992197 A	11-05-1998
		AU	768178 B2	04-12-2003
		AU	6877601 A	22-11-2001
		CA	2268825 A1	23-04-1998
		DE	69733020 D1	19-05-2005
		EP	0930893 A1	28-07-1999
		JP	2001503254 T	13-03-2001
		WO	9816247 A1	23-04-1998
		US	6610661 B1	26-08-2003
		US	2003232780 A1	18-12-2003
		US	2004006010 A1	08-01-2004

5

23

PATENT COOPERATION TREATY

21

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

To: GLAXOSMITHKLINE Attn. Stephen, Robert 980 Great West Road, GlaxoSmithKline Brentford, Middlesex TW8 9GS UNITED KINGDOM Received BRENTFORD 02 JUN 2005		(PCT Rule 44.1)	
ATTY: ☐ ADMIN: ☐		Date of mailing (day/month/year) 02/06/2005	
Applicant's or agent's file VJR/VB60529		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below	
International application No. PCT/EP2004/011621		International filing date (day/month/year) 11/10/2004	
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA			

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith. Filing of amendments and statement under Article 19: The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48): When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet. Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.	
2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.	
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that: ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices. ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.	
4. Reminders Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication. The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date. Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the <i>PCT Applicant's Guide</i> , Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.	

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018	Authorized officer Müge Aydemir
--	--

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference VJR/VB60529	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/KP2004/011621	International filing date (day/month/year) 11/10/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13/10/2003
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/011621

23

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/011621

24

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-12, and 29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/011621

25

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 8 of the first sheet)

The invention relates to a combination therapy that finds utility in the treatment or prophylaxis of infectious diseases, cancers, autoimmune diseases and related conditions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011621

26

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/39 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/68896 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 20 September 2001 (2001-09-20) page 3, line 32 - page 4, line 6 page 6, line 4 - page 7, line 26 page 9, line 14 - line 31 page 14, line 17 - line 22	1-35
Y	WO 99/51259 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 14 October 1999 (1999-10-14) page 3, line 25 - page 4, line 14 page 5, line 8 - line 20 page 7, line 25 - page 26, line 30 page 30, line 32 - page 32, line 2 page 35, line 12 - page 36, line 5 page 41, line 29 - page 44, line 13 -/-	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 2005

Date of mailing of the international search report

02/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Montero Lopez, B

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011621

27

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.) 11 November 1999 (1999-11-11) cited in the application the whole document	1-35
A	WO 98/16247 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 April 1998 (1998-04-23) cited in the application page 10, line 3 - page 12, line 14 page 14, line 21 - page 18, line 18 page 19, line 1 - page 21, line 14	1-35
P,X	Y LI ET AL.: "IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9?" GENE THERAPY, vol. 11, 2004, pages 941-948, XP002328862 abstract page 943, right-hand column, paragraph 4 - page 946, right-hand column, paragraph 3	1,5-14, 17-25, 28-31, 33-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011621

28

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168896	A	20-09-2001	AU 4541401 A	24-09-2001
			WO 0168896 A1	20-09-2001
			US 2001044418 A1	22-11-2001
WO 9951259	A	14-10-1999	AU 760549 B2	15-05-2003
			AU 3467899 A	25-10-1999
			CA 2323929 A1	14-10-1999
			EP 1067956 A2	17-01-2001
			JP 2002510644 T	09-04-2002
			WO 9951259 A2	14-10-1999
			US 6218371 B1	17-04-2001
			US 2002064515 A1	30-05-2002
WO 9956775	A	11-11-1999	AU 3827699 A	23-11-1999
			CA 2328059 A1	11-11-1999
			WO 9956775 A1	11-11-1999
			EP 1075275 A1	14-02-2001
			JP 2002513547 T	14-05-2002
WO 9816247	A	23-04-1998	AT 292980 T	15-04-2005
			AU 4992197 A	11-05-1998
			AU 768178 B2	04-12-2003
			AU 6877601 A	22-11-2001
			CA 2268825 A1	23-04-1998
			DE 69733020 D1	19-05-2005
			EP 0930893 A1	28-07-1999
			JP 2001503254 T	13-03-2001
			WO 9816247 A1	23-04-1998
			US 6610661 B1	26-08-2003
			US 2003232780 A1	18-12-2003
			US 2004006010 A1	08-01-2004

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
6 de Mayo de 2005 (06.05.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/039630 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/39, A61P 35/00

(74) Agente: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2004/011621

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional:
11 de Octubre de 2004 (11.10.2004)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
0323968.8 13 de Octubre de 2003 (13.10.2003) GB

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION [US/US]; One Franklin Plaza, P.O. Box 7929, Philadelphia, PA 19101 (US).

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(72) Inventores; e

(73) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): BRUCK, Claudine, Elvire, Marie [BE/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). JONAK, Zdenka Ludmilla [US/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US).

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:
21 de Julio de 2005

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

(57) Resumen: La invención se refiere a una terapia de combinación que encuentra utilidad en el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas, cánceres, enfermedades autoinmunes y padecimientos relacionados.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 May 2005 (06.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/039630 A3

(51) International Patent Classification⁷: **A61K 39/39, A61P 35/00**

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/011621

(22) International Filing Date: 11 October 2004 (11.10.2004)

(25) Filing Language: **English**

(26) Publication Language: **English**

(30) Priority Data:
0323968.8 13 October 2003 (13.10.2003) GB

(71) Applicants (for all designated States except US): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION [US/US]; One Franklin Plaza, P.O. Box 7929, Philadelphia, PA 19101 (US).**

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (for US only): **BRUCK, Claudine, Elvire, Marie [BE/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). JONAK, Zdenka Ludmila [US/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US).**

(74) Agent: **STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).**

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GE, GD, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): **ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
21 July 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **IMMUNOGENIC COMPOSITIONS**

(57) Abstract: **The invention relates a combination therapy that finds utility in the treatment or prophylaxis of infectious diseases, cancers, autoimmune diseases and related conditions.**

WO 2005/039630 A3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

31

Para: ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
		Fecha de correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011621	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 11.10.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 13.10.2003																									
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K39/39, A61P35/00																											
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA																											
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table border="0"> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. I</td> <td>Bases de la opinión</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table> 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.				☒	Casilla No. I	Bases de la opinión	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial	☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☒	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases de la opinión																									
☐	Casilla No. II	Prioridad																									
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial																									
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																									
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación																									
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																									
☒	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																									
☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																									
Nombre y dirección de correo de la ISA: Oficina Europea de Patentes - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Funcionario Autorizado Montero Lopez, B Teléfono No. +31 70 340-3739																									

Casilla No. I Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.

☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

ver hoja separada

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-12 y 29 con respecto a aplicabilidad industrial

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 1-12 y 29 con respecto a aplicabilidad industrial se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):
ver hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):
- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos.
- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:
- la forma escrita ☐ no se ha proporcionado
☐ no cumple con el estándar
- el formato legible por computador ☐ no se ha proporcionado
☐ no cumple con el estándar
- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Ver la hoja separada para más detalles

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones 3, 4, 10-12 No: Reivindicaciones 1, 2, 5-9, 13-35
Nivel Inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones No: Reivindicaciones 1-35
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones 13-28, 30-35 No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional

Han sido notados los siguientes defectos en la forma o contenidos de la solicitud internacional:

ver hoja separada

Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la pregunta si las reivindicaciones están totalmente soportadas por la descripción, son hechas:

ver hoja separada

Re Item I

Bases del reporte

1. El listado de secuencias radicado posteriormente con la carta de 24.3.2005 no forma parte de los documentos de la solicitud.

Re Item III

No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las Reivindicaciones 1-12 y 29 se relacionan con la materia objeto considerada por esta Autoridad como cubierta por las provisiones de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan dicha declaración

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: WO 01/68896 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) Septiembre 20 de 2001 (2001-09-20)
- D2: WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.) Noviembre 11 de 1999 (1999-11-11)
- D3: WO 99/51529 (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) Octubre 14 de 1999 (1999-10-14)

1. La presente solicitud está relacionada con el efecto adyuvante sinérgico del IL-18 y un oligonucleótido CpG. Se reivindica la composición que comprende IL-18, un antígeno y un adyuvante de CpG, así como su uso para mejorar una respuesta inmune y para el tratamiento del cáncer.

2. El Documento D1 revela el tratamiento de reacciones alérgicas y el asma con una composición de vacuna que comprende un péptido de fusión de IL-18 y un antígeno (página 3, línea 32 - página 4, línea 6). El antígeno puede ser un antígeno bacteriano, viral, protozoos o asociado a tumor (página 7, líneas 17-26). Además, la composición puede comprender un adyuvante de CpG (página 9, líneas 14-31). La proteína de fusión puede ser formulada con un adyuvante como QS21 y en las formulaciones farmacéuticas actuales (página 14, línea 17 - página 15, línea 23). Las reivindicaciones 1, 2, 5-9, 13-35 por lo tanto, no son novedosas y no cumplen con los requerimientos del Artículo 33(2) PCT.

2.1. Las Reivindicaciones 3 y 4 se refieren al uso de la composición para reducir la severidad del cáncer en un paciente. Tal uso particular no es especificado en D1. Sin embargo, como D1 cita antígenos de tumor, como antígenos posibles a ser incluidos en la composición inmunogénica, sería obvio para el experto que la composición de D1 se pueda usar para el tratamiento del cáncer cuando se formula con un antígeno de tumor. Las Reivindicaciones 3 y 4, por lo tanto, no involucran un nivel inventivo y no cumplen con los requerimientos del Artículo 33(3) PCT.

2.2. Las Reivindicaciones 10-12 se refieren a características específicas del adyuvante de CpG que el experto determinaría de acuerdo con las circunstancias, sin necesidad de aplicar un nivel inventivo. Las Reivindicaciones 10-12, por lo tanto, no cumplen con los requerimientos del Artículo 33(3) PCT.

3. El Documento D2 revela composiciones inmunogénicas que comprenden IL-18 como un adyuvante de vacuna (página 2, último párr. - página 3, párr. 2). Los vehículos farmacéuticos actuales están revelados (página 4, párr. 3) y el agente activo puede ser un antígeno de origen viral, bacteriano o parasítico (página 5, párr. 3). A la luz de D2, el problema a resolver consiste en la provisión de una composición inmunogénica mejorada. La solución proporcionada por el solicitante consiste en la inclusión de CpG, que parece tener un efecto adyuvante sinérgico con IL-18 como se muestra en el Ejemplo II de la solicitud. Esta solución no puede considerarse que involucra un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT) porque el efecto adyuvante sinérgico de las citocinas y CpG ya se ha mostrado en D3. Se da una lista no limitante de citocinas empleadas para este propósito (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15...) en la página 11, líneas 17-27. El experto consideraría inevitablemente incluir CpG en la composición de D2 para proveer un efecto adyuvante sinérgico con IL-18. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-35 carecen de nivel inventivo y contravienen los requerimientos del Artículo 33(3) PCT.

4. Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 13-28 y 30-35 acerca de la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones para un compuesto conocido para primer uso en un tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Re Item VII

Ciertos defectos en la solicitud internacional

1. La Reivindicación 12 se refiere al "oligonucleótido inmunoestimulador". En las reivindicaciones anteriores, este componente ha sido designado, sin embargo, como el "adyuvante de CpG". Se debe usar una terminología consistente en todas las reivindicaciones para designar las mismas características.
2. El Ejemplo III indica un experimento en el cual los ratones con un tumor son separados en 4 grupos a ser tratados respectivamente con PBS, IL-18, proteína Mage3 y una combinación de la vacuna con IL-18. Sin embargo, los resultados del experimento no se muestran.
3. Contrario a los requerimientos de la Regla 5.1(a)(ii) PCT, la técnica precia relevante revelada en los documentos D1 y D3 no se menciona en la descripción, ni estos documentos son identificados allí.

Re Item VIII

Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

1. La expresión relativa "cantidad segura y efectiva" en las reivindicaciones 1 a 3 no tiene un significado bien reconocido, siendo determinadas de acuerdo a las circunstancias, y por lo tanto, deja al lector en duda en cuanto al significado de las características técnicas a las cuales se refiere, haciendo así que la definición de la materia objeto de dichas reivindicaciones no sea clara, Artículo 6 PCT..

2. Los términos "fragmento bioactivo", "variante" y "derivado" usados en las reivindicaciones 1-8, 13, 15-18, 25-27, 30, 31, 33 y 34 son vagos y no claros y dejan al lector en duda en cuanto al significado de las características técnicas a las cuales se refieren, haciendo así que la definición de la materia objeto de dichas reivindicaciones no sea clara, Artículo 6 PCT.
3. Las expresiones "separadamente" y "secuencialmente" en las reivindicaciones 5, 13 y 25 no son claras porque no es posible determinar el lapso de tiempo entre dos eventos para ser definidos como secuenciales o separados (Artículo 6 PCT).
4. La expresión "condiciones relacionadas" en las reivindicaciones 13, 30 y 31 es vago y no claro, y deja al lector en duda en cuanto al significado de las características técnicas a las que se refiere, haciendo así que la definición de la materia objeto de dichas reivindicaciones no sea clara, Artículo 6 PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

39

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2004/011821

International filing date (day/month/year)
11.10.2004

Priority date (day/month/year)
13.10.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K3839, A61P3500

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentkan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3018

Authorized Officer

Montero Lopez, B

Telephone No. +31 70 340-3739



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/011621

40

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☐ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:
see separate sheet

43

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/011621

41

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 1-12 and 29 with respect to industrial applicability

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-12 and 29 with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/011621

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/a.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	3, 4, 10-12
	No: Claims	1, 2, 5-9, 13-35
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-35
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	13-28, 30-35
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/011621

Re Item I

Basis of the report

1. The sequence listing subsequently filed with the letter of 24.3.2005 does not form part of the application documents.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. Claims 1-12 and 29 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 01/68896 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 20 September 2001 (2001-09-20)
- D2: WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.) 11 November 1999 (1999-11-11)
- D3: WO 99/51259 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 14 October 1999 (1999-10-14)

1. The present application relates to the synergistic adjuvant effect of IL-18 and a CpG oligonucleotide. Composition are claimed comprising IL-18, an antigen and a CpG adjuvant as well as their use for enhancing an immune response and for cancer treatment.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/011621

2. Document D1 discloses the treatment of allergic reactions and asthma with a vaccine composition comprising a fusion peptide of IL-18 and an antigen (page 3, line 32 - page 4, line 6). The antigen may be a bacterial, viral, protozoal or tumour associated antigen (page 7, lines 17-26). In addition the composition may comprise a CpG adjuvant (page 9, lines 14-31). The fusion protein may be formulated with an adjuvant as QS21 and in current pharmaceutical formulations (page 14, line 17 - page 15, line 23). Claims 1, 2, 5-9, 13-35 are therefore not novel and do not comply with the requirements of Article 33(2) PCT.

2.1. Claims 3 and 4 refer to the use of the composition for reducing the severity of cancer in a patient. Such particular use is not specified in D1. However, since D1 recites tumour antigens as possible antigens to be included in the immunogenic composition, it would be obvious for the skilled person that the composition of D1 may be used for cancer treatment when formulated with a tumour antigen. Claims 3 and 4 therefore do not involve an inventive step and do not comply with the requirements of Article 33(3) PCT.

2.2. Claims 10-12 refer to specific features of the CpG adjuvant which the skilled person would determine according to the circumstances without the need of applying an inventive step. Claims 10-12, therefore, do not fulfill the requirements of Article 33(3) PCT.

3. Document D2 discloses immunogenic compositions comprising IL-18 as vaccine adjuvant (page 2, last par. - page 3, par. 2). Current pharmaceutical carriers are disclosed (page 4, par. 3) and the active agent can be an antigen of viral, bacterial or parasitic origin (page 5, par. 3). In the light of D2, the problem to be solved consists in the provision of an improved immunogenic composition. The solution provided by the applicant consists in the inclusion of CpG, which appears to have a synergistic adjuvant effect with IL-18 as shown in Example II of the application. This solution cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) since the synergistic adjuvant effect of cytokines and CpG has been already shown in D3. A non-limiting list of cytokines employed for this purpose (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 ...) is given in page 11, lines 17-27. The skilled person would inevitably consider to include CpG in the composition of D2 to provide a synergistic adjuvant effect with IL-18. Therefore, claims 1-35 lack inventive step and contravene the requirements of Article 33(3) PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/011621

4. For the assessment of the present claims 13-28, and 30-35 on the question whether they are Industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VII

Certain defects in the International application

1. Claim 12 refers to the "immunostimulatory oligonucleotide". In the previous claims, this component has been however designated as the "CpG adjuvant". A consistent terminology should be used throughout the claims to designate the same features.
2. Example III sets out an experiment in which mice with a tumour are separated in 4 groups to be treated respectively with either PBS, IL-18, Mage3 protein and a combination of the vaccine with IL-18. However, the results of the experiment are not shown.
3. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in the documents D1 and D3 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.

