



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 708**

51 Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 15/16 (2006.01)
A61P 15/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99968288 .3**
96 Fecha de presentación : **24.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1140165**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

54 Título: **Composiciones adyuvantes de saponina mejorada y métodos relacionados con las mismas.**

30 Prioridad: **08.01.1999 AU PP8073**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **CSL Limited**
45 Poplar Road
Parkville, VIC 3052, AU

72 Inventor/es: **Walker, John**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 317 708 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones adyuvantes de saponina mejorada y métodos relacionados con las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona de manera general con una composición adyuvante que tiene altas propiedades adyuvantes y baja reactogenicidad. La composición adyuvante de la presente invención es útil donde es inaceptable el desarrollo de la reactogenicidad luego de la administración de una composición inmunogénica, por ejemplo, pero no se limita a, la administración de una composición LHRH como un agente profiláctico y/o terapéutico para la modificación de la fertilidad y los patrones de comportamiento de animales domésticos o ganado destinado para el consumo.

Antecedentes de la invención

15 Los detalles bibliográficos de las publicaciones a que se refiere el autor en esta especificación se recolectan al final de la descripción.

Los adyuvantes están incluidos o se agregan a vacunas y otras formulaciones inmunogénicas, para incrementar y en algunos casos dirigir la respuesta inmune (ver revisiones de Gupta, 1998, Cox y Coulter, 1992, Azuma, 1992 y Aguado *et al.* 1999). Se apreciará que algunos adyuvantes, por ejemplo las emulsiones de aceite en agua y el agua en aceite, son consideradas ampliamente como adyuvantes fuertes en la medida en que ellas estimulan los altos niveles de anticuerpos, pero la reactogenicidad de tales adyuvantes precluye su uso rutinario en muchas especies animales o en el hombre. La reactogenicidad inaceptable se ha demostrado en muchos animales con la tradicional emulsión de aceite en agua de Friends, en la proporción en que el uso de este adyuvante en animales se ha prohibido o desanimado en algunos países, aún para propósitos experimentales. El uso de un adyuvante combinado de aceite en agua/dextrano DEAE en ganado (Hodgkinson *et al.* 1990) dio como resultado reacciones significativas e indeseables en el 30% de los animales vacunados.

Los adyuvantes más ampliamente utilizados en el hombre y animales se basan en sales de aluminio insolubles, particularmente las formas de hidróxido y fosfato, comúnmente y colectivamente denominadas "alumbre". La revisión reciente de Aguado *et al.* (1999) resalta la necesidad prevalente de adyuvantes más fuertes tanto en el hombre como en los animales para el desarrollo de vacunas más efectivas.

Por ejemplo, con un amplio rango de antígenos solubles, la respuesta inmune a tal antígeno suministrado solo es muy pobre, y en muchos casos es indetectable aún después de dos vacunaciones. Tales antígenos requieren el uso de un adyuvante para estimular una respuesta inmune consistente. Se apreciará que los adyuvantes conocidos ofrecen un rango de capacidades para estimular una respuesta inmune, más usualmente definida en términos de la respuesta de anticuerpo al antígeno inmunizante.

Para haptenos acoplados a una proteína portadora, se reconoce de manera amplia que se requiere un adyuvante poderoso. Por ejemplo, la hormona de péptido hipotálmica LHRH es un péptido de 10 aminoácidos que por sí misma es no inmunogénica. El acoplamiento de un LHRH a las proteínas portadoras, por ejemplo el toxoide de difteria o la ovalbúmina suministra la ayuda necesaria de la célula T para una respuesta inmune al hapteno LHRH. Para otros antígenos de peso molecular grande y complejos, la ayuda de la célula T se suministra usualmente por los epítopos de célula T dentro de la molécula misma.

El uso del dextrano DEAE como un adyuvante se ha descrito bien en la literatura científica. Wittman *et al.* (1975), utilizó el dextrano DEAE como adyuvante en una Vacuna de Virus de la Enfermedad de Pie y Boca (FMDV) en cerdos, y mostró que ésta indujo muy altos niveles de inmunidad. Houston *et al.* (1976) utilizó este adyuvante a una tasa de dosificación de un peso corporal de 1-5 mg/kg, para vacunar monos con un virus equino y mostró que éste indujo altos títulos de anticuerpo. Beh y Lascelles (1985) también han utilizado este adyuvante para inmunizar ovejas con ovalbúmina, y mostraron que éste indujo títulos mayores de anticuerpo que otros adyuvantes solubles. Ninguno de estos estudios consideró la reactividad del sitio del dextrano DEAE, sino ellos describieron los efectos adyuvantes significativos del dextrano DEAE en estas especies animales. El dextrano DEAE se ha utilizado en venados con el antígeno hemocianina de la lapa ojo de cerradura (KLH) (Hibma y Griffin, 1992). En este estudio, el dextrano DEAE indujo mayores respuestas del IgG al KLH que el adyuvante de Friends o el alumbre.

