



CPT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No **06-34535**

54 TÍTULO "COMPOSICIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN
UNA INTERLEUCINA 18 Y SISTEMA DE ADYUVANTE
DE SARDINIA

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/39

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

DOMICILIO LIXENSART, BELGICA Y PHILADELPHIA
Y ESTADO DE PENNSYLVANIA ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA

74 APODERADO ALICIA LOREDA RICAUTE
T.P. 53.215

22 BOGOTÁ, D C, 7 ABRIL 2006

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-034635- -00000-0000 Fea: 2005-04-07 19:02:01
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEMII Ene 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 160

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

13-05-2005

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 CORPORATION

Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica y One Franklin Plaza, Philadelphia, Estado de Pennsylvania 19101, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica y Philadelphia, 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: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

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

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.890.713 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 Y GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América y Bélgica

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011620

Fecha: 11/10/04

Publicación Internacional No. WO 2005/039634 A1

Fecha: 06/05/05

⑥

Título (54) "COMPOSICIONES DE VACUNA QUE COMPRENEN UNA INTERLEUCINA 18 Y SISTEMA DE ADYUVANTE DE SAPONINA"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39, A61P 31/02, 31/12, 33/04,

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

13/10/03

(31) Número de Solicitud

0323965.4

⑨

Comprobante de Pago No. 06 - 20.832

Fecha: 15/03/06

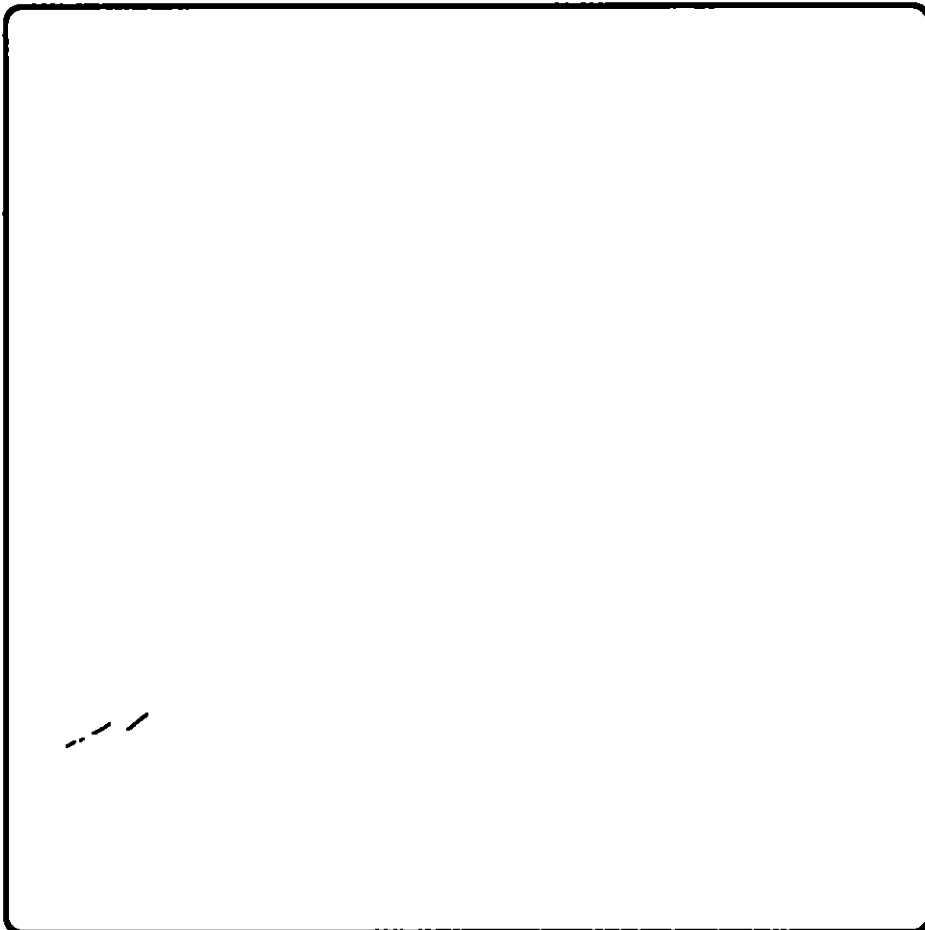
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas. (2)
- ☒ 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 con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 20,832
FECHA : MARZO 15 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-034535-00000-0000 Fea: 2006-04-07 16:02:01
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTE(Y) Evt 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 150

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	36588902	15/03/2006	3,504,000.00

CONCEPTO

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.

SOM: 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

55

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

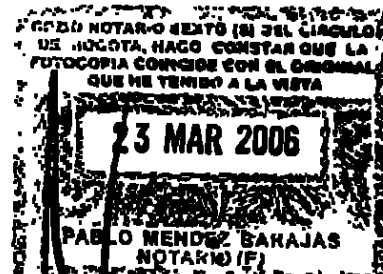
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

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



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 3177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES.

260567

Anita Esobai

CUYA FIRMA APARECE EN EL

DOCUMENTO DESEMPENA

LAS FUNCIONES INDICADAS

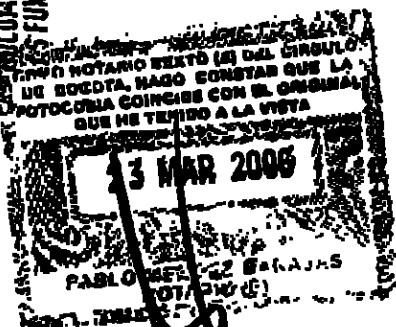
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10 47

ues

JEFE DE LEGALIZACIONES

BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

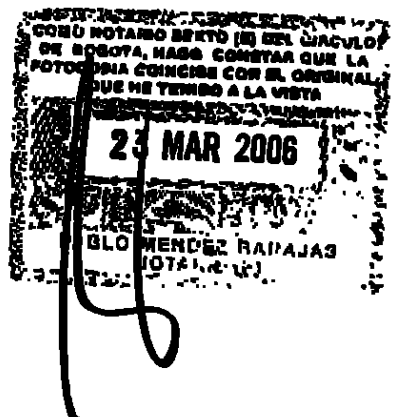
W. Glass
Por el Secretario de Estado

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,

CERTIFICO:

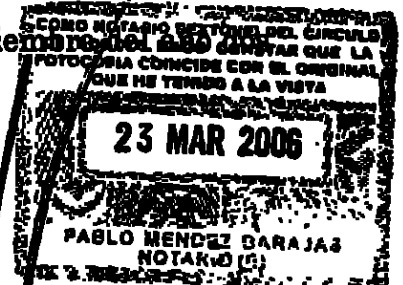
QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada **"GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A."** (anteriormente denominada **"Smithkline Beecham Biologicals s.a."**), 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 de mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



SCHEER
NOTARIES

APOSTILLE

(Hague Convention of 5-October 1961/Convention de La Haye du 5 octot

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

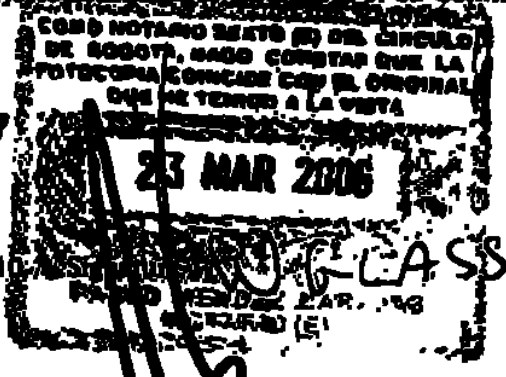
Certified/Attesté

- 5. at London/à Londres
- 6. the/le 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



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 8o., 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 párrafo 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, desistir, 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.

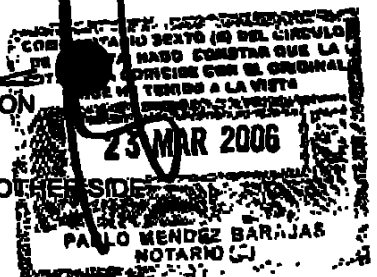
We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this

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

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

31 AUG 2004



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.

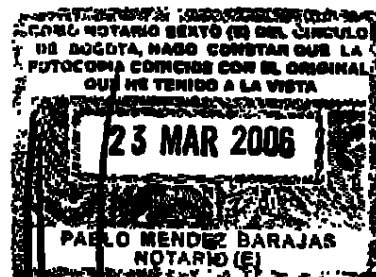
Notary Public (Notario Público).

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)

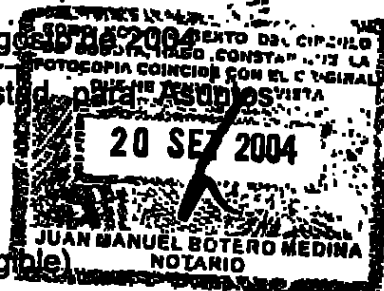
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

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

CERTIFICADO

6. en Londres
7. el 26 de agosto de 2004
8. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
9. Número G499867
10. Sello/Estampilla
11. Sello de la Oficina de Asuntos

Firma: (ilegible)
M. Monaghan



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2004 SET -3 P 12:11
Jefe de LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258647
Amor Escobar
ESTATISTA APARECE EN EL
DOCUMENTO EN UN PENA
E INSTRUCCIONES INDICADAS

NOTARIO BENTO DE CIRCULO
NOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
20 SET 2004
JUAN MANUEL ENTERO MEDINA
NOTARIO

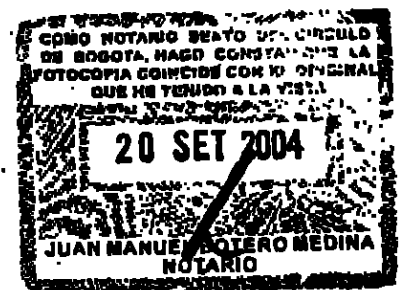
Exteriores y del Commonwealth

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 autentica. 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.

TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION 2177
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



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;

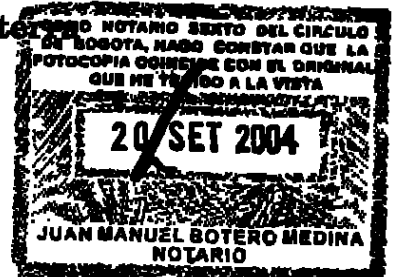
QUE el citado Señor Don Peter John GIDDINGS está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 24 de noviembre de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

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



DE PINNA

35 Piccadilly London W1J 0LJ

Telephone: +44 (0)20 7338 5000 Fax: +44 (0)20 7338 0088 UK No. 48581 Piccadilly 2

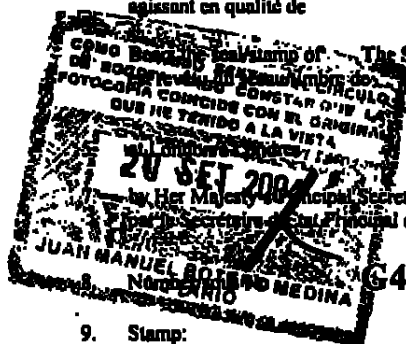
APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

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



The Said Notary Public

Certified/Attesté
6. the/le 26 August 2004

- 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.

G499867

9. Stamp:
timbre:

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.

13
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, perclbir 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, 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 valid and good all such acts and measures that our 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

Peter John GIDDINGS as Attorney and Authorised Official

...

...

Folio 13 ~~extra~~
14 15 ~~extra~~

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/VB60528	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP2004/011620	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 Recuadro No. I.

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

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

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

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

COMPOSICIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN UNA INTERLEUCINA 18 Y SISTEMA DE ADYUVANTE DE SAPONINA

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. 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 seleccionado por esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como seleccionado por esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras que serán publicadas con el resumen

15 REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011620

Casilla I Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. 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.

2. ☐ 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.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011620
A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC 7 A61K39/39 A61P31/02 A61P31/12 A61P37/04		
Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) IPC 7 A61K		
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-Interno, Dato WPI, PAJ, Dato CHEM ABS, BIOSIS		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Cita de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 6 375 945 B1 (BOON THIERRY ET AL) 23 de Abril de 2002 (2002-04-23) columna 1, línea 14 – línea 24 columna 3, línea 31 – columna 4, línea 33 reivindicaciones; ejemplos	1-32
X	WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.; NICOLSON, LESLEY; RIJKE, ERIC, ONNO) 11 de Noviembre de 1999 (1999-11-11) página 2, línea 22 – página 3, línea 19 página 4, línea 15 – línea 26 reivindicaciones; ejemplos	1-32
X	US 6 355 256 B1 (NOGUCHI YUJI ET AL) 12 de Marzo de 2002 (2002-03-12) columna 1, línea 10 – línea 27 reivindicaciones; ejemplos	1-32
-/-		
☒ 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 9 de Febrero de 2005		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 17/02/2005
Nombre y dirección del correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax No. (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Rankin, R

17

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011620

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	KIM J J ET AL: "Modulación de la amplitud y dirección de respuestas inmunes mediante co-administración de casetes de expresión del gen de citocina con inmunógenos de ADN" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILHEIM, DE vol. 28, 1998, páginas 1089-1103, XP000914724 ISSN: 0014-2980 todo el documento	1-32
A	WO 98/18810 A (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION; KRIEG, ARTHUR, M; KLINE, J) 7 de Mayo de 1998 (1998-05-07) página 27, línea 34 página 50, línea 19 reivindicación 27	1-32
A	WO 01/58956 A (BASF AKTIENGESSELLSCHAFT, GHAYUR, TARIQ, DIXON, RICHARD, W; ROGUSKA, MI) 16 de Agosto de 2001 (2001-08-16) página 14, tabla 5	1-32
A	WO 01/57219 A (SCHERING CORPORATION) 9 de Agosto de 2001 (2001-08-09) figura 1	1-32

17

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011620

Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 1 de la primera hoja)

Este informe 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 1-9 y 26 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ 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 No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 2 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.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011620

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 6375945	B1 23-04-2002	CA 2293614 A1 EP 0977589 A1 JP 2002504135 T CA 2294051 A1 WO 9857659 A1 WO 9857660 A1 EP 1001808 A1 JP 2002504136 T US 2002160011 A1	23-12-1998 09-02-2000 05-02-2002 23-12-1998 23-12-1998 23-12-1998 24-05-2000 05-02-2002 31-10-2002
WO 9956775	A 11-11-1999	AU 3827699 A CA 2328059 A1 WO 9956775 A1 EP 1075275 A1 JP 2002513647 T	23-11-1999 11-11-1999 11-11-1999 14-02-2001 14-05-2002
US 6355256	B1 12-03-2002	AU 3735095 A WO 9610423 A1 ZA 9508230 A	26-04-1996 11-04-1996 15-07-1996
WO 9818810	A 07-05-1998	US 6207646 B1 AU 5242498 A CA 2270345 A1 CN 1235609 A EP 0948510 A1 JP 2001503267 T JP 2003286174 A JP 2004041224 A KR 2000082994 A NZ 335397 A WO 9818810 A1 US 2003100527 A1 US 6429199 B1 US 2003191079 A1 US 6653292 B1 US 2004106568 A1 US 2004147468 A1 US 2004087538 A1 US 2004132685 A1 US 2004167089 A1 US 2004198688 A1 US 2003050261 A1 US 2005004061 A1 US 2004229835 A1 US 6239116 B1	27-03-2001 22-05-1998 07-05-1998 17-11-1999 13-10-1999 13-03-2001 07-10-2003 12-02-2004 26-08-2000 24-11-2000 07-05-1998 29-05-2003 06-08-2002 09-10-2003 25-11-2003 03-06-2004 29-07-2004 06-05-2004 08-07-2004 26-08-2004 07-10-2004 13-03-2003 06-01-2005 18-11-2004 29-05-2001
WO 0158956	A 16-08-2001	AU 3680701 A BG 107045 A BR 0108188 A CA 2399148 A1 CN 1461310 T EP 1257585 A2 HU 0300423 A2 JP 2004500086 T NO 20023788 A PL 356836 A1 SK 12942002 A3 WO 0158956 A2	20-08-2001 30-05-2003 26-02-2003 16-08-2001 10-12-2003 20-11-2002 28-06-2003 08-01-2004 09-10-2002 12-07-2004 02-05-2003 16-08-2001

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011620

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 0158956	A	ZA 200206266 A	06-11-2003
WO 0157219	A	AU: 3321201 A	14-08-2001
	09-08-2001	WO 0157219 A2	09-08-2001
		US 2002102234 A1	01-08-2002

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

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
Brentford, Middlesex TW8 9GS
UNITED KINGDOM

GlaxoSmithKline
Corporate IP
Received BRENTFORD

17 FEB 2005

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) **17/02/2005**

Applicant's or agent's file reference
VJR/VB60528

ATP VJR / FPA ADMIN 3/1
IPM: N/A **ON: 11/02/2005**
ATTY CHECKED/FILE

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/EP2004/011620

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 46):

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 18 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 18 months.

See the Annex to Form PCT/ISA/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, 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

Barbara Klaver

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference VJR/VB60528	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2004/011620	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:

VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING AN INTERLEUKIN 18 AND SAPONIN ADJUVANT SYSTEM

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/EP2004/011620

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/EP2004/011620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/39 A61P31/02 A61P31/12 A61P37/04

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

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, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 375 945 B1 (BOON THIERRY ET AL) 23 April 2002 (2002-04-23) column 1, line 14 - line 24 column 3, line 31 - column 4, line 33 claims; examples	1-32
X	WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V; NICOLSON, LESLEY; RIJKE, ERIC, ONNO) 11 November 1999 (1999-11-11) page 2, line 22 - page 3, line 19 page 4, line 15 - line 26 claims; examples	1-32
X	US 6 355 256 B1 (NOGUCHI YUJI ET AL) 12 March 2002 (2002-03-12) column 1, line 10 - line 27 claims; examples	1-32
	-/-	

☒ 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 relating 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

"B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 2005

Date of mailing of the international search report

17/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Rankin, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/011620

25

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM J J ET AL: "MODULATION OF AMPLITUDE AND DIRECTION OF IN VIVO IMMUNE RESPONSES BY CO-ADMINISTRATION OF CYTOKINE GENE EXPRESSION CASSETTES WITH DNAIMMUNOGENS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WEINHEIM, DE, vol. 28, 1998, pages 1089-1103, XP000914724 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-32
A	WO 98/18810 A (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION; KRIEG, ARTHUR, M; KLINE, J) 7 May 1998 (1998-05-07) page 27, line 34 page 50, line 19 claim 27	1-32
A	WO 01/58956 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT; GHAYUR, TARIQ; DIXON, RICHARD, W; ROGUSKA, MI) 16 August 2001 (2001-08-16) page 14; table 5	1-32
A	WO 01/57219 A (SCHERING CORPORATION) 9 August 2001 (2001-08-09) figure 1	1-32

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/011620

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 1-9 and 26 are directed to a method of treatment of the human 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6375945	B1	23-04-2002	CA 2293614 A1 23-12-1998
			EP 0977589 A1 09-02-2000
			JP 2002504135 T 05-02-2002
			CA 2294051 A1 23-12-1998
			WO 9857659 A1 23-12-1998
			WO 9857660 A1 23-12-1998
			EP 1001808 A1 24-05-2000
			JP 2002504136 T 05-02-2002
			US 2002160011 A1 31-10-2002
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
US 6355256	B1	12-03-2002	AU 3735095 A 26-04-1996
			WO 9610423 A1 11-04-1996
			ZA 9508230 A 15-07-1996
WO 9818810	A	07-05-1998	US 6207646 B1 27-03-2001
			AU 5242498 A 22-05-1998
			CA 2270345 A1 07-05-1998
			CN 1235609 A 17-11-1999
			EP 0948510 A1 13-10-1999
			JP 2001503267 T 13-03-2001
			JP 2003286174 A 07-10-2003
			JP 2004041224 A 12-02-2004
			KR 2000052994 A 25-08-2000
			NZ 335397 A 24-11-2000
			WO 9818810 A1 07-05-1998
			US 2003180527 A1 29-05-2003
			US 6429199 B1 06-08-2002
			US 2003191079 A1 09-10-2003
			US 6653292 B1 25-11-2003
			US 2004106568 A1 03-06-2004
			US 2004147468 A1 29-07-2004
			US 2004087538 A1 06-05-2004
			US 2004132685 A1 08-07-2004
			US 2004167089 A1 26-08-2004
			US 2004198688 A1 07-10-2004
			US 2003050261 A1 13-03-2003
			US 2005004061 A1 06-01-2005
			US 2004229835 A1 18-11-2004
			US 6239116 B1 29-05-2001
WO 0158956	A	16-08-2001	AU 3680701 A 20-08-2001
			BE 107045 A 30-05-2003
			BR 0108188 A 25-02-2003
			CA 2399148 A1 16-08-2001
			CN 1461310 T 10-12-2003
			EP 1257585 A2 20-11-2002
			HU 0300423 A2 28-06-2003
			JP 2004500086 T 08-01-2004
			NO 20023788 A 09-10-2002
			PL 356836 A1 12-07-2004
			SK 12942002 A3 02-05-2003
			WO 0158956 A2 16-08-2001

INTERNATI NAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0158956	A	ZA 200206266 A	06-11-2003
WO 0157219	A	AU 3321201 A	14-08-2001
	09-08-2001	WO 0157219 A2	09-08-2001
		US 2002102234 A1	01-08-2002

28

30

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(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 2005/039634 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 39/39,
A61P 31/02, 31/12, 37/04

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP2004/011620

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

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación: INGLES

(30) Información de Prioridad:

0323965.4 13 de Octubre de 2003 (13.10.2003) GB

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto Estados Unidos de América): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [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) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para los Estados Unidos de América únicamente): BRUCK, Claudine, Elvire, Marie [BE/US]; GlaxoSmithKline, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., 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) Agente: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado para cada clase de la 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.