Re Item VIII

Certain observations on the International application

1. The relative expression "safe an effective amount" in claims 1 and 3 has no well-recognised meaning, being determined according to the circumstances, and therefore, it leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2004/011621

2. The terms "bioactive fragment", "variant" and "derivative" used in claims 1-8, 13, 15-18, 25-27, 30, 31, 33, and 34 are vague and unclear and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which they refer, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

3. The expressions "separately" and "sequentially" in claims 5, 13, and 25 are unclear as it is not possible to determine the lapse of time between two events to be defined as sequential or separate (Article 6 PCT).

4. The expression "related conditions" in claims 13, 30, and 31 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical features to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5. La presente invención se refiere a una terapia de combinación que encuentra utilidad en el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas, cánceres, enfermedades auto-inmunes y padecimientos relacionados.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a una terapia de
5 combinación que encuentra utilidad en el tratamiento o
profilaxis de enfermedades infecciosas, cánceres,
enfermedades auto-Inmunes y padecimientos relacionados. En
particular, la terapia de combinación comprende la
administración de una citocina TH-1, en particular IL-18, y
10 una composición Inmunogénica, en particular, una vacuna que
comprende un antígeno y un adyuvante CpG. En particular, la
presente invención se refiere al uso de la IL-18 o un
fragmento bioactivo o variante de la misma y una composición
inmunogénica que comprende un antígeno asociado con el
15 tumor y un adyuvante CpG, para el tratamiento de lesiones
preneoplásticas o cáncer. La invención se refiere además a
preparaciones combinadas y equipos farmacéuticos
adecuados para utilizarse de acuerdo con la presente
invención. Estos métodos de tratamiento y preparaciones
20 farmacéuticas son especialmente útiles para el estímulo de
una respuesta inmune adecuada para aplicaciones
profilácticas e Inmunoterapéuticas, especialmente para la
prevención y/o tratamiento de tumores.

Antecedentes de la Invención

25 El cáncer es una enfermedad que se desarrolla de una

sola célula debido a los cambios genéticos. A pesar de las enormes inversiones de recursos financieros y humanos, el cáncer continúa siendo una de las causas principales de la muerte. La detección clínica de estos tumores ocurre la mayoría de las veces, en una etapa relativamente tardía de la enfermedad, cuando el tumor primario puede ser extirpado mediante cirugía, y cuando ya ha ocurrido la existencia de micro metástasis asentadas en diferentes órganos. A pesar de los avances considerables en el entendimiento de los mecanismos que conducen al cáncer, ha habido poco progreso en la terapia de los cánceres metastáticos y para prevenir el progreso de los tumores en etapas tempranas hacia lesiones más malignas y metastáticas. La quimioterapia con frecuencia no elimina completamente estas células, las cuales entonces permanecen como una fuente de enfermedad recurrente.

Las citocinas del tipo TH-1, por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-12, IL-18, etc, tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes portadas por las células a un antígeno administrado. En contraste, los niveles altos de citocinas del tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. La interleucina-18 (IL-18), también conocida como el factor inductor del Interferon-gama (IFN γ), ha sido descrita como una citocina pleotrópica con efectos inmuno-reguladores que

estimulan el propio sistema inmune del paciente contra la enfermedad (por ejemplo, el cáncer). La IL-18 es expresada de manera temprana en la respuesta inmune y actúa tanto en las respuestas inmunes celulares como humorales y conduce a las respuestas hacia un mejor perfil del tipo TH-1. Se ha producido mediante células que presentan un antígeno activado y se ha reportado que tienen varias bioactividades, específicamente para promover la diferenciación de las células naturales CD4 T en las células Th1, de estimular las células exterminadoras naturales (NK), las células exterminadoras naturales T (NKT) y para inducir la proliferación de las células T activadas, predominantemente células T citotóxicas (del fenotipo CD8+) que secretan el interferon gama (IFN-gama) (Okamura H. et al. 1998, Adv. Immunol. 70: páginas 281 a 312). La IL-18 también es portadora de la muerte del tumor inducida por Fas, promueve la producción de IL-1a y GMCSF, y tiene una actividad anti-angiogénica.

La IL-18 tiene la capacidad de estimular la inmunidad innata de ambas respuestas portadas por las células Th1- y Th2-. En la presencia de la IL-12, la IL-18 puede actuar en las células Th1, células T no polarizadas, células NK, células B y células dendríticas para producir el IFNg. Sin la ayuda de la IL-12, la IL-18 tiene el potencial de inducir la producción de IL-4 e IL-13 en las células T, células NK, células de

mamas y basófilos.

La IL-18 ha mostrado que induce la regresión del tumor, a través de la producción de IFN-gama, el cual es un componente crítico de las respuestas inmunes endógenas y antitumor inducidas por la citocina. Se ha demostrado la eficacia en diferentes modelos de tumores de animales (Jonak Z et al. 2002, J. Immunother. 25, páginas S20-S27; Akamatsu S; et al. 2002, J. Immunother. 25, páginas S28-S34). Se han descrito composiciones que comprenden la IL-18 combinada con otros agentes, en particular la IL-18 en combinación con agentes quimioterapéuticos (Patente Norteamericana No. 6,582,689). La IL-18 también ha sido descrita como que actúa como un adyuvante para las vacunas (Documentos WO 99/56775; WO 03/031569).

Los oligonucleótidos que contienen CpG, (en los cuales el dinucleótido CpG es no metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en los Documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes Norteamericanas Nos. 6,008,200 y 5,856,462. Las secuencias de ADN inmunoestimulantes también han sido descritas, por ejemplo, por Sato et al., en Science 273: página 352, 1996. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen dinucleótidos CpG no metilados ("en lo sucesivo CpG") son conocidos en la técnica como que son adyuvantes cuando son

administrados, tanto por rutas en la mucosa como sistémicas (Documentos WO 96/02555, Patente Europea EP 468520, Davis et al., J.Immunol, 1998, 160(2): páginas 870 a 876; McCluskie y Davis, J.Immunol., 1998, 161(9): páginas 4463 a 4466). CpG es una abreviatura para los patrones del dinucleótido de citocina-guanosina presentes en el ADN. Históricamente, se ha observado que la fracción de ADN del BCG podría ejercer un efecto anti-tumor. En estudios adicionales, los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias del gen BCG mostraron tener la capacidad de inducir efectos inmunoestimulantes (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, que incluyen un patrón CG central, portan esta actividad. El rol central del patrón CG en la inmunoestimulación fue evidenciado después en una publicación de Krieg, en Nature 374, página 546, 1995. El análisis detallado ha mostrado que el patrón CG tiene que ser en un cierto contexto de secuencia, y que dicha secuencia es común en el ADN bacteriano, pero es rara en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimulante es frecuentemente de: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en donde el patrón CG del dinucleótido no es metilado, pero otras secuencias CpG no metiladas son conocidas como que son inmunoestimulantes y pueden ser utilizadas en la presente invención.

En ciertas combinaciones de seis nucleótidos está presente una secuencia palindrómica. Varios de estos patrones, ya sea como repeticiones de un patrón o una combinación de patrones diferentes, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoestimulantes que contienen oligonucleótidos puede activar varios subconjuntos inmunes, incluyendo las células exterminadoras naturales (las cuales producen el Interferon γ y tienen una actividad citolítica) y los macrófagos (Wooldrige et al Vol 89 (no. 8), 1977). Aunque otras secuencias que contienen el CpG no metilado que no tienen esta secuencia de consenso ahora han mostrado también ser inmuno-reguladoras.

El CpG cuando es formulado en vacunas, generalmente es administrado en una solución libre junto con un antígeno libre (Documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, mencionado anteriormente) o conjugado de manera covalente a un antígeno (Publicación PCT No. WO 98/16247), o formulado con un portador, tal como hidróxido de aluminio (antígeno de la superficie de hepatitis) Davis et al., mencionado anteriormente; Brazolot-Millan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EUA, 1998, 95(26), páginas 15553 a 15558).

La presente invención se refiere al descubrimiento sorprendente de que la administración combinada de la citocina TH-1 tal como IL-18 y de una composición

Inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante CpG es extremadamente potente y proporciona la profilaxis o el tratamiento bien tolerado o eficiente de enfermedades infecciosas, enfermedades neoplásicas, metastáticas primarias (por ejemplo, cánceres), enfermedades autoinmunes y padecimientos relacionados, y es particularmente efectivo, para inhibir la proliferación de las células cancerosas humanas que expresan un antígeno asociado con el tumor.

Sumario de la invención

10 Por consiguiente, se proporciona un método para evidenciar una respuesta inmune mejorada a un antígeno en un paciente, el cual comprende la administración al paciente de una cantidad segura y efectiva de i) una composición inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un
15 antígeno o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG y ii) un polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo. En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la severidad de un cáncer en un paciente, que incluye el
20 tratamiento de tumores previamente establecidos (tumores primarios y tumores metastáticos) o de prevenir las recurrencias de cáncer, comprendiendo dicho método la administración al paciente que lo necesita de una cantidad segura y efectiva de i) un polipéptido IL-18 o fragmento
25 bioactivo o variante del mismo, ii) una composición

inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un antígeno o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG.

En una modalidad, el polipéptido IL-18 es un polipéptido
5 múrido, o un polipéptido IL-18 humano o un fragmento bioactivo o variante del mismo. En otra modalidad, el antígeno es un antígeno asociado con el tumor. Por consiguiente, en una modalidad, la presente invención se refiere a un método para reducir la severidad de un cáncer en
10 un paciente, que incluye el tratamiento de tumores previamente establecidos (tumores primarios y tumores metastáticos) o prevenir de las recurrencias del cáncer, particularmente el carcinoma de mama, el pulmón, (particularmente el carcinoma del pulmón de células no
15 pequeñas), melanoma, el carcinoma colo-rectal, del ovario, de la próstata, vejiga, escamoso de cabeza y cuello, gástrico y otros carcinomas GI (gastrointestinales), en particular, el cáncer del esófago, leucemia, linfomas, mielomas, plasmacitomas, comprendiendo dicho método la
20 administración al mamífero de i) una composición inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un antígeno asociado con el tumor o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG y ii) el polipéptido IL-18 o un fragmento bioactivo o variante del mismo.

25 La presente invención también se refiere a una

preparación combinada que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes individuales: (1) un polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante CpG, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, separado o consecutivo para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer, incluyendo tumores primarios y tumores metastáticos, enfermedades autoinmunes y padecimientos relacionados. En una modalidad la composición inmunogénica dentro de la preparación combinada contiene un químico adicional inmunoestimulante seleccionado del grupo consistente de: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol y una emulsión de aceite en agua o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes. Por ejemplo, el adyuvante adicional es una saponina, por ejemplo QS-21.

En un aspecto relacionado la presente invención también proporciona un equipo farmacéutico que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes individuales: (1) un polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo, (2) una composición inmunogénica que comprende un derivado del antígeno o inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, separado o consecutivo para la

profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer, incluyendo tumores primarios y tumores metastáticos, y enfermedades autoinmunes.

La presente invención se refiere además al uso de (1)
5 un polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG, en la manufactura de un medicamento para lograr una respuesta inmune protectora o reducir la severidad de una
10 enfermedad en un paciente, administrando a dicho paciente una cantidad efectiva y segura de ambos componentes.

La presente invención se refiere además a procesos para elaborar dichas composiciones inmunogénicas, al uso de dichas composiciones para la prevención y/o el tratamiento de
15 enfermedades, en particular, el cáncer y al uso de dichas composiciones para inhibir el crecimiento de tumores y células cancerosas en los mamíferos, incluyendo los humanos.

Descripción Detallada de la Invención

20 En una forma de la presente invención, el adyuvante CpG dentro de la composición inmunogénica contiene uno, o dos o más patrones CpG de dinucleótidos separados por al menos tres, por ejemplo, por al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención
25 generalmente son desoxinucleótidos. En una modalidad el

Internucleótido del oligonucleótido es fosforoditioato, o fosforotioato enlazado, aunque los enlaces fosfodiéster y otros internucleótidos se encuentran dentro del alcance de la presente invención, incluyendo los oligonucleótidos con
5 enlaces internucleótidos mezclados. Los métodos para producir los oligonucleótidos fosforotioato o fosforoditioato se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,666,153, 5,278,302 y el Documento WO95/26204.

Los ejemplos de los oligonucleótidos tienen las
10 siguientes secuencias. Las secuencias pueden contener enlaces internucleótidos modificados por fosforotioato.

OLIGO 1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG
TT (CpG 1826)

OLIGO 2(SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT
15 (CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT
GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4(SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT
GTC GTT (CpG 2006, también conocido como CpG 7909)

20 OLIGO 5(SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG
CT (CpG 1668)

Alternativamente los oligonucleótidos CpG pueden comprender las secuencias anteriores, ya que ellos tienen eliminaciones o adiciones intrascendentes de los mismos.

25 Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente

Invención pueden ser sintetizados por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, Patente Europea EP 468520). De una manera conveniente, dichos oligonucleótidos pueden ser sintetizados utilizando un sintetizador automático.

5 Los oligonucleótidos utilizados en la presente invención también son generalmente desoxinucleótidos. En una modalidad, los enlaces internucleótidos del oligonucleótido son enlaces fosforoditioato, o fosforotioato, aunque los fosforodiósteres también se encuentran dentro del alcance de
10 la presente invención. Los oligonucleótidos que comprenden enlaces internucleótidos diferentes están contemplados, es decir, fosforotioato fosfodiósteres mezclados. Pueden ser utilizados otros enlaces internucleótidos los cuales estabilizan el oligonucleótido.

15 El antígeno puede ser un antígeno derivado de un organismo infeccioso, por ejemplo, un antígeno asociado con el tumor o un derivado inmunogénico o derivado del mismo. El polipéptido IL-18 puede ser un polipéptido murino o polipéptido IL-18 humano o un fragmento bioactivo del mismo.
20 La composición inmunogénica y el IL-18 pueden actuar sinérgicamente en la inducción de un anticuerpo específico del antígeno y pueden ser potentes para inducir o mejorar las respuestas inmunes humorales y/o celulares convencionalmente asociadas con el sistema inmune del tipo
25 TH-1. La mejora de la respuesta inmune significa un aumento

total en la respuesta inmune, determinada por la respuesta inmune portada por las células y/o humoral, o mediante la reducción del tamaño del tumor y/o la carga. La sinergia significa que el polipéptido IL-18 o el fragmento inmunogénico o variante del mismo tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune cuando es administrado en una terapia combinada con la composición inmunogénica de la presente invención y la presencia de dicha composición inmunogénica puede mejorar la eficacia del polipéptido IL-18 o el fragmento inmunogénico o variante del mismo. El resultado de la inducción de la respuesta inmune puede ser la profilaxis, reducción de la severidad de la enfermedad (incluyendo, en el caso del cáncer, la reducción de tumores previamente establecidos, primarios o metástasis, o la prevención de las recurrencias del cáncer) y/o la terapia.

Por consiguiente, en una modalidad se proporciona un método para promover una respuesta inmune a un antígeno en un mamífero, el cual comprende la administración a un mamífero de i) una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que comprende un antígeno derivado de un organismo infeccioso, un antígeno asociado con el tumor y un adyuvante CpG y ii) el polipéptido IL-18 o un fragmento bioactivo o variante del mismo. En una modalidad, ambos componentes del tratamiento se administran de manera consecutiva. Se dice que la composición inmunogénica es

utilizada para acelerar la respuesta inmune celular y/o humoral preparada por la administración del polipéptido IL-18. Alternativamente, en otra modalidad, la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención es
5 utilizada para preparar una respuesta inmune celular y/o humoral en un individuo el cual recibirá consecutivamente el polipéptido IL-18. Todavía en otra modalidad ambos componentes de dicho tratamiento son administrados simultáneamente, ya sea a través de la co-administración en
10 dos sitios diferentes o mezclados dentro de la misma preparación. Los expertos en la técnica entenderán que ambas la composición inmunogénica y el polipéptido IL-18 pueden ser administrados una vez o de manera repetida.