Las propiedades adyuvantes de la saponina han sido largamente reconocidas, porque tiene su capacidad para incrementar los títulos de anticuerpo a los inmunógenos. Como se utiliza aquí, el término "saponina" se refiere a un grupo de glucósidos de superficie activa, de origen vegetal compuestos de una región hidrofílica (usualmente varias cadenas de azúcar) en asocio con una región hidrófoba de estructura esteroide o triterpenoide. Aunque la saponina está disponible de un número de diversas fuentes, la saponina con la actividad adyuvante útil se ha derivado del árbol de América del Sur Quillaja saponaria (Molina). La saponina proveniente de esta fuente se utilizó para aislar una fracción "homogénea" denotada "Quil A" (Dalsgaard, 1974).

La reactividad del sitio de dosis es una preocupación mayor tanto para uso veterinario como humano de la Quil A en preparaciones de vacuna. Una manera de evitar la toxicidad del Quil A es el uso de complejos inmunoestimulantes (conocido como IscomsTM, una abreviatura para Complejos Inmuno Estimulantes). Esto es principalmente porque el

Quil A es menos reactivo cuando se incorpora a los complejos inmuno estimulantes, porque su asociación con el colesterol en el complejo reduce su capacidad a unirse al colesterol en las membranas celulares y de esta manera sus efectos celulíticos. Además, una cantidad más pequeña de Quil A se requiere para generar un nivel similar del efecto adyuvante.

Las propiedades de inmunomodulatorias de las saponinas del Quil A y los beneficios adicionales a derivarse de estas saponinas cuando ellas se incorporan en un complejo inmunoestimulante se han descrito en varias publicaciones, por ejemplo, Cox y Coulter, 1992; Dalsgaard, 1974; Morein *et al.* Especificaciones de las Patentes Australianas Nos. 558258, 589915, 590904 y 632067.

La vacunación contra la hormona liberadora de la hormona luteinizante de la hormona hipotalámica (denominada aquí como "LHRH", también conocida como GnRH) se ha demostrado como un método inmunológico para controlar la reproducción desde el comienzo de los 70 (Fraser 1975, Jeffcoate *et al* 1982). Elicitar una respuesta inmune al LHRH evita la liberación de la pituitaria anterior de las hormonas LH y FSH, que se requieren para el desarrollo y el mantenimiento de las gónadas -los testículos en el macho y los ovarios en la hembra. Así la reducción de los niveles de LH y FSH conduce a la pérdida de la función reproductiva.

Las operaciones de desexado (o castración) son los procedimientos quirúrgicos más ampliamente practicados en medicina veterinaria y en el manejo de animales de hatos. Una proporción significativa de ambos sexos de ganado doméstico y de animales de compañía son rutinariamente desexados quirúrgicamente para evitar una variedad de características indeseables que acompañan la madurez sexual. Los rasgos incluyen lucha, correteo, comportamiento sexual, pérdida de condición, tumores de los órganos reproductivos y embarazo.

El control del comportamiento de apareamiento mediante vacuna con vacunas conjugadas de LHRH en animales de compañía tales como perros, gatos y caballos, y en ganado específicamente en cerdos macho y ganado macho y hembra, se ha identificado como una meta tan significativa como el control de la fertilidad.

De manera similar, el control y tratamiento de los trastornos de las gónadas y otros órganos reproductivos, tanto de humanos como de animales, tal como el cáncer testicular, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, el agrandamiento de la próstata o la endometriosis es de importancia.

La Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU98/00532(WO 99/02180) describe que la eficacia de la vacunación contra el LHRH se mejora significativamente cuando el LHRH se administra como un conjugado con el toxoide de difteria y un polisacárido iónico tal como el dextrano DEAE. Sin embargo, aunque se mejora la eficacia, esta formulación induce aún así la reactividad tal como el hinchamiento visible, que puede ser de larga duración, en el sitio de administración. En algunos casos, tal como cuando se utiliza la formulación para vacunar animales domésticos (por ejemplo, perros) o ganado destinado para el consumo, la ocurrencia de tal reactividad luego de la vacunación contra LHRH que utiliza esta formulación es inaceptable. De acuerdo con esto, subsiste la necesidad de desarrollar una vacuna LHRH que exhiba tanto eficacia como baja reactividad.

La WO 91/04052 describe composiciones de vacuna sólida que comprenden una sustancia antigénica, una saponina y un adyuvante policatiónico tal como el dextrano DEAE. La sustancia antigénica da origen a anticuerpos con el propósito de luchar contra infecciones o para otros propósitos: por ejemplo, los anticuerpos contra GnRH pueden modular la fertilidad. La combinación de una saponina y un adyuvante policatiónico dan la longevidad mejorada de la vacuna y le posibilitan ser utilizada como un implante. La WO 88/7547 describe que un péptido que tiene una homología estructural primaria a una secuencia continua de los residuos de aminoácido de la hormona de crecimiento se puede utilizar en una formulación antigénica para potenciar los efectos de la hormona de crecimiento en un vertebrado. Ningún documento describe un componente de saponina como un complejo inmunoestimulante.