(84) Estados Designados (salvo que de otro modo indicado para cada clase de la 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, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR) OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

___ con reporte de búsqueda internacional

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

(54) Título: "COMPOSICIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN UNA INTERLEUCINA 18 Y SISTEMA DE ADYUVANTE DE SAPONINA"

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



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

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/039634 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/39, (74) Agent: STEPHEN, Robert; GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).
A61P 31/02, 31/12, 37/04
- (21) International Application Number: PCT/EP2004/011620
- (22) International Filing Date: 11 October 2004 (11.10.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0323965.4 13 October 2003 (13.10.2003) 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, 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.

- (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) Inventors/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).

(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

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.

WO 2005/039634 A1

(54) Title: VACCINE COMPOSITIONS COMPRISING AN INTERLEUKIN 18 AND SAPONIN ADJUVANT SYSTEM

(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.

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)																									
		Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/220 (segunda página)																									
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver el párrafo 2 a continuación																									
Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/011620	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, A61P31/02, A61P31/12, A61P37/04																											
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 del Reporte</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 Examinadora Preliminar. 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 del Reporte	☐	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 del Reporte																									
☐	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 ISA: European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax No. (+31-70) 340-3016		Funcionario Autorizado Rankin, R Teléfono No. +31 70 340-4659																									

OPINION ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/011620

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:

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

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

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-9, 26 (parcialmente)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 1-9, 26 (por razones de aplicabilidad industrial) se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):
ver hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de 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, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Sí: Reivindicaciones	1-32
	No: Reivindicaciones	
Nivel inventivo (IS)	Sí: Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	1-32
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí: Reivindicaciones	10-25, 27-32
	No: Reivindicaciones	1-9, 26

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Casilla No. VIII Algunas observaciones sobre la solicitud internacional

Las siguientes observaciones con respecto a la claridad de las reivindicaciones, la descripción, y los dibujos o cuando las reivindicaciones están totalmente soportadas en la descripción, están hechas:

ver hoja separada

Re Item III

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

Las reivindicaciones 1-9 y 26 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 bajo el Artículo 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración

3.1 Aplicabilidad Industrial

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 1-9 y 26 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, el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

3.2 Documentos Citados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: US-B1-6 375 945 (BOON THIERRY ET AL) Abril 23 de 2002 (2002-04-23)
- D2: WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V.; NICOLSON, LESLEY; RIJKE, ERIC, ONNO) Noviembre 11 de 1999 (1999-11-11)
- D3: US-B1-6 355 256 (NOGUCHI YUJI ET AL) Marzo 12 de 2002 (2002-03-12)
- D4: WO 98/18810 A (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION; KRIEG, ARTHUR, M; KLINE, J) Mayo 7 de 1998 (1998-05-07)

3.3 Novedad

La materia objeto de las reivindicaciones 1-32 es novedosa con respecto a la técnica previa (Artículo 33(2) PCT).

3.4 D1 revela composiciones de adyuvante que comprende una saponina como QS1, lípido A monofosforilo e interleucina 12. Estos sistemas de adyuvante son apropiados para

uso en vacunas para el cáncer y enfermedad infecciosa. D1 no revela el uso de IL-18 en tales composiciones.

3.5 D2 revela el uso de IL-18 como un adyuvante de vacuna pero no revela la formulación de tales composiciones con saponinas.

3.6 D3 revela composiciones de adyuvante que comprenden IL-2 y Quil A, pero no revela el uso de IL-18 en estas composiciones.

3.7 En consecuencia, la materia objeto de las reivindicaciones 1-32 es novedoso con respecto a la técnica previa.

3.8 Nivel Inventivo

3.9 La técnica previa más cercana es D1, D1 revela composiciones de adyuvante que comprenden una saponina tal como QS21, lípido A monofosforilo e interleucina 12. Estos sistemas de adyuvante son apropiados para uso en vacunas para el cáncer y enfermedad infecciosa (cf columna 1, líneas 14-24; columna 3, línea 31 a columna 4, línea 33; ejemplos; reivindicaciones)

3.10 La diferencia entre la reivindicación 1 y D1 es que D1 no revela el uso de IL-18 en tales composiciones.

3.11 El problema a ser resuelto puede, por consiguiente, considerarse como proveer un sistema de adyuvante alternativo para uso de protocolos de inmunización.

3.12 La reivindicación 1 resuelve este problema al proveer un sistema de adyuvante que comprende una saponina e IL-18. Esta solución no se puede considerar como inventiva porque el experto lo hubiera visto obvio a la luz de D2 que ilustra la actividad del adyuvante de IL-18 así como la posibilidad de combinar la IL-18 con otros adyuvantes conocidos tales como QS21 en una formulación (cf página 4, líneas 15-26). En consecuencia, a la luz de D1 y D2, el experto hubiera intentado, en la fecha de prioridad de la solicitud actual, combinar IL-18 y una saponina en un sistema de adyuvante con una expectativa razonable de éxito. La materia objeto de la reivindicación 1 no puede considerarse inventiva (Artículo 33(3) PCT).

3.13 El razonamiento anterior también aplica a la materia objeto de las reivindicaciones 2, 10, 22, 25-28, que, por lo tanto, tampoco son inventivas (Artículo 33(3) PCT). Las reivindicaciones 2-9, 11-21, 23,

24 y 29-32 no contienen, en combinación con cualquier reivindicación a la que se refieren, la materia objeto que podría considerarse inventiva (Artículo 33(3) PCT).

3.14 Las Reivindicaciones 1-32 no son, en consecuencia, inventivas (Artículo 33(3) PCT).

Re Item VIII

Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

8.1 Los términos "fragmento", "variante" y "derivado" usados en las reivindicaciones 1-5, 7, 10, 12-14, 22-24, 27, 28, 30 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.

8.2 El uso de los términos "tales como", en la reivindicación 2, "seleccionado del grupo que comprende" en las reivindicaciones 4 y 13, y el término "condiciones relacionadas" en la reivindicación 7 hace que el alcance de las reivindicaciones mencionadas anteriormente no sean claras, haciendo así que la definición de la materia objeto de dichas reivindicaciones no sea clara, Artículo 6 PCT.

8.3 La Reivindicación 6 se refiere a una citosina TH1 de la reivindicación 5 aunque la reivindicación 5 no contiene tal característica. En consecuencia, la reivindicación 6 no es clara (Artículo 6 PCT).

8.4 Las reivindicaciones 8, 15 y 31 buscan protección para el polipéptido IL-18 o el fragmento de las SEC ID 6 y 7. Estas secuencias no son fragmentos de IL-18 sino que son secuencias inmunoestimuladoras CpG ODN (ver documento D4, página 27, línea 34; página 50, línea 19). Las Reivindicaciones 8, 15 y 31, por lo tanto no son claras.

8.5 La reivindicación 10 busca protección para una "preparación combinada" aunque la reivindicación posterior habla de "uso separado o secuencial" de la preparación. Por lo tanto, no es claro lo que significa "combinada" y como resultado, la reivindicación no es clara (Artículo 6 PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

38

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA220

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

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file-reference
see form PCT/ISA220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2004/011620

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
A61K39/39, A61P31/02, A61P31/12, A61P37/04

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 68.1bis(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/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - 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 - 3018

Authorized Officer

Rankin, R

Telephone No. +31 70 340-4659



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/011620

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:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2004/011620

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. 1-9, 28 (Partially)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-9, 28 (for reasons of 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/EP2004/011620

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	1-32
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-32
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	10-25, 27-32
	No: Claims	1-9, 26

2. Citations and explanations

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/EP2004/011620

Re Item III

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

Claims 1-9 and 26 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

3.1 Industrial Applicability

For the assessment of the present claims 1-9 and 26 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

3.2 Cited Documents

Reference is made to the following documents:

- D1: US-B1-6 375 945 (BOON THIERRY ET AL) 23 April 2002 (2002-04-23)
- D2: WO 99/56775 A (AKZO NOBEL N.V; NICOLSON, LESLEY; RIJKE, ERIC, ONNO) 11 November 1999 (1999-11-11)
- D3: US-B1-6 355 256 (NOGUCHI YUJI ET AL) 12 March 2002 (2002-03-12)
- D4: WO 98/18810 A (THE UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION; KRIEG, ARTHUR, M; KLINE, J) 7 May 1998 (1998-05-07)

3.3 Novelty

The subject matter of claims 1-32 is novel with regard to the prior art (Article 33(2) PCT)

3.4 D1 discloses adjuvant compositions comprising a saponin such as QS21, monophosphoryl lipid A and interleukin 12. These adjuvant systems are appropriate for

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

International application No.

PCT/EP2004/011620

use in vaccines for cancer and infectious disease. D1 does not disclose the use of IL-18 in such compositions.

3.5 D2 discloses the use of IL-18 as a vaccine adjuvant but does not disclose the formulation of such compositions with saponins.

3.6 D3 discloses adjuvant compositions comprising IL-12 and Quil A but does not disclose the use of IL-18 in these compositions.

3.7 Consequently the subject matter of claims 1-32 is novel with regard to the prior art.

3.8 Inventive Step

3.9 The closest prior art is D1. D1 discloses adjuvant compositions comprising a saponin such as QS21, monophosphoryl lipid A and interleukin 12. These adjuvant systems are appropriate for use in vaccines for cancer and infectious disease (cf column 1, lines 14-24; column 3, line 31 to column 4, line 33; examples; claims).

3.10 The difference between claim 1 and D1 is that D1 does not disclose the use of IL-18 in such compositions.

3.11 The problem to be solved may therefore be considered as providing an alternate adjuvant system for use in immunisation protocols.

3.12 Claim 1 solves this problem by providing an adjuvant system comprising a saponin and IL-18. This solution cannot be considered as inventive because the skilled person would view it as obvious in light of D2 which illustrates the adjuvant activity of IL-18 as well as the possibility of combining the IL-18 with other known adjuvants such as QS21 in a formulation (cf page 4, lines 15-26). Consequently, in light of D1 and D2, the skilled person would have attempted, at the priority date of the current application, to combine IL-18 and a saponin in an adjuvant system with a reasonable expectation of success. The subject matter of claim 1 cannot therefore be considered inventive (Article 33(3) PCT).

3.13 The above reasoning also applies to the subject matter of claims 2, 10, 22, 25-28 which are therefore also not inventive (Article 33(3) PCT). Dependent claims 2-9, 11-21, 23,

24 and 29-32 do not contain, in combination with any claim they refer to, subject matter which could be considered inventive (Article 33(3) PCT).

3.14 Claims 1-32 are consequently not inventive (Article 33(3) PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

8.1 The terms "fragment", "variant" and "derivative" used in claims 1-5, 7, 10, 12-14, 22-24, 27, 28, 30 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.

8.2 The use of the terms "such as" in claim 2, "selected from the group comprising" in claims 4 and 13 and the term "related conditions" in claim 27 renders the scope of the aforementioned claims unclear, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

8.3 Claim 6 refers to a TH1 cytokine in claim 5 yet claim 5 does not contain such a feature. Consequently, claim 6 is unclear (Article 6 PCT).

8.4 Claims 8, 15 and 31 seek protection for the IL-18 polypeptide or fragment of SEQ IDs 6 and 7. These sequences are NOT IL-18 fragments but instead are immunostimulatory CpG ODN sequences (see document D4, page 27, line 34; page 50, line 19). Claims 8, 15 and 31 are therefore unclear (Article 6 PCT).

8.5 Claim 10 seeks protection for a "combined preparation" yet the claim later speaks of "separate or sequential use" of the preparation. It is therefore unclear what is meant by "combined" and as a result the claim is unclear (Article 6 PCT).

**COMPOSICIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN UNA
INTERLEUCINA 18 Y SISTEMA DE ADYUVANTE DE
SAPONINA**

5 R E S U M E N-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

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

**COMPOSICIONES DE VACUNA QUE COMPRENDEN UNA
INTERLEUCINA 18 Y SISTEMA DE ADYUVANTE DE
SAPONINA**

5 Campo del Invento

La presente invención se refiere a una terapia de combinación que tiene utilidad en el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas, cánceres, enfermedades autoinmune y condiciones relacionadas. En particular, la
10 terapia de combinación comprende la administración de una citocina TH-1, en particular IL-18, y una composición inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un antígeno y un adyuvante de saponina. En particular, la presente invención se refiere al uso de IL-18 ó variante
15 bioactivo del mismo y a una composición inmunogénica que comprende un antígeno asociado con tumor y un adyuvante de saponina, para el tratamiento de lesiones preneoplásicas o cáncer. La presente invención se refiere además a preparaciones combinadas y equipos farmacéuticos
20 adecuados para utilizarse de acuerdo con la presente invención. Estos métodos de tratamiento y preparaciones farmacéuticas son especialmente útiles para el estímulo de una respuesta inmune adecuada para aplicaciones profilácticas e inmunoterapéuticas, especialmente para la
25 prevención y/o tratamientos de tumores.

Antecedentes del invento

El cáncer es una enfermedad que se desarrolla a partir de una sola célula debido a cambios genéticos. A pesar de enormes investigaciones con recursos financieros y humanos, el cáncer permanece como una de las principales causas de muerte. La detección clínica de estos tumores ocurre en su mayor parte en una etapa de la enfermedad relativamente tardía, cuando el tumor primario puede ser eliminado mediante cirugía, y la existencia de micrometástasis depositadas en diferentes órganos ya ha ocurrido. A pesar de avances considerables en la comprensión de los mecanismos que conducen al cáncer, ha habido menos progreso en la terapia de cánceres metastáticos y en la prevención del progreso de tumores de etapas tempranas hacia más lesiones malignas y metastáticas. La quimioterapia con frecuencia no elimina completamente estas células, las cuales posteriormente permanecen como una fuente de enfermedad recurrente.

Las citocinas tipo TH-1, por ejemplo IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-12, IL-18, etc., tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmune transmitidas por la célula a un antígeno administrado. En contraste, los altos niveles de citocinas tipo Th-2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10) tiende a favorecer la inducción de respuestas inmune humorales. La interleucina-18 (IL-18) también conocida como factor de

Inducción de interferón-gamma (IFNg), ha sido descrita como una citocina pleotrópica con efectos inmunomoduladores que estimulan el propio sistema inmune del paciente contra la enfermedad (por ejemplo cáncer). IL-18 se expresa en forma temprana en la respuesta inmune y actúa en respuestas inmune tanto humorales como celulares y conduce la respuesta hacia un mejor perfil tipo TH-1. Se produce mediante células que presentan antígeno activado y ha sido reportado por tener diversas bioactividades, específicamente por promover la diferenciación de células CD4 T naïve en células Th1, para estimular las células exterminadoras naturales (NK), células exterminadoras naturales T (NKT) y por inducir la proliferación de células T activadas, predominantemente células T citotóxicas (fenotipo CD8+) que segregan interferón gamma (IFN-gamma) (Okamura H. y Asociados, 1998, Adv. Immunol. 70:281-312). IL-18 también transmite muerte de tumor inducida por Fas, promueve la producción de IL-1a y GMCSF, y tiene actividad anti-angiogénica.

IL-18 tiene la capacidad de estimular inmunidad innata y respuestas transmitidas tanto por Th1 como Th2. En la presencia de IL-12, IL-18 puede actuar en células Th1, células T no polarizadas, células NK, células B y células dendríticas que producen IFNg. Sin la ayuda de IL-12, IL-18 tiene potencial para inducir la producción IL-4 e IL-13 en

células T, células NK, células mástil y basófilos.

IL-18 ha demostrado inducir regresión de tumor, a través de la producción de IFN-gamma, el cual es un componente importante de las respuestas inmune antitumor endógenas e inducidas por citocina. Se ha demostrado eficacia en diferentes modelos de animal con tumor (Jonak Z. y Asociados, 2002, *J. Immunother.* 25, S20-S27; Akamatsu S. y Asociados, 2002, *J. Immunother.* 25, S28-S34). Se han descrito composiciones que comprenden IL-18 combinado con otros agentes, en particular IL-18 en combinación con agentes quimioterapéuticos (Patente Norteamericana No. 6,582,689). También se ha descrito IL-18 como actuando como un adyuvante para vacunas (Publicaciones WO 99/56775 y WO 03/031569).

Las saponinas se consideran en: Lacaille-Dubois, M. y Wagner H. (1996. Una revisión de las actividades biológicas y farmacológicas de las saponinas. *Phytomedicine Volumen 2*, páginas 363-386). Las saponinas son esteroides o glucósidos de triterpeno ampliamente distribuidos en los reinos de las plantas y animales marinos. Las saponinas se observan en la formación de soluciones coloidales en agua, las cuales hacen espuma al momento de agitarse, y precipitan el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares, crean estructuras tipo poro en la membrana lo cual origina que la membrana explote. La

hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, lo cual es una propiedad de ciertas, pero no todas las saponinas.

Las saponinas son conocidas como adyuvantes en
5 vacunas para administración sistémica. El adyuvante y la actividad hemolítica de saponinas individuales ha sido estudiada ampliamente en la técnica (Lacaille-Dubois y Wagner, *supra*). Por ejemplo, Quil A. (derivado de la corteza del árbol de Quillaka Saponaria Molina de América
10 del Sur) y fracciones del mismo se describen en la Patente Norteamericana No. 5,057,540, y en "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996, 12 (1-2):1-55; y en la Patente EP 0,362,279 B1. Las estructuras de particulado, denominadas Complejos de
15 Estimulación Inmune (ISCOMS), que comprenden Quil A. ó fracciones del mismo, han sido utilizadas en la fabricación de vacunas (Morein, B., Patente 0,109,942 B1). Estas estructuras han sido reportadas por tener actividad adyuvante (Patente EP 0,109,942 B1; Publicación WO
20 96/11711). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas de Quil A purificadas por HPLC) han sido descritas como adyuvantes sistémicos potentes, y el método para su producción se describe en la Patente Norteamericana No. 5,057,540 y en la Patente EP 0,362,279
25 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7

(una fracción no hemolítica de Quil-A) la cual actúa como un adyuvante potente para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe en forma adicional en la Publicación de Kensil y Asociados (1991, *J. Immunology*, volumen 146, 431-437). Las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina también son conocidas (WO 99/10008). Los sistemas de adyuvante de particulado que comprenden fracciones de QuilA, tal como QS21 y QS7 se describen en la Publicación WO 96/33739 y WO 96/11711.