La terapia de combinación como está contemplada
15 dentro del alcance de la presente invención, es por lo menos tan efectiva, o puede ser de una eficacia aumentada, comparada con su componente utilizado solo. Especialmente en el campo del cáncer, el tratamiento combinado es provechoso debido a que combina dos agentes anti-cáncer,
20 los cuales operan de un modo aditivo, por ejemplo sinérgicamente, por medio de un mecanismo diferente de acción para producir una respuesta citotóxica mejorada contra las células del tumor humano.

En una modalidad relacionada se proporciona una
25 preparación combinada (por ejemplo, un equipo farmacéutico

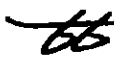
64

o un empaque de frascos farmacéuticos múltiples) que comprenden como ingredientes activos (1) un polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo y (2) una composición Inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante CpG, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, separado o consecutivo para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.

La preparación combinada significa una preparación farmacéutica, o un empaque farmacéutico (de frascos múltiples) o un aparato abastecedor el cual puede contener una o más formas de dosis unitaria que contiene los ingredientes activos. El empaque puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un empaque blister. El empaque o aparato abastecedor puede estar acompañado por instrucciones para la administración. En donde el polipéptido IL-18 y la composición Inmunogénica se pretenden para la administración como dos composiciones separadas, éstas pueden ser presentadas en la forma de, por ejemplo, un empaque de frascos múltiples. Los ingredientes activos que son administrados, ya sea al mismo tiempo o por separado, o consecutivamente, de acuerdo con la presente invención, no representan un mero agregado de los agentes conocidos, sino una combinación nueva con la propiedad sorprendentemente valiosa de que el uso del polipéptido IL-18, permite la simulación de ambos componentes Innatos y

adaptables del sistema inmune, incluyendo la activación de la célula NK, así como las respuestas inmunes portadas por las células T y la producción de citocina, aumentando de este modo la eficacia de la composición inmunogénica. Esto da
5 como resultado un tratamiento nuevo y efectivo. Deberá quedar entendido que la preparación combinada también designada como un equipo de partes significa que los componentes de la preparación combinada no están necesariamente presentes como una unión, es decir en
10 composición, con el objeto de que estén disponibles para la aplicación separada o consecutiva. Por lo tanto, la expresión equipo de partes, significa que no necesariamente es una combinación real, en vista de la separación física de los componentes.

15 La preparación combinada puede ser utilizada, ya sea para el tratamiento o profilaxis del cáncer, en particular, para la reducción de la severidad del cáncer o la prevención de las recurrencias del cáncer. Los cánceres que se pueden beneficiar de la terapia combinada como se describe en este
20 documento, incluyen cualquier enfermedad caracterizada por el crecimiento celular no controlado y la proliferación, lesiones preneoplásticas, tumores primarios y tumores y lesiones neoplásticas metastáticas, e incluyen, pero no están limitadas a, carcinoma de mama, pulmón (particularmente el
25 carcinoma -NSCLC- del pulmón de célula que no es

- 3 - 

pequeña), melanoma, el carcinoma colo-rectal, del ovario, de la próstata, la vejiga, escamoso de cabeza y cuello, el carcinoma gástrico y otros GI (gastrointestinales), en particular, el cáncer del esófago, leucemia, linfoma, mieloma, y plasmacitoma.

Los antígenos de ejemplo derivados y fragmentos de los mismos, incluyen péptidos (es decir, de menos de aproximadamente 50 aminoácidos), incluyen el antígeno codificado por la familia de MAGE (Genes que codifican el Antígeno de Melanoma) los cuales son conocidos como antígenos del cáncer (-testículos), (Gaugler B. et al. J. Exp. Med., 1994, 179: página 921; Weynants P. et al. Int. J. Cancer, 1994, 56: página 826; Patard J.J. et al. Int. J. Cancer, 1995, 64: página 60). Los cánceres que expresan las proteínas MAGE son conocidos como tumores asociados con MAGE. Los genes MAGE pertenecen a una familia de genes estrechamente relacionados, incluyendo por ejemplo, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (Gen-3 que codifica el Antígeno de Melanoma), MAGE 4, MAGE 5, MAGE 6, MAGE 7, MAGE 8, MAGE 9, MAGE 10, MAGE 11, MAGE 12, localizado en el cromosoma X y que comparte con los otros de un 64% a 85% de homología en su secuencia de codificación (De Plaen E. et al., Immunogenetics, 1994, 40, páginas 360 a 369). Estos algunas veces son conocidos como MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A5, MAGE A6, MAGE A7, MAGE

A8, MAGE A9, MAGE A10, MAGE A11, MAGE A12 (La familia MAGE A). Otros dos grupos de proteínas también son parte de la familia MAGE aunque están relacionadas de una manera más distante. Estas son el grupo MAGE B y el grupo MAGE C.

5 La familia MAGE B Incluye MAGE B1 (también conocido como MAGE Xp1, y DAM 10), MAGE B2 (conocido también como MAGE Xp2 y DAM 6) MAGE B3 y MAGE B4 – la familia MAGE C incluye actualmente MAGE C1 y MAGE C2. En términos generales, una proteína MAGE puede ser definida como que
10 contiene una firma de secuencia del núcleo localizada hacia el extremo de la terminal C de la proteína (por ejemplo, con respecto al MAGE A1, una proteína de 309 aminoácidos, la firma del núcleo corresponde a los aminoácidos del 195 al 279).

15 Por lo tanto, el patrón de consenso de la firma del núcleo se describe de la manera siguiente, en donde x representa cualquier aminoácido, los residuos del caso inferior son conservados (se permiten las variantes conservadoras) y los residuos del caso superior son
20 perfectamente conservados.

La firma de la secuencia del núcleo:

LlxvL(2x)l(3x)g(2x)apEExiWexl(2x)m(3-4x)Gxe(3-
4x)gxp(2x)lIt(3x)VqexYLxYxqVPxsxP(2x)yeFLWGprA(2x)Et(3x)
)kv

25 Las substituciones conservadoras son bien conocidas y

tb

generalmente son preparadas como matrices de calificación por omisión (default) en los programas de cómputo de alineación de secuencias. Estos programas incluyen PAM250 (Dayhoft M.O. et al., 1978, "Un modelo de cambios de evolución en las proteínas", en el "Atlas de secuencias de proteínas y estructura" 5(3) M.O. Dayhoft (ed.), páginas 345 a 352), La Fundación Nacional de Investigación Biomédica, Washington, y Blosum 62 (Steven Henikoff & Jorja G. Henikoff (1992), "Matrices de sustitución de aminoácidos de los bloques de proteínas"), Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89 (Bioquímica): páginas 10915 a 10919.

En términos generales, la sustitución dentro de los siguientes grupos son sustituciones conservadoras, pero las sustituciones entre los grupos son consideradas no conservadas. Los grupos son:

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

En general y en el contexto de la presente invención, la proteína MAGE será aproximadamente 50% idéntica en esta región del núcleo a los aminoácidos del 195 al 279 de la MAGE A1.

La **MAGE-3** es expresada en el **69%** de los melanomas (Gaugler B. et al. J. Exp. Med., 1994, 179: página 921), y también puede ser detectada en un **44%** de NSCLC (Yoshimatsu T. J Surg Oncol., 1998, 67, páginas 126 a 129),
5 **75%** de cánceres del pulmón de célula pequeña (SCLC) (Traversari C. et al., Gene Ther. 1997, 4: páginas 1029 a 1035), **48%** de carcinoma de la célula escamosa de cabeza y cuello, **34%** del carcinoma de la célula transicional de la vejiga, **57%** del carcinoma del esófago, **32%** de cánceres del
10 **colón**, **24%** de cánceres de mama (Van Pel A. et al., Immunol. Rev., 1995, 145: página 229; Inoue H. et al. Int. J. Cancer, 1995, 63: página 523; Nishimura S et al., Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 1997, Abril 20 (2): páginas 95 a 101). Han sido identificados varios epítopes CTL en la proteína
15 **MAGE-3** los cuales tienen patrones de enlace específicos para cualquiera de las moléculas MHC de la clase I HLA.A1, ó HLA.A2 (Van der Bruggen P. et al., Eur. J. Immunol., 1994, 24 páginas 3038 a 3043) y alelos HLA.B44 (Herman, J. et al., Immunogenetics, 1996, 43, páginas 377 a 383),
20 **respectivamente.**

Otros antígenos de ejemplo o derivados o fragmentos derivados de los mismos incluyen los antígenos **MAGE** tales como los que se describen en el Documento WO 99/40188, **PRAME** (Documento WO 96/10577), **BAGE**, **RAGE**, **LAGE 1**
25 **(Documento WO 98/32855), LAGE 2** (también conocido como

NY-ESO-1, Documento WO 98/14464), XAGE (Liu et al, Cancer Res, 2000, 60: páginas 4752 a 4755; el Documento WO 02/18584) SAGE, y HAGE (el Documento WO 99/53061) ó GAGE (Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, páginas 628 a 636; Van den Eynde et al., International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentado en 1997); Correale et al. (1997). Journal of the National Cancer Institute 89, página 293. Indudablemente estos antígenos son expresados en un amplio rango de tipos de tumores, tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vesícula.

En una modalidad, se utilizan antígenos de la próstata, tales como antígenos del cáncer de la próstata o antígenos de diferenciación específica de la próstata (PSA), PAP, PSCA (PNAS 95(4) páginas 1735 a 1740 1998), PSMA o un antígeno conocido como prostasa.

En una modalidad, el antígeno de la próstata es P501S o un fragmento del mismo. El P501S, también denominado prostetina (Xu et al., Cancer Res. 61, 2001, páginas 1563 a 1568), es conocido como la SEQ ID NO. 113 del Documento WO98/37814 y es una proteína de 553 aminoácidos. Los fragmentos inmunogénicos y fracciones de los mismos que comprenden 20 o por lo menos 20, 50 o por lo menos 50 ó 100 o por lo menos 100 aminoácidos contiguos, se describen en la solicitud de patente a que se hizo referencia

anteriormente, y están específicamente contemplados por la presente invención. Los fragmentos se describen en el Documento WO 98/50567 (antígeno PS108), y como la proteína asociada con el cáncer de la próstata (SEQ ID NO: 9
5 del Documento WO 99/67384). Otros fragmentos tienen los aminoácidos del 51 al 553, del 34 al 553 ó del 55 al 553 de la proteína P501S de longitud completa. En particular, las construcciones 1, 2 y 3 (ver figura 2, SEQ ID NOs. 27-32) están expresamente contempladas y pueden ser expresadas
10 en sistemas de levadura, por ejemplo secuencias de ADN que codifican dichos polipéptidos que pueden ser expresadas en un sistema de levadura.

La prostasa es una prostasa de serina específica de la próstata (similar a la tripsina), con una longitud de 254
15 aminoácidos, con una tríada catalítica H-D-S de proteasa de serina conservada y una secuencia pre-propéptido y la terminal amino, indicando un punto de secreción potencial (P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Linas, L. Hood & K. Wand, "Clonación molecular y caracterización de prostasa,
20 una proteasa de serina regulada por el andrógeno con una expresión restringida en la próstata" (Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate restricted expression.) en Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1999) 96, páginas 3114 a 3119). Se ha
25 descrito un sitio de glucosilación. La estructura pronosticada

es muy similar a otras proteasas de serina conocidas, mostrando los dobleces del polipéptido maduro en un solo dominio. La proteína madura es de una longitud de 224 aminoácidos, con por lo menos un epítope A2 mostrado para
 5 que sea procesado de manera natural. La secuencia de nucleótidos de prostasa y la secuencia de polipéptidos deducida y el homólogo se describen en la publicación de Ferguson, et al. en (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1999, 96, páginas 3114 a 3119) y en las Solicitudes Internacionales de
 10 Patentes Documento WO 98/12302 (y también la Patente Norteamericana concedida correspondiente 5,955,306), el Documento WO 98/20117 (y también las Patentes correspondientes concedidas US 5,840,871 y US 5,786,148) (kallikreina específica de la próstata) y el Documento WO
 15 00/04149 (P703P).

Otros antígenos específicos de la próstata son conocidos por el Documento WO98/37418, y el Documento WO/004149. Otro es el STEAP (PNAS 96 14523 14528 páginas de la 7 a la 12, 1999).

20 Otros antígenos asociados con el tumor útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu -1 J Biol. Chem 274 (22) páginas 15633 a 15645, 1999, HASH -1, HASH-2 (Alders, M. et al., Hum. Mol. Genet. 1997, 6, páginas 859 a 867), Cripto (Salomon et al Bioassays 199, 21 páginas
 25 61 a 70, la Patente Norteamericana No. 5654140), CASB616

(Documento WO 00/53216), Criptina (Patente Norteamericana No. 5,981,215). Adicionalmente, los antígenos particularmente importantes para las vacunas en la terapia de cáncer también comprenden tirosinasa, telomerasa, P53, NY-
5 Br1.1 (Documento WO 01/47959) y fragmentos de los mismos tales como los que se describen en el Documento WO 00/43420, B726 (Documento WO 00/60076, SEQ ID Nos. 469 y 463; Documento WO 01/79286, SEQ ID Nos. 474 y 475), P510 (Documento WO 01/34802 SEQ ID Nos. 537 y 538) y
10 survivina.

La presente invención también es útil en combinación con antígenos del cáncer de mama, tales como Her-2/neu, mamaglobina (Patente Norteamericana No. 5,668,267), B305D (Documento WO00/61753 SEQ ID nos. 299, 304, 305 y 315), y
15 los que se describen en los Documentos WO00/52165, WO99/33869, WO99/19479, WO 98/45328. Los antígenos Her-2/neu se describen entre otros, en la Patente Norteamericana No. 5,801,005. El antígeno Her-2/neu pueden comprender el dominio extracelular completo (comprendiendo de
20 aproximadamente el aminoácido 1 al 645) o fragmentos del mismo y por lo menos una porción inmunogénica de o un dominio intracelular completo de aproximadamente 580 aminoácidos de la terminal C. En particular, la porción intracelular debe de comprender el dominio de fosforilación y
25 los fragmentos del mismo. Dichas construcciones se

describen en el Documento WO00/44899. Una construcción es conocida como ECD-PhD, una segunda es conocida como ECD deltaPhD (ver el Documento WO00/44899) también denominado dHER2. El antígeno Her-2/neu como se usa en la
5 presente invención puede ser derivado de rata, ratón o humano.

Ciertos antígenos de tumor son antígenos de péptidos pequeños (es decir de menos de aproximadamente 50 aminoácidos). Los péptidos de ejemplo incluyen péptidos
10 derivados de Mucina, tales como MUC-1 (ver por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,744,144; 5,827,666; El Documento WO88/05054, la Patente Norteamericana No. 4,963,484). Están específicamente contemplados los péptidos derivados de MUC-1 que comprenden por lo menos una
15 unidad de repetición del péptido MUC-1, o por lo menos dos de dichas repeticiones, las cuales son reconocidas por el anticuerpo SM3 (Patente Norteamericana No. 6,054,438). Otros péptidos derivados de mucina incluyen el péptido de MUC-5.

20 Alternativamente, dicho antígeno puede ser una interleucina, tal como IL13 e IL14. Dicho antígeno puede ser una hormona de auto péptido, tal como una hormona de liberación de la hormona de Gonadotropina de longitud total (GnRH, Documento WO95/20600), un péptido corto con una
25 longitud de 10 aminoácidos, útil en el tratamiento de muchos

cánceres o en la inmunocastración. Otros antígenos específicos del tumor incluyen, pero no están restringidos a, gangliósidos específicos del tumor, tales como GM2 y GM3.