En un aspecto del trabajo que conduce a la presente invención, se ha determinado que la reactividad del LHRH conjugado al toxoide de difteria y un polisacárido iónico se pueden reducir cuando se reemplaza una proporción del componente de polisacárido iónico con un componente de saponina, particularmente un complejo inmunoestimulante.

Resumen de la invención

A lo largo de esta especificación y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprende" y las variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán por implicar la inclusión de un entero establecido o paso o grupo de enteros o pasos pero no la exclusión de ningún otro entero o paso o grupo de enteros o pasos.

Los Números de Identidad de Secuencia (SEQ ID NOS.) para las secuencias de nucleótido y aminoácido a que se refiere en la especificación se definen luego de la bibliografía. Un resumen de las SEQ ID NOS. se suministra en los Ejemplos.

Un aspecto de la presente invención se relaciona con una composición de adyuvante que comprende un componente polisacárido iónico y un componente de saponina, en donde el componente de saponina es un complejo inmunoestimulante.

ES 2 317 708 T3

Se ha encontrado que tal composición adyuvante tiene alta actividad adyuvante combinada con baja reactogenicidad. La ventaja de este adyuvante combinado sobre otros adyuvantes conocidos es que éste posee una combinación inusual de propiedades que incluyen:

- 5 a) una capacidad de obtener una respuesta inmune fuerte a un rango de antígenos y
- b) tener al mismo tiempo muy baja reactogenicidad o reactividad.
- 10 c) la reactogenicidad es inferior que aquella del componente más reactogénico en la combinación, y
- d) el efecto adyuvante o el efecto inmunoestimulante es mayor que aquella de los adyuvantes componentes solos.

15 En un aspecto, la composición adyuvante comprende un componente complejo inmunoestimulante libre de proteína.

En un aspecto adicional de la presente invención se suministra una composición inmunogénica que comprende un inmunógeno y una composición adyuvante como se describió anteriormente.

20 En aún otro aspecto adicional de la presente invención se suministra una composición farmacéutica que comprende una composición inmunogénica como se describió ampliamente anteriormente, junto con uno o más portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

25 En aún otro aspecto, la presente invención suministra el uso de una composición adyuvante como se describió ampliamente anteriormente en la elaboración de una composición para atraer una respuesta inmune efectiva en un animal.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se predica, en parte, sobre la determinación de que cuando el componente polisacárido iónico de la vacuna comprende LHRH conjugado a toxoide de difteria como se describió en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU98/00532 (WO 99/02180) se combina con un complejo inmuno estimulante, la reactogenicidad de la composición inmunogénica se reduce sin reducción significativa en la eficacia.

35 De acuerdo con esto, un aspecto preferido de la presente invención se relaciona con una composición inmunogénica para uso en obtener una respuesta inmune efectiva al LHRH, dicha composición comprende un conjugado toxoide de LHRH-difteria y una composición adyuvante, cuya composición adyuvante comprende un componente polisacárido iónico y un componente de saponina, en donde el componente de saponina es un complejo inmunoestimulante.

40 El desarrollo de la reactogenicidad a una preparación inmunogénica, tal como en el sitio de administración de una vacuna, se evalúa usualmente mediante referencia al desarrollo de un número de síntomas que incluyen los síntomas de inflamación tal como el hinchamiento que se detecta mediante palpación o, si es más severa, por el ojo, enrojecimiento, y formación de absceso. El grado de reactogenicidad se determina usualmente mediante referencia a la ocurrencia, duración y severidad de uno cualquiera o más de estos síntomas. Por ejemplo, la reactogenicidad que resulta en la 45 formación visible de un absceso es de mayor severidad que la reactogenicidad que involucra solamente hinchamiento. Además, el hinchamiento que es visible al ojo es una forma más severa de reactogenicidad que el hinchamiento que se detecta solo mediante palpación. De acuerdo con la presente invención, la referencia a la reactogenicidad que es “baja” se debe entender como la reactogenicidad que produce síntomas no detectables o síntomas que no son visibles al ojo. Por ejemplo, el hinchamiento que es detectable solo mediante palpación es un ejemplo de reactogenicidad que es baja. 50 La presente invención se debe entender como extendida a la ausencia completa de cualquier reactogenicidad. En el contexto de la presente invención, la baja reactogenicidad también se puede tomar por incluir hinchamiento visible de solamente corta duración.

55 La referencia a un “polisacárido iónico” se debe entender como una referencia a cualquier polisacárido o derivado o equivalente químico de éstos positivamente para ser cargado negativamente. La referencia a “derivado” y “equivalente químico” se debe entender por tener los mismos significados como se subraya adelante.

60 El polisacárido se puede modificar químicamente para introducir grupos cargados, de tal forma que éstos se vuelven altamente cargados. En forma sólida o cuando está en solución, los grupos cargados se parean con un contra ión de tal forma que la carga neta total es cero o cerca de cero. El polisacárido se puede seleccionar de uno cualquiera de un número de tales moléculas, preferiblemente moléculas solubles para ayudar en la esterilización por ejemplo mediante filtración, pero el polisacárido no se restringe a los polisacáridos solubles, como se pueden esterilizar los materiales insolubles mediante radiación, calor en húmedo o en seco u otros procesos que no se basan en la solubilidad. El polisacárido es preferiblemente un polímero de glucosa, ligado a alfa 1-6 para formar un dextrano soluble, aunque 65 también se pueden utilizar formas insolubles de dextrano ligadas a alfa 1-3.