10 Otras saponinas que han sido utilizadas en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies de plantas tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford y Asociados, *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992).

Las saponinas también son conocidas por haber sido
15 utilizadas en estudios de vacunas aplicadas en la mucosa, las cuales han tenido un éxito variado en la inducción de respuestas inmune. La saponina Quil-A ha mostrado previamente no tener efecto en la inducción de una respuesta inmune cuando el antígeno se administra en
20 forma intranasal (Gizurarson y Asociados, 1994, *Vaccine Research*, 3, 23-29). Entre tanto, otros autores han utilizado este adyuvante con éxito (Maharaj y Asociados, *Can. J. Microbiol.* 1986, 32(5):414-20; Chavall y Campbell, *Immunology*, 174(3):347-59). Los ISCOMs que comprenden
25 la saponina Quil A, han sido utilizados en formulaciones de

vacunas Intragástricas e Intranasales y han exhibido actividad adyuvante (Mcl Mowat y Asociados, 1991, *Immunology*, 72, 317-322; Mcl Mowat y Donachie, *Immunology Today*, 12, 383-385). QA21, la fracción no tóxica de Quil A, también ha sido descrita como un adyuvante oral o Intranasal (Sumino y Asociados, *J. Virol.*, 1998, 72(6):4931-9; Publicación WO 98/56415).

La presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que la administración combinada de una citocina TH-1, tal como IL-18 y de una composición inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante de saponina tal como, pero sin limitarse a, QS-21 es extremadamente potente y proporciona una profilaxis o tratamiento eficiente y bien tolerado de enfermedades infecciosas, enfermedades neoplásicas primarias y metastáticas (por ejemplo, cánceres), enfermedades autoinmune y condiciones relacionadas, y es particularmente efectiva para inhibir el crecimiento de células de cáncer humano que expresan un antígeno asociado con tumor.

Sumario del Invento

Por consiguiente se proporciona un método para elicitar una respuesta inmune mejorada a un antígeno en un paciente, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad segura y efectiva de i) una

composición inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina, e ii) un polipéptido IL-18 o fragmento o variante bioactivo del mismo. En otra
5 modalidad, la presente invención proporciona un método para reducir la severidad de un cáncer en un paciente, en donde el método incluye tratar tumores establecidos previamente (tumores primarios y tumores metastáticos) o prevenir recurrencias de cáncer, en donde el método
10 comprende administrar al paciente que necesita del mismo, una cantidad segura y efectiva de i) un polipéptido IL-18 ó un fragmento o variante bioactiva del mismo e ii) una composición inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un antígeno asociado con tumor o un derivado
15 inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina.

En una modalidad, el polipéptido IL-18 es un polipéptido IL-18 de murino o humano o un fragmento o variante inmunogénico del mismo. En otra modalidad el antígeno es un antígeno asociado con tumor. Aún en otra
20 modalidad, la saponina es una fracción no tóxica de Quil A, por ejemplo QS-17 ó QS-21. En un ejemplo, la saponina es Qs-21. Por consiguiente, en una modalidad, la presente invención se refiere a un método para reducir la severidad de un cáncer en un paciente, incluyendo tratar tumores
25 establecidos previamente (tumores primarios o tumores

metastáticos) o prevenir las recurrencias de cáncer, particularmente carcinoma de seno, de pulmón (particularmente carcinoma de pulmón de célula no pequeña), melanoma, colorrectal, de ovarios, próstata, vejiga, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, gástrico y otros GI (gastrointestinales), en particular cáncer de esófago, en donde el método comprende administrar al mamífero, i) una composición inmunogénica, en particular una vacuna, que comprende un antígeno asociado con el tumor o un derivado inmunogénico del mismo y QS-21, e ii) polipéptido IL-18 y fragmento bioactivo o variante del mismo.

La presente Invención también se refiere a una preparación combinada que comprende en la forma de ingredientes activos los siguientes componentes individuales: (1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento o variante bioactivo del mismo, y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o un adyuvante de saponina, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, por separado o en secuencias para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cánceres, incluyendo tumores primarios y tumores metastáticos, enfermedades autoinmunes y condiciones relacionadas. En una modalidad, la composición inmunogénica dentro de la preparación combinada contiene un químico

inmunoestimulante adicional seleccionado del grupo que comprende: colesterol, 3D-MPL, un oligonucleótido Inmunoestimulador, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, tocoferol y una emulsión de aceite en agua o una
5 combinación de dos o más de dichos adyuvantes. Por ejemplo, el adyuvante adicional puede ser un oligonucleótido Inmunoestimulador.

En un aspecto relacionado, la presente invención también proporciona un equipo farmacéutico que comprende
10 en la forma de ingredientes activos los siguientes componentes individuales: (1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento o variante bioactivo del mismo, y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de
15 saponina, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, por separado o en secuencias para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cánceres, incluyendo tumores primarios y tumores metastáticos, y enfermedades autoinmunes.

20 La presente invención se refiere además al uso de (1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento o variante bioactivo del mismo, y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina, en la fabricación de un
25 medicamento para lograr una respuesta inmune protectora o

reducir la severidad de una enfermedad en un paciente, administrando al paciente una cantidad segura y efectiva de ambos componentes.

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

10 **Descripción Detallada del Invento**

En una forma de la presente invención, el adyuvante de saponina dentro de las composiciones Inmunogénicas es una fracción no tóxica de Quil A, por ejemplo QS-17 ó QS-21, por ejemplo QS-21. El antígeno puede ser un antígeno
15 derivado de un organismo infeccioso, por ejemplo un antígeno asociado con tumor o derivado Inmunogénico o derivado del mismo. En una modalidad, la citocina TH-1 es un fragmento bioactivo de murino o de humano IL-18 del mismo. La composición inmunogénica e IL-18, pueden
20 actuar en forma sinérgica en la inducción del anticuerpo específico del antígeno, y pueden ser potentes para inducir o mejorar las respuestas inmune celulares y/o humorales asociadas normalmente con el sistema inmune tipo TH-1. Por la frase "aumento de respuesta Inmune" se entiende el
25 incremento total en la respuesta inmune, tal como se

determina mediante la respuesta inmune humoral y/o transmitida por células, o por la inducción del tamaño y/o carga del tumor. Por el término "sinergia" se entiende que el polipéptido IL-18 ó el fragmento o variante inmunogénico del mismo tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune cuando se administra en una terapia combinada con la composición inmunogénica de la presente invención, y la presencia de dicha composición inmunogénica puede aumentar la eficacia el polipéptido IL-18 ó fragmento inmunogénico o variante del mismo. El resultado de la inducción de la respuesta inmune puede ser profilaxis, reducción de la severidad de la enfermedad (incluyendo, en el caso de cáncer, reducción de tumores establecidos previamente, primarios o metástasis, o prevención de recurrencias de cáncer), y/o terapia.

Por consiguiente, en una modalidad, se proporciona un método para generar una respuesta inmune a un antígeno en un mamífero, en donde el método comprende administrar a un mamífero i) una cantidad efectiva de una composición inmunogénica que comprende un antígeno derivado de un organismo infeccioso, o un antígeno asociado con tumor y QS-21, e ii) un polipéptido IL-18 ó fragmento o variante bioactivo del mismo. En una modalidad, ambos de los componentes del tratamiento se proporcionan en secuencias. Esto es que la composición inmunogénica se

utiliza para reforzar una respuesta inmune humoral y/o celular imprimada por la administración de IL-18. Como alternativa, en otra modalidad, la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención se utiliza para
5 imprimir una respuesta inmune humoral y/o celular en un individuo el cual recibirá posteriormente IL-18. Aún en otra modalidad ambos componentes del tratamiento se administran en forma simultánea, ya sea mediante co-administración en dos diferentes sitios o mezclados en
10 adiciones dentro de la misma preparación. Los expertos en la técnica comprenderán que tanto la composición inmunogénica como el polipéptido IL-18 o fragmento o variante inmunogénico del mismo, se pueden administrar una vez o en forma repetida.

15 La terapia de combinación tal como se contempla dentro del alcance de la presente invención, es al menos tan efectiva, por ejemplo con eficacia incrementada, comparada con cualquier componente usado solo. Especialmente en el campo del cáncer, el tratamiento
20 combinado es conveniente debido a que combina dos agentes anti-cáncer, operando cada uno en un modo aditivo, por ejemplo en forma sinérgica, a través de un mecanismo de acción diferente para producir una respuesta citotóxica mejorada contra células de tumor humano.

25 En una modalidad relacionada, se proporciona una

preparación combinada (por ejemplo, un empaque de frasco múltiple farmacéutico) que comprende en la forma de ingredientes activos (1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento o variante bioactivo del mismo, y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante de saponina, siendo los ingredientes activos para el uso simultáneo, por separado o en secuencias para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, y cáncer.

Por el término "preparación combinada", se entiende una preparación farmacéutica, o un paquete farmacéutico (de frascos múltiples) o aparato de suministro el cual puede contener una o más formas de dosificación por unidad que contienen los ingredientes activos. El paquete puede comprender por ejemplo lámina de metal o plástico, tal como un empaque de burbuja. El paquete o aparato de suministro puede estar acompañado por instrucciones para administración. Cuando el polipéptido IL-18 ó fragmento o variante bioactivo del mismo y la composición inmunogénica están proyectados para administración en la forma de dos composiciones separadas, se pueden presentar en la forma de, por ejemplo, un paquete de frascos múltiples. Los ingredientes activos que se administran ya sea al mismo tiempo, o por separado, en secuencias, de acuerdo con la presente invención, no representan un mero agregado de agentes conocidos, aunque una nueva combinación con la

propiedad sorprendentemente valiosa de que el uso de un polipéptido IL-18 o fragmento o variante inmunogénico del mismo, permite la simulación de ambos de los componentes innatos y adaptivos del sistema inmune, incluyendo
5 activación de célula NK, así como respuestas inmune transmitidas por célula T y producción de citocinas, incrementando de este modo la eficacia de la composición inmunogénica. Esto da como resultado un tratamiento nuevo y efectivo. Quedará entendido que la preparación
10 combinada, también designada como equipo de partes, significa que los componentes de la preparación combinada no se encuentran necesariamente como una unión, por ejemplo, en composición, con el objeto de estar disponibles para aplicación por separado o en secuencias. Por lo tanto,
15 la expresión equipo de partes, significa que no es necesariamente una combinación real, en virtud de la separación física de los componentes.

La preparación combinada puede ser utilizada ya sea para el tratamiento o profilaxis de cáncer, en particular para
20 reducción de la severidad de cáncer o la prevención de recurrencias de cáncer. Los cánceres que pueden beneficiarse de la terapia combinada tal como se describe en la presente invención, impiden cualquier enfermedad caracterizada por crecimiento de célula no controlado y
25 proliferación, lesiones preneoplásticas, tumores primarios y

lesiones neoplásicas metastáticas, e incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de seno, pulmón (particularmente de pulmón de célula no pequeña - NSCLC - carcinoma), melanoma, colorrectal, de ovarios, próstata, vejiga, 5 carcinoma escamoso de cabeza y cuello, gástrico, y otros GI (gastrointestinales), en particular cáncer de esófago, leucemia, linfoma, mieloma y plasmacitoma.

Los antígenos de ejemplo o derivados y fragmentos de los mismos, incluyendo péptidos (por ejemplo menores a 10 aproximadamente 50 aminoácidos), incluyen los antígenos codificados por la familia de MAGE (genes que codifican antígeno de melanoma) los cuales son conocidos como antígenos de cáncer (-testículos) (Gaugler B. y Asociados, *J. Exp. Med.*, 1994, 179:921; Weynants P. y Asociados, *Int. J. Cancer*, 1994, 56:826; Patard J. J. y Asociados, *Int. J. Cancer*, 1995, 64:60). Los cánceres que expresan proteínas MAGE son conocidos como tumores asociados con MAGE. Los genes MAGE pertenecen a una familia de genes relacionados en forma cercana, incluyendo por ejemplo, 20 MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (gen-3 que codifica 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 comparten entre sí del 64 al 85% de homología en su secuencia de codificación (De Plaen E. y 25 Asociados, *Immunogenetics*, 1994, 40, 360-369). 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).
 Dos de los otros grupos de proteína también son parte de la
 5 familia MAGE aunque en forma relacionada más distante.
 Existe el grupo MAGE B y MAGE C. La familia MAGE B
 incluye MAGE B1 (también conocida como MAGE Xp1, DAM
 10), MAGE B2 (también conocido como MAGE Xp2 y DAM 6)
 MAGE B3 y MAGE B4 - la familia MAGE C incluye
 10 normalmente MAGE C1 y MAGE C2. En términos generales,
 se puede definir una proteína MAGE como conteniendo una
 signatura de secuencia de núcleo hacia el extremo de
 terminal-C de la proteína (por ejemplo con respecto a MAGE
 A1, una proteína de 309 aminoácidos, en donde la signatura
 15 del núcleo corresponde al aminoácido 195 a 279).

El patrón de consenso de la signatura de núcleo se
 describe por lo tanto como se indica a continuación, en
 donde X representa cualquier aminoácido, se conservan los
 residuos del cuadro inferior (variantes conservadoras
 20 permitidas) y los residuos del cuadro superior se conservan
 perfectamente.

Signatura de secuencia de núcleo:

LlxvL(2x)l(3x)g(2x)apEExIWexl(2x)m(3-4x)Gxe(3-
 4x)gxp(2x)llt(3x)VqexYLxYxqVPxsxP(2x)yeFLWGprA(2x)Et(3
 25 x)kv

Las substituciones conservadoras son bien conocidas y generalmente se establecen como las matrices de marcación por default en programas por computadora de alineación de secuencias. Estos programas incluyen

5 PAM250 (Dayhoff M. O. y Asociados, 1978, "A model of evolutionary changes in proteins", en "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M. O. Dayhoff (ed.), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington, y

10 Blosum 62 (Steven Henikoff & Jorja G. Henikoff (1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks", Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89 (Biochemistry): 10915-10919.

En términos generales, la substitución dentro de los siguientes grupos son substituciones conservadoras, aunque las substituciones entre los grupos se consideran

15 como no conservadas. Los grupos son:

- i) aspartato/asparagina/glutamato/glutamina,
- ii) serina/treonina,
- iii) lisina/arginina,
- iv) fenilalanina/tirosina/triptófano,
- 20 v) leucina/isleucina/valina/metionina,
- vi) glicina/alanina.

En general, y dentro del contexto de la presente invención, una proteína MAGE será aproximadamente el 50% idéntica en esta región del núcleo a los aminoácidos

25 195 a 279 de MAGE A1.

MAGE-3 se expresa en el 69% de los melanomas (Gaugler B. y Asociados, J. Exp. Med., 1994, 179:921), y también se puede detectar en el 44% de NSCLC (Yoshimatsu T. J. Surg. Oncol., 1998, 67, 126-129), 75% de los cánceres de pulmón de célula pequeña (SCLC) (Traversari C. y Asociados, Gene Ther. 1997, 4:1029-1035), 48% de los carcinomas de célula escamosa de cabeza y cuello, el 34% de los carcinomas de célula de transición de vejiga, el 50% de los carcinomas de esófago, el 32% de los cánceres de colon y el 24% de los cánceres de seno (Van Pel A. y Asociados, Immunol. Rev. 1995, 145:229; Inoue H. y Asociados, Int. J. Cancer, 1995, 63:523; Nishimura S. y Asociados, Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 1997, Apr, 20 (2): 95-101). Se han identificado diversos epítopes CTL en la proteína MAGE-3, ya sea para los alelos de molécula MHC clase I HLA.A1, ó HLA.A2 (Van der Bruggen P. y Asociados, Eur. J. Immunol. 1994, 24, 3038-3043), y HLA.B44 (Herman, J. y Asociados, Immunogenetics, 1996, 43, 377-383), respectivamente.

Aunque se ha detectado MAGE-3 en melanomas, cánceres de pulmón y de esófago, el nivel de expresión de estos antígenos en pacientes con tumores asociados con MAGE parece ser limitado y debajo del valor de umbral del reconocimiento inmune (Welsser T. S. y Asociados, Ann. Thorac. Surg. 2001, 71:295-302).

Otros antígenos de ejemplo o derivados o fragmentos de los mismos incluyen antígenos MAGE tales como los que se describen en la Publicación WO 99/40188, PRAME (WO 96/10577), BAGE, RAGE, LAGE 1 (Publicación WO 98/32855), LAGE 2 (también conocido como NY-ESO-1, Publicación WO 98/14464), XAGE (Liu y Asociados, Cancer Res, 2000, 60:4752-4755; WO 02/18584) SAGE, y HAGE (WO 99/53061) ó GAGE (Robbins and Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, páginas 628-636; Van den Eynde y Asociados, International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentado 1997); Correale y Asociados (1997), Revista del Instituto Nacional de Cáncer 89, p293. De hecho estos antígenos se expresan en un amplio rango de tipos de tumor tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga.

En una modalidad se utilizan antígenos de próstata, tales como antígenos de cáncer de próstata o antígeno de diferenciación específica de próstata (PSA), PAP, PSCA (PNAS 95(4) 1735-1740, 1998), PSMA ó el antígeno conocido como prostasa.

En otra modalidad, el antígeno de próstata es P501S o un fragmento del mismo. P501S también denominado como prostelina (Xu y Asociados, Cancer Res. 61, 2001, 1563-1568), es conocido como la SEQ ID NO:113 de la Publicación No. WO 98/37814 y es una proteína de 553

aminoácidos. Los fragmentos y proteínas Inmunogénicas del mismo, comprenden 20 ó al menos 20, 50 ó al menos 50 ó 100 ó al menos 100 aminoácidos contiguos, tal como se describe en la Sollicitud de Patente referenciada
5 anteriormente y se contemplan de manera específica en la presente invención. Los fragmentos que pueden ser utilizados se describen en la Publicación No. WO 98/50567 (antígeno PS108) y en la forma de una proteína asociada con cáncer de próstata (SEQ ID NO:9 de la Publicación WO
10 99/67384). Otros fragmentos que pueden ser utilizados son los aminoácidos 51 a 553, 34 a 553, ó 55 a 553 de la proteína P501S de longitud total. Particular, se puede contemplar la construcción 1, 2, y 3 (ver figura 2, secuencias 27 a 32) y se pueden expresar en sistemas de
15 levadura, por ejemplo secuencias de ADN que codifican dichos polipéptidos se pueden expresar en un sistema de levadura.

La prostasa es una proteasa de serina específica de la próstata (tipo tripsina), con 254 aminoácidos de longitud,
20 con una tríada catalítica de proteasa de serina conservada H-D-S y una secuencia de pre-propéptido de terminal amino que indica una función de segregación potencial (P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Linas, L. Hood y K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an
25 androgen-regulated serine protease with prostate restricted

expression, en Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1999) 96, 3114-3119). Se ha descrito un sitio de glucosilación putativa. La estructura anticipada es muy similar a otras proteasas de serina conocidas, mostrando que el polipéptido maduro se
5 dobla en un solo dominio. La proteína madura tiene 224 aminoácidos de longitud, con al menos un epítipo A2 mostrado como procesado en forma natural. La secuencia de nucleótidos de prostasa y la secuencia de polipéptidos deducidos y homólogos se describen en la Publicación de
10 Ferguson y Asociados (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1999, 96, 3114-3119) y en las Solicitudes de Patente Internacional Nos. WO 98/12302 (y también en la Patente otorgada correspondiente No. US 5,955,306), WO 98/20117 (y también en las Patentes otorgadas correspondientes Nos.
15 US 5,840,871 y US 5,786,148) (callicreína específica de próstata) y WO 00/04149 (P703P).