El antígeno también puede ser derivado de fuentes que son patogénicas para los humanos, incluyendo virus, bacterias o parásitos, tales como el virus de Inmunodeficiencia Humana VIH-1 (tales como tat, nef, transcriptasa Inversa, gag, gp120 y gp160), el virus del herpes simplex humano, tales como el gD, o derivados del mismo o una proteína Temprana Inmediata, tal como la ICP27 del HSV1 ó HSV2, el citomegalovirus ((especie humana) (tal como el gB o derivados del mismo), Rotavirus (Incluyendo virus atenuado vivo), el virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), Virus de Varicela Zoster (tal como gpl, II e IF63), o del virus de hepatitis, tal como el virus de hepatitis B (por ejemplo el antígeno de Superficie de Hepatitis B ó un derivado del mismo), el virus de hepatitis A, el virus de hepatitis C y el virus de hepatitis E o de otros patógenos virales, tales como el paramixovirus: el virus Sincitial Respiratorio (tal como las proteínas F y G o derivados de las mismas), el virus parainfluenza, el virus de las viruelas, el virus de las paperas, el virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18, ..), el flavivirus (por ejemplo el Virus de la Fiebre Amarilla, el Virus del Dengue, el virus de encefalitis portado por la Garrapata, Virus de

Encefalitis Japonesa) o virus de Influenza (completo vivo o virus inactivado, virus de influenza dividido, que prolifera en los huevos y las células MDCK, o los virosomas completos del flu (tal como lo describen R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 5 páginas 915 a 920) o proteínas recombinantes o purificadas de los mismos, tales como las proteínas HA, NP, NA, o M, o combinaciones de las mismas) o derivados de patógenos bacteriales tales como tal como *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de enlace de transferrina, proteínas de enlace de lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo, las proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácido lipoteicoico), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, 15 incluyendo *M. Catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina de la pertusis o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, ciclasa de adenilato, fimbriae), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, Antígeno 85A, -B ó -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, 20 incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, incluyendo el *E. coli* enterotóxico (por ejemplo, factores de colonización,

- toxinas débiles al calor o derivados de las mismas, toxinas estables al calor o derivados de las mismas), *E. coli* enterohemorrágico, *E. coli* enteropatógeno (por ejemplo, la toxina similar a la toxina shiga o derivados de la mismas);
- 5 *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera y derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, la proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni*
- 10 (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas), y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*; *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa y toxina de vacuolación);
- 15 *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*; incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo, toxina del tétano y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina
- 20 botulino o derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas del clostridio A ó B y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo, toxinas del botulino y derivados de las mismas); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxinas de la difteria
- 25 y derivados de las mismas); *Borrelia spp.*, incluyendo *B.*

burgdorferi (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., incluyendo *E. equi* y el agente de la Erliquiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia* spp., incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de enlace a la heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de enlace a la heparina), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., incluyendo *L. interrogans*; *Treponema* spp., incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo, las proteínas de membrana rara exterior), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o derivados de parásitos, tales como *Plasmodium* spp., incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp., incluyendo *E. histolytica*; *Babesia* spp., incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma* spp., incluyendo *T. cruzi*; *Giardia* spp., incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania* spp., incluyendo *L. major*; *Pneumocystis* spp., incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas* spp., incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma* spp., incluyendo *S. mansoni*, o derivado de la levadura tal como *Candida* spp., incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos específicos para el *M. tuberculosis* son por ejemplo, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV,

MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (Documento WO 99/51748). Las proteínas para el *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas en donde por lo menos dos o tres polipéptidos de *M. tuberculosis* son fusionadas en una proteína más grande. Las fusiones pueden incluir Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTTC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTTC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748).

La mayor parte de los antígenos para la *Chlamydia* incluyen, por ejemplo, una Proteína de Alto Peso Molecular (HWMP) (Documento WO 99/17741), ORF3 (Patente Europea 366 412), y las proteínas de membrana putativa (Pmps). Otros antígenos de la *Chlamydia* de la formulación de vacuna pueden ser seleccionados del grupo descrito en el documento WO 99/28475.

Los antígenos bacterianos pueden ser derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados del mismo, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de enlace de colina), y el antígeno de proteína Pneumolysin (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, página 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, páginas 337 a 342), y los derivados mutantes destoxificados de los mismos (Documentos WO 90/06951; WO 99/03884). Otros antígenos bacterianos pueden ser derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo el *H. Influenzae* del tipo B

(por ejemplo, PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (Patente Norteamericana 5,843,464), y variantes de copias múltiples y proteínas de fusión de los mismos.

Los derivados del antígeno de Superficie de la Hepatitis B son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, aquellos antígenos S PreS1, PreS2, establecidos que se describen en las Solicitudes de Patente Europeas EP-A-414 374; EP-A-0304 578 y EP 198-474. En una modalidad, el antígeno HBV es una polimerasa HBV (Ji Hoon Jeong et al, 1996, BBRC 223, páginas 264-271; Lee H.J. et al, Biotechnol. Lett. 15, páginas 821 a 826). Los antígenos derivados del VIH también están contemplados, tales como el antígeno gp120 del VIH-1, especialmente cuando es expresado en las células CHO.

La composición inmunogénica de la presente invención puede comprender un antígeno derivado del Virus de Papiloma Humano (HPV 6a, 6b, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), en particular, aquellos serotipos HPV considerados como responsables de las verrugas genitales (HPV 6 ó HPV 11 y otros), y el virus HPV responsable del cáncer cervical (HPV16, HPV18 y otros). Los antígenos de HPV adecuados son E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2. Los

ejemplos de las formas profilácticas o terapéuticas de las verrugas genitales, comprenden las fusiones de partículas L1 o capsómeros, y las proteínas de fusión comprenden uno o más antígenos seleccionados del HPV 6 y HPV 11, las proteínas E6, E7, L1 y L2. Los ejemplos de las formas de proteína de fusión son: L2E7 como se describen en el Documento WO 96/26277, y la proteína D(1/3)-E7 descrita en el Documento WO 99/10375. Una infección cervical o cáncer por HPV, en la vacuna de profiláctica o terapéutica, la composición puede comprender los antígenos HPV 16 ó 18. Por ejemplo, los monómeros del antígeno L1 ó L2, o los antígenos L1 ó L2 presentados juntos como un virus similar a partículas (VLP), o la proteína L1 sola presentada sola en una estructura VLP o capsómero. Dichos antígenos, partículas similares a los virus y capsómeros, son conocidos *per se*. Ver por ejemplo, los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 y WO93/02184.

Las proteínas tempranas adicionales pueden ser incluidas solas o como proteínas de fusión, tales como por ejemplo, las proteínas E7, E2 ó E5; las modalidades de estas proteínas incluyen las proteínas de fusión L1E7 que comprenden el VLP (documento WO96/11272). Los antígenos de HPV 16 pueden comprender las proteínas tempranas E6 ó E7 en fusión con un portador de proteína D para formar las fusiones de Proteína D - E6 ó E7 del HPV 16 o combinaciones

de las mismas; o combinaciones de E6 ó E7 con L2 (documento WO96/26277). Alternativamente, las proteínas tempranas de HPV 16 ó 18 E6 y E7, pueden ser presentadas en una sola molécula, por ejemplo, la Proteína de fusión D-
5 E6/E7. Otras fusiones contienen opcionalmente cualquiera o ambas de las proteínas E6 y E7 del HPV 18, por ejemplo, en la forma de una Proteína D – E6, o Proteína de fusión D – E7 o proteína de fusión D E6/E7. Las fusiones pueden comprender antígenos de otras cepas de HPV, por ejemplo,
10 de las cepas HPV 31 ó 33.

Los antígenos derivados de parásitos que ocasionan la Malaria también están contemplados. Por ejemplo, los antígenos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. La RTS es una proteína híbrida que comprende
15 substancialmente toda la porción de la terminal C de la proteína de circunsporozoito (CS) de *P. falciparum* enlazada por cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de superficie de la Hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de hepatitis B. Su estructura completa se describe en el
20 documento WO93/10152. Cuando es expresado en levadura el RTS es producido como una partícula de lipoproteína y cuando es co-expresada con el antígeno S del HBV produce una partícula mezclada conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en el documento WO90/01496. Una
25 modalidad de la presente invención es una fusión en donde la

preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de *plasmodia* que son probablemente candidatos para ser componentes de las proteínas de fusión son *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en el *Plasmodium spp.*

Como se usa en la presente descripción, el término "composición inmunogénica" es usado en el sentido más amplio para que signifique una composición que, al momento de la administración a un paciente, afecte de manera positiva la respuesta inmune de dicho paciente. Una composición Inmunogénica proporciona al paciente una respuesta inmune sistémica o local mejorada, ya sea respuestas inmunes celulares tales como CTL o respuestas inmunes humorales tales como la promoción de anticuerpos. En particular, una composición Inmunogénica de acuerdo con la presente invención se puede referir a una formulación que comprende una cantidad efectiva de una proteína/polipéptido del antígeno, en particular un antígeno asociado con el tumor, o un derivado Inmunogénico derivado del mismo, o particularmente fragmentos del mismo, o los polinucleótidos de codificación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por una cantidad segura y efectiva se entiende una dosis de

proteína, de ser necesario en asociación con un adyuvante, cuando es administrada en un humano, produce una respuesta inmune que se puede detectar, tal como una respuesta humoral (anticuerpos), o una respuesta celular, o

5 tiene la capacidad para inmuno-regular la respuesta inmune, sin los efectos laterales adversos importantes de las vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de cual inmunogén específico es empleado y como es presentado. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda de 1 a

10 5000 μg de proteína, por ejemplo, de 1 a 1000 μg de proteína, por ejemplo, de 1 a 500 μg , por ejemplo de 1 a 100 μg , por ejemplo de 1 a 50 μg . Una cantidad óptima para una vacuna particular puede ser asegurada mediante estudios estándar que comprenden la observación de las respuestas inmunes

15 apropiadas en los sujetos. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo separadas de manera adecuada. La preparación de la vacuna se describe generalmente en Diseño de Vacunas ("La subunidad y el método adyuvante"), ("The subunit and

20 adjuvant approach") (editores Powell M.F. & Newman M.J.). (1995) Plenum Press New York). La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton, en la Patente Norteamericana No. 4,235,877.

Los polipéptidos del antígeno inmunogénico se refieren

a polipéptidos los cuales reaccionan de manera detectable dentro de un inmunoensayo (tal con un ensayo de ELISA o de estímulo de la célula T) con antisuero y/o células T de un paciente que expresa dicho polipéptido. La selección de la actividad Inmunogénica se puede realizar utilizando técnicas bien conocidas para un experto en el arte. Por ejemplo, dichas selecciones se pueden realizar utilizando métodos tales como los que se describen en la publicación de Harlow y Lane, en "Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio" (Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En un ejemplo ilustrativo, el polipéptido puede ser inmovilizado en un soporte sólido y ponerse en contacto con el suero del paciente para permitir el enlace de los anticuerpos con el suero al polipéptido inmovilizado. El suero no enlazado entonces puede ser eliminado y los anticuerpos enlazados detectados utilizando, por ejemplo, la Proteína A marcada ¹²⁵I.

Los antígenos de polipéptido de la presente invención son proporcionados, por ejemplo, por lo menos 80% puros o por ejemplo, 90% puros como son visualizados por el SDS PAGE. Los antígenos polipéptidos pueden aparecer en una sola banda por medio del SDS PAGE.

Los derivados inmunogénicos de los antígenos, tales como los fragmentos inmunogénicos o porciones de los mismos, en particular de antígenos asociados con el tumor o

específicos del tumor, también están comprendidos por la presente invención. El término un "fragmento inmunogénico" como se usa en la presente descripción, es un fragmento que por sí mismo es inmunológicamente reactivo (es decir, que se enlaza específicamente) con las células B y/o los receptores del antígeno de la superficie de la célula T que reconocen el polipéptido. Las porciones inmunogénicas generalmente pueden ser identificadas utilizando técnicas bien conocidas tales como las que se resumen en el libro de Paul, "Inmunología Fundamental" (Fundamental Immunology), 3ª. ed., páginas 243 a 247 (Raven Press, 1993) y las referencias citadas en el mismo. Dichas técnicas incluyen la selección de polipéptidos por su capacidad para reaccionar con anticuerpos específicos del antígeno, antisuero y/o las líneas o clones celulares T. Como se usa en la presente descripción, el antisuero y los anticuerpos son "específicos del antígeno" si se enlazan específicamente a un antígeno (es decir, que reaccionan con la proteína en un inmunoensayo de ELISA u otro, y no reaccionan de manera detectable con proteínas no relacionadas). Dichos antisueños y anticuerpos pueden ser preparados como aquí se describe, y utilizando técnicas bien conocidas.

En una modalidad, una porción inmunogénica de un polipéptido es una porción que reacciona con el antisuero y/o las células T en un nivel que no es substancialmente menor

que la reactividad del polipéptido de longitud total (por ejemplo, en un ensayo de ELISA y/o de reactividad de la célula T). El nivel de la actividad inmunogénica de la porción inmunogénica puede ser de por lo menos aproximadamente el 50% o por lo menos aproximadamente el 70% o mayor de aproximadamente el 90% de la inmunogenicidad del polipéptido de longitud total. En algunos casos, las porciones Inmunogénicas pueden ser identificadas, de modo que tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor que la del polipéptido de longitud total correspondiente, por ejemplo, que tienen una actividad Inmunogénica mayor de aproximadamente 100% ó 150% o más. En ciertas otras modalidades, las porciones Inmunogénicas ilustrativas pueden incluir péptidos en los cuales la secuencia principal de la terminal N y/o el dominio transmembrana han sido eliminados. Otras porciones inmunogénicas ilustrativas contendrán una eliminación pequeña de la terminal C y/o N (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos, por ejemplo de aproximadamente de 5 a 15 aminoácidos), en relación con la proteína madura.

En otra modalidad, las composiciones inmunogénicas ilustrativas, tales como por ejemplo, las composiciones de vacuna de la presente invención, comprenden un polinucleótido que codifica uno o más de los polipéptidos

como aquí se describieron anteriormente, de modo que el polipéptido es generado en el sitio. El polinucleótido puede ser administrado dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de administración conocidos. Indudablemente, numerosas técnicas de administración de genes son bien conocidas en el arte, tales como aquellas descritas por Rolland, en Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15: páginas 143 a 198, 1998, y las referencias citadas en la misma. Por supuesto, los sistemas de expresión apropiados del polinucleótido contendrán las secuencias reguladoras de ADN necesarias para la expresión en un paciente (tales como un promotor adecuado y una señal de terminación). Alternativamente, los sistemas de administración bacteriana pueden comprender la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*), que expresa una porción inmunogénica del polipéptido en su superficie celular o secreta dicho epítopo.

En una modalidad de la presente invención, un polinucleótido es administrado en la forma de un ADN "al natural", por ejemplo, como lo describe la publicación de Ulmer et al., en Science 259: páginas 1745 a 1749, 1993 y revisada por Cohen, en Science 259: páginas 1691 a 1692, 1993. La asimilación del ADN al natural puede ser aumentada recubriendo el ADN sobre cuentas biodegradables, las cuales son transportadas de manera eficiente dentro de las células.

En una modalidad, la composición es administrada de manera intradérmica. En particular, la composición es administrada por medio de técnicas de administración de pistola de genes (particularmente bombardeo de partículas) las cuales
5 comprenden el recubrimiento del vector a una cuenta (por ejemplo, oro) el cual entonces es administrado bajo alta presión en la epidermis; tal como por ejemplo, lo describe Haynes et al., en J. Biotechnology 44: páginas 37 a 42 (1996).

10 En un ejemplo ilustrativo, la aceleración de las partículas conducidas por gas puede ser lograda con aparatos tales como los que fabrican Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, RV) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de las cuales se describen en las Patentes
15 Norteamericanas Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807 y la Patente Europea No. 0500 799. El método ofrece un método de administración libre de agujas en donde una formulación de polvo seco de partículas microscópicas, tales como polinucleótidos, son acelerados a una alta
20 velocidad dentro de un chorro de gas de helio generado por un aparato portátil, impulsando las partículas dentro de un tejido objetivo de interés, generalmente la piel. Las partículas pueden ser cuentas de oro de 0.4 a 4.0 μm , por ejemplo de 0.6 a 2.0 μm de diámetro y el conjugado de ADN recubierto

sobre estas y luego encerrado en un cartucho o cassette colocándolo dentro de la "pistola de genes".

En otra modalidad relacionada, otros aparatos y métodos que pueden ser útiles para la inyección de composiciones sin agujas operada por gas de la presente invención, incluyen la que se proporciona por Bioject, Inc. (Portland, OR), y algunos ejemplos de los cuales se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 y 5,993,412.