El polisacárido se puede modificar para dar grupos fuertes cargados positivamente (+ve) a valores de pH entre 5.0 y 8.0. El grupo modificante se puede seleccionar de uno cualquiera de un número de los grupos cargados +ve, pero

ES 2 317 708 T3

preferiblemente es un grupo dietilaminoetilo (DEAE). Un polisacárido cargados +ve alternativo es el dextrano QAE. El dextrano modificado conocido como dextrano DEAE, puede tener un tamaño molecular en el rango de 50.000 Da a 5×10^6 Da, preferiblemente un rango de peso molecular de 500,000 a 1.5×10^6 da. Se conoce que tales macromoléculas grandes como el dextrano son de tamaño heterogéneo, típicamente con 95% del material en aproximadamente un rango de tamaño de 4 veces. El nivel de modificación es alto, de tal forma que en promedio cada tercer residuo de glucosa se sustituye con un grupo DEAE. Tal material se puede comprar comercialmente o elaborar de dextrano. Alternativamente, el dextrano u otro polisacárido se puede cargar negativamente, por ejemplo mediante la modificación con grupos sulfato. Preferiblemente, el componente polisacárido iónico de la composición adyuvante de la presente invención es un componente de dextrano DEAE.

El componente de saponina puede ser, por ejemplo, Quil. A u otra preparación de saponina purificada o semi-purificada (que incluye una mezcla de fracciones de saponina).

Los complejos inmunoestimulantes (o IscomTM) que se incorporan en la composición adyuvante de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas por las personas expertas en el arte, y que se describen en detalle en las publicaciones de Cox y Coulter, 1992 y Morein *et al.* Especificaciones de Patentes Australianas No. 558258, 589915, 590904 y 632067.

En resumen, los complejos inmunoestimulantes son típicamente, pero no se limitan a, estructuras similares a jaulas pequeñas de 30-40 nM de diámetro. La formulación final del complejo inmunoestimulante con una cantidad óptima de proteína es una proporción molar de Quil A, colesterol, fosfatidil colina y proteína en una proporción de 5:1:1:1. Un complejo inmunoestimulante puede contener, por ejemplo, 5 a 10% en peso de Quil A, 1 a 5% de colesterol y fosfolípidos y la proteína restante. Los péptidos se pueden incorporar en el complejo inmunoestimulante bien sea directamente o por un acoplamiento químico a una proteína portadora (por ejemplo, el toxoide de difteria o la proteína de cubierta de influenza) después de la incorporación de la proteína en los complejos inmunoestimulantes. La referencia a un "complejo inmunoestimulante" se debe entender por incluir la referencia a los derivados, equivalentes químicos y análogos de ésta. Por ejemplo, la referencia a un derivado de un complejo inmunoestimulante incluye la referencia a un complejo inmunoestimulante en el cual uno o más del Quil A, colesterol, fosfatidil colina o proteína, por ejemplo, se vacían o donde el componente además del Quil A, colesterol, fosfatidil colina o proteína se agrega al complejo. El equivalente funcional de un complejo inmunoestimulante puede ser un complejo inmunoestimulante en el cual uno o más de sus cuatro componentes se reemplazan con un equivalente funcional. En una modalidad preferida de la presente invención, el componente de proteína del complejo inmunoestimulante se suprime. Este tipo de complejo inmunoestimulante se denomina aquí como un "complejo inmunoestimulante libre de proteína" (o IscomatrixTM).

El complejo inmunoestimulante en la composición adyuvante de la presente invención se debe cargar opuestamente al componente polisacárido iónico. Así en la combinación preferida con dextrano DEAE positivamente cargado, el complejo inmunoestimulante se carga negativamente. Esta característica deseable se puede lograr mediante la incorporación de saponinas cargadas en la estructura. La formación de una composición adyuvante efectiva al combinar un complejo inmunoestimulante con un componente polisacárido negativamente cargado requeriría que el complejo inmunoestimulante se cargue positivamente. En una forma alternativa, el complejo inmunoestimulante positivamente cargado se combinaría con un componente polisacárido iónico negativamente cargado.

Un amplio rango de antígenos, u otros inmunógenos se pueden combinar con la composición adyuvante novedosa de la presente invención, incluyendo antígenos de proteína soluble, el hapteno de péptido conjugado a una proteína portadora y el virus completo como antígeno. Además, el conocimiento previo de los adyuvantes y su actividad, otros antígenos tales como las proteínas recombinantes, los polisacáridos antigénicos, los lípidos antigénicos, los péptidos y otras partículas antigénicas también se pueden utilizar adecuadamente con esta composición adyuvante.