Otros antígenos específicos de la próstata son conocidos a partir de las Publicaciones WO 98/37418, y WO/004149. Otro es STEAP (PNAS 96 14523 14528 7 - 12
20 1999).

Otros antígenos asociados con tumor útiles dentro del contexto de la presente invención incluyen: Plu -1 J. Biol. Chem. 274 (22) 15633-15645, 1999, HASH -1, HASH-2 (Alders, M. y Asociados, Hum. Mol. Genet. 1997, 6, 859-
25 867), Cripto (Salomon y Asociados, Bioessays 199, 21 61 -

70, Patente 5654140), CASB616 (WO 00/53216), Criptin (US 5,981,215). Además, los antígenos particularmente relevantes para vacunas en la terapia de cáncer también comprenden tirosinasa, telomerasa, P53, NY-Br1.1 (WO 01/47959), y fragmentos de los mismos tal como se describe en las Publicaciones 00/43420, B726 (WO 00/60076, SEQ ID NOs: 469 y 463; WO 01/79286, SEQ ID NOs:474 y 475), P510 (WO 01/34802 SEQ ID NOs:537 y 538), y survivina.

La presente invención también es útil en combinación con antígenos de cáncer de seno tales como Her-2/neu, mamaglobina (Patente Norteamericana No. 5,668,267), B305D (WO00/61753 SEQ ID NOs:299, 304, 305, y 315), o aquellas que se describen en las Publicaciones WO00/52165, WO99/33869, WO99/19479, WO 98/45328. Los antígenos Her-2/neu se describen inter alla, en la Patente Norteamericana No. 5,801,005. El Her-2/neu puede comprender todo el dominio extracelular (que comprende aproximadamente los aminoácidos 1 a 645) o fragmentos de los mismos y al menos una parte inmunogénica de, o todo el dominio extracelular aproximadamente los 580 aminoácidos de terminal-C. En particular, la porción intracelular puede comprender el dominio de fosforilación o fragmentos del mismo. Dichas construcciones se describen en la Publicación WO00/44899. Una construcción que se puede utilizar es conocida como ECD-PhD, una segunda es

conocida como ECD deltaPhD (ver Publicación WO00/44899) también denominada dHer2. El Her-2/neu tal como se utiliza en la presente invención, puede derivarse de, por ejemplo, rata, ratón, o humano.

5 Ciertos antígenos de tumor son antígenos de péptido pequeños (es decir con menos de aproximadamente 50 aminoácidos). Los péptidos de ejemplo incluyen péptidos derivados de mucina tales como MUC-1 (ver por ejemplo la Patente Norteamericana No. US 5,744,144; Patente
10 Norteamericana No. US 5,827,666; Publicación WO88/05054, Patente Norteamericana No. US 4,963,484). Específicamente contemplados son los péptidos derivados de MUC-1 que comprenden al menos una unidad de repetición del péptido MUC-1, o al menos dos de dichas
15 repeticiones y que son reconocidos por el anticuerpo SM3 (Patente Norteamericana No. US 6,054,438). Otros péptidos derivados de mucina incluyen péptido de MUC-5.

 Como alternativa, el antígeno puede ser una interleucina tal como IL-13 e IL-14. El antígeno puede ser
20 una hormona de auto-péptido tal como la hormona que libera hormona de gonadotropina de longitud total (GnRH, WO95/20600), un péptido largo de 10 aminoácidos cortos, útil en el tratamiento de muchos cánceres, o en inmunocastración. Otros antígenos específicos de tumor
25 incluyen, pero no están restringidos a gangliósidos

específicos de tumor tales como GM2 y GM3.

El antígeno también puede ser derivado de fuentes que son patogénicas para humanos, tales como virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 (tal como tat, nef, transcriptasa inversa, gag, gp120 y gp160), virus de herpes simple de humano, tal como gD ó derivados de los mismos o proteína temprana inmediata tal como ICP27 de HSV1 ó HSV2, citomegalovirus ((especie humana)(tal como gB ó derivados del mismo), rotavirus (incluyendo virus atenuados vivos) virus de Epstein Barr (tal como gp350 ó derivados del mismo), virus de varicela Zoster (tal como gp1, II y IE63) ó de virus de hepatitis tal como virus de hepatitis B (por ejemplo antígeno de superficie de hepatitis B ó un derivado del mismo), virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus: virus sincitial respiratorio (tal como proteína F y G o derivados de los mismos), virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18, ...), flavivirus (por ejemplo, Virus de fiebre amarilla, virus de dengue, virus de encefalitis por nacimiento de garrapatas, virus de encefalitis japonesa) o virus de Influenza (virus completo vivo o inactivado, virus de Influenza dividido, crecimiento en huevos o células MDCK, o virusomas flu completos (tal como se describe en la Publicación de R. Gluck, Vaccine,

1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tal como proteínas HA, NP, NA, ó M, o combinaciones de los mismos) o derivadas de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo N. gonorrhea, y N. meningitidis (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de enlace de transferina, proteínas de enlace de lactoferrina, PIIC, adhesinas); *S. pyrogenos* (por ejemplo, proteínas M ó fragmentos de los mismos, proteasa C5A, ácido lipoteicoico), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, 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 pertussis o derivados de los mismos, hemaglutinina filamentosa, ciclasa de adenilato, fimbriae), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, Antígeno 85A, -C, ó -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxico (por ejemplo factores de colonización, toxina débil con calor o derivados de los mismos, toxina estable con calor o derivados de los mismos), *E. coli* enterohemorrágico, *E. coli* enterohepatogénico (por

ejemplo, toxina tipo toxina shiga o derivados de los
 mismos); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo
 toxina de cólera o derivados de los mismos); *Shigella spp.*,
 incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia*
 5 *spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una
 proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*;
Campylobacter spp., incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo,
 toxinas, adhesinas, e invasinas), y *C. coli*; *Salmonella spp.*,
 incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S.*
 10 *enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*;
Helicobacter spp., incluyendo *H. pylori* (por ejemplo,
 ureasa, catalasa, toxina de vacuolación); *Pseudomonas*
spp., incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*,
 incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*,
 15 incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*,
 incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina de tétanos y
 derivados de los mismos), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina
 de botulino y derivados de los mismos), *C. difficile* (por
 ejemplo, toxinas de clostridio A ó B, y derivados de los
 20 mismos); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por
 ejemplo, toxina de botulino y derivados de los mismos);
Corynebacterium spp., incluyendo *C. diphtheriae* (por
 ejemplo, toxina de difteria y derivados de los mismos);
Borrelia spp., incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA,
 25 OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC,

DbpA, DbpB), *B. afzelli* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente del *Ehrlichiosis* granulocítico humano; *Rickettsia* 5 *spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de enlace de heparina); *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de enlace de heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T.* 10 *pallidum* (por ejemplo, las proteínas de membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o derivados de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo 15 *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.* 20 *mansoni*, ó derivados de levadura tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos para *M. tuberculosis* son por ejemplo Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, 25 mTTC2, y hTCC1 (Publicación WO 99/51748). Las proteínas

para *M. tuberculosis* también proteínas de fusión y variantes de los mismos en donde al menos dos o al menos tres polipéptidos de *M. tuberculosis* están fusionados en una proteína más grande. Los ejemplos de fusiones incluye
5 Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (Publicación WO 99/51748).

Los antígenos de *Chlamydia* incluyen por ejemplo la Proteína de Alto Peso Molecular (HWMP) (Publicación WO
10 99/17741); ORF3 (Patente EP 386,412), y las proteínas de membrana putativa (Pmps). Otros antígenos de *Chlamydia* de la formulación de vacunas pueden ser seleccionados del grupo que se describe en la Publicación WO 99/28475.

Los antígenos bacterianos pueden derivarse de
15 *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteína de enlace de colina) y el antígeno de proteína *Pneumolysin* (Biochem. Biophys. Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y Asociados, Microbial
20 Pathogenesis, 25, 337-342), y derivados destoxificados mutantes de los mismos (Publicaciones WO 90/06951 y WO 99/03884). Otros antígenos bacterianos se derivan de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados de los mismos), *H. influenzae* sin
25 tipo, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular,

P5, P6, proteína D, y lipoproteínas D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (Patente Norteamericana No. 5,843,464), o variantes de copias múltiples o proteínas de fusión de los mismos.

5 Los derivados del antígeno de superficie de hepatitis B son conocidos en la técnica e incluyen, inter alia, los antígenos PreS1, PreS2 S, descritos en la Solicitudes de Patente Europea No. EP-A-414,374; EP-A-0304-578, y EP-198-474. En una modalidad el antígeno HBV es polimerasa
10 HBV (Ji Hoon Jeong y Asociados, 1996, BBRC 223, 264-271; Lee H. J. y Asociados, Biotechnol. Lett. 15, 821-826). Los antígenos derivados de VIH también están contemplados, tales como antígeno de VIH-1 gp120, especialmente cuando se expresan en células CHO.

15 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 los serotipos HPV considerados como responsables de verrugas genitales
20 (HPV 6 ó HPV 11 y otros), y los virus HPV responsables de cáncer cervical (HPV16, HPV18 y otros). Los antígenos HPV adecuados son E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2. Los ejemplos de formas de fusiones profilácticas o terapéuticas para verrugas genitales comprenden partículas L1 ó
25 capsómeros, y proteínas de fusión que comprenden uno o

más antígenos seleccionados de las proteínas HPV 6 y HPV 11, E6, E7, L1 y L2. Los ejemplos de proteínas de fusión son: L2E7 que se describen en la Publicación WO96/26277, y la proteína D(1/3)-E7 que se describe en la Publicación
5 WO99/10375. Una composición de vacuna terapéutica o para profilaxis infección o cáncer cervical HPV puede comprender antígenos HPV 16 ó 18. Por ejemplo, los monómeros L1 ó L2, o los antígenos L1 ó L2 presentados juntos como un virus tipo partícula (VLP) o la proteína L1
10 sola presentada sola en una estructura VLP o de capsómero. Dichos antígenos, partículas tipo virus y capsómeros son conocidos por sí mismos. Ver por ejemplo las Publicaciones Nos. WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792, y WO93/02184.

15 Las proteínas tempranas adicionales pueden incluirse solas o como proteínas de fusión tales como E7, E2 ó E5, por ejemplo; otras modalidades incluyen un VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (Publicación WO96/11272). Los antígenos HPV 16 pueden comprender
20 las proteínas tempranas E6 ó E7 en fusión con un vehículo de proteína D para formar proteína D - fusiones E6 ó E7 de HPV 16 o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 ó E7 con L2 (Publicación WO96/26277).

Como alternativa las proteínas tempranas E6 y E7 de
25 HPV 16 ó 18 pueden presentarse en una sola molécula, por

ejemplo, una fusión de proteína D E6/E7. Otras fusiones contienen opcionalmente ya sea una o ambas de las proteínas E6 ó E7 de HPV 18, por ejemplo en la forma de una proteína de fusión de proteína D - E6 ó proteína D - E7
5 ó una proteína de fusión o proteína D E6/E7. Las fusiones pueden comprender antígenos de otras cepas HPV, por ejemplo de las cepas HPV 31 ó 33.

Los antígenos derivados de parásitos que originan malaria también están contemplados. Por ejemplo, los
10 antígenos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que contiene substancialmente toda la porción de terminal-C de la proteína de circumsporozoite (CS) de *P. falciparum* enlazada a través de cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno de
15 superficie de Hepatitis B al antígeno de superficie (S) del virus de hepatitis B. Su estructura total se describe en la Publicación WO93/10152. Cuando se expresa en RTS de levadura se produce como una partícula de lipoproteína, y cuando se expresa en conjunto con el antígeno S de HVB
20 produce una partícula mezclada conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la Publicación WO90/01496. Una modalidad de la presente invención, es una fusión en donde la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros
25 antígenos de plasmodia que son igualmente candidatos para

ser componentes de la fusión, son *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin; PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Psf16, Psf48/45, Pfs230 y sus
5 análogos en *Plasmodium spp.*

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "composición inmunogénica" se utiliza en su sentido más amplio para significar una composición que, al momento de la administración a un paciente, afecta de
10 manera positiva la respuesta inmune del paciente. Una composición inmunogénica que se proporciona al paciente con una respuesta inmune local o sistémica mejorada, ya sea respuestas inmunes celulares tales como respuestas inmunes CTL ó humorales, tal como la generación de
15 anticuerpos. En particular, la composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención puede referirse a una formulación que comprende una cantidad efectiva de un polipéptido/proteína de antígeno, por ejemplo un antígeno asociado con tumor, y un derivado inmunogénico del mismo,
20 por ejemplo fragmentos de los mismos, o el polinucleótido de codificación y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por el término "cantidad segura y efectiva" se entiende una dosis de proteína que, si es necesario en asociación con un adyuvante, cuando se administra a un humano, produce una
25 respuesta inmune detectable tal como una respuesta

humoral (anticuerpos) o una respuesta celular, tiene la capacidad de inmunomodular el sistema inmune, sin efectos secundarios significativamente adversos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo de qué Inmunogén específico sea empleado y de cómo se presente. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda de 1 a 5,000 µg de proteína, por ejemplo de 1 a 1,000 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 de una vacuna en particular puede determinarse a través de estudios estándar que comprenden observación de las respuestas inmune adecuadas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas en forma adecuada. La preparación de vacunas se describe generalmente en la Publicación Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press Nueva York). La encapsulación dentro de liposomas se describe en la Publicación de Fullerton, la Patente Norteamericana No. 4,235,877.

Los polipéptidos de antígeno inmunogénico se refieren a polipéptidos que reaccionan en forma detectable dentro de un inmunoensayo (tal como un ensayo de estimulación de célula-T ó ELISA) con antisuero y/o células-T de un paciente que expresa el polipéptido. La clasificación de

actividad inmunogénica puede llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichas clasificaciones se pueden llevar a cabo utilizando métodos tales como los que se describen en la

5 Publicación de Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En un ejemplo ilustrativo, se puede Inmovilizar un polipéptido en un soporte sólido y contactarse con el suero del paciente para permitir el enlace de anticuerpos dentro del suero al

10 polipéptido inmovilizado. El suero no enlazado se puede eliminar posteriormente y los anticuerpos enlazados se detectan utilizando, por ejemplo, proteína A etiquetada ¹²⁵I.

Los antígenos de polipéptido de la presente invención se proporcionan, por ejemplo, al menos el 80% puros, por

15 ejemplo el 90% puros tal como se visualiza mediante SDS PAGE. Los antígenos de polipéptido pueden aparecer como una sola banda mediante SDS PAGE.

Los derivados inmunogénicos tales como fragmentos o porciones inmunogénicas de antígenos, por ejemplo de

20 antígenos asociados con tumor o específicos de tumor también están comprendidos en la presente invención. Un "fragmento inmunogénico" tal como se utiliza en la presente invención, es un fragmento que por sí mismo es inmunológicamente reactivo (por ejemplo, enlace en forma

25 específica) con los receptores de antígeno de superficie de

célula-B y/o célula-T que reconocen el polipéptido. Las porciones inmunogénicas pueden ser identificadas generalmente utilizando técnicas bien conocidas, tales como las que se resumen en la Publicación de Paul, 5 *Fundamental Immunology*, 3ª edición, 243-247 (Raven Press, 1993) y las referencias ahí mencionadas. Dichas técnicas incluyen clasificación de polipéptidos que tengan la capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos de antígenos, antisueros y/o líneas o clones de célula-T.

10 Tal como se utiliza en la presente invención los antisueros y anticuerpos son "específicos-antígenos" si se enlazan en forma específica a un antígeno (por ejemplo reaccionan con la proteína en el ELISA u otro inmunoensayo, y no reaccionan en forma detectable con 15 proteínas no relacionadas. Dichos antisueros y anticuerpos se pueden preparar tal como se describe en la presente invención, utilizando técnicas bien conocidas.

En una modalidad, la porción inmunogénica de un polipéptido es una porción que reacciona con un antisuero y 20 células-T en un nivel que no es sustancialmente menor a la reactividad del polipéptido de longitud total (por ejemplo, en un ensayo ELISA y/o de reactividad de célula-T. El nivel de actividad inmunogénica de la porción inmunogénica puede tener al menos aproximadamente el 50%, al menos 25 aproximadamente el 70%, o mayor a aproximadamente 90%

de inmunogenicidad del polipéptido de longitud total. En algunos casos, las porciones inmunogénicas serán identificadas por tener un nivel de actividad inmunogénica mayor al del polipéptido de longitud total correspondientes, por ejemplo, que tienen más de aproximadamente 100% o 150% o más de actividad inmunogénica. En otras ciertas modalidades, las porciones inmunogénicas ilustrativas pueden incluir péptidos en los cuales se ha eliminado la secuencia líder de terminal-N y/o el dominio de transmembrana. Otras partes inmunogénicas ilustrativas contendrán una pequeña eliminación de terminal-N y/o -C (por ejemplo, aproximadamente de 1 a 50 aminoácidos, aproximadamente 1 a 30 aminoácidos, aproximadamente 5 a 15 aminoácidos), en forma relativa a la proteína madura.

En otra modalidad, las composiciones inmunogénicas ilustrativas, tales como por ejemplo composiciones de vacuna de la presente invención, comprenden un polinucleótido que codifica uno o más de los polipéptidos tal como se describe anteriormente, de modo que el polipéptido se genere *in situ*. El polinucleótido puede administrarse dentro de cualquiera de una variedad de sistemas de suministro conocidos. De hecho, en el arte se conocen numerosas técnicas de suministro de genes, tales como las que se describen en la publicación de Rolland, Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, 1998 y las

referencias ahí mencionadas. Por supuesto los sistemas de expresión de polinucleótidos adecuados contendrán las secuencias reguladoras de ADN necesarias para la expresión en un paciente (tal como un promotor y una señal de terminación adecuados). Como alternativa, los sistemas de suministro bacteriano pueden comprender la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido en su superficie celular o segrega un epítope.

10 En una modalidad de la presente invención, se administra/suministra un polinucleótido en la forma de ADN "descubierto, por ejemplo tal como se describe en la publicación de Ulmer y asociados., Science 259:1745-1749, 1993 y revisado por Cohen, Science 259:1691-1692. La
15 captación de ADN desprotegido puede incrementarse recubriendo el ADN en cuentas biodegradables las cuales se transportan de manera eficiente en las células. En una modalidad, la composición se administra en forma intradérmica. En particular, la composición se administra
20 por medio de técnicas de administración de pistola de genes (particularmente bombardeo de partículas) las cuales comprenden recubrir el vector en una cuenta (por ejemplo oro), la cual posteriormente se administra bajo alta presión dentro de la epidermis; tal como, por ejemplo, como se
25 describe en la publicación de Haynes y asociados., J

Biotechnology 44:37-42 (1996).

En un ejemplo ilustrativo, se puede lograr la aceleración de partículas operada por gas con aparatos tales como los fabricados por Powderject Pharmaceuticals PCL (Oxford, UK) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI),
5 algunos ejemplos de los cuales se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; y Patente EP No. 0500 799. El método ofrece una estrategia de suministro libre de agujas
10 en donde la formulación en polvo seco de partículas microscópicas, tales como polinucleótido, son aceleradas a alta velocidad dentro de un chorro de gas helio generado por un aparato portátil, que impulsa las partículas en un tejido objetivo de interés, normalmente la piel. Las
15 partículas pueden ser cuentas de oro con un diámetro de 0.4 – 4.0 μm , 0.6-2.0 μm y el conjugado de ADN se recubre en estas y posteriormente se guarda en un cartucho o cinta para colocarse en la "pistola genética".