Por lo tanto, en algunas modalidades, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos inmunogénicos aquí descritos son introducidos en células huésped de mamífero adecuadas para la expresión utilizando cualquiera de un número de sistemas basados en virus conocidos. En una modalidad ilustrativa, el retrovirus proporciona una plataforma conveniente y efectiva para el sistema de administración genética. Una secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser insertada en un vector y empacada en partículas retrovirales que utilizan técnicas conocidas en el arte. El virus recombinante entonces puede ser aislado y administrado a un sujeto. Se han descrito un número de sistemas retrovirales ilustrativos (por ejemplo, en la Patente Norteamericana No. 5,219,740; en Miller y Rosman (1989) BioTechniques 7: páginas 980 a 990; Miller, A.D. (1990)

Human Gene Therapy 1: páginas 5 a 14; Scarpa et al. (1991) Virology 180: páginas 849 a 852; Burns et al, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90: páginas 8033 a 8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: páginas 102 a 5 109.

Además, también se han descrito un número de sistemas ilustrativos basados en el adenovirus. A diferencia del retrovirus el cual se integra en un genoma huésped, el adenovirus persiste fuera del cromosoma, por lo tanto, 10 minimiza los riesgos asociados con la mutagénesis de inserción (Haj-Ahmad y Graham (1986) J. Virol. 57: páginas 267 a 274; Bett et al. (1993) J. Virol. 67: páginas 5911 a 5921; Mittereder et al. (1994) Human Gene Therapy 5: páginas 717 a 729; Seth et al. (1994) J. Virol. 68: páginas 15 933 a 940; Barr et al. (1994) Gene Therapy 1: páginas 51 a 58; Berkner, K. L. (1988) Bio Techniques 6: páginas 616 a 629; y Rich et al. (1993) Human Gene Therapy 4: páginas 461 a 476). Debido a que los humanos algunas veces son infectados por serotipos comunes del adenovirus humano, 20 tales como el AdHu5, una porción importante de la población tiene una respuesta de neutralización del anticuerpo al adenovirus, el cual es probable que efectúe la respuesta inmune a un antígeno heterólogo en un sistema basado en una vacuna recombinante. Los vectores de adenovirus de 25 primates no humanos, tales como el adenovirus 68 del

chimpancé (AdC68, Fitzgerald et al. (2003) J. Immunol 170(3): páginas 1416 a 1422)) y puede ofrecer un sistema adenoviral alternativo sin la desventaja de la respuesta de la neutralización de anticuerpos previamente existentes.

5 Varios sistemas de vector de virus asociados con el adeno (AAV) también han sido desarrollados para la administración de polinucleótidos. Los vectores AAV pueden ser contruidos fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Ver por ejemplo, las Patentes Norteamericanas
10 Nos. 5,173,414 y 5,139,941; las Publicaciones Internacionales Nos. WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski et al. (1988) Molec. Cell. Biol. 8: páginas 3988 a 3996; Vincent et al, (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) Current Opinion In Biotechnology 3:
15 páginas 533 a 539; Muzyczka. N. (1992) Current Topics In Microbiol. and Immunol. 158: páginas 97 a 129; Kotin. R. M. (1994) Human Gene Therapy 5: páginas 793 a 801; Shelling y Smith (1994) Gene Therapy 1: páginas 165 a 169; y Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179: páginas 1867 a 1875.

20 Los vectores virales adicionales útiles para la administración de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de la presente invención mediante la transferencia genética incluyen aquellos derivados de una familia de virus de la viruela, tal como un virus de vacunas y
25 un virus de viruela aviaria. A modo de ejemplo, los virus de

vacunas recombinantes que expresan moléculas novedosas pueden ser construidos de la manera siguiente. El ADN que codifica un polipéptido es el primero insertado en un vector apropiado, de modo que está adyacente al promotor de la
5 vacuna y las secuencias de flaqueo de ADN de la vacuna, de modo que la secuencia que codifica la cinasa de timidina (TK). Este vector entonces es utilizado para transfectar las células, las cuales son infectadas simultáneamente con las vacunas. La recombinación homóloga sirve para insertar el
10 promotor de vacuna más el gen que codifica un polipéptido de interés en el genoma viral. El recombinante TK.sup.(-) resultante puede ser seleccionado cultivando las células en la presencia de 5-bromodesoxiuridina y recolectando las placas virales resistentes a la misma.

15 Los sistemas de infección/transfección basados en vacunas pueden ser utilizados convenientemente para proporcionar la expresión transitoria, o la co-expresión que se puede inducir de uno o más polipéptidos aquí descritos en las células huésped de un organismo. En este sistema particular,
20 las células son infectadas primero *in vitro* con el recombinante del virus de vacuna que codifica la polimerasa de ARN T7 del bacteriófago. Esta polimerasa muestra una especificidad exquisita debido a que solamente transcribe plantillas que portan los promotores T7. Después de la
25 infección, las células son transferidas con el polinucleótido o

polinucleótidos de interés, e impulsadas por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del recombinante del virus de vacuna transcribe el ADN transfectado en ARN el cual entonces es traducido en polipéptido por la maquinaria de traducción del huésped. El método proporciona la producción de alto nivel, transitoria, citoplásmica de grandes cantidades de ARN en sus productos de traducción. Ver por ejemplo, las publicaciones de Elroy-Stein y Moss, en Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1990) 87: páginas 6743 a 6747; Fuerst et al. en Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1986) 83: páginas 8122 a 8126.

Alternativamente, el virus de pox avlaria, tal como los virus de viruela avlaria en aves o canarios, también pueden ser utilizados para administrar las secuencias de codificación de interés. El virus de viruela avlaria recombinante que expresa los inmunogenes de patógenos mamíferos es conocido que confieren inmunidad protectora cuando son administrados a especies que no son aviarias. El uso del vector Avipox es particularmente deseable en humanos y otras especies de mamíferos, ya que los miembros de los genes Avipox solamente pueden duplicarse de manera productiva en especies aviarias susceptibles y por lo tanto, no son infecciosas en las células de mamíferos. Los métodos para producir los virus de viruela avlaria recombinantes son bien conocidos en la técnica y emplean la recombinación

genética, tal y como se describió anteriormente con respecto a la producción de los virus de vacuna. Ver por ejemplo, los Documentos WO 91/12882; WO 89/03429; y WO 92/03545.

Cualquiera de un número de vectores del alfavirus también pueden ser utilizados para la administración de composiciones de polinucleótidos de la presente invención, tales como los vectores que se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 y 6,015,694. También pueden ser utilizados ciertos vectores basados en la Encefalitis Equina Venezolana (VEE), los ejemplos ilustrativos de los cuales se pueden encontrar en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,505,947 y 5,643,576.

Los vectores que comprometen las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos antigénicos son administrados en una cantidad tal que podrá ser efectiva profiláctica y terapéuticamente. La cantidad que va a ser administrada, generalmente se encuentra en un rango de un pico-gramo a 16 miligramos, por ejemplo, de 1 pico-gramo a 10 microgramos para la administración portada por partículas, por ejemplo, de 10 microgramos a 16 miligramos para otras rutas de nucleótidos por dosis. La cantidad exacta puede variar considerablemente dependiendo del peso del paciente que está siendo inmunizado y la ruta de administración.

Las técnicas adecuadas para la introducción de polinucleótidos o vectores al natural en un paciente también

incluyen la aplicación tópica con un vehículo apropiado. El ácido nucleico puede ser administrado tópicamente a la piel, o a superficies de la mucosa, por ejemplo, mediante la administración intranasal, oral, intravaginal o intra-rectal. El

5 polinucleótido natural o vector puede estar presente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina regulada por fosfato (PBS). La asimilación del ADN puede ser facilitada además mediante el uso de agentes de facilitación, tales como bupivacaina, ya sea por separado

10 o incluida en la formulación del ADN. Otros métodos de administración del ácido nucleico directamente a un recipiente incluyen las técnicas de ultrasonido, estímulo eléctrico, electroporación y micro-sembrado, los cuales se describen en la Patente Norteamericana No. 5,697,901.

15 La asimilación de las construcciones de ácido nucleico pueden ser mejoradas mediante técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato de calcio y

20 DEAE-Dextrano y lipofectores, por ejemplo, lipofectamo y transfectamo. La dosificación de ácido nucleico que va a ser administrada puede ser alterada.

Todavía en otra modalidad, las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenden un

25 anticuerpo, o un suero, o un dominio de un anticuerpo, tal

como Fab y el fragmento F(ab')₂. Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. La dosificación efectiva es generalmente de 100 µg a 500 mg, por ejemplo, de 1 mg a 50 mg por kilo del peso corporal del paciente. Por consiguiente, los métodos de la presente invención incluyen la inmunoterapia pasiva o la inmunoprofilaxis pasiva.

Las composiciones inmunogénicas y el polipéptido IL-18 de la presente invención pueden ser administrados por un número de rutas, tales como intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

El polipéptido IL-18 o el fragmento bioactivo del mismo de acuerdo con la presente invención es uno que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los niveles altos de citosinas del tipo Th1 (por ejemplo, IFN-γ, TNFα, IL-2, IL-12, IL-18, etc) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes portadas por la célula a un antígeno administrado. En contraste, los niveles altos de citosinas del tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Para una revisión de las familias de citosinas, consultar la publicación de Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: páginas 145 a 173, 1989. Los términos "polipéptido IL-18" o "IL18" significan un polipéptido IL-18 tal

y como se describe en la Patentes Europeas EP 0692536, EP 0712931, EP 0767178 y el Documento WO97/2441. Los derivados o variantes de los polipéptidos IL-18 incluyen polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos, la cual tiene por lo menos el 70% de identidad. Por ejemplo, por lo menos el 80% de identidad, por ejemplo, por lo menos el 90% de identidad, por ejemplo, por lo menos el 95% de identidad, por ejemplo, por lo menos del 97% al 99% de identidad con la SEQ ID NO:6 (IL-18 humano) o la SEQ ID NO:7 (IL-18 murina) como se ilustra en la figura 1, sobre la longitud total de las SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, respectivamente. Dichos polipéptidos incluyen los que comprenden el aminoácido de las secuencias SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, respectivamente. El polipéptido IL-18 puede tener la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7. Pueden ser usados los fragmentos IL-18 también están contemplados, es decir un fragmento de IL-18 el cual tiene la capacidad de exhibir una actividad biológica (antigénica o inmunogénica) del IL-18, tal como la inducción de IFN- γ . Los fragmentos bioactivos del IL-18 y/o los fragmentos inmunogénicos de IL-18.

El polipéptido IL-18 puede estar en la forma de una proteína madura o puede ser una parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión. También están contemplados los variantes de IL-18, es decir polipéptidos

que varían mediante sustituciones conservadoras de aminoácidos, por medio de las cuales un residuo es substituido por otro con características similares. Dichas sustituciones típicas se encuentran entre Ala, Val, Leu y Ile; entre Ser y Tr; entre residuos ácidos de Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre residuos básicos Lis y Arg; o residuos aromáticos Fe y Tir. Las variantes pueden ser utilizadas en las cuales varios de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, de 1 a 2 ó 1 aminoácido son substituidos, eliminados o agregados en cualquier combinación. Los fragmentos bioactivos de IL-18 también están contemplados. El término "fragmento bioactivo" significa un fragmento de IL-18 el cual tiene retenida substancialmente la misma bioactividad que el IL-18 de longitud completa. La palabra bioactividad significa cualquiera de las siguientes propiedades: aumento de la actividad de la célula exterminadora natural (NK) y respuestas de la célula Th1 (activación de células NK, NKT, inducción de la proliferación de células T activada), actividad antiangiogénica, aumento de la expresión del ligando Fas en las células NK, NKT y T activadas, la producción aumentada de IFNg, GM-CSF y otras citosinas, por ejemplo del tipo Th1, la capacidad para estimular la inmunidad Innata y las respuestas portadas por ambas Th1 y Th2.

En particular, un fragmento bioactivo de IL-18 es un fragmento el cual ha retenido la capacidad para aumentar la

producción de IFN γ medida, *in vitro*, en el sistema de ensayo KG-1. Las líneas de células mielomonocíticas humanas (KG-1), que expresa el receptor IL-18 humano, responderá al tratamiento con IL-18 aumentando la producción (secreción) de IFN γ (medido mediante el ensayo de ELISA) y la activación de NF κ B (Matsuko Taniguchi et al. J. Immunological Methods, 1998, 217, páginas 97 a 102).

Los polipéptidos IL-18 de acuerdo con la presente invención pueden ser preparados de cualquier manera adecuada. El aislamiento incluye polipéptidos que ocurren de manera natural, de manera recombinante o sintéticamente, produciendo dichos polipéptidos, etc. Dichos medios de preparación son bien entendidos en la técnica.

La composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención puede incluir de manera provechosa un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una molécula portadora puede comprender varias formas, incluyendo un organismo portador tal como un vector bacteriano vivo o una cepa del portador bacteriano, agua, solución salina o un químico inmunoestimulante. Un portador puede ser agua, solución salina u otras soluciones fisiológicas reguladas. Una molécula portadora también puede incluir una partícula de polímero poroso, tal como microcuentas o una nanopartícula, y una partícula de sal metálica, tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio,

fosfato de calcio o fosfato de magnesio, fosfato de hierro, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, sulfato de calcio, hidróxido de magnesio, o sales dobles como fosfato de hierro-amonio, fosfato de potasio-hierro, fosfato de calcio-hierro, carbonato de calcio-magnesio, o una mezcla de estas sales.

Al momento de la administración de una preparación combinada como aquí se proporciona, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye las respuestas del tipo Th1 y Th2.

Dentro de las modalidades de la presente invención, la composición inmunogénica puede comprender adicionalmente otro adyuvante, por ejemplo, uno que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los adyuvantes de inducción de TH-1 pueden ser seleccionados del tipo de adyuvante que comprenden, adyuvantes derivados del lipopolisacárido tales como lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS), 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, y un oligonucleótido CpG una mezcla de dos o más de dichos adyuvantes. Ciertos adyuvantes para promover la respuesta predominantemente del tipo Th-1 pueden incluir, por ejemplo, una combinación de lípido A monofosforilo, por ejemplo, lípido A 3-de-O-acilado fosforilo, junto con una sal de aluminio. Los adyuvantes MPL® están disponibles en Corixa Corporation (Seattle, WA; ver por ejemplo, las

Patentes Norteamericanas Nos. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094).

En una modalidad, la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención puede comprender
5 adicionalmente un adyuvante de saponina, por ejemplo, una fracción no tóxica de Quil A, por ejemplo, QS-17 ó QS-21, por ejemplo QS-21.

Las saponinas son enseñadas en la publicación de: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. Una revisión de
10 actividades biológicas y farmacológicas de las saponinas. Phytomedicine vol 2 páginas 363 a 386). Las saponinas son glucósidos de esteroide o triterpeno ampliamente distribuidos en los reinos vegetal y de animales marinos. Las saponinas son observadas para la formación de soluciones coloidales en
15 agua, las cuales hacen espuma al momento de agitarlas, y para precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares ellas crean estructuras similares a poros en las membranas, las cuales ocasionan que la membrana reviente. La hemólisis de los eritrocitos es
20 un ejemplo de este fenómeno, el cual es una propiedad de ciertas, pero no todas las saponinas.

Es sabido que son conocidas las saponinas como adyuvantes en vacunas para la administración sistémica. El adyuvante y la actividad hemolítica de las saponinas
25 individuales han sido estudiados extensamente en la técnica

(Lacaille-Dubois y Wagner, mencionadas anteriormente). Por ejemplo, el Quil A (derivado de la mordida de la *Quillaja Saponaria Molina* del árbol Sud Americano), y fracciones de la misma se describen en la Patente Norteamericana No. 5,057,540 y en el libro "Saponinas como adyuvantes de vacunas" ("Saponins as vaccine adjuvants") de Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., 1996, 12 (1-2): páginas 1 a 55; y la Patente Europea EP 0 362 279 B1. Las estructuras de particulado, los complejos denominados de estímulo inmune (ISCOMS), que comprende Quil A o fracciones del mismo, han sido utilizados en la fabricación de vacunas (Morein, B., Patente Europea 0 109 942 B1). Estas estructuras se ha reportado que tienen una actividad adyuvante (Patente Europea 0 109 942 B1; Documento WO 96/11711). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) han sido descritas como adyuvantes sistémicos potentes y los métodos para su producción se describen en la Patente Norteamericana No. 5,057,540 y la Patente Europea EP 0 362 279 B1. También se describe en estas referencias el uso de la QS7 (una fracción de Quil-A) la cual actúa como un adyuvante potente para vacunas sistémicas. El uso del QS21 se describe además en la publicación de Kensil et al. (1991, en J. Immunology vol 146, páginas 431 a 437). Las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina también son conocidas (Documento WO

99/10008). Los sistemas adyuvantes de particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los Documentos WO 96/33739 y WO 96/11711.