La formulación final se va a utilizar para generar una respuesta inmune contra el antígeno de elección. Ambos complejos inmunoestimulantes cargados con antígeno o complejos inmunoestimulantes libres de proteína se pueden utilizar para formar la composición adyuvante. El adyuvante de combinación se puede formar con el antígeno incorporado primero en el complejo inmunoestimulante. En una forma alternativa, el antígeno se puede agregar al adyuvante de combinación después de la formulación del adyuvante. Esto tiene muchas ventajas en la elaboración de vacunas, tanto experimental como comercialmente, como una forma en que se puede utilizar el adyuvante para un amplio rango de antígenos.

El dextrano DEAE se conoce en la técnica por ser un adyuvante muy fuerte, pero a menudo con reactogenicidad inaceptable. Los complejos inmunoestimulantes son conocidos por ser adyuvantes aceptables por si mismos, pero con un grado mucho menor de actividad inmunoestimulante cuando se compara con el dextrano DEAE. Más específicamente, el nuevo adyuvante es una combinación cuidadosamente controlada de dextrano DEAE y complejo inmunoestimulante, la proporción controlada siendo aquella que mantiene la actividad adyuvante de ambos componentes, particularmente del adyuvante más poderosos de dextrano DEAE pero también de complejos inmunoestimulantes, pero la combinación es tal que la reactogenicidad no deseada del dextrano DEAE se neutraliza. En la técnica, se espera que las combinaciones de adyuvantes sean más reactogénicas que los componentes individuales.

Tal es el caso con el dextrano DEAE combinado con emulsiones de aceite (Hodgkinson *et al.* 1990).

ES 2 317 708 T3

La experimentación extensiva en el rango de las especies animales ha mostrado que la proporción en masa del polisacárido iónico tal como el dextrano DEAE sobre aquella del complejo inmunoestimulante puede ser crítica para obtener un adyuvante en combinación de baja reactividad. Reduciendo el nivel de dextrano DEAE en 10 veces daría como resultado un adyuvante de combinación de actividad débil, pero también baja reactividad. Como se demostró en los Ejemplos, utilizando un nivel más alto de dextrano DEAE con una proporción más baja de complejos inmunoestimulantes, por ejemplo, una proporción en masa de 208, de como resultado un adyuvante de combinación de actividad inmunoestimulante ligeramente más baja, pero reactividad inaceptablemente mayor.

Las proporciones en masa referidas aquí se relacionan con la composición adyuvante preferida que comprende el dextrano DEAE en el cual el dextrano se sustituye cada tercer residuo de glucosa, y un complejo inmunoestimulante libre de proteína que tiene una proporción de Quil A:colesterol:fosfolípido de 5:1:1.

Las formulaciones con una proporción en masa en el rango de 50 a 300 se han encontrado como efectivas, con un rango preferido de 100 a 140. Una formulación preferida es una con una proporción en masa de dextrano DEAE a un complejo inmunoestimulante de 125. Esto se ejemplifica por vacunas que contienen 10 mg de dextrano DEAE y 80 μ g de complejo inmunoestimulante para uso en animales más pequeños o más sensibles tales como perros o el hombre, o de manera similar 100 mg de dextrano DEAE con 800 μ g de complejo inmunoestimulante, o 150 mg de dextrano DEAE con 500 μ g de complejo inmunoestimulante, para uso en animales más grandes tales como caballos, ganado, ovejas y cerdos.

La referencia a una respuesta inmune “efectiva” se debe entender como una referencia a una respuesta inmune que conduce directa o indirectamente a un efecto profiláctico o terapéutico deseado. En el caso donde el inmunógeno comprende un conjugado de toxina LHRH-difteria, tal respuesta incluye la reducción o el bloqueo completo de la función reproductiva (es decir, reduce o evita el desarrollo de o el funcionamiento de una cualquiera o más de las actividades de los órganos reproductores o modula los niveles hormonales de un animal de tal forma que uno cualquiera o más aspectos de la reproducción o la actividad reproductiva se reducen) en por lo menos 90%, y preferiblemente por lo menos 95%, de los animales tratados. Se debe entender que la eficacia es una medida funcional y no se define mediante referencia a un título de anticuerpo anti-LHRH solo en razón a que la presencia del anticuerpo circulante solo no es necesariamente indicativa de la capacidad de dicho anticuerpo circulante a bloquear la función reproductiva. El término “órgano reproductor” se debe entender en su sentido más amplio por referirse a las gónadas macho y hembra y a los órganos sexuales accesorios. Los “órganos sexuales accesorios” se deben entender también en su sentido más amplio e incluyen, por ejemplo, la próstata, los senos, las vesículas seminales y el útero.

La referencia en lo sucesivo a “LHRH” se debe leer como incluyendo la referencia a todas las formas de LHRH y derivados, equivalentes y análogos de éste.