En una modalidad relacionada, otros aparatos y
20 métodos que pueden ser útiles para la inyección sin aguja operada por gas de composiciones de la presente invención, incluyen los proporcionados por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos de los ejemplos de dichos aparatos se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 4,790,824; 5,064,413;
25 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 y 5,993,412.

Por consiguiente, en ciertas modalidades, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos inmunogénicos aquí descritos, son introducidos en células huésped de mamífero adecuadas para expresión utilizando cualquiera de un número de sistemas a base de virales conocidos. En una modalidad ilustrativa, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente y efectiva para sistemas de suministro de genes. Una secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica un polipéptido de la presente invención, se puede insertar en un vector y empacarse en partículas retrovirales utilizando las técnicas conocidas en el arte. El virus recombinante posteriormente puede ser aislado y suministrado a un sujeto. Se ha descrito un número de sistemas retrovirales ilustrativos (por ejemplo, Patente Norteamericana No. 5,219,740; Miller y Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa y asociados (1991) Virology 180:849-852; Burns y asociados (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109.

Además, también se ha descrito un número de sistemas a base de adenovirus ilustrativos. A diferencia de los retrovirus, los cuales se integran en el genoma huésped, los adenovirus persisten en forma extracromosomal, minimizando de esta forma los riesgos asociados con

mutagénesis de inserción (Haj-Ahmad and Graham (1986) J. Virol. 57:267-274; Bett y asociados (1993) J. Virol. 67:5911-5921; Mittereder y asociados (1994) Human Gene Therapy 5:717-729; Seth y asociados (1994) J. Virol. 68:933,940;

5 Barr y asociados (1994) Gene Therapy 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629; y Rich y asociados (1993) Human Gene Therapy 4:461-476). Ya que los humanos algunas veces son infectados por serotipos de adenovirus humanos comunes tales como AdHu5, una

10 proporción significativa de la población tiene una respuesta de anticuerpos de neutralización a los adenovirus, lo cual es probablemente para llevar a cabo la respuesta inmune a un antígeno heterólogo en un sistema base de vacuna recombinante. Los vectores adenovirales de primates no

15 humanos, tales como adenovirus de chimpancé 68 (AdC68, Fitzgerald y asociados (2003) J. Immunol 170 (3):1416-22)) pueden ofrecer un sistema adenoviral alternativos en la desventaja de la respuesta de neutralización de anticuerpos existente previamente.

20 También se han desarrollado diversos sistemas de vector de virus adeno-asociados (AAV), para el suministro de polinucleótidos. Los vectores AAV pueden ser contruidos fácilmente utilizando técnicas bien conocidas en le arte. Por ejemplo ver las Patentes Norteamericanas

25 Nos. 5,173,414 y 5,139,941; las Publicaciones

Internacionales Nos. WO 92/01070 y WO 93/03769; la publicación de Lebkowski y asociados (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent y asociados (1990) *Vacunas 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinión In Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. And Immunol.* 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling and Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; and Zhou y asociados (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

- 10 Los vectores virales adicionales útiles para administrar las moléculas de ácido nucleíco que codifican los polipéptidos de la presente invención mediante transferencia de genes, incluyen los derivados de la familia de virus pox tales como vacunas de virus y virus pox avian.
- 15 A manera de ejemplo, las vacunas de virus recombinantes que expresan las moléculas novedosas, pueden ser construidas tal como se indica a continuación. El ADN que codifica un polipéptido se inserta primero en un vector adecuado de modo que quede adyacente a un promotor de
- 20 vacunas y flanquee las secuencias de ADN de la vacuna, tales como las secuencias que codifican cinasa de timidina (TK). Posteriormente este vector se utiliza para transfectar células las cuales se infectan en forma simultánea con vacunas. La recombinación homóloga sirve para insertar el
- 25 promotor de vacuna más el gen que codifica el polipéptido

de interés en el genoma viral. El TK.sup.(-) recombinante resultante, puede seleccionarse cultivando las células en la presencia de 5-bromodesoxiuridina y levantando las placas virales resistentes al mismo.

- 5 Se puede utilizar de manera conveniente un sistema de infección/transfección a base de vacunas para proporcionar una expresión o co-expresión inducible temporal, de uno o más polipéptidos descritos en la presente invención en células huésped de un organismo. En este sistema en
- 10 particular, las células se infectan primero *in vitro* con un virus de vacuna recombinante que codifica la polimerasa de ARN de bacteriofago T7. Esta polimerasa despliega una especificidad exquisita en cuanto que únicamente transcribe plantillas que contienen los promotores T7. Después de la
- 15 infección las células se transfectan con el polinucleótido o polinucleótidos de interés conducidos por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus de vacuna recombinante, transcribe el ADN transfectado en ARN, el cual posteriormente se traduce en el polipéptido a
- 20 través de la maquinaria de traducción de huésped. El método proporciona una producción citoplásmica, temporal, de alto nivel de grandes cantidades de ARN y sus productos. Ver por ejemplo la publicación de Elroy-Stein y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1990) 87:6743-6747;
- 25 Fuerst y asociados. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1986)

83:8122-8126.

Como alternativa, los avipoxvirus, tales como los virus de aves de corral y canario, también pueden utilizarse para suministrar las secuencias de codificación de interés. Los virus de avipox recombinantes, que expresan Inmunogenes de patógenos mamíferos, son conocidos por conferir inmunidad protectora cuando se administran a especies no avian. El uso de un vector Avipox es particularmente deseable en humanos y otras especies de mamíferos, ya que los miembros de los géneros avipox únicamente pueden replicarse de manera productiva en especies avian susceptibles y por consiguiente no infectan las células de mamíferos. Los métodos para producir Avipoxvirus recombinantes son conocidos en la técnica y emplean recombinación genética, tal como se describió anteriormente con respecto a la producción de virus de vacunas. Ver por ejemplo las publicaciones WO 91/12882; WO 89/03429; y WO 92/03545.

También se pueden utilizar cualquiera de un número de vectores de alfavirus para suministrar composiciones de polinucleótidos de la presente invención, tal como los vectores que se describen en las Patente Norteamericanas Nos. 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 y 6,015,694. También se pueden utilizar ciertos vectores basados en Encefalitis de Equino de Venezuela (VEE), los ejemplos ilustrativos se

pueden encontrar en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,505,947; y 5,643,576.

Los vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos antigénicos se administran en una cantidad tal que será profiláctica o terapéuticamente efectiva. La cantidad que será administrada puede estar dentro del rango de un programa a 16 miligramos, 1 picograma a 10 microgramos para el suministro transmitido por partículas, y 10 microgramos a 16 miligramos para otras rutas de nucleótidos por dosis. La cantidad exacta puede variar de manera considerable dependiendo del peso del paciente que esté siendo inmunizado y la ruta de administración.

Las técnicas adecuadas para introducir el polinucleótido o vector desprotegido en un paciente, también incluye en la aplicación tópica con un vehículo adecuado. El ácido nucleico puede administrarse en forma tópica a la piel, o a superficie mucosas, por ejemplo mediante administración intranasal, oral, intravaginal o intrarectal. El polinucleótido o vector descubierto puede encontrarse junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como solución salina regulada por fosfato (PBS). La captación de ADN se puede facilitar en forma adicional a través del uso de agentes de facilitación tales como bupivacaína, ya sea en forma separada o incluida en

la formulación de ADN. Otros métodos de administración del ácido nucleico directamente a un receptor, incluyen ultrasonido, estimulación eléctrica, electroporación y microsembrado, el cual se describe en la Patente 5 Norteamericana No. 5,697,901.

La captación de construcciones de ácido nucleico se puede aumentar a través de diversas técnicas de transfección conocidas, por ejemplo las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes 10 incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectam y transfectam. La dosis del ácido nucleico que será administrada puede ser alterada.

Aún en otra modalidad, las composiciones 15 inmunogénicas de la presente invención, comprenden un anticuerpo, o un suero, o un dominio de un anticuerpo tal como Fab y fragmento F(ab')₂. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo. La dosis efectiva normalmente es de 100 µg a 500 µg, por ejemplo 1 20 mg a 50 mg por kilo de peso corporal del paciente. Por consiguiente, los métodos de la presente invención incluyen inmunoterapia o inmunopprofilaxis pasiva.

Las composiciones inmunogénicas y el polipéptido IL-18 de la presente invención, pueden suministrarse a través 25 de un número de rutas tales como intramuscular,

TH

subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

El polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo del mismo de acuerdo con la presente Invención, es uno que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los
5 altos niveles de citocinas tipo Th1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-12, IL-18, etc.) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes transmitidas por células a un antígeno administrado. En contraste, los altos niveles de citocinas tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e
10 IL-10) tienen a favorecer la inducción de respuestas inmunohumorales. Para una revisión de las familias de citocinas, ver la publicación de Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173, 1989. Por los términos "IL-18" ó "polipéptido IL-18" se entiende un polipéptido IL-18 tal
15 como se describe en las Patentes EP 0692536, EP 0712931, EP 0767178 y WO 97/2441. Los derivados de polipéptidos IL-18 o variantes incluyen polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos la cual tiene al menos el 70% de identidad, al menos el 80% de identidad,
20 al menos el 90% de identidad, al menos el 95% de identidad, al menos del 97 al 99% de identidad a la de la secuencia SEQ ID NO:6 (IL-18 humano) o SEQ ID NO:7 (IL-18 de murdo) tal como se ilustra en la figura 1, con respecto a la longitud total de la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID
25 NO:7, respectivamente. El polipéptido IL-18 puede se la

secuencia de aminoácidos que se establecen en la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7, respectivamente. Los fragmentos IL-18 también están contemplados, esto es un fragmento de IL-18 que tiene la capacidad de exhibir una actividad biológica (antigénica o inmunogénica) de IL-18 tal como la inducción de IFN- γ . Se pueden utilizar fragmentos bioactivos IL-18, se pueden utilizar fragmentos inmunogénicos IL-18.

El polipéptido IL-18 puede estar en la forma de una proteína madura o puede ser una parte de una proteína mayor tal como una proteína de fusión. También se contemplan variantes IL-18, esto es polipéptidos que pueden variar mediante las sustituciones de aminoácido conservadoras, mediante lo cual se sustituye un residuo por otro con características similares. Las sustituciones típicas están entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre los residuos básicos Lys y Arg; o residuos aromáticos Phe y Tyr. Por ejemplo, variantes en donde se sustituyen diversos aminoácidos 5 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 1 a 2 ó 1, se eliminan o agregan en cualquier combinación. Los fragmentos bioactivos IL-18 también están contemplados. Por el término "fragmento bioactivo" se entiende un fragmento de IL-18 el cual tiene retenida sustancialmente la misma bioactividad del IL-18 de longitud total. Por el término "bioactividad" se entiende cualquiera de las siguientes

propiedades: aumento de la actividad de célula activadora natural (NK) y respuesta de célula Th1 (activación de NK, células NKT, inducción de la proliferación de células T activadas), actividad anti-angiogénica, aumento de la expresión del ligando Fas en células NK, NKT y células T activadas, producción incrementada de IFN γ , GM-CSF y otras citocinas por ejemplo tipo TH1, capacidad para estimular la inmunidad innata y respuestas transmitidas tanto por Th1 y Th2.

10 En particular, un fragmento bioactivo de IL-18 es un fragmento que tiene retenida la capacidad de incrementar la producción de IFN γ tal como se mide, in vitro, a través del sistema de ensayo KG-1. La línea de célula mielomonocítica humana (KG-1) que expresa el receptor IL-15 18 humano, responderá al tratamiento con IL-18 incrementando la producción (secreción) de IFN γ (medido mediante ELISA) y la activación de NF κ B (Matsuko Taniguchi y asociados J. Immunological Methods, 1998, 217, 97-102).

20 Los polipéptidos IL-18 de acuerdo con la presente invención, se pueden preparar en cualquier forma adecuada. El aislamiento de polipéptidos que ocurren en forma natural, que producen en forma recombinante o sintética los polipéptidos, etc. Los medios de preparación son bien 25 conocidos en la técnica.

Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la presente invención pueden incluir de manera conveniente un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Una molécula transportadora puede comprender varias formas, incluyendo un organismo transportador tal como un vector bacteriano vivo o una cepa de vehículo bacteriano, agua, solución salina o un químico inmunoestimulante. Un vehículo puede ser agua, solución salina u otras soluciones reguladas. Una molécula transportadora también puede incluir una partícula polimérica tal como una microcuenta o una nanopartícula, y una partícula de sal metálica tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o 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 tipo fosfato de hierro-amonio, fosfato de potasio-hierro, fosfato de calcio-hierro, carbonato de calcio-magnesio, o una mezcla de cualesquiera de dichas sales.

Al momento de administrar la composición combinada tal como se proporciona en la presente invención, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas tipo Th1 y Th2.

Las composiciones inmunogénicas y el polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo o variante del mismo de acuerdo con la presente invención, se pueden suministrar a través

de un número de rutas tal como intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

Los vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos antigénicos, se administran en una cantidad tal que será profiláctica o terapéuticamente efectiva. La cantidad que será administrada, generalmente está dentro del rango de un picogramo a 16 miligramos, por ejemplo 1 picogramo a 10 microgramos para el suministro transmitido por partículas, y 10 microgramos a 16 miligramos de otras rutas de nucleótidos por dosis. La cantidad exacta puede variar considerablemente dependiendo del peso del paciente que esté siendo inmunizado y la ruta de administración.

Las técnicas adecuadas para introducir el polinucleótido o vector descubierto en un paciente también incluyen en aplicación tópica con un vehículo adecuado. El ácido nucleico puede administrarse en forma tópica a la piel, o a las superficies mucosas, por ejemplo mediante administración intranasal, oral, intravaginal o intrarectal. El polinucleótido o vector descubierto puede presentarse juntos con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina regulada por fosfato (PBS). La captación de ADN se puede facilitar en forma adicional a través del uso de agentes de facilitación tal como bupivacaina, ya sea en forma separada o incluida en la

formulación de ADN. Otros métodos para administrar el ácido nucleico directamente a un receptor incluyen ultrasonido, estimulación eléctrica, electroporación y microsemebrado el cual se describe en la Patente 5 Norteamericana No. 5,697,901.

La captación de construcciones de ácido nucleico puede mejorarse a través de diversas técnicas de transfección conocidas, por ejemplo aquellas que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos 10 agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectam y transfectam. La dosis del ácido nucleico que será administrada también puede ser alterada.

El polipéptido IL-18 o fragmento bioactivo de acuerdo 15 con la presente invención, es uno que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los altos niveles de citocinas tipo Th1 (por ejemplo IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-12, IL-18, etc) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes transmitidas por células a un antígeno 20 administrado. En contraste, los altos niveles de citocinas tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunohumorales. Para una revisión de las familias de citocinas, ver la publicación de Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 25 7:145-173, 1989. Los niveles de estas citocinas pueden ser

evaluadas fácilmente utilizando ensayos estándar. Por el término "IL-18" se entiende un polipéptido IL-18 tal como se describe en las Patentes EP 0692536, EP 0712931, EP 0767178 y la publicación WO 97/2441. Los polipéptidos IL-18 incluyen polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos la cual tiene al menos el 70% de identidad, al menos el 80% de identidad, al menos el 90% de identidad, al menos el 95% de identidad, al menos del 97 al 99% de identidad a la de la secuencia SEQ ID NO:1 (IL-18 humano) o SEQ ID NO:2 (IL-18 de murino) tal como se ilustra en la figura 1, con respecto a la longitud total de la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2, respectivamente. Dichos polipéptidos incluyen los que comprenden el aminoácido de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2, respectivamente. El polipéptido IL-18 puede tener la secuencia de aminoácidos que se establecen en la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. También se contemplan fragmentos IL-18, esto es un fragmento de IL-18 que tiene la capacidad de exhibir una actividad biológica (antigénica o inmunogénica) de IL-18 tal como la inducción de IFN- γ .

El polipéptido IL-18 puede estar en la forma de una proteína madura o puede ser una parte de una proteína mayor tal como una proteína de fusión. También se contemplan variantes IL-18, esto es polipéptidos que pueden variar mediante las sustituciones de aminoácido

conservadoras, mediante lo cual se sustituye un residuo por otro con características similares. Normalmente dichas sustituciones están entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos de ácido Asp y Glu; entre Asn y Gln; 5 entre los residuos básicos Lys y Arg; o residuos aromáticos Phe y Tyr. Por ejemplo, variantes en donde se sustituyen diversos aminoácidos 5 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 1 a 2 ó 1, se eliminan o agregan en cualquier combinación.

Los polipéptidos IL-18 de acuerdo con la presente 10 invención, se pueden preparar en cualquier forma adecuada. Incluye el aislamiento de polipéptidos que ocurren en forma natural, que producen en forma recombinante o sintética los polipéptidos, etc. Los medios de preparación son bien conocidos en la técnica.

15 Al momento de administrar la composición combinada tal como se proporciona en la presente invención, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas tipo Th1 y Th2.

Dentro de las modalidades de la presente invención, la 20 composición inmunogénica comprende además otro adyuvante, por ejemplo uno que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th1. Los adyuvantes que inducen TH-1 pueden ser seleccionados del grupo de adyuvantes que comprenden: adyuvante derivado de 25 lipopolisacáridos tal como lipopolisacárido enterobacteriano

(LPS), ED-MPL, colesterol y oligonucleótido CpG o una mezcla de dos o más de dichos adyuvantes. Los adyuvantes para generar una respuesta predominante tipo Th1, pueden incluir, por ejemplo, una combinación del lípido A de monofosforilo, por ejemplo lípido A de monofosforilo acilado 3-de-O-, 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 comprende además un oligonucleótido CpG inmunoestimulador.

Los oligonucleótidos que contienen CpG (en donde el dinucleótido CpG está no metilado también inducen una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen en las publicaciones WO 96/02555, WO 99/33488 y Patentes Norteamericanas Nos. 6,008,200 y 5,856,462. También se describen secuencias de ADN de inmunoestimulación, por ejemplo ver la publicación de Sato y asociados., Science 273:352, 1996.

Los CpG's son bien conocidos en la técnica como adyuvantes cuando se administran a través de rutas tanto sistémicas como mucosas (publicación WO96/02555, Patente No. EP 468520, Davis y asociados., J. Immunol,

1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, J.Immunol., 1998, 161(9):4463-6). CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótidos de citosina-guanosina que se encuentran en el ADN. Históricamente se observó que la fracción de ADN de BCG podría ejercer un efecto anti-tumor. En estudios adicionales, los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias de gen BCG se mostraron como capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto in vitro como in vivo). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo CG central, llevan esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunoestimulación, fue explicado posteriormente en una publicación de Krieg, Nature 374, p546, 1995. El análisis detallado ha demostrado que el motivo CG tiene que estar dentro de cierto contexto de secuencia, y que dichas secuencias son comunes en ADN bacteriano pero son raras en ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora con frecuencia es: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en donde el motivo CG de dinucleótido no está metilado, aunque otras secuencias CpG no metiladas son conocidas por ser inmunoestimuladores y pueden ser utilizadas en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos se encuentra una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, ya sea en la forma de repeticiones de un motivo o

una combinación de diferentes motivos, se puede encontrar en el mismo oligonucleótido. La presencia de uno o más de estas secuencias inmunoestimuladoras que contienen oligonucleótidos, puede activar varios subgrupos inmune, incluyendo células exterminadoras naturales (que producen interferón γ y tienen actividad citólica) y macrófagos (Wooldridge y asociados Vol 89 (no. 8), 1977). Aunque otras secuencias que contienen CpG no metilado no tienen esta secuencia de consenso, ahora han demostrado ser

10 Inmunomoduladores.

Los oligonucleótidos para utilizarse de acuerdo con la presente invención, pueden contener dos o más motivos CpG de dinucleótidos separados, por lo menos tres, al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la

15 presente invención, pueden ser desoxinucleótidos. En una modalidad, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o un enlace de fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces de internucleótidos están dentro del alcance de la presente invención, incluyendo

20 oligonucleótidos con ligaduras de internucleótidos mezcladas. Los métodos para producir oligonucleótidos de fósforo tioato o fósforo ditioato se describen en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,666,153, 5,278,302 y la publicación WO95/26204.