Otras saponinas que han sido utilizadas en los estudios
5 de vacunas sistémicas incluyen aquellas derivadas de otras especies de planta tales como *Gypsophila* y *Saponaria* (Bomford et al., Vaccine, 10(9): páginas 572 a 577, 1992).

También es sabido que las saponinas han sido utilizadas en estudios de vacunas aplicadas en la mucosa, las cuales
10 han encontrado un éxito variable en la inducción de respuestas inmunes. La saponina Quil-A ha mostrado anteriormente que no tiene efecto en la inducción de una respuesta inmune cuando el antígeno es administrado intranasalmente (Gizurarson et al. 1994. Vaccine Research 3,
15 páginas 23 a 29). Mientras que otros autores han usado este adyuvante con éxito (Maharaj et al., Can.J.Microbiol, 1986, 32(5): páginas 414 a 420; Chavali y Campbell, Immunobiology, 174(3): páginas 347 a 359). Las ISCOMs comprenden saponina Quil A, y han sido utilizadas en las
20 formulaciones intragástricas e intranasales de vacunas y exhibieron una actividad adyuvante (McI Mowat et al., 1991, Immunology, 72, páginas 317 a 322; McI Mowat y Donachie, Immunology Today, 12, páginas 383 a 385). El QS21, la fracción no tóxica de la Quil A, también ha sido descrita en un
25 adyuvante oral o intranasal (Sumino et al., J.Virol., 1998,

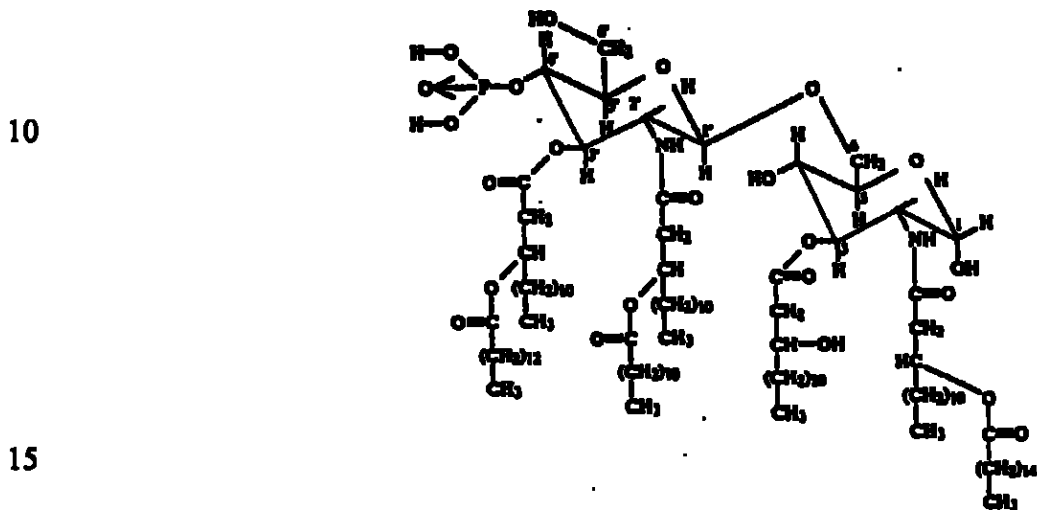
72(6): páginas 4931 a 4939; y el Documento WO98/56415).

Una formulación mejorada puede comprender la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG con un derivado de saponina, por ejemplo, la combinación de CpG y
5 QS21 como se describe en el Documento WO00/09159 y en el Documento WO00/62800. Dicha formulación puede comprender adicionalmente una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Por consiguiente, todavía una modalidad adicional de la composición inmunogénica de la presente invención
10 comprende una combinación de un oligonucleótido CpG y una saponina, por ejemplo, QS21, formulada opcionalmente en una emulsión de aceite en agua. La formulación puede comprender de manera opcional adicionalmente un adyuvante 3D-MPL®. La QS-21 puede ser proporcionada en su
15 composición menos reactogénica en donde es extinguida con colesterol, tal y como se describe en el Documento WO 96/33739.

En otra modalidad, la composición inmunogénica de la presente invención comprende adicionalmente un
20 lipopolisacárido enterobacteriano derivado como adyuvante, por ejemplo, el lípido A monofosforilo, por ejemplo, 3-de-O-lípido monofosforilo-acilado A.

Se ha sabido desde mucho tiempo atrás que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un estimulante
25 potente del sistema inmune, aunque su uso en los adyuvantes

ha sido detenido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico del LPS, el lípido A monofosforilo (MPL), producido mediante la remoción del grupo de carbohidratos del núcleo y el fosfato de glucosamina del extremo de reducción, ha sido
 5 descrito por Ribi et al en (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp., Ny, páginas 407 a 419), y tiene la siguiente estructura:



Una versión destoxificada adicional del MPL es el resultado de la remoción de la cadena acilo de la posición 3 de la estructura del disacárido y es denominado lípido A 3-O-monofosforilo-Desacilado (3D-MPL). Este puede ser purificado y preparado mediante los métodos enseñados en la Patente Británica GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación del lípido A difosforilo y variantes 3-O-desaciladas de los mismos. Una forma del 3D-MPL es en la
 25 forma de una emulsión que tiene un tamaño pequeño de

partícula menor de 0.2µm de diámetro y su método de
manufactura se describe en el Documento WO94/21292. Han
sido descritas formulaciones acuosas que comprenden el
lípidido A monofosforilo y un tensioactivo en el Documento
5 WO98/43670A2.

Los adyuvantes derivados del lipopolisacárido bacteriano
que van a ser formulados en la combinación adyuvante de la
presente invención pueden ser purificados y procesados de
fuentes bacterianas, o alternativamente, pueden ser
10 sintéticos. Por ejemplo, un lípidido A monofosforilo purificado
se describe en la publicación de Ribí et al 1986 (mencionado
anteriormente) y el lípidido A monofosforilo o difosforilo 3-O-
Desacilado derivado de *Salmonella sp.* se describe en la
Patente Británica GB2220211 y en la Patente Norteamericana
15 No. 4,912,094. Otros lipopolisacáridos sintéticos y purificados
han sido descritos en el Documento (WO98/01139; la Patente
Norteamericana 6,005,099 y la Patente Europea EP0729 473
B1; Hilgers et al., 1986, Int.Arch.Allergy.Immunol., 79(4):
páginas 392 a 396; Hilgers et al., 1987, Immunology, 60(1):
20 páginas 141 a 146 y la Patente Europea EP0549074B1). Los
adyuvantes de lipopolisacáridos bacterianos que pueden ser
utilizados son 3D-MPL y los disacáridos de glucosamina β(1-
6) descritos en la Patente Norteamericana No.6,005,099 y la
Patente Europea No. EP0729 473B1.

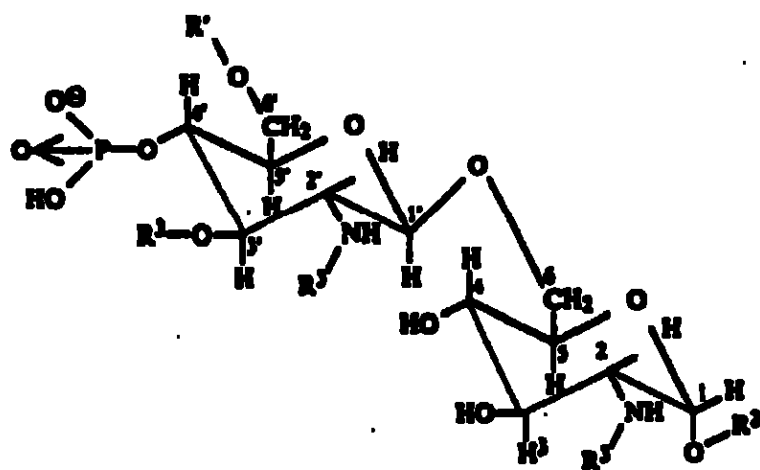
ADB

Por consiguiente, los derivados LPS que pueden ser utilizados en la presente invención son aquellos inmuoestimulantes que son similares en la estructura a la del LPS ó MPL ó 3D-MPL. En otro aspecto de la presente 5 invención, los derivados LPS pueden ser un monosacárido acilado, el cual es una subporción de la estructura anterior del MPL.

Un adyuvante disacárido es un lípido A purificado ó sintético de la siguiente fórmula.

10

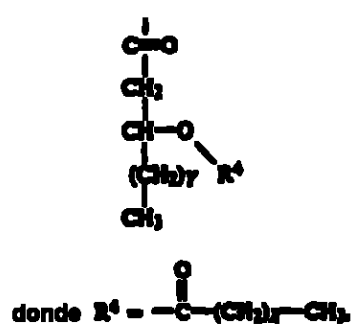
15



20

En donde R2 puede ser H ó PO3H2; R3 puede ser una cadena acilada o β-hidroxiimiristoilo o un residuo 3-aciloiacilo que tienen la fórmula:

25



y en donde X e Y tienen un valor de 0 hasta aproximadamente 20.

Las combinaciones de los adyuvantes 3D-MPL y saponina derivados de la mordida de la *Quillaja Saponaria*
5 *mollna* han sido descritos en la Patente Europea EP0761231B. El Documento WO95/17210 describe un sistema adyuvante de emulsión basado en escualeno, α -tocoferol y monooleato de desorbitan polioxietileno (TWEEN80), formulado con el inmunoestimulante QS21, opcionalmente con
10 3D-MPL.

Por consiguiente, en otra modalidad, la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención comprende (1) un antígeno o fragmento inmunogénico del mismo, (2) una combinación de adyuvante CpG con uno o más
15 de los siguientes adyuvantes seleccionados de la lista que comprende, por ejemplo: un adyuvante de saponina, por ejemplo, QS21, en su forma extinguida con colesterol, 3D-MPL y una emulsión de aceite en agua.

En una modalidad adicional, la composición
20 inmunogénica de acuerdo con la presente invención incluye la combinación de un lípido A monofosforilo para el adyuvante CpG y puede incluir ambas, una combinación de un lípido A monofosforilo y de los adyuvantes de saponina, tales como la combinación del adyuvante 3D-MPL® con QS21 como se

MAD

describe en el Documento WO94/00153 o una composición menos reactogénica en donde el QS21 es extinguido con colesterol, como se describe en el Documento WO96/33739. Otras formulaciones pueden comprender una emulsión de
5 aceite en agua y tocoferol además de QS21. Otra formulación la cual puede ser agregada al adyuvante CpG es una formulación que emplea una combinación de QS21, adyuvante 3D-MPL® y tocoferol en una emulsión de aceite en agua como se describe en el Documento WO95/17210. Por consiguiente,
10 la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención comprende un antígeno, por ejemplo, un antígeno asociado con el tumor, un adyuvante CpG, un adyuvante de saponina, por ejemplo QS-21, opcionalmente junto con el adyuvante 3D-MPL®, que comprende opcionalmente una
15 emulsión de aceite en agua y tocoferol, además del QS-21. Por ejemplo, el QS-21 es extinguido con colesterol.

Alternativamente, el adyuvante de saponina cuando está presente dentro de la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención, puede ser combinado con
20 vehículos para vacuna compuestos de quitosan y otros polímeros policationicos, poliláctidos y partículas de poliláctido co-glicólido, una matriz de polímero basada en poli-N-acetil glucosamina, partículas compuestas de polisacáridos o polisacáridos químicamente modificados,

AAA

liposomas y partículas basadas en lípidos, partículas compuestas de monoésteres glicerilo, etc. Las saponinas también pueden ser formuladas en la presencia de colesterol para formar estructuras de particulado, tales como liposomas o ISCOMs. Además, las saponinas pueden ser formuladas 5 junto con un éter o éster polioxietileno, en cualquiera de una solución o suspensión no particulada, o en una estructura particulada, tal como un liposoma paucilamelar o ISCOM. Las saponinas también pueden ser formuladas con excipientes 10 tales como Carbopol^R para aumentar la viscosidad o pueden ser formuladas en una forma de polvo seco con un excipiente en polvo, tal como lactosa.

Las vacunas y las composiciones inmunogénicas pueden ser presentadas en contenedores de dosis unitarias o dosis 15 múltiples, tales como ampollitas o frascos sellados. Dichos recipientes pueden ser sellados herméticamente para conservar la esterilidad de la formulación hasta el uso. En general, las formulaciones pueden ser almacenadas en la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos 20 aceitosos o acuosos. Alternativamente, una vacuna o composición inmunogénica puede ser almacenada en una condición congelada seca, que requiere solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de utilizarla.

25 Cualquiera de una variedad de vehículos de

administración pueden ser empleados dentro de las composiciones inmunogénicas y las vacunas para facilitar la producción de la respuesta inmune específica del antígeno, que tiene como objetivo las células del tumor. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la composición inmunogénica aquí descrita es administrada a un huésped por medio de células que presentan el antígeno (APCs), tales como células dendríticas, macrófagos, células B, monocitos y otras células que pueden ser diseñadas para que sean células APCs eficientes. Las células APCs pueden, pero no necesariamente, deben ser genéticamente modificadas para aumentar la capacidad para presentar el antígeno, para mejorar la activación y/o mantenimiento de la respuesta de la célula T para que tengan efectos antitumor de por sí y/o ser compatibles inmunológicamente con el receptor (por ejemplo, haplotipo HLA acoplado). Las APCs generalmente pueden ser aisladas de cualquiera de una variedad de fluidos biológicos y órganos, incluyendo tejidos del tumor y peritumorales y pueden ser autólogas alogeneicas, singeneicas y xenogeneicas.

Ciertas modalidades de la presente invención, pueden utilizar células dendríticas o progenitoras de las mismas como las células que presentan el antígeno. Las células dendríticas son APCs altamente potentes (Banchereau J. & Steinman R.M., Nature, 1998, 392: páginas 245 a 251) y han mostrado

ser efectivas como un adyuvante fisiológico para promover la inmunidad profiláctica y terapéutica antitumor (ver por ejemplo, la publicación de Timmerman J.M. y Levy R., en Ann. en Rev. Med, 1999, 50: páginas 507 a 529). En general, las

5 células dendríticas pueden ser identificadas basadas en su forma típica (de estrella en el sitio, con procesos citoplásmicos marcados (dendritos) visibles *in vitro*) y su capacidad para asimilar, procesar y presentar antígenos con alta eficiencia y su capacidad para activar la respuesta de la

10 célula T natural. Las células dendríticas, por supuesto, pueden ser diseñadas para expresar receptores de superficies celulares específicos o ligandos que no son encontrados comúnmente en las células dendríticas *in vivo* o *ex vivo*, y dichas células dendríticas modificadas están contempladas

15 por la presente invención. Como una alternativa para las células dendríticas, las células dendríticas cargadas con antígeno de vesículas secretadas (denominadas exosomas) pueden ser utilizadas dentro de una vacuna (ver la publicación de Zitvogel L. et al., en Nature Med., 1998, 4:

20 páginas 594 a 600). Por consiguiente, se proporciona una formulación inmunoestimulante, por ejemplo, una vacuna que comprende una cantidad efectiva de células dendríticas o células que presentan el antígeno, modificadas mediante la carga *in vitro* con un polipéptido tal y como aquí se describe,

25 o genéticamente modificadas *in vitro* para expresar un

AA

polipéptido como aquí se describe y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las células dendríticas y los progenitores pueden ser obtenidos de la sangre periférica, la médula ósea, células que
5 infiltran el tumor, células que infiltran los tejidos peritumorales, nodos linfáticos, del bazo, la piel, sangre del cordón umbilical y cualquier otro tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas pueden ser diferenciadas y agregando *ex vivo* una combinación de citocinas, tales como
10 las citocinas GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o TNF α a cultivos de monocitos cultivados de la sangre periférica. Alternativamente, las células CD34 positivas y cultivadas de la sangre periférica, la sangre del cordón umbilical o la médula ósea pueden ser diferenciadas en células dendríticas
15 agregando al medio de cultivo combinaciones de ligando GM-CSF, IL-3, TNF α , CD40 lipopolisacárido LPS, ligando flt3 y y/u otros compuestos que inducen la diferenciación, maduración y proliferación de las células dendríticas. Las células dendríticas son categorizadas convenientemente como
20 células "inmaduras" y "maduras", que permiten un medio simple para discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe de ser interpretada como que excluye todas las etapas intermedias posibles de la diferenciación. Las células

dendríticas inmaduras se caracterizan como APCs con una capacidad alta de asimilación del antígeno y procesamiento, lo cual se correlaciona con la alta expresión del receptor Fcγ y el receptor de manosa. El fenotipo maduro generalmente es
5 caracterizado por una expresión más baja de estos marcadores, pero una expresión alta de moléculas de la superficie celular responsables de la activación de la célula T, tal como las moléculas MHC clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas
10 coestimulantes (por ejemplo, CD40, CD80, CD86, y 4-1BB).