La referencia a “derivados, equivalentes y análogos” se debe entender como incluyendo la referencia a los fragmentos, partes, porciones, equivalentes químicos, mutantes, homólogos y análogos de fuentes natural, sintética o recombinante, incluyendo proteínas de fusión. Por ejemplo, con respecto al LHRH, dicho LHRH incluye péptidos que comprenden una secuencia de los amino ácidos sustancialmente como se establecen en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4 o que tiene por lo menos 50% de similitud con ésta. Las moléculas definidas en las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3 son del humano y se conservan en todos los mamíferos. La SEQ ID NO:4 es un derivado de la SEQ ID NO:2 en donde los espaciadores se han introducido en el terminal N. Los equivalentes químicos del LHRH pueden actuar como un análogo funcional del LHRH. Los equivalentes químicos pueden no ser derivados necesariamente del LHRH pero pueden compartir ciertas similitudes. Alternativamente, los equivalentes químicos pueden ser específicamente diseñados para semejar ciertas propiedades físico-químicas del LHRH. Los equivalentes químicos se pueden sintetizar químicamente o se pueden detectar luego de, por ejemplo, selección del producto natural.

Los homólogos de LHRH contemplados aquí incluyen, pero no se limitan a, LHRH derivado de diferentes filas incluyendo aves, peces, reptiles e invertebrados.

Los “derivados” también se pueden derivar de la inserción, supresión o sustitución de aminoácidos. Los derivados de inserción de aminoácido incluyen fusiones terminales amino y/o carboxílicas así como también las inserciones intrasecuencia de aminoácidos únicos o múltiples. Las variantes de secuencia de los aminoácidos de inserción son aquellas en las cuales uno o más aminoácidos o residuos de aminoácido no naturales se introducen en un sitio pre-determinado en la proteína aunque también es posible la inserción aleatoria con la selección adecuada del producto resultante. Las variantes supresionales se caracterizan por la remoción de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes sustitucionales del aminoácido son aquellas en las cuales por lo menos un residuo en la secuencia se ha removido y se han insertado en su lugar diferentes residuos naturales o no naturales. Las sustituciones típicas son aquellas hechas de acuerdo con la Tabla 1:

65

ES 2 317 708 T3

TABLA 1

Residuos adecuados para sustituciones de aminoácido

Residuo Original	Sustituciones de Ejemplo
Ala	Ser
* Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
* Glu	Ala
* Gly	Pro
* His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
* Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
* Ser	Thr
Thr	Ser
* Trp	Tyr
* Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu
Clave: Los residuos de aminoácido marcados con un * indican residuos presentes en la secuencia LHRH de mamífero	

Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a los isómeros D de dichos aminoácidos. Las “adiciones” a las secuencias de aminoácido incluyen la fusión con otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

La referencia al toxoide de difteria se debe entender como una referencia a todas las formas de toxoide de difteria y a los derivados de ésta. El término “derivados” tiene el mismo significado que se definió anteriormente. Los derivados pueden incluir, por ejemplo, moléculas que comprenden los epítomos de célula T del toxoide de difteria o dichos epítomos de célula T en aislamiento.

Preferiblemente, dicho LHRH comprende un fragmento terminal C de LHRH de por lo menos cinco aminoácidos. Más preferiblemente, dicho LHRH es un LHRH de longitud completa o una “forma 1-10 de LHRH” que comprende la secuencia de aminoácido sustancialmente como se establece en la SEQ ID NO:1. Aún más preferiblemente, dicho LHRH comprende la secuencia de aminoácido sustancialmente como se establece en la SEQ ID NO: 2 y en donde el terminal carboxilo de dicha secuencia de aminoácido se amina. Dicho LHRH preferido se denomina aquí como la “forma 2-10 de LHRH”.

De acuerdo con esto, en una modalidad preferida, se suministra una composición para uso en obtener una respuesta inmune efectiva a LHRH que comprende un conjugado toxoide de difteria con la forma 2-10 de LHRH y una composición adyuvante, cuya composición adyuvante comprende un componente polisacárido iónico (preferiblemente un componente de dextrano DEAE) y un componente de saponina, en donde el componente de saponina es un complejo inmunoestimulante.

En otra modalidad, se suministra una composición para uso en obtener una respuesta inmune efectiva a LHRH que comprende un conjugado de toxoide de difteria que forma 2-10 LHRH y una composición adyuvante, cuya composición adyuvante comprende un componente polisacárido iónico (preferiblemente un componente de dextrano DEAE) y un componente de saponina, en donde el componente de saponina es un complejo inmunoestimulante libre de proteína.

Aunque no pretende limitar esta modalidad de la invención a ningún otro método, el péptido LHRH se puede sintetizar mediante química Fmoc y el péptido resultante ser acoplado a un toxoide de difteria de la proteína portadora. Dicho acoplamiento se puede desarrollar como se describe en Ladd *et al* 1990 o en Bonneau *et al* 1994, y el conjugado resultante del péptido y la proteína portadora (denominada aquí como “conjugado de péptido”) procesado para

ES 2 317 708 T3

ser un péptido libre desunido y otros subproductos de conjugación. Tal procesamiento se puede lograr mediante diálisis convencional o mediante ultrafiltración. El conjugado de péptido resultante se adsorbe al adyuvante polisacárido iónico.