25 Los ejemplos de oligonucleótidos tienen las siguientes

secuencias. Las secuencias pueden contener ligaduras de internucleótidos modificadas por fosforotioato.

OLIGO 1(SEQ ID NO:3): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

5 OLIGO 2(SEQ ID NO:4): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO:5): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

**OLIGO 4(SEQ ID NO:6): TCG TCG TTT TGT CGT TTT
10 GTC GTT (CpG 2006 también conocido como CpG 7909)**

OLIGO 5(SEQ ID NO:7): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

**Los oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender la secuencia anterior, ya que tienen
15 eliminaciones y adiciones irrelevantes en la misma.**

**Los oligonucleótidos CpG utilizados en la presente invención pueden ser sintetizados a través de cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo patente EP 468520). En forma conveniente, los oligonucleótidos
20 pueden ser sintetizados utilizando un sintetizador automático.**

**Los oligonucleótidos utilizados en la presente invención pueden ser desoxinucleótidos. En una modalidad el enlace de internucleótido el oligonucleótido es
25 fosforoditioato, o enlace de fosforoditioato, aunque los**

fosfodiésteres están dentro del alcance de la presente invención. El oligonucleótido que comprende diferentes ligaduras de internucleótido esta contemplado, por ejemplo, fosforotioato, fosforodlésteres. Se pueden utilizar otros
5 enlaces de internucleótidos que estabilizan el oligonucleótido.

CpG cuando se formula en vacunas, generalmente se administra en una solución libre junto con el antígeno libre (publicación WO 96/02555; McCluskie y Davis, supra) o se
10 conjuga en forma covalente a un antígeno (Publicación PCT No. WO 98/16247), o se formula con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de hepatitis) Davis y asociados, supra; Brazolot-Millan y asociados., Proc. Natl. Acad. Sci., EUA, 1998, 95(26), 15553-8).

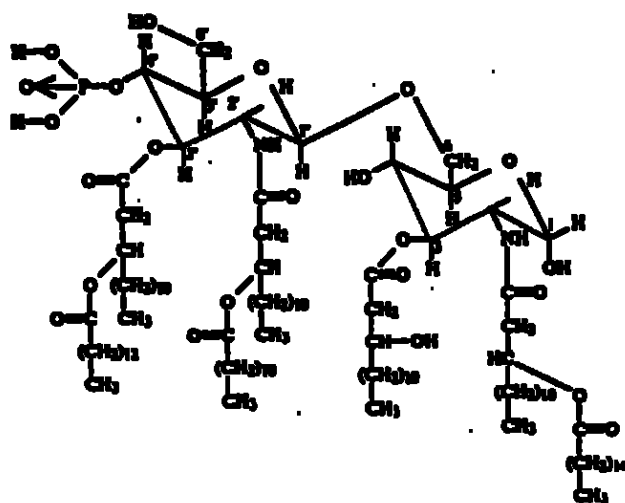
15 Una formulación mejorada puede comprender la combinación de oligonucleótido que contiene CpG con un derivado de saponina, particularmente la combinación de CpG y QS21 tal como se describe en la publicación WO00/09159 y en la publicación WO00/62800. Dicha
20 formulación puede comprender además una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Por consiguiente, en una modalidad, aún adicional la composición inmunogénica de la presente invención comprende una combinación de un oligonucleótido CpG y una saponina, por ejemplo QS21,
25 formulada opcionalmente en una emulsión de aceite en

agua. La formulación puede comprender además de manera opcional el adyuvante ED-MPL®. QS-21 puede proporcionarse en su composición menos reactogénica cuando se extingue con colesterol, tal como se describe en la publicación WO 96/33739.

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

Se ha sabido durante mucho tiempo que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulador del sistema inmune aunque su uso en adyuvantes ha sido restringido por sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico de LPS, lípido A de monofosforilo (MPL), producido mediante la eliminación del grupo de carbohidrato del núcleo y el fosfato de la glucosamina con término de reducción, ha sido descrito por Ribi y asociados (1986, Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins, Plenum Publ. Corp. NY, p407-419) y tiene la siguiente estructura:

5



10 Una versión destoxificada adicional de MPL, resulta de la eliminación de la cadena de acilo de la posición-3 del esqueleto de disacárido, y se denomina lípido A de monofosforilo Desacilado-O-3 (3D-MPL). Se puede purificar y preparar a través de los métodos considerados en la

15 Patente GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación del lípido A de difosforilo, y variantes desaciladas 3- O de los mismos. 3D-MPL puede estar en la forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño menor a 0.2 μm de diámetro, y su método de

20 fabricación se describe en la publicación WO94/21292. En la publicación No. WO98/43670A2 se describen formulaciones acuosas que comprenden el lípido A de monofosforilo y un tensioactivo.

Los adyuvantes derivados de lipopolisacárido

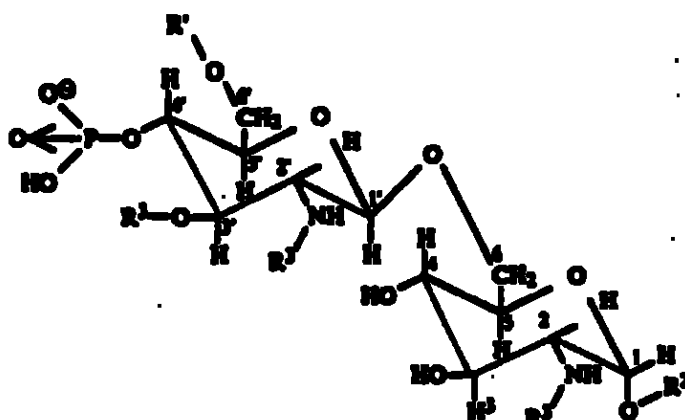
25 bacteriano que serán formulados en las combinaciones de

adyuvante de la presente invención, pueden ser purificados y procesados de fuentes bacterianas, o como alternativa pueden ser sintéticos. Por ejemplo, el lípido A de monofosforilo se describe en la publicación de Ribí y asociados 1986 (supra), y monofosforilo Desacilado-3-O- y el lípido A de difosforilo derivado de la especie *Salmonella* sp. se describe en la patente GB 2220211 y en la Patente Norteamericana No. 4912094. Otros lipopolisacáridos sintéticos y purificados han sido descritos (publicación WO 98/01139; Patente Norteamericana NO. 6,005,099 y la Patente EP 0 729473 B1; Hilgers y asociados., 1986, Int. Arch.Allergy.Immunol., 79(4):392-6; Hilgers y asociados., 1987, Immunology, 60(1):141-6; y patente EP 0 549 074 B1). Los adyuvantes de lipopolisacárido bacterianos pueden incluir 3D-MPL y los disacáridos de glucosamina $\beta(1-6)$ descritos en la Patente Norteamericana No. 6,005,099 y patente EP 0 729 473 B1.

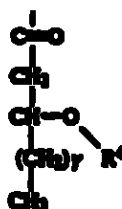
Por consiguiente, los derivados LPS que se pueden utilizar en la presente invención son aquellos inmunoestimulantes que son similares en la estructura a la de LPS ó MPL ó 3D-MPL. En otro aspecto de la presente invención, los derivados de LPS pueden ser un monosacárido acilado, el cual es una sub-porción de la estructura anterior de MPL.

Un ejemplo de un adyuvante de disacárido es un lípido

A purificado o sintético de la siguiente fórmula:



en donde R2 puede ser H ó PO₃H₂; R3 puede ser una cadena de acilo o β-hidroxiimiristoilo o un residuo de 3-aciloxilacilo que tiene la fórmula:



en donde R⁴ = $\text{---C(=O)---(CH}_2\text{)}_x\text{---CH}_3$

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

Las combinaciones de 3D-MPL y adyuvantes de saponina derivados de la corteza de Quillaja Saponaria molina han sido descritas en la Patente EP 0 761 231B. La

publicación WO 95/17210 describe una emulsión adyuvante con base en escualeno, α -tocoferol y monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80), formulado con el inmunoestimulador QS21 opcionalmente con 3D-MPL.

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

En una modalidad, la composición inmunogénica
15 incluye la combinación de un lípido A de monofosforilo para el adyuvante de saponina tal como el adyuvante 3D-MPL con QS21, tal como se describe en la publicación WO94/00153, o una composición menos reactogénica en donde QS21 se extingue con colesterol, tal como se
20 describe en la publicación WO96/33739. Otras formulaciones pueden comprender una emulsión de aceite en agua y tocoferol además de QS21. Otra formulación que emplea una formulación de QS21, adyuvante 3D-MPL® y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en
25 la publicación WO95/17210. Por consiguiente, la

composición inmunogénica de acuerdo con la presente invención, comprende un antígeno, por ejemplo un antígeno asociado con tumor, un adyuvante de saponina, por ejemplo QS-21, junto con adyuvante 3D-MPL®, que comprende
5 opcionalmente una emulsión de aceite en agua y tocoferol además de QS-21. Por ejemplo QS21 se extingue con colesterol.

Otra formulación comprende la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG con el derivado de
10 saponina, por ejemplo la combinación de CpG y QS21 tal como se describe en la publicación WO00/09159 y en la publicación WO00/62800. Dicha formulación puede comprender además una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Por consiguiente, aún en otra modalidad
15 adicional la composición inmunogénica de la presente invención comprende una combinación de una saponina, por ejemplo QS21 y un oligonucleótido CpG, formulado opcionalmente en una emulsión de aceite en agua. La formulación puede comprender además opcionalmente un
20 adyuvante 3D-MPL®. QS-21 puede proporcionarse en su composición menos reactogénica, en donde se extingue con colesterol, tal como se describe en la publicación WO96/33739.

Como alternativa el adyuvante de saponina dentro de
25 la composición inmunogénica de acuerdo con la presente

invención, puede combinarse con vehículos de vacuna compuestos de quitosán u otros polímeros policatiónicos, partículas de poliláctido y poliláctido-co-glucólido, matriz de polímero a base de glucosamina de pol-N-acetilglucosamina, 5 partículas compuestas de polisacáridos o polisacáridos químicamente modificados, liposomas y partículas a base de lípidos, partículas compuestas de monoésteres a base de glicerol, etc. Las saponinas también se pueden formular en la presencia de colesterol para formar estructuras de 10 particulado tales como liposomas o ISCOMs. Además, las saponinas pueden formarse junto con un éter o éster de polioxietileno, ya sea en una solución o suspensión no particulada, o en una estructura particulada tal como liposoma paucilamelar ISCOM. Las saponinas también 15 pueden ser formuladas con excipientes tales como Carbopol^R para incrementar la viscosidad, o pueden ser formuladas en una forma de polvo seco con un excipiente en polvo tal como lactosa.

Las composiciones de vacunas y composiciones 20 inmunogénicas pueden presentarse en contenedores por dosis de unidad o dosis múltiples, tales como ampollas o frascos sellados, dichos contenedores pueden estar herméticamente sellados para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones 25 pueden almacenarse en la forma de suspensiones,

soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos. Como alternativa, una composición de vacuna o composición inmunogénica puede almacenarse en una condición seca por congelación que requiere únicamente la
5 adición de un vehículo o líquido estéril inmediatamente antes de utilizarse.

Cualquiera de una variedad de vehículos de suministro pueden ser empleados dentro de las composiciones inmunogénicas y vacunas para facilitar la producción de una
10 respuesta inmune específica de antígenos que se dirige a las células de tumor. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, la composición inmunogénica aquí descrita se suministra a un huésped a través de células que presentan antígenos (APCs), tal como células dendríticas,
15 macrófagos, células B, monocitos y otras células que pueden ser construidas para ser APCs eficiente. Las células APCs pueden, pero no necesitan, ser modificadas genéticamente para incrementar la capacidad para presentar el antígeno para mejorar la activación y/o
20 mantener la respuesta de célula T para tener efectos anti-tumor por sí mismos y/o para ser inmunológicamente compatibles con el receptor (por ejemplo, haplotipo HLA cotejado). Los APCs pueden ser aislados generalmente de cualquiera de una variedad de fluidos y órganos biológicos,
25 incluyendo tejidos de tumor y peri-tumorales, y pueden ser

células autólogas, halogenéicas, singeneícas o xenogeneícas.

Ciertas modalidades de la presente invención, utilizan células dendríticas o progenitoras de los mismos en la forma de células que presentan antígenos. Las células dendríticas son APCs altamente potentes (Banchereau J. & Steinman R.M. Nature, 1998, 392:245-251) y han mostrado ser efectivas como un adyuvante fisiológico para generar inmunidad antitumor profiláctica o terapéutica (ver la publicación de Timmerman J.M. y Levy R., Ann. Rev. Med. 1999, 50:507-529). En general, las células dendríticas pueden ser identificadas con base en su forma típica (estrellado in situ, con procesos citoplásmicos marcados (dendritos) visibles in vitro), su capacidad para tomarse, proceso y presentación de antígenos con alta eficiencia y su capacidad para activarse respuesta de células T naïve. Por supuesto las células dendríticas pueden construirse para expresar receptores de superficie de célula específica o ligandos que no se encuentran comúnmente en células dendríticas in vivo o ex vivo, y dichas células dendríticas modificadas están contempladas en la presente invención. Como una alternativa para las células dendríticas, las células dendríticas cargadas con antígeno de vesículas segregadas (denominadas exosomas) se pueden utilizar dentro de una vacuna (ver la publicación de Zitvogel L. y

asociados., Nature Med., 1998, 4:594-600). Por consiguiente, se proporciona una formulación inmunoestimulante, por ejemplo una vacuna que comprende una cantidad efectiva de células dendríticas o células que
5 presentan antígenos, modificados por carga in vitro con un polipéptido tal como se describe en la presente invención y un vehículo farmacéuticamente efectivo.

Las células y progenitores dendríticos pueden obtenerse de sangre periférica, médula ósea, células de
10 infiltración en tumores, células de infiltración en tejidos peritumorales, nodos linfáticos, bazo, piel, sangre de cordón umbilical o cualquier otro fluido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas pueden diferenciarse ex vivo agregando una combinación de citocinas tales como
15 GM-CSF, IL-4, IL-13 y/o $TNF\alpha$ a cultivos de mocitos recolectados de sangre periférica. Como alternativa, las células positivas CD34 de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o médula ósea pueden ser diferenciadas en células dendríticas agregando al medio de cultivo
20 combinaciones de GM-CSF, IL-3, $TNF\alpha$, ligando CD40, lipopolisacáridos LPS, ligando flt3 y/o otros compuestos que inducen la diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas. Las células dendríticas se categorizar en forma conveniente como células "inmaduras" y "maduras"
25 lo cual permite una simple forma para discriminar entre dos

fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no debe ser construida para excluir todas las posibles etapas intermedias de diferenciación. Las células dendríticas Inmaduras están caracterizadas como APC con una alta capacidad para captación de antígenos y procesamiento, que se correlaciona con la alta expresión del receptor Fcγ y el receptor de manosa. El fenotipo maduro normalmente está caracterizado por una menor expresión de estos marcadores, aunque una alta expresión de moléculas de superficie celular responsables de la activación de célula T, tal como MHC clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo, CD54 y CD11) y moléculas co-estimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Los APCs generalmente pueden ser transfectados con un polinucleótido que codifica la proteína de tumor (por ejemplo, MAGE-3, Her2/neu, o derivados del mismo) de modo que el polipéptido de tumor, o una porción inmunogénica del mismo se exprese en la superficie celular.

Dicha transfección puede tener lugar ex vivo, y posteriormente se puede utilizar una composición o vacuna que comprende dichas células transfectadas para propósitos terapéuticos, tal como se describe en la presente invención. Como alternativa, se puede administrar a un paciente un vehículo de suministro de genes que dirige una célula

dendrítica u otra célula que presenta antígenos, dando como resultado la transfección que ocurre in vivo. La transfección in vivo y ex vivo de células dendríticas, por ejemplo, generalmente se pueden llevar a cabo utilizando cualesquiera método conocidos en la técnica tales como los que se describen en la publicación WO 97/244447, o el método de pistola genética descrito por Mahvi D. M. y asociados., Immunology and Cell Biology, 1997, 75:456-460. La carga de antígenos de células dendríticas se puede lograr incubando células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido de tumor, ADN (descubierto dentro de un vector de plásmido) o ARN; o con bacterias o virus recombinantes que expresan antígenos (por ejemplo o vacunas, virus de aves de corral, adenovirus o vectores de lentivirus).

Otros sistemas de suministro adecuados incluyen microesferas en donde el material antigénico se incorpora en, o se conjuga con polímeros/microesferas biodegradables de modo que el material antigénico puede ser mezclado con un vehículo farmacéutico adecuado y puede ser utilizado en la forma de una vacuna. El término "microesferas" se emplea generalmente para describir partículas coloidales que son sustancialmente esféricas y tienen un diámetro dentro del rango de 10 nm a 2 mm. Las microesferas elaboradas de un rango muy amplio de polímeros naturales y

sintéticos han encontrado uso en una variedad de aplicaciones biomédicas. Este sistema de suministro es especialmente conveniente para proteínas que tienen vidas medias cortas in vivo, que requieren múltiples tratamientos para proporcionar eficacia, o que son inestables en fluidos biológicos o no son completamente absorbidos del tracto gastrointestinal debido a sus pesos moleculares relativamente altos. Varios polímeros han sido descritos como una matriz para la liberación de proteína. Los polímeros adecuados incluyen gelatina, colágeno, alginatos, dextrano. Los sistemas de suministro pueden incluir poli(DL-ácido láctico) biodegradable (PLA), poli(láctido-co-glucólido) (PLG), poli(ácido glucólico) (PGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), y copolímeros poli(ácido DL-láctico-co-glucólico) (PLGA). Otros sistemas pueden incluir hidrogeles heterogéneos tales como multibloque de poli(éter éster) que contiene bloques de repetición con base en poli(etilenglicol) hidrofílico (PEG) y poli(butileno tereftalato) hidrofóbico (PBT), o poli(etileno glicol)-tereftalato/poli(butileno tereftalato) (PEGT/PBT) (Sohler y asociados., Eur. J. Pharm and Biopharm, 2003, 55, 221-228). Los sistemas que pueden proporcionar liberación sostenida durante 1 a 3 meses son PLGA, PLA y PEGT/PBT.

El régimen de tratamiento se variará de manera significativa dependiendo del tamaño y especie del paciente

respectivo, la cantidad de vacuna de ácido nucléico y/o composición de proteína administrada, la ruta de administración, la potencia y dosis de cualesquiera de los compuestos adyuvantes utilizados y otros factores que
5 podrán ser apreciados por los expertos en la técnica.

La presente invención se describirá en forma adicional haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo I

Preparación de vacuna utilizando composiciones
10 inmunogénicas basadas en QS-21.

I.1.- Preparación Inmunogénica que contiene QS21 y 3 de lípido A de monofosforilo acilado-O- (3D-MPL) en una emulsión de aceite en agua (formulación AS02):

Este sistema de adyuvante AS02, ha sido descrito
15 previamente en la publicación WO95/17210.