Las APCs pueden generalmente ser transfectadas con un polinucleótido que codifica la proteína del tumor (por ejemplo, MAGE-3, Her2/neu o derivados del mismo) de modo que el polipéptido del tumor o una porción inmunogénica del
15 mismo sea expresado en la superficie de la célula. Dicha transfección puede tener lugar *ex vivo* y una composición o vacuna que comprende dichas células transfectadas, entonces puede ser utilizada para propósitos terapéuticos como aquí se describen. Alternativamente, un vehículo de administración
20 del gen que tiene como objetivo un antígeno dendrítico o de otra categoría que presenta células puede ser administrado a un paciente, dando como resultado la transfección que ocurre *in vivo*. La transfección *in vivo* y *ex vivo* de las células dendríticas, por ejemplo, puede ser realizada generalmente
25 utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica,

tales como los que se describen en el Documento WO 97/24447, o el método de pistola de genes descrito por Mahvi D.M. et al., en Immunology y Cell Biology, 1997, 75: páginas 456 a 460. La carga del antígeno de las células dendríticas puede ser lograda incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido del tumor, ADN (al natural o dentro de un vector plásmido) o ARN; o con una bacteria o virus recombinante que expresan el antígeno (por ejemplo, vaccinia, virus de viruela aviar, adenovirus o lentivirus).

- 10 Otros sistemas de administración adecuados incluyen microesferas en donde el material antigénico es incorporado en o conjugado a polímeros/microesferas biodegradables, de modo que el material antigénico puede ser mezclado con un vehículo farmacéutico adecuado y utilizado como una vacuna.
- 15 El termino "microesferas" generalmente se emplea para describir partículas coloidales las cuales son substancialmente esféricas y tienen un diámetro en un rango de 10 nm a 2mm. Las microesferas hechas de un amplio rango de polímeros naturales y sintéticos han encontrado uso en
- 20 una variedad de aplicaciones biomédicas. El sistema de administración es especialmente provechoso para proteínas que tienen vidas promedio cortas *in vivo* que requieren tratamientos múltiples para proporcionar eficacia o que siendo inestables en los fluidos biológicos o no
- 25 completamente absorbidos del aparato gastrointestinal,

AA7

debido a sus pesos moleculares relativamente altos. Varios polímeros se han descrito como una matriz para la liberación de proteínas. Dichos polímeros adecuados incluyen gelatina, colágeno, alginatos, dextrano. Los sistemas de administración
5 pueden incluir ácido poli(DL-ácido láctico) (PLA), poli(láctido-co-glicólido) (PLG), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y copolímeros de ácido poli(DL-ácido lactoglicólico) (PLGA). Otros sistemas pueden incluir hidrogels heterogéneos, tales como copolímeros de bloques
10 múltiples de poli(éter éster), que contienen bloques repetitivos basados en poli-(etilenglicol) hidrofílico (PEG) y poli (butilén tereftalato) hidrofóbico (PBT) o poli(etilenglicol)-tereftalato/poli(butilén tereftalato) (PEGT/PBT) (Sohler et al. Eur. J. Pharm y Biopharm, 2003, 55, páginas 221 a 228). Los
15 sistemas pueden proporcionar una liberación sostenida de 1 a 3 meses, tales como los sistemas PLGA, PLA Y PEGT/PBT.

El régimen de tratamiento será variado de manera importante dependiendo del tamaño y las especies de pacientes involucrados, la cantidad de vacuna de ácido
20 nucleico y/o la composición de la proteína administrada, la ruta de administración, la potencia y dosis de los compuestos adyuvantes utilizados y otros factores los cuales podrían ser apreciados por los expertos en la técnica médica.

La presente invención se describirá adicionalmente
25 haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos:

AMB

EJEMPLO 1**Preparación de la vacuna utilizando composiciones
Inmunogénicas basadas en CpG****1.1. – Preparación Inmunogénica que contiene QS21 y CpG
5 en una formulación de liposoma (adyuvante AS15):**

Este sistema adyuvante AS15 ha sido descrito anteriormente en el Documento WO 00/62800. El AS15 es una combinación novedosa de dos sistemas adyuvantes, AS01B y AS07A. El AS01B está compuesto de liposomas que contienen
10 3D-MPL y QS21 y el AS07A está compuesto de CpG 7909 (también conocido como CpG 2006) en una solución salina regulada por fosfato.

3D-MPL: es un derivado inmunoestimulante del lipopolisacárido (LPS) de la bacteria *Salmonella minnesota*
15 gram positiva. El MPL ha sido desaclado y carece del grupo fosfato en una porción del lípido A. El tratamiento químico reduce de manera dramática la toxicidad mientras que conserva las propiedades inmunoestimulantes (Ribi, 1986). Ribi Immunochemistry produce y suministra el MPL a GSK-
20 Biologicals.

QS21: es una molécula natural de saponina extraída de la mordida de la *Quillaia saponaria Molina* del árbol de Sud América. Una técnica de purificación desarrollada para separar la saponinas individuales de los extractos crudos de
25 la mordida, permitieron el aislamiento de la saponina

particular, QS21, la cual es un glucósido triterpeno que demuestra una actividad adyuvante más fuerte y una toxicidad más baja, comparada con el componente de origen. El QS21 ha mostrado activar el MHC clase I restringiendo los CTLs a
5 varias unidades Ags, así como para estimular la proliferación linfocítica específica de Ag (Kensil, 1992). Aquila (formally Cambridge Biotech Corporation) produce y suministra la QS21 a GSK-Biologics.

CpG: El CpG ODN 7909 es un oligodesoxi-nucleótido
10 fosforotioato de cadenas sencillas sintético (ODN) de 24 bases de longitud. Su secuencia básica la cual es 5'-TCGTCGTTTTG-TCGTTTTGTCGTT-3', ha sido optimizada para el estímulo del sistema inmune humano. El ADN del CpG o el ODN sintético que contienen patrones CpG es sabido que
15 activa las células dendríticas, monocitos y macrófagos para que secreten citocinas similares a la TH1 e induzcan la respuesta de la célula T TH1 incluyendo la generación de las células citolíticas, estimulan las células NK y secretan IFNg y aumentan su actividad lítica, también activan las células B
20 para que proliferen (Krieg A et al. 1995 Nature 347: página 546, Chu R et al. 1997 J. Exp. Med. 186 página 1623). El CpG 7909 no es antisentido en cualquiera de las secuencias conocidas del genoma humano. El CpG7909, es un adyuvante de propiedad desarrollado por y producido a nombre de Coley
25 Pharmaceutical Group, Inc., MA, EUA.

Formulación con CpG:

Las formulaciones se prepararon los días de las inyecciones. El volumen de la inyección por ratón fue de 50 ó 100 µl. Una formulación típica que contiene CpG, 3D-MPL y QS21 en liposomas se hace de la manera siguiente: se diluyen de 20 µg a 25 µg del antígeno con H₂O y PBS en un pH de 7.4 para la isotonicidad. Después de 5 minutos, el QS21 (0.5 µg), mezclado con los liposomas en una proporción de peso de QS21/colesterol de 1/5 (a la que nos referimos como DQ) se agregó a la formulación. 30 minutos después se agregaron 10 µg CpG (ODN 2006) y 30 minutos antes de la adición de 1 µg/ml de tloersal como conservador. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

1.2.- Preparación Inmunogénica que contiene CpG y AS02 (El AS02 es QS21 y lípido A monofosforilo 3 de-O-acilado (3D-MPL) en una emulsión de aceite en agua):

El sistema adyuvante AS02 ha sido descrito anteriormente en el Documento WO 95/17210.

3D-MPL: es como se describió anteriormente.

QS21: es como se describió anteriormente.

La emulsión de aceite/agua está compuesta de una fase orgánica hecha de dos aceites (un tocoferol y escualeno) y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como

121

emulsificador. La emulsión comprendía 5% de escualeno, 5% de tocoferol 0.4% de Tween 80 y tenía un tamaño partícula promedio de 180 nm y es conocido como SB62 (ver Documento WO 95/17210).

5 **Preparación de la emulsión SB62 (concentrado doble):**

El Tween 80 es disuelto en solución salina regulada por fosfato PBS para producir una solución al 2% en el PBS. Para producir 100 ml en una emulsión de concentrado doble, se mezclaron completamente mediante agitación en vórtice 5g
10 de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno. Se le agregaron 90 ml de una solución de PBS/Tween y se mezclaron completamente. La emulsión resultante entonces fue pasada a través de una jeringa y finalmente microfluidificada utilizando una máquina de microfluidificación M110S. Las gotitas de
15 aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180nm.

Formulaciones con CpG:

Una formulación típica que contiene 3D-MPL y QS21 en una emulsión de aceite/agua se lleva a cabo de la manera
20 siguiente: se diluyen de 20µg a 25µg del antígeno concentradas en 10 dobleces de PBS, pH 6.8 y H₂O antes de la adición consecutiva de SB62 (50µL), MPL (20µg), QS21 (20µg), que comprende el oligonucleótido CpG (100 µG) y 1 µg/ml de tiomersal como conservador. La cantidad de cada

componente puede variar según sea necesario. Todas las incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente con agitación.

EJEMPLO II

5 Efecto del mL 18 en combinación con la vacuna Her2/neu adyuvada con AS15 en un modelo terapéutico TC1 Her2

II.1. Diseño experimental

Vacuna

La vacuna Her-2/neu es ECD-PhD y comprende el
10 dominio extracelular completo (comprendiendo los aminoácidos del 1 al 645) y una porción inmunogénica del dominio intracelular que comprende el dominio de fosforilación. Dicha construcción de vacuna se describe en el Documento WO00/44899 y es denominada dHER2.

15 La proteína dHER2 fue co-liofilizada con CpG, diluyendo el antígeno en una mezcla de H₂O, sacarosa NaH₂PO₄/K₂HPO₄. Después de 5 minutos, se le agregó CpG ODN 7909 para obtener un volumen final que contiene
20 625µg/ml de Her2neu, 1250 µg/ml de CpG, 3.15% de sacarosa, y 5mM de PO₄, pH 7 antes del secado por congelación. El volumen final fue liofilizado de acuerdo con un ciclo de 3 días. Para la formulación extemporánea, la torta liofilizada que contiene el CpG y el antígeno se suspendió de nuevo con 625µg de AS01B el cual es un diluyente que

contiene 100µg/ml de MPL Y DQ.

Los animales fueron inyectados con 50µl con un contenido de 25µg de Her2/neu, 50µg de CpG y 5µg MPL y DQ.

5 HER-2/neu que expresa el modelo de tumor

El modelo de tumor utilizado en este experimento: TC1HER2 fue generado mediante la transducción retroviral de las células TC1 (proporcionadas por Dr T.C. Wu John's Hopkins University, Baltimore) con un retrovirus recombinante
10 que codifica el HER-2/neu).

Los clones individuales han sido aislados, amplificados y la estabilidad del HER2/neu y la expresión MHC clase I fue confirmada mediante citometría de flujo.

Grupos de ratones:

15 4 grupos de 5 ratones CB6F1 hembra recibió en el día 0 una inyección sub-cutánea (SC) con células 2×10^6 TC1Her2 cl8, seguido por la vacunación, ya sea con:

-gr1: PBS

20 -gr2: inyección diaria de 100µg de mL18 (múrido) del día 7 al día 27 (SC).

-gr3: 25 µg de proteína dHER2 en AS15 en los días 7 y 14 (IM)

-gr4: la combinación de la vacuna y el mL18

II.2. Proliferación y mortalidad del tumor *in vivo*:

Los resultados se muestran en la figura 2 y en la Tabla 1.

Tabla 1: porcentajes de ratones los cuales permanecen libres de tumores, 27 días después de la inyección de TC1HER2al tumor.

10

PBS	0%
mIL18	20% (mortalidad : 2/5)
dHER2/AS15	0%
dHER2/AS15 mIL18	60% (2/5 desarrollo de un tumor pequeño)

II.3 Conclusión

La estrategia de la vacuna basada en el uso de la proteína HER-2/neu purificada recombinante (dHER2) formulada en un adyuvante (AS15) combinada con la inyección repetida de recombinante múrido IL-8 produjo resultados mejorados en tumores previamente establecidos, los cuales expresan el antígeno HER2/neu, comparados con una estrategia de vacunación con cualquiera de la composiciones vacuna o el IL-18 solos. La vacunación basada en el uso de las proteínas dHER recombinantes formuladas en el adyuvante AS15 había mostrado anteriormente proteger de una manera muy eficiente contra un reto con estas células del tumor que expresan el antígeno HER2/neu. La protección es

específica para el antígeno HER2/neu y está asociada con la inducción de una memoria inmune de largo plazo. En este modelo terapéutico más severo se preestablecieron los tumores y las vacunas han mostrado ser menos efectivas
5 teniendo solamente un impacto limitado en el crecimiento del tumor (ningún ratón rechazó completamente los tumores en estas condiciones). Sin embargo, de manera sorprendente, cuando ambos tratamientos se administraron de manera consecutiva, se observó una sinergia y el 60% de los ratones
10 permaneció completamente libre de tumores mientras que el 40% solamente desarrolló un tumor pequeño. En conclusión, existe un beneficio claro al combinar el mIL-18 y las vacunas como se muestra en la Tabla 1. Esto podría significar que ambas la inducción de las respuestas de la célula T
15 específica de HER2/neu mediante la vacuna en la activación del sistema inmune mediante la inyección repetida de IL-18 son cruciales para obtener la regresión del tumor.

EJEMPLO III

**Efecto del mIL18 en combinación con la vacuna MAGE-3
20 adyuvada con AS15 en el modelo terapéutico TC1 Mage3**

III.1. Diseño del experimento

Vacuna

El modelo de tumor que expresa el antígeno del tumor Mage3 ha sido generado (TC1Mage3) modificando
25 genéticamente las células TC1de origen mediante la

transfección clásica de un plásmido de ADN que codifica el Mage3 (PcDNA3 Mage3). Este modelo de tumor fue generado transfectando las células TC1 de origen, (proporcionadas por T.C. Wu at John's Hopkins University, Baltimore) con un
5 plásmido PcDNA3 que codifica el Mage3. La transfección fue realizada utilizando lipofectamina de acuerdo con la recomendación del proveedor del equipo (Gibco BRL Life Technologies, catálogo no. 18324-012).

Estas células son tumorigénicas y el 100% de los
10 ratones inyectados con ellas desarrollaron un tumor de células 2 10^6 TC1 Mage3.