5 Aún sin limitar la presente invención a una cualquiera teoría o modo de acción, la administración de una cantidad efectiva de la preparación de LHRH de la presente invención induce una respuesta inmune significativamente más efectiva contra el LHRH que las composiciones de LHRH-portador-adyuvante descritas en la técnica anterior. Dicha eficacia mejorada se observa cuando la composición LHRH inmunogénica comprende específicamente el toxoide de difteria portadora y un adyuvante polisacárido iónico. Al reemplazar una porción del componente polisacárido iónico
10 con un componente del complejo inmunoestimulante, la reactogenicidad de la preparación del conjugado LHRH se puede reducir mientras que se mantiene su eficacia.

Las preparaciones del conjugado LHRH adecuadas para uso de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente 5-500 μg del conjugado toxoide LHRH-difteria en 5-500 mg de polisacárido iónico (tal como dextrano DEAE)/40-400 μg de complejo inmunoestimulante (tal como IscomatrixTM).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden administrar mediante inyección por cualquiera de las rutas habitualmente conocidas en la técnica de vacunología, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intradérmica o por administración oral, o por aplicación a las membranas de mucosa, sea
20 por aplicación directa en solución o gel u otra formulación adecuada, o por administración de aerosol a las superficies nasal o respiratoria. Preferiblemente, la formulación se administra mediante una inyección subcutánea o intramuscular.

La formulación se puede almacenar como sólido, congelada o seca, bien sea por secado por congelamiento o liofilización, o por secado por dispersión u otras formas de secado.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o las dispersiones y los polvos estériles para la preparación extemporánea de las soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ésta debe ser estable bajo condiciones de elaboración y almacenamiento y se deben preservar contra la acción contaminante de los microorganismos tales como las bacterias y los hongos. El portador puede ser
30 un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede efectuar mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o sales tales como cloruro de sodio. La absorción prolongada o la liberación retrasada de las composiciones inyectables se pueden efectuar mediante el uso de las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan al incorporar los varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables
45 estériles, los métodos preferidos de preparación son la técnica de secado por vacío, secado por congelamiento y la técnica de secado por rociado que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la solución filtrada previamente estéril de ésta.

Cuando los ingredientes activos son adecuadamente protegidos ellos se pueden administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o ellos se pueden incluir en una cápsula de gelatina con cubierta dura o suave, o estar comprimidos en tabletas, o incorporados directamente con el alimento de la dieta. Para la administración oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizarse en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, galletas, y similares. El porcentaje de las composiciones y preparaciones pueden, por supuesto, variar y estar convenientemente entre aproximadamente 5 a
55 aproximadamente 80% del peso de la unidad. La cantidad del compuesto activo en tales composiciones útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada.

Las tabletas, pastillas, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener los componentes como se listan a continuación: un aglutinante tal como goma, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de papa, ácido alginico y similares; y un lubricante tal como estearato de magnesio. Cuando la forma de unidad de dosis es una cápsula, ésta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Otros varios materiales pueden estar presentes como recubrimientos o modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosis. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, metilo y propilparabenos como conservantes, y un tinte. Por supuesto, cualquier material, utilizado
65 para preparar cualquier forma de unidad de dosis debe ser veterinariamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el o los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

ES 2 317 708 T3

Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso isotónicos y de absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias veterinariamente activas son bien conocidos en la técnica. Excepto hasta ahora como medio o agente convencional es incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso de éste en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosis para la fácil administración y la uniformidad de la dosificación. Para la administración al ganado es particularmente ventajoso utilizar un recipiente multi-dosis ligado a una pistola de vacunación repetitiva. La forma de unidad de dosis como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asocio con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosis novedosas de la invención se dictan por y directamente dependen de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición tal como un material activo para el tratamiento de enfermedades en sujetos vivos que tienen una condición de enfermedad en la cual la salud del cuerpo se afecta como se describe aquí en detalle.

El ingrediente activo principal está compuesto para una administración conveniente y efectiva en cantidades efectivas con un portador farmacéuticamente adecuado en la forma de unidad de dosis como se describió anteriormente. Una forma de unidad de dosis puede, por ejemplo, contener el compuesto activo principal en cantidades que varían desde 0.5 μg a aproximadamente 2000 μg . Expresadas en proporciones, el compuesto activo se presenta en general desde aproximadamente 0.5 μg a aproximadamente 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de portador. En el caso de las composiciones que contienen los ingredientes activos suplementarios, las dosis se determinan mediante referencia a la dosis y manera usuales de administración de dichos ingredientes.

La referencia a un "animal" se debe entender como la referencia a todos los animales que incluyen primates (por ejemplo, humanos, monos), animales de ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, caballos, burros, cabras, cerdos), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, ratas, conejillos de indias, conejos, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), animales silvestres cautivos (por ejemplo, emus, canguros, ciervos, zorros), aves (por ejemplo, pollos, patos, gallinas enanas, faisanes, emus, avestruces), reptiles (por ejemplo, lagartijas, serpientes, ranas) y peces (por ejemplo, trucha, salmón, atún). Dicho animal puede ser macho o hembra.