3D-MPL: es un Inmunoestimulante derivado de lipopolisacárido (LPS) de la bacteria Gram-negativa *Salmonella minnesota*. MPL ha sido desacilado y carece de un grupo de fosfato en la porción de lípido A. Este
20 tratamiento químico reduce en forma dramática la toxicidad y al mismo tiempo conserva las propiedades inmunoestimulantes (Ribi, 1986). Ribi Immunochemistry produce y suministra MPL a SB-Biologicals.

QS21: es una molécula de saponina natural extraída
25 de la corteza del árbol de Molina saponaria Quillaja de

América del Sur. Una técnica de purificación desarrollada para separar las saponinas individuales de los extractos crudos de la corteza, permitió el aislamiento de la saponina particular, QS21, la cual es un glucósido de triterpeno que
5 demuestra actividad adyuvante más fuerte y menor toxicidad en comparación con el componente de origen. QS21 ha demostrado activar los CTLs restringidos por MHC clase I para diversas sub-unidades Ags, así como para estimular la proliferación linfocítica específica de Ag (Kensil, 1992).
10 Aquila (formalmente Cambridge Biotech Corporation) produce y suministra QS21 a SB-Biologicals.

La emulsión de aceite/agua está compuesta de una fase orgánica elaborada de 2 aceites (un tocoferol y un escualeno), y una fase acuosa de PBS que contiene Tween
15 80 como el emulsificante. La emulsión comprendió escualeno al 5%, tocoferol al 5%, Tween 80 al 0.4% y tuvo un tamaño partícula promedio de 180 nm y es conocido como SB62 (ver publicación WO95/17210).

Preparación de emulsión SB62 (concentrado de 2
20 dobleses):

Se disolvió Tween 80 en solución salina regulada por fosfato (PBS) para proporcionar una solución al 2% en el PBS. Para proporcionar 100ml de emulsión de concentrado de 2 dobleces 5g de tocoferol alfa DL y 5ml de escualeno se
25 vortizaron para mezclarse profundamente. Se agregó una

solución de 90ml de PBS/Tween y se mezcló profundamente. La emulsión resultante se pasó posteriormente a través de una jeringa y finalmente se micro-fluidizó utilizando una máquina de microfluidos M110S. Las gotas de aceite
5 resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

Formulaciones:

Se llevó a cabo una formulación típica que contiene 3D-MPL y QS21 en una emulsión de aceite/agua tal como se indica a continuación. Se diluyeron 20µg – 25µg C-LytA P2-
10 P501S en un concentrado de 10 dobleces de PBS con pH 6.8 y H₂O, antes de la adición consecutiva de SB62 (50µl), MPL, (20µg), QS21 (20µg), comprendiendo opcionalmente los oligonucleótidos CpG (100µg) y 1µg/ml de tiomersal como conservador. La cantidad de cada componente puede
15 variar según sea necesario. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura ambiente con agitación.

1.2.- Preparación inmunogénica que contiene QS21 y CpG en una formulación liposomal (adyuvante AS15):

Este sistema de adyuvante AS15 se ha descrito
20 previamente en la publicación WO00/62800.

AS15 es una combinación novedosa de los dos sistemas de adyuvante, AS01B y AS07A. AS01B está compuesto de liposomas que contienen 3D-MPL y QS21 y AS07A están compuestos de CpG 7909 (también conocido
25 como CpG 2006) en solución salina regulada por fosfato.

QS-21 es tal como se describió anteriormente.

CpG: CpG ODN 7909 es un oligodesoxi-nucleótido de fosforotioato de una sola hebra sintético (ODN) de 24 bases de longitud. Su secuencia base, la cual es 5'-
5 **TCGTCGTTTTG-TCGTTTTGTCTT**-3', ha sido optimizada para estimulación del sistema inmune humano. El ADN CpG u ODN sintético que contiene motivos CpG, son conocidos por activar células dendríticas, monocitos y macrófagos que segregan citosinas tipo-TH1 y por inducir respuestas de
10 célula T TH1 incluyendo la generación de células T citolíticas, estimular células NK que segregan IFN γ e incrementar su actividad lítica, también activan células B para proliferación (Krieg A y asociados 1995 Nature 374: 546, Chu R y asociados 1997 J. Exp. Med. 186: 1623). CpG
15 7909 no es antisentido para cualquier secuencia conocida del genoma humano. CpG 7909 es un adyuvante propietario desarrollado por y producido a nombre de Coley Pharmaceutical Group, Inc. MA, US.

Formulaciones con CpG:

20 Las formulaciones se llevaron a cabo los días de las inyecciones. El volumen de inyección de un ratón fue 50 ó 100 μ l. Una formulación típica que contiene CpG, 3D-MPL y QS21 en liposomas se llevó a cabo tal como se indica a continuación: se diluyó 20 μ g-25 μ g de antígeno con H₂O y
25 PBS, pH 7.4 para isotonicidad. Después de 5 minutos, se

mezcló QS21 (0.5 μ g) con liposoma en una proporción de peso QS21/colesterol de 1/5 (referido como DQ) y se agregó a la formulación. 30 minutos después, se agregaron 10 μ g de CpG (ODN2006) 30 minutos antes de la adición de 1 μ g/ml de tiomersal como conservador. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

Ejemplo II

Efecto de mL 18 en combinación con vacuna de proteína D-E7 HPV16 adyuvantada con AS02 en el modelo terapéutico TC1 en ratones E7-Tg y en ratones sin E7-Tg:

II.1.- Diseño experimental.

7 grupos de 5 ratones hembra E7 Tg (C. Ledent y asociados PNAS (EUA) 1990, 87; 6176-6180) ó C57Bl/6 sin Tg (Iffa Credo) recibieron un estímulo de tumor de células TC1 10⁶ (SC) en 200 μ l el día 0.

Ratones transgénicos que expresan proteína E7 HPV16:

La cepa de ratón transgénico ha sido generada por M. Parmentier y C. Ledent at the IRIBHN (ULB). (Ref: PNAS (EUA) 1990, 87; 6176-6180). Ya que los ratones transgénicos viven con el gen E7 HPV16 desde el nacimiento, son considerados como "tolerantes" para este gen: E7 de HPV16, en esta situación se considera como un "auto antígeno". La expresión del transgén es conducida por el promotor de tiroglobulina. Ya que la tiroglobulina se

expresa en forma constitutiva únicamente en la tiroides, E7 se expresa en la tiroides. Como consecuencia de esta expresión, proliferan las células de tiroides, los ratones desarrollan bocio y nódulos que después de seis meses a un año pueden evolucionar en cáncer invasivo.

Línea de célula de tumor TC1:

Las células epiteliales de pulmón primario de ratones C57BL/6 fueron inmortalizadas mediante HPV 16 E6 y E7 y posteriormente fueron transformadas con un oncogén ras activado, produciendo una línea celular tumorigena que expresa E6 y E7 (Lin KY y asociados, 1995). La expresión de E7 ha sido verificada mediante análisis FACS de células TC1 fijas y permeabilizadas utilizando el Mab anti-HPV 16 E7 de ratón (Triton Corp. Alameda, CA)

Vacunas: Con 5 μ g de PD1/3E7 (lote PDE7 02/025) preparado tal como se describe en la publicación WO99/10375, adyuvantado en el QS21 que contiene el adyuvante AS02B (1/5 $^{\circ}$ de una dosis humana (MPL20 μ g/ QS21 20 μ g/ SB62 50 μ l) se administró en forma Intramuscular (IM) los días 7 y 14.

IL18-mIL-18 de múrido (lote _SB-528775 lot MJG-288800-176 en 1 mg/ml) se administró S. C. En 100 μ l diariamente durante tres semanas (comenzando en el día 7).

II.2. Crecimiento de tumor *in vivo*:

Las células TC1 que crecen en cultivo *in vitro* fueron tripsinizadas, lavadas dos veces en medio libre de suero y se inyectaron S. C. en el flanco derecho de los ratones.

Para evaluar el tratamiento de los tumores
5 establecidos, se inyectaron células TC1 en dosis de 1×10^6 células/ratón. Una y dos semanas después de la inyección de células de tumor, los ratones fueron vacunados IM con $5\mu\text{g}$ en $100\mu\text{l}$ de His protD 1/3 E7 preparado tal como se describe en la publicación WO99/10375 y adyuvantado
10 en el QS-21 que contiene el adyuvante AS02 ó con PBS solo. Se utilizaron 5 ratones en cada grupo.

Grupos de ratones

- gr1: PBS
- gr2: PDE7 AS02B
- 15 - gr3: PDE7 AS02B + $100\mu\text{g}$ mL-18
- gr4: PDE7 AS02B + $1\mu\text{g}$ mL-18
- gr5: PDE7 AS02B + $0.1\mu\text{g}$ mL-18
- gr6: $1\mu\text{g}$ mL18
- gr7: $0.1\mu\text{g}$ mL18

20 Los ratones fueron monitoreados dos veces a la semana para crecimiento de tumor *in vivo* durante 5 semanas (hasta el día 35). Se analizó la serología (Ig tot e isotipos) en el día 35. La masa/grupo de tumor promedio (expresada en mm^2 por cada grupo de 5 animales) se
25 muestra en la figura 2 (ratones de control sin Tg) y en la

figura 3 (ratones E7 Tg). La figura 2A muestra los resultados obtenidos con 1µg de IL-18 y la figura 2B muestra los resultados obtenidos con 100µg de IL-18. La figura 3A muestra los resultados obtenidos con 1µg de IL-18 y la figura 3B muestra los resultados obtenidos con 100µg de IL-18.

La tabla 1 que se encuentra a continuación, resume el porcentaje de ratones que rechazaron completamente su tumor al momento de la vacuna en combinación o sin inyecciones repetidas de IL-18 y también muestra claramente el beneficio de combinar la vacuna y una alta dosis de IL18.

Tabla 1

Grupo de ratones	% de regresión completa ratones de control	% de regresión completa ratón E7Tg
PBS	0	0
PDE7 + AS02B	20	0
PDE7 + AS02B 0.1µg IL18	20	0
PDE7 + AS02B 1µg IL18	0	0
PDE7 + AS02B 100µg IL18	100	100
0.1µg IL18	0	0
1µg IL18	0	0
100µg IL18 (de experimentos previos)	20	0

II.3. Conclusión

Los datos obtenidos en este experimento demuestran que:

- Existe un claro beneficio en la combinación de IL-18

con la vacuna E7 adyuvantada con QS21 que contiene AS02B en regresión de tumor tanto en ratones de control no transgénicos así como en ratones E7Tg.

- Los únicos grupos de ratones que permanecieron
5 libres de tumor después del estímulo, son los que recibieron tanto la vacuna como el IL 18.

- El beneficio de la combinación también depende de la dosis.

II.4. Serología-lecturas inmunológicas.

10 La respuesta de anticuerpos y el perfil isotípico (en suero reunido) se midieron mediante Elisa utilizando PD1/3E7-16 (02/025) en la forma de un antígeno de recubrimiento tal como se describe a continuación.

Se tomaron sueros individuales al mismo tiempo que
15 se tomaron los órganos y se presentaron para ELISAs indirectos. Se utilizaron 2µg/ml de proteína E7 purificada en la forma de antígeno recubierto. Después de la saturación en PBS 0.1% Tween 20 0.1% BSA 1 hora a 37°C, los sueros se diluyeron en serie (comenzando en 1/100) en el
20 regulador de saturación y se incubaron 90 minutos a una temperatura de 37°C. Después de lavar en PBS Tween 20 0.1%, se utilizó Ig anti ratón de becerro biotinilado (1/5000) o anti sueros de subclase Ig anti ratón de becerro (total IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b) (1/5000) como segundos
25 anticuerpos, después de incubación durante 90 minutos a

una temperatura de 37°C, se agregó estreptavidina acoplada a peroxidasa y se utilizó TMB (tetra-metilo-benzidina/peróxido) como el sustrato. Después de 10 minutos, se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0.5 M y se determinó el O.D.450. La figura 4 muestra los resultados obtenidos con ratones de control sin Tg, aunque la figura 5 muestra los resultados obtenidos con ratones E7Tg.

II.5 Conclusión

En ratones de control que reciben el IL-18 solo, no se detectaron anticuerpos específicos de E7 tal como se esperó. No se observó una diferencia importante en la respuesta Ig total en cualquier grupo. La adición de IL-18 tiende a mejorar el perfil isotípico TH1 especialmente en dosis altas en combinación con la vacuna.

En ratones E7Tg parece haber una relación inversa entre la dosis de IL-18 y el nivel de anticuerpos para E7. No existe un impacto importante por la adición de IL-18 en el perfil isotípico.

II.6 Conclusión general.

- IL-18 impacta por sí mismo el crecimiento de tumor TC1 en una forma dependiente de la dosis;
- Hay un claro beneficio en el crecimiento de tumor TC1 por combinar la inyección especialmente cuando se combinan altas dosis de mIL-18 (100µg) con vacunación E7 + AS02B, en ratones tanto de control como E7Tg;

- IL-18 afecta ligeramente la respuesta de anticuerpos inducida por vacunación (mejor perfil isotípico TH1 en ratones de control y mejores tituladores en ratones E7Tg)

5 Ejemplo III

Efecto de mIL18 en combinación con vacuna Her2/neu adyuvantada con AS15 en el modelo terapéutico TC1 Her2.

III.1. Designio experimental.

Vacuna.

10 La vacuna Her-2/neu es ECD-PhD y comprende todo el dominio extracelular (que comprende aminoácido 1-645) y una parte inmunogénica del dominio intracelular comprende el dominio de fosforilación. Dicha construcción de vacuna se describe en una publicación WO00/44899 y se denomina
15 dHER2.

La proteína dHER2 fue co-liofilizada con CpG, diluyendo el antígeno en una mezcla de H₂O, sacarosa y NaH₂PO₄/K₂HPO₄. Después de 5 minutos, se agregó CpG ODN 7909 para obtener un volumen final que contiene
20 625 µg/ml de Her2/neu, 1250 µg/ml de CpG, 3.15% de sacarosa y 5 mM PO₄, pH 7, antes de secarse por congelación. El volumen final se liofilizó de acuerdo con un ciclo de 3 días. Para la formulación extemporánea, la pasta liofilizada que contiene CpG y el antígeno fueron
25 suspendidos nuevamente con 625 µl de diluyente AS01B que

contiene 100 μ g/ml de MPL y DQ.

Los animales fueron inyectados con 50 μ l que contiene 25 μ g de Her2/neu, 50 μ g de CpG y 5 μ g de MPL y DQ.

Modelo de tumor que expresa Her-2/neu

5 El modelo de tumor utilizado en este experimento: TC1HER2 fue generado mediante transducción retroviral de las células TC1 (proporcionada por el doctor T. C. Wu John's Hopkins University Baltimore) con retrovirus recombinantes que codifican Her-2/neu).

10 Los clones individuales han sido aislados, amplificados y se confirmó la estabilidad de Her-2/neu y la expresión MHC clase I mediante citometría de flujo.

Grupos de ratones:

15 4 grupos de 5 ratones CB5F1 hembra han recibido en el día 0 un estímulo sub cutáneo (SC) con 2 x 10E6 de células TC1 Her2 c18 seguido de vacunación con cualesquiera de:

- gr1: PBS
- gr2: inyección diaria de 100 μ g de mL 18 (múrido) a
20 partir del día 7 hasta el día 27 (SC)
- gr3: 25 μ g de proteína dHER2 en AS15 los días 7 y 14 (IM)
- gr4: la combinación de la vacuna y el mL18.

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

25 Los resultados se muestran en la figura 6 y en la tabla

2.

Tabla 2: porcentaje de ratones que permanecieron libres de tumor, 27 días después del estímulo con tumor TC1HER2.

5

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

II.3. Conclusión

10

Una estrategia de vacunación basada en el uso de una proteína HER-2/neu purificada recombinante (dHER2) formulada en un adyuvante (AS15) combinada con inyección repetida de IL-18 recombinante de murino, proporcionó resultados mejorados en tumores establecidos previamente, que expresan el antígeno HER2/neu, en comparación con una estrategia de vacunación ya sea con la composición de vacunas o el IL-18 solo. La vacunación basada en el uso de proteína dHER recombinante formulada en el adyuvante AS15 había mostrado previamente proteger en forma muy eficiente a los ratones contra un estímulo con estas células de tumor que expresan el antígeno HER2/neu. Esta protección es específica del antígeno HER2/neu y está asociada con la inducción de memoria inmune a largo plazo. En este modelo terapéutico más estricto, en donde había tumores establecidos previamente, las vacunaciones han

15

20

25

mostrado ser menos efectivas teniendo únicamente un impacto limitado en el crecimiento de tumor (no hubo ratones que rechazaran completamente los tumores en estas condiciones). Sin embargo sorprendentemente cuando
5 ambos tratamientos se administraron en forma concomitante, se observó una sinergia y el 60% de los ratones permanecieron completamente libres de tumor, en tanto que el 40% únicamente desarrolló un tumor pequeño. En conclusión, hay un claro beneficio en combinar mL-18 y
10 las vacunas tal como se muestra en la tabla 2. Esto podría significar que tanto la inducción de respuesta de célula T específica de HER2/neu a través de la vacuna como la activación del sistema inmune mediante inyección repetida de IL-18 son cruciales para obtener la regresión del tumor.

15 Ejemplo IV

Efecto de mL18 en combinación con vacuna MAGE-3 adyuvantada con ?? en el modo terapéutico Mage3 TC1.

III.1. Diseño experimental

Vacuna.

20 Se ha generado un modelo de tumor que expresa el antígeno de tumor Mage3 (TC1 Mage3) mediante modificación genética de las células de origen TC1 mediante transfección clásica de un plásmido de ADN que codifica Mage3 (PcADN3 Mage3). Este modelo de tumor fue
25 generado transfectando las células TC1 de origen

(proporcionadas por el doctor T. C. Wu John's Hopkins University Baltimore) con un plásmido PcADN3 que codifica Mage3. La transfección ha sido llevada a cabo utilizando lipofectamina de acuerdo con la recomendación del proveedor del equipo (Gibco BRL Life Technologies, cat no 18324-012).

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

10 4 grupos de 5 ratones C57BL/6 hembra recibirán en el día 0 un estímulo sub cutáneo (SC) con 2×10^6 de células TC1 Mage3 seguido de la vacunación con cualesquiera de

- gr1: PBS
- gr2: inyección diaria de $100 \mu\text{g}$ de mL 18 (múrido)
- 15 del día 7 hasta el día 27 (SC)
- gr3: $10 \mu\text{g}$ de proteína Mage3 en AS15 los días 7 y 14 (IM)
- gr4: la combinación de vacunas y mL18.

Se evaluó la capacidad de Mage3 en vacunación AS15, inyecciones IL18 y tratamiento combinado para inducir la regresión de tumor. El impacto de la vacunación y/o tratamiento IL18 en el parámetro Inmune, también fue medido (Info-proliferación, producción de citosinas).

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la respuesta inmune a un antígeno en un mamífero, en donde el método comprende administrar al mamífero una cantidad segura y efectiva de
5 1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento bioactivo o variante del mismo, y 2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado Inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina.

2. Un método de conformidad con la reivindicación 1,
10 caracterizado porque el antígeno o derivado Inmunogénico del mismo, se deriva de un organismo seleccionado del siguiente grupo: virus de inmunodeficiencia humana VIH-1, virus de herpes simple de humano, citomegalovirus, rotavirus, virus de Epstein Barr, virus de varicela Zoster, de
15 virus de hepatitis tal como virus de hepatitis B, virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papilloma humano, flavivirus o virus de influenza, de *Neisseria spp.*, *Moraxella*
20 *spp.*, *Bordetella spp.*, *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxico; *Salmonella spp.*; *Listeria spp.*; *Helicobacter spp.*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Borrelia spp.*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C.*
25 *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, en donde el método comprende administrar al paciente que necesita del mismo, una cantidad segura y efectiva de 1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento bioactivo o variante del mismo, y 2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno asociado con tumor o un derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina.