4 grupos de 5 ratones C57BL/6 hembras recibirán en el día 0 una inyección subcutánea (SC) de desafío con células 2×10^6 TC1Mage3 seguido por la vacunación con cualquiera
15 de:

-gr1: PBS

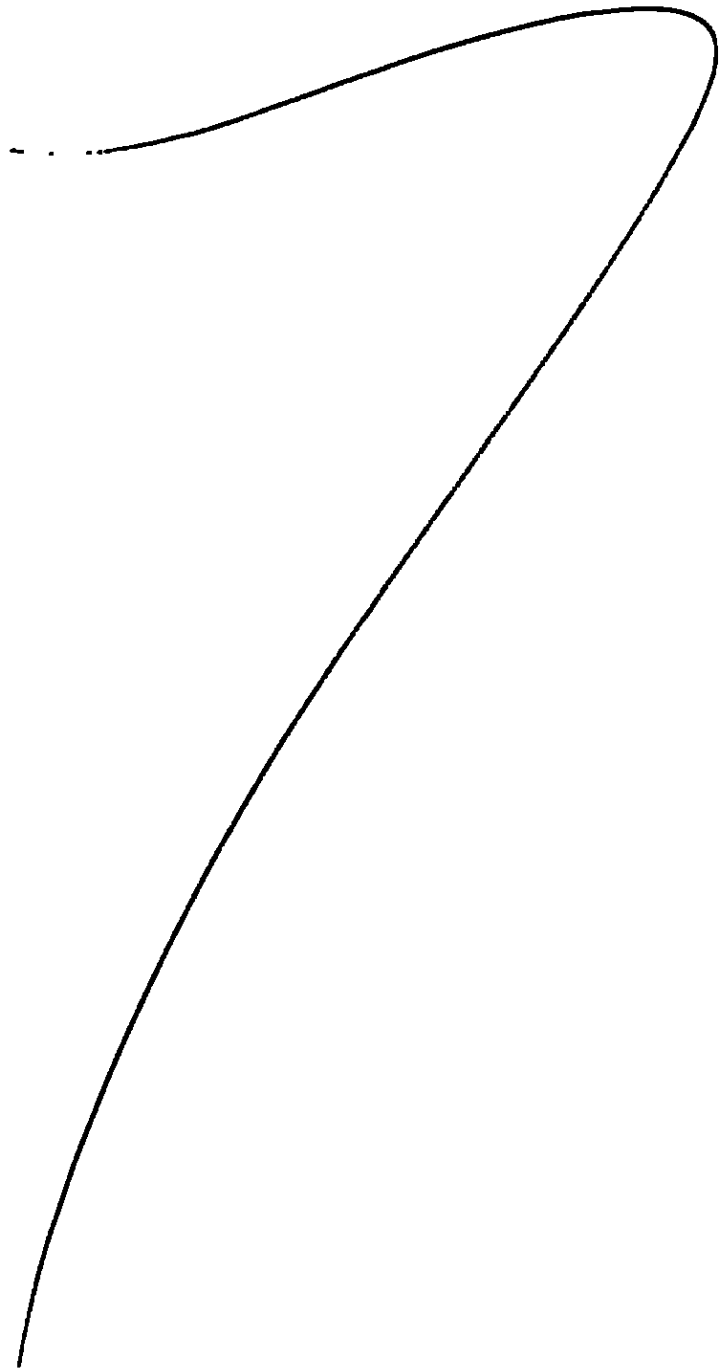
-gr2: inyección diaria de $100 \mu\text{g}$ de mL18 (múrido) del día 7 al día 27 (SC)

-gr3. $10 \mu\text{g}$ de proteína Mage3 en AS15 los días 7 y 14
20 (IM)

-gr4: la combinación de la vacuna y el mL 18

La capacidad del Mage3 en la vacunación AS15, se evaluaron las inyecciones de IL18 y el tratamiento combinado para inducir la regresión del tumor. El impacto de la

vacunación y/o el tratamiento de IL 18 en el parámetro inmune también es medido (proliferación linfática, producción de citocinas).



REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar una respuesta inmune a un antígeno en un mamífero, el cual comprende la administración al mamífero de una cantidad segura y efectiva de 1) un
5 polipéptido IL-18 o un fragmento bioactivo o variante del mismo y 2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG.

2. El método tal y como se describe en la
10 reivindicación 1 caracterizado porque el antígeno o el derivado inmunogénico del mismo es derivado de un organismo seleccionado del grupo siguiente: el virus VIH-1 de inmunodeficiencia humana, virus de herpes simplex humano, citomegalovirus, Rotavirus, virus de Epstein Barr, Virus de
15 Varicela Zoster, de un virus de hepatitis tal como el virus de hepatitis B, virus de hepatitis A, virus hepatitis C y virus de hepatitis E, virus Sincitial Respiratorio, virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano, flavivirus o virus de influenza provenientes
20 de *Neisseria spp*, *Moraxella spp*, *Bordetella spp*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*; *Escherichia spp*, incluyendo el *E. coli* enterotóxico; *Salmonella spp.*; *Listeria spp*; *Helicobacter spp*; *Staphylococcus spp.*; incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Borrelia spp*;
25 *Chlamydia spp.*; incluyendo *C. Trachomatis*, *C. pneumoniae*;

Plasmodium spp., incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*,
Candida spp.

3. Un método para reducir la severidad de un cáncer en un paciente, que comprende la administración a un
5 paciente que la necesita de una cantidad segura y efectiva de
1) un polipéptido IL-18 o un fragmento bioactivo o variante del mismo y 2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno asociado con el tumor o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG.

10 4. Un método tal y como se describe en la reivindicación 3, caracterizado porque el antígeno o derivado inmunogénico del mismo asociado con el tumor es seleccionado del grupo que comprende: un antígeno de la familia MAGE, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, SAGE,
15 HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, proteína, P501S, HASH2, Cripto, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, prostasa, STEAP, tirosinasa, telomerasa, survivina, CASB616, P53, o her2 neu.

5. Un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado porque el
20 polipéptido IL-18 o el fragmento bioactivo o variante del mismo en la composición inmunogénica son administrados simultáneamente, por separado o consecutivamente en cualquier orden.

6. El método tal y como se describe en la
25 reivindicación 5, caracterizado porque el polipéptido IL-18 o

el fragmento bioactivo o variante del mismo y la composición inmunogénica son administrados simultáneamente en la forma de una preparación farmacéutica combinada.

7. Un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado porque el polipéptido IL-18 o el fragmento bioactivo derivado del mismo es de origen humano o murino.

8. Un método tal y como se describe en la reivindicación 7, caracterizado porque el IL-18 es el polipéptido de la SEQ ID NO.6 ó SEQ ID NO.7 o el fragmento bioactivo o derivado del mismo.

9. Un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, caracterizado porque el adyuvante CpG comprende una Purina, Purina, C, G, pirimidina, y secuencia de pirimidina.

10. Un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8 caracterizado porque el adyuvante CpG es seleccionado del grupo que comprende: TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (SEQ ID NO:1); TCT CCC AGC GTG CGC CAT (SEQ ID NO:2); ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO.3) TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (SEQ ID NO:4); TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (SEQ ID NO:5).

11. Un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8 caracterizado porque el

adyuvante CpG contiene por lo menos dos repeticiones CG no metiladas, estando separadas por lo menos por 3 nucleótidos.

12. Un método tal y como se describe en la reivindicación 11, caracterizado porque el oligonucleótido
5 inmuoestimulante contiene por lo menos tres repeticiones CG no metiladas, estando separadas por 6 nucleótidos.

13. Una preparación combinada que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes individuales:
(1) un polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo (2) una composición inmunogénica que comprende un
10 antígeno y un adyuvante CpG, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, separado o consecutivo para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades autoinmunes y padecimientos
15 relacionados.

14. Una preparación combinada tal y como se describe en la reivindicación 13 caracterizada porque los componentes (1) y (2) son mezclados en una composición.

15. Una preparación combinada tal y como se describe
20 en la reivindicación 13 ó 14 caracterizada porque la composición inmunogénica comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo asociado con el tumor y es profilácticamente o terapéuticamente activo contra el cáncer.

16. Una preparación combinada tal y como se describe
25 en la reivindicación 15, caracterizada porque el antígeno o

derivado inmunogénico del mismo asociado con el tumor es
seleccionado del grupo que comprende un antígeno de la
familia MAGE, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, SAGE,
HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, proteína, P501S, HASH2,
5 Cripto, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, Prostasa, STEAP,
tirosinasa, telomerasa, survivina, CASB616, P53, ó her 2 neu.

17. Una preparación combinada tal y como se describe
en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 16,
caracterizada porque el polipéptido IL-18 o el fragmento
10 bioactivo o derivado del mismo es de origen humano o
múrido.

18. Una preparación combinada tal y como se describe
en la reivindicación 17, caracterizada porque el IL-18 es el
polipéptido de la secuencia SEQ ID NO. 6 ó SEQ ID NO. 7 ó
15 un fragmento bioactivo o derivado del mismo.

19. Una preparación combinada tal y como se describe
en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 18,
caracterizado porque el adyuvante CpG es tal y como se
describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 12.

20. La preparación combinada tal y como se describe
en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 19, en la
cual la composición inmunogénica comprende adicionalmente
un químico inmunoestimulante seleccionado del grupo que
comprende: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol,
25 hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol y una

emulsión de aceite en agua o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes.

21. La preparación combinada tal y como se describe en la reivindicación 20, caracterizada porque el adyuvante de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL, CpG, QS21, colesterol o una emulsión de aceite en agua.

22. La preparación combinada tal y como se describe en la reivindicación 21, caracterizada porque la emulsión de aceite en agua comprende escualeno, tocoferol y monooleato de polioxietilensorbitan (Tween 80).

23. La preparación combinada tal y como se describe en la reivindicación 20, caracterizada porque la composición inmunogénica comprende QS21, colesterol y un adyuvante CpG.

24. La preparación combinada tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a la 23, caracterizada porque ambos componentes activos se encuentran en formas de soluciones que se pueden inyectar.

25. Un equipo farmacéutico que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes individuales (1) un polipéptido IL-18 ó fragmento bioactivo del mismo (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, separado o consecutivo para la profilaxis y/o tratamiento de

enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades autoinmunes.

26. El equipo farmacéutico tal y como se describe en la reivindicación 25 caracterizado porque la composición
5 inmunogénica comprende un antígeno asociado con el tumor o un derivado inmunogénico del mismo y es profilácticamente o terapéuticamente activo contra el cáncer:

27. Un equipo farmacéutico tal y como se describe en la reivindicación 26, caracterizado porque el antígeno
10 asociado con el tumor o derivado inmunogénico del mismo es seleccionado del grupo que comprende: un antígeno de la familia MAGE, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, SAGE, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, proteína, P501S, HASH2, Cripto, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, Prostasa, STEAP,
15 tirosinasa, telomerasa, survivina, CASB618, P53, ó su her 2 neu.

28. Una preparación combinada tal y como se describe en cualquiera de la reivindicaciones de la 13 a la 23 para utilizarse en una medicina.

20 29. Un método tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 12 el cual comprende el uso de una preparación combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 13 a al 24.

30. El uso de un polipéptido IL-18 o fragmento
25 bioactivo o derivado del mismo en la fabricación de un

medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de pacientes que sufren o son susceptibles a enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades autoinmunes o padecimientos relacionados, y que ya ha sido preparado con una
5 composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG.

31. El uso de una composición inmunogénica que comprende un antígeno o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante CpG en la fabricación de un
10 medicamento para el tratamiento de pacientes que sufren de o son susceptibles a enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades autoinmunes y padecimientos relacionados, y que ya han sido preparados con un polipéptido IL-18 ó fragmento bioactivo derivado o del mismo.

15 32. El uso tal y como se describe en la reivindicación 30 ó 31 en donde el antígeno es un antígeno asociado con el tumor y el cáncer es seleccionado del grupo consistente de cáncer de mama, cáncer de pulmón, NSCLC, cáncer de colón, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de la vejiga, carcinoma
20 escamoso de cabeza y cuello, cáncer del esófago.

33. El uso tal y como se describe en las reivindicaciones de la 30 a la 32, caracterizado porque el polipéptido IL-18 y el fragmento bioactivo o derivado del mismo es de origen humano o murino.

25 34. El uso tal y como se describe en la reivindicación

33, en donde el IL-18 es el polipéptido de la secuencia SEQ ID NO.6 ó SEQ ID NO. 7 ó un fragmento bioactivo o derivado del mismo.

35. El uso tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 30 a la 34, caracterizado porque el adyuvante CpG es tal y como se describe en cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 12.

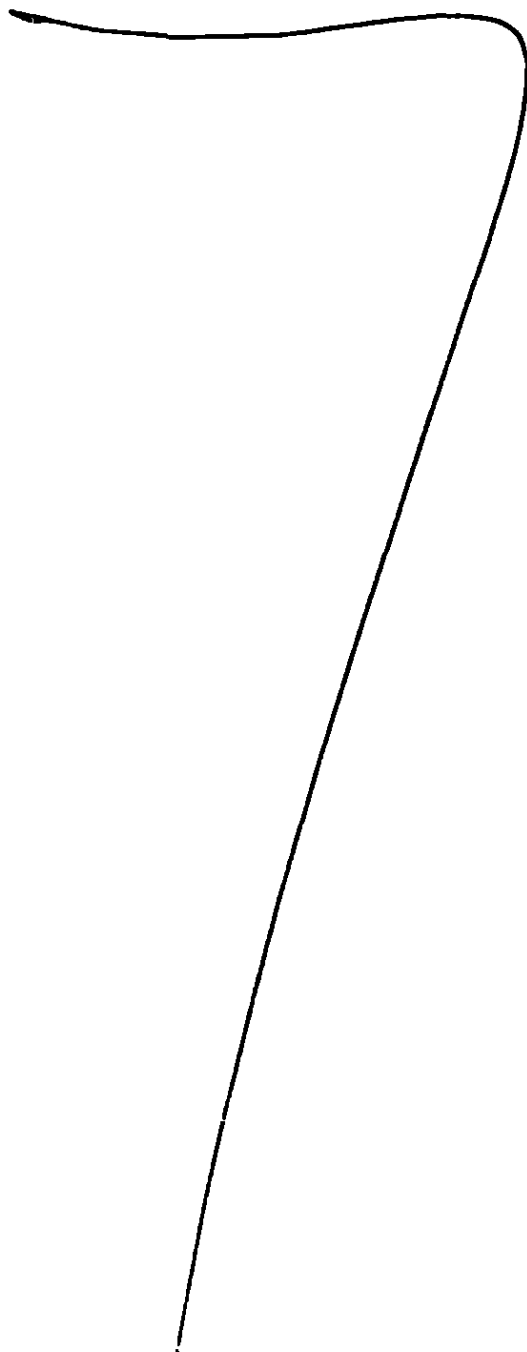


FIG. 1 Polipéptidos IL-18

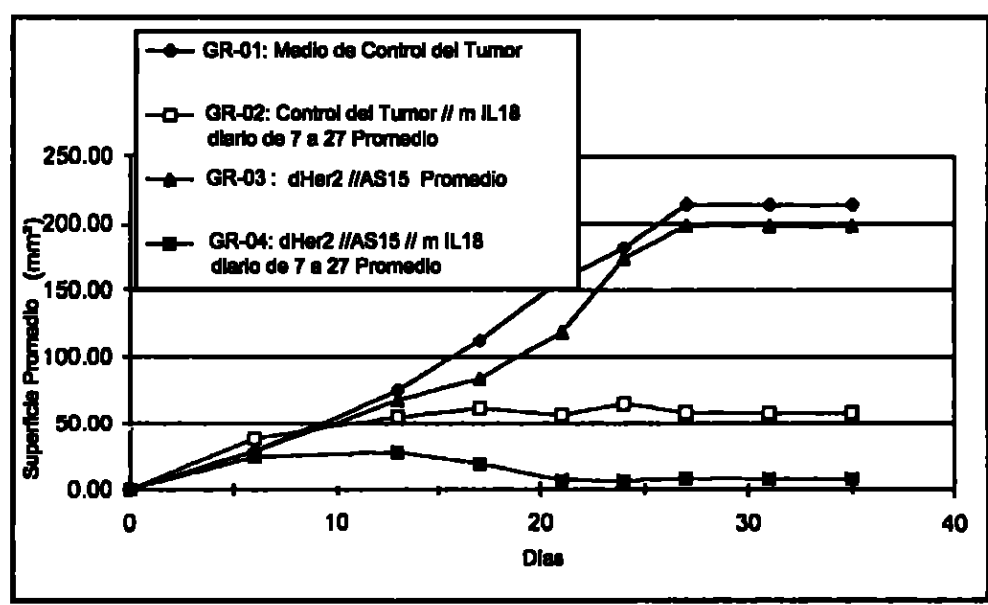
FIG. 1A Secuencia del polipéptido IL-18 humano

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1			5					10					15		
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
		20						25					30		
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
		35						40					45		
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
	50						55				60				
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
			85							90				95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
		100							105					110	
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
		115						120				125			
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
		130					135					140			
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145					150						155				

FIG. 1B Secuencia del polipéptido IL-18 murino

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met
			20					25					30		
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile
		35					40					45			
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser
	50					55				60					
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile
	65				70					75				80	
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser
				85					90					95	
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu
			100					105					110		
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu
		115					120						125		
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp
	130					135					140				
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser			
145				150						155					

FIG. 2 Crecimiento del tumor in vivo en el modelo terapéutico TCI Her2





REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 50
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 138
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x] INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA [] INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha abr 17 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

454317
Anda Escobar
COP: FIANZA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JUN -8 A 11 41

Uso
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D. C.