4. Un método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el antígeno asociado con tumor o el 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, Prostase, STEAP, tirosinasa, telomerasa, survivina, CASB616, P53, ó Her2/neu.

5. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado porque el polipéptido IL-18 ó el fragmento bioactivo o variante del mismo, y la composición inmunogénica se administran en forma simultánea, por separado o en secuencias en cualquier orden.

6. Un método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque la citosina TH-1 y la composición

inmunogénica se administran en forma simultánea en la forma de una preparación farmacéutica combinada.

7. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, caracterizado porque el
5 polipéptido IL-18 ó el fragmento bioactivo o variante del mismo, es de origen humano o de murino.

8. Un método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque IL-18 es el polipéptido de la SEQ ID No. 6 ó de la SEQ ID No. 7 o el fragmento bioactivo o
10 derivado del mismo.

9. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, caracterizado porque el adyuvante de saponina es QS-21 ó QS-17.

10. Una preparación combinada que comprende en la
15 forma de ingredientes activos los siguientes componentes individuales: (1) polipéptido IL-18 ó fragmento bioactivo o variante del mismo y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno y un adyuvante de saponina, siendo los ingredientes activos, para el uso simultáneo, por
20 separado o en secuencias para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades autoinmunes y condiciones relacionadas.

11. Una preparación combinada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque los componentes
25 (1) y (2) se mezclan en adiciones en una composición.

12. Una preparación combinada de conformidad con las reivindicaciones 10 ó 11, caracterizada porque la composición inmunogénica comprende un antígeno asociado con tumor o un derivado inmunogénico del mismo y es
5 profiláctica o terapéuticamente activa contra cáncer.

13. Una preparación combinada de conformidad con la reivindicación 12, caracterizada porque el antígeno asociado con tumor o derivado inmunogénico del mismo se selecciona del grupo que comprende: un antígeno de la
10 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, Prostase, STEAP, tirosinasa, telomerasa, survivina, CASB616, P53, ó Her2/neu.

14. Una preparación combinada de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 13, caracterizada porque el polipéptido IL-18 ó el fragmento bioactivo o variante del mismo es de origen humano o de
múrido.

15. Una preparación combinada de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque IL-18 es el polipéptido de la SEQ ID No.6 ó la SEQ ID No. 7 ó un fragmento bioactivo o derivado del mismo.

16. Una preparación combinada de conformidad con
25 cualesquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 15,

caracterizada porque el adyuvante de saponina es QS-21 ó QS-17.

17. Una preparación combinada de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16, 5 caracterizada porque la composición inmunogénica comprende además un químico inmunoestimulante seleccionado del grupo que comprende: 3D-MPL, colesterol, oligonucleótido CpG que contiene al menos un dinucleótido CG inmuno-estimulador, hidróxido de aluminio, fosfato de 10 aluminio, tocoferol y una emulsión de aceite en agua o una combinación de 2 ó más de dichos adyuvantes.

18. Una preparación combinada de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque el adyuvante de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL, QS21, 15 colesterol o una emulsión de aceite en agua.

19. Una preparación combinada de conformidad con la reivindicación 18, caracterizada porque la emulsión de aceite en agua comprende escualeno, tocoferol y monooleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80).

20. Una preparación combinada de conformidad con la reivindicación 17, caracterizada porque la composición inmunogénica comprende QS21, colesterol y un oligonucleótido CpG que contiene al menos un dinucleótido CG inmuno-estimulador.

25. Una preparación combinada de conformidad con

cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 20, caracterizada porque ambos componentes activos están en la forma soluciones inyectables.

22. Un equipo farmacéutico que comprende en la
5 forma de ingredientes activos los siguientes componentes individuales: (1) un polipéptido IL-18 ó un fragmento bioactivo del mismo y (2) una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina, siendo los ingredientes
10 activos para el uso simultáneo, por separado o en secuencias para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades infecciosas, cáncer y enfermedades auto inmune.

23. Un equipo farmacéutico de conformidad con la
15 reivindicación 22, caracterizado porque la composición inmunogénica comprende un antígeno asociado con tumor o un derivado inmunogénico del mismo, y es profiláctica o terapéuticamente activo contra cáncer.

24. Un equipo farmacéutico de conformidad con la
20 reivindicación 23, caracterizado porque el antígeno asociado con 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,
25 Cripto, B726, NY-BR1.1, P510, MUC-1, Prostase, STEAP,

tirosinasa, telomerasa, survivina, CASB616, P53, o Her2/neu.

25. Una preparación combinada de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 20, para
5 utilizarse en medicina.

26. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 9, caracterizado porque comprende el uso de una preparación combinada de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones de la
10 10 a la 20.

27. El uso de un polipéptido IL-18 ó un fragmento bioactivo o variante del mismo en la fabricación de un medicamento para profilaxis y/o tratamiento de pacientes que padecen de o que son susceptibles a enfermedades
15 infecciosas, cáncer, enfermedades autoinmunes y condiciones relacionadas, y que ya están imprimados con una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina.

20 28. El uso de una composición inmunogénica que comprende un antígeno o derivado inmunogénico del mismo y un adyuvante de saponina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pacientes que padecen de o que son susceptibles a enfermedades infecciosas,
25 cáncer, enfermedades autoinmunes y condiciones

relacionadas, y que ya están imprimadas con un polipéptido IL-18 ó fragmento o variante inmunogénico del mismo.

29. El uso de conformidad con las reivindicaciones 27 ó 28, caracterizado porque el antígeno es un antígeno asociado con tumor y el cáncer es seleccionado del grupo que comprende: cáncer de seno, cáncer de pulmón, NSCLC, cáncer de colon, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, carcinoma escamoso de cabeza y cuello y cáncer de esófago.

30. El uso de conformidad con las reivindicaciones de la 27 a la 29, caracterizado porque el polipéptido IL-18 ó fragmento bioactivo o variante del mismo es de origen humano o de murino.

31. El uso de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque IL-18 es el polipéptido de la SEQ ID No. 6 ó SEQ ID No. 7 ó el fragmento bioactivo o derivado del mismo.

32. El uso de conformidad con las reivindicaciones de la 27 a la 31, caracterizado porque el adyuvante de saponina es QS-21 ó QS-17.

FIG. 1 Polipéptidos IL-18

FIG. 1A Secuencia de polipéptido IL-18 de 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 de polipéptido IL-18 de Múrido

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 de tumor in vivo en ratones no Tg de control

FIG. 2A -IL-18 1 μ g + vacunación con E7 + AS02

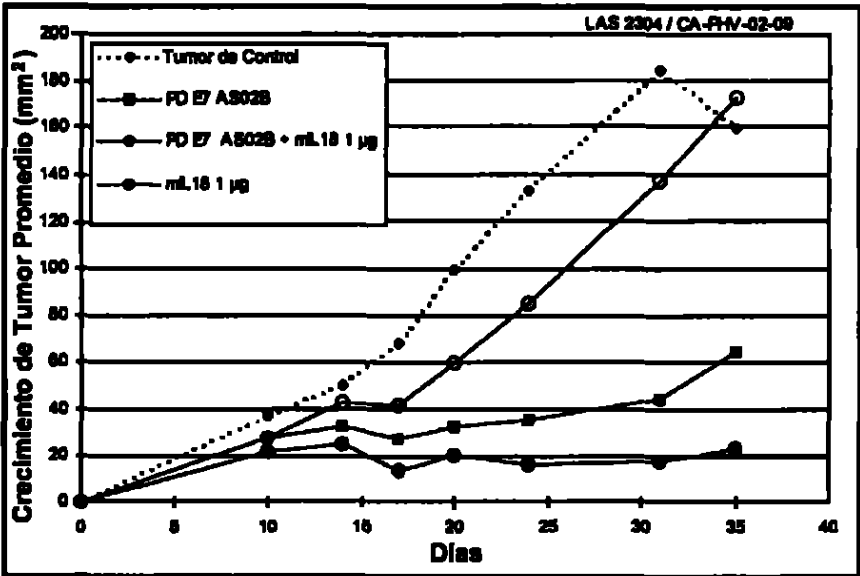


FIG. 2B -IL-18 100 μ g + vacunación con E7 + AS02

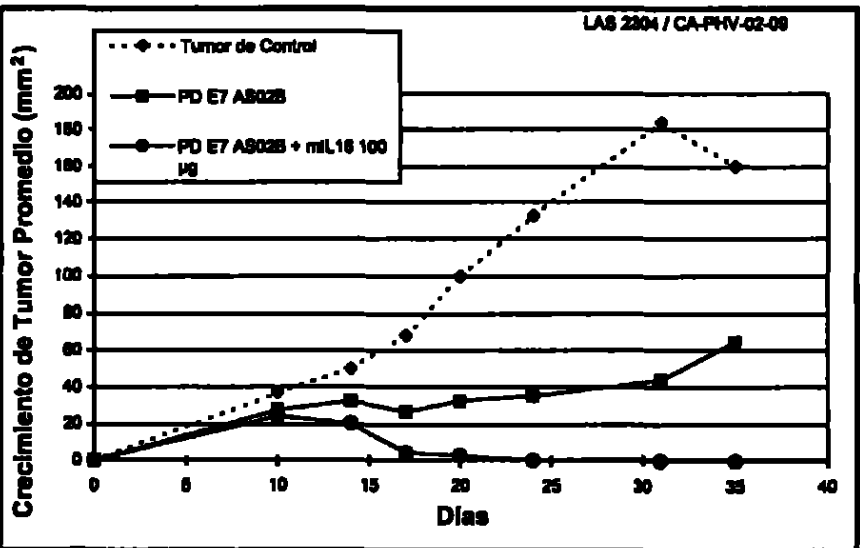


FIG. 3 Crecimiento de tumor In vivo en ratones Tg E7

FIG. 3A -IL-18 1 μ g + vacunación con E7 + AS02

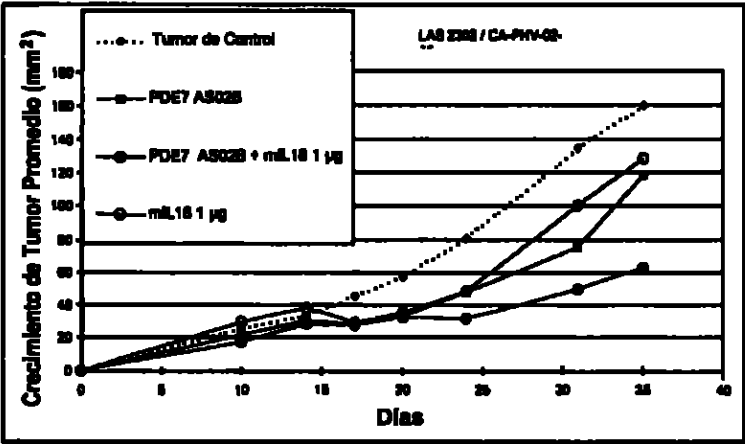


FIG. 3B -IL-18 100 μ g + vacunación con E7 + AS02

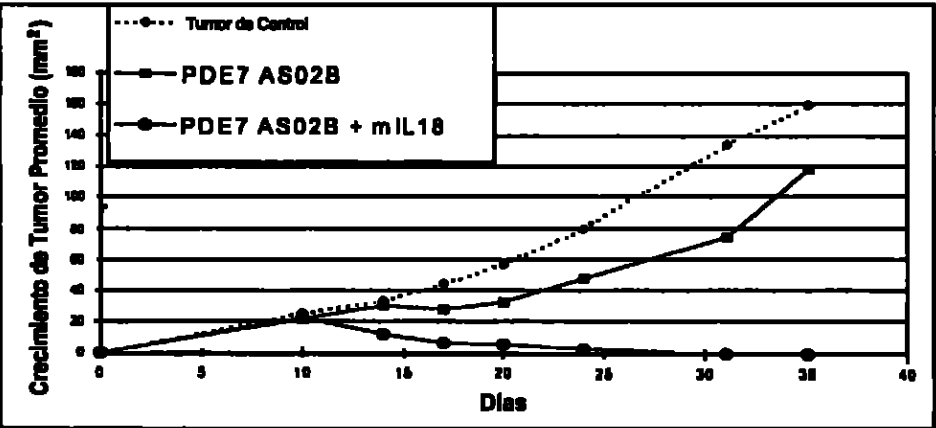


FIG. 4 Respuesta anticuerpo y perfil isotípico en ratones no Tg de control

FIG. 4A Respuesta anticuerpo

Respuesta Ig total (los tituladores estándar se expresan en EU/ml).

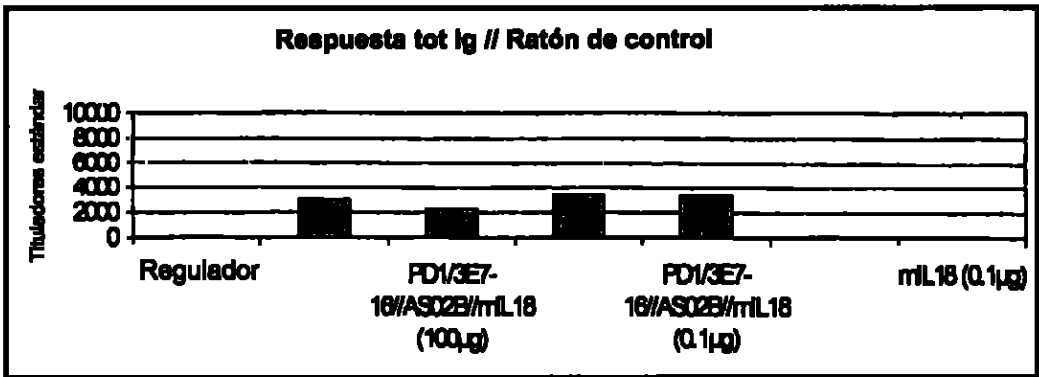


FIG. 4B Perfil isotípico

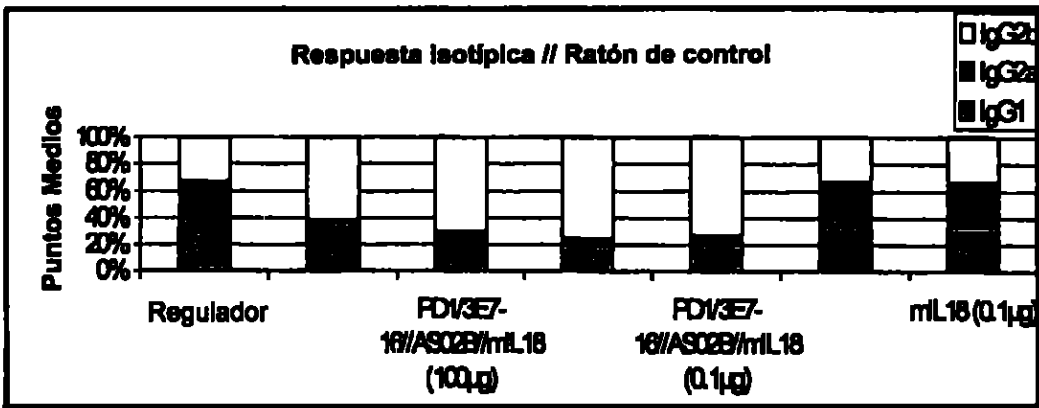


FIG. 5 Respuesta anticuerpo y perfil isotípico en ratones Tg E7

FIG. 5A Respuesta anticuerpo
Respuesta Ig total (los tituladores estándar se expresan en EU/ml).

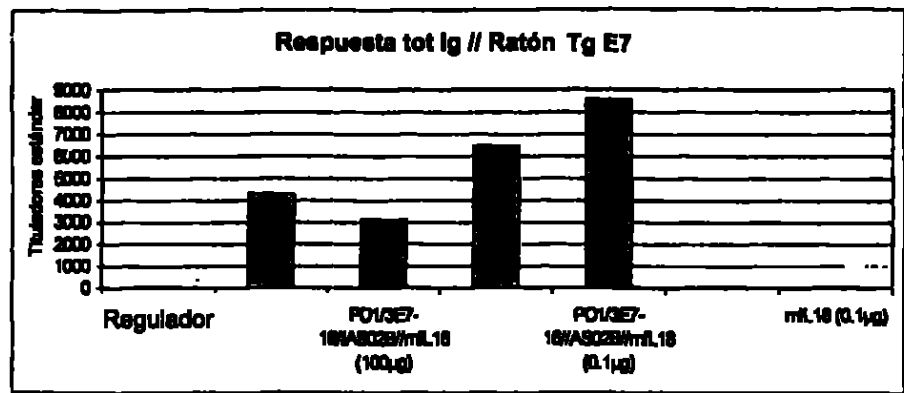


FIG. 5A Perfil isotípico

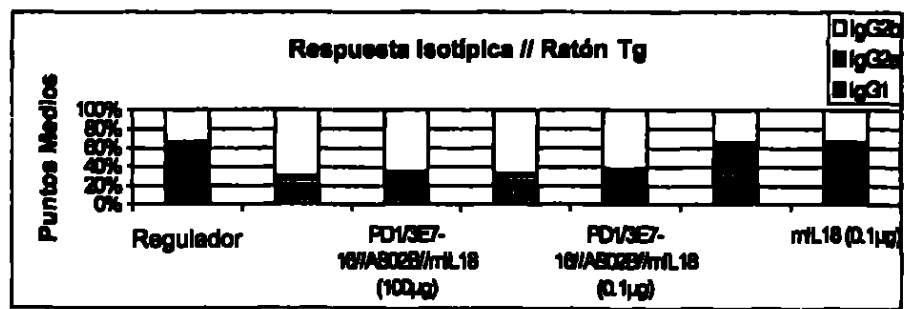
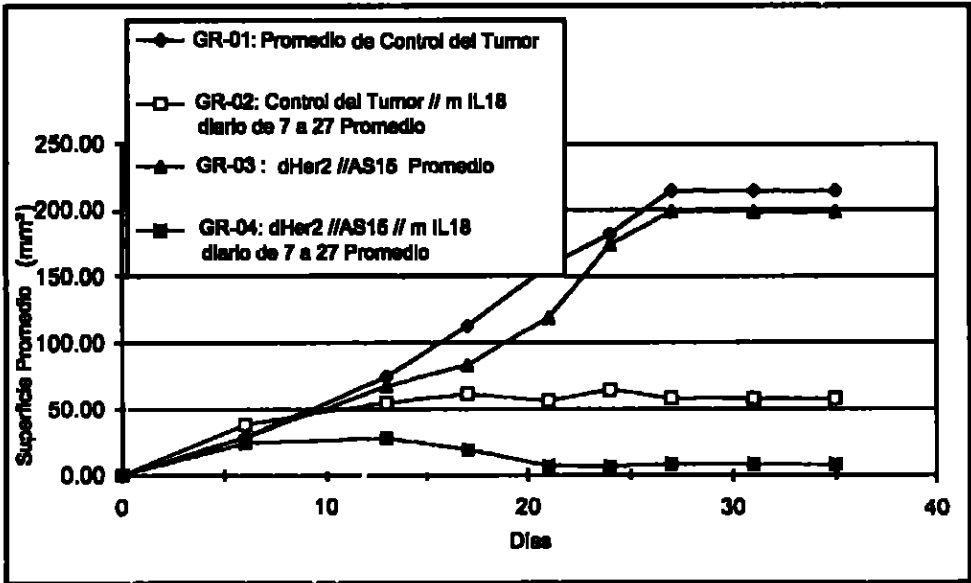


FIG. 6 Crecimiento del tumor in vivo en el modelo terapéutico TCI Her2



**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]
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ♦ 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 []


Firma Responsable

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 05-034636-00000-0000 Fec: 2008-04-07 19:02:01
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEMI Eje 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 150

COMPLETA []

Fecha _____

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

+56