Las características adicionales de la presente invención se describen más completamente en los siguientes Ejemplos. Se debe entender, sin embargo, que esta descripción detallada está incluida solamente con propósitos de ejemplificar la presente invención. No se debe entender de ninguna manera como una restricción sobre la descripción amplia de la invención como se establece anteriormente.

Ejemplo 1

Preparación de la preparación del conjugado LHRH

El conjugado LHRH se basa en un péptido de forma 2-10 sintética de la Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante (LHRH) acoplada a una proteína portadora. El péptido en sí mismo es demasiado pequeño por ser antigénico, y el acoplamiento a una proteína portadora se requiere de tal forma que el péptido actúa como un hapteno y se induce inmunidad al LHRH. La proteína portadora es un toxoide de difteria.

El péptido se sintetiza mediante química Fmoc y el péptido LHRH de la forma 2-10 resultante se acopla al toxoide de difteria. El acoplamiento se puede desarrollar como se describe en Ladd *et al.* 1990 o en Bonneau *et al.* 1994, y el conjugado de péptido resultante y el toxoide de difteria procesado para ser un péptido libre o desunido y otros subproductos de conjugación. Tal procesamiento se puede lograr mediante diálisis convencional o mediante ultrafiltración.

La preparación de la proteína portadora LHRH resultante se puede utilizar para preparar una composición para la administración mediante la formulación con o en un adyuvante. Los niveles de componente activo y adyuvante son en parte dependientes de las especies que son objetivo y se escogen para lograr el nivel deseado y la duración de la respuesta inmune requerida y en la falta de reactividad (es decir compatibilidad de tejidos).

Ejemplo 2

A. Preparación de un complejo inmunoestimulante libre de proteína (Iscomatrix™)

La solución de Quil A (Superfos, Dinamarca) (estéril) y un dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC)/solución de colesteroles en 20% de Mega 10 detergente se combinan asépticamente bajo condiciones GMP en un recipiente de reacción a temperatura controlada estéril en cantidades calculadas para dar como resultado las proporciones de partida de 5:1:1 para Quil A:DPPC:colesterol (en peso). Después de la reacción, la preparación se ultrafiltra para remover los materiales de partida no incorporados y el detergente Mega 10 libre. Esta preparación, conocida como Iscomatrix™, es esencialmente un adyuvante desarrollado que consiste de partículas de complejo inmunoestimulante libre de proteína.

ES 2 317 708 T3

B. Preparación del Adyuvante de Combinación que comprende dextrano DEAE e Iscomatrix™

5 El dextrano DEAE (Farmacia, TM rango 500,000 a 1,500,000) se prepara simplemente como una solución al 20% p/v al disolverse primero en agua, el pH se ajusta a 7.5 con NaOH, el volumen ajustado para dar la concentración requerida y luego esterilizado mediante filtración.

10 El Iscomatrix™ y el dextrano DEAE, más el antígeno se mezclan entonces en proporciones apropiadas, seguido mediante la adición de diluyente para ajustar el volumen final para lograr la concentración correcta de todos los componentes de la vacuna.

15 Un volumen apropiado de dextrano DEAE se agrega primero al recipiente de mezcla estéril que contiene un dispositivo de agitación adecuado. Para volúmenes de menos de 2 litros, es adecuada una barra de agitación magnética. El volumen apropiado de Iscomatrix™ (2 mg/mL) se agrega luego, seguido mediante los volúmenes apropiados de antígeno y luego el diluyente para llevar el material al volumen correcto. El diluyente de elección se de baja concentración iónica, para llevar la formulación final total a una isotonicidad aproximada y así evitar el dolor a la inyección debido a la hiper-tonicidad o mayor que la osmolaridad fisiológica. Esto es de particular importancia en la técnica de la formulación de vacuna, en razón a que el dolor severo que resulta de la inyección es altamente indeseable y haría la formulación completa inadecuada. El diluyente encontrado por ser adecuado para una vacuna de canino es de agua estéril para inyección, es decir agua destilada libre de pirógeno.

20

Ejemplo 3

25 A. Preparación de Vacunas para Ensayos en Perros

a. Adyuvante de dextrano DEAE solo

30 La formulación requerida para ser probada en este ensayo fue 1 mL de dosis que contiene 50 mg de dextrano DEAE, 200 µg de conjugado de toxoide de LHRH-difteria, con tiomersal (0.01%) agregado como conservante, en una solución salina amortiguada de fosfato estéril.

35 El adyuvante para esta vacuna se prepara al disolver dextrano DEAE en agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con hidróxido de sodio. La concentración final del dextrano DEAE se ajusta a 20% p/v mediante la adición de agua destilada, después de ajuste del pH. La solución es luego filtrada estéril. El péptido LHRH (2-10 LHRH) se conjuga al toxoide de difteria como se describió en el Ejemplo 1. La preparación del conjugado se filtra estéril y la concentración de proteína determinada mediante métodos estándar, por ejemplo, ensayo de proteína BCA. La preparación utilizada para este estudio fue de 5.7 mg de proteína/mL.

40 b. Adyuvante Iscomatrix™ solo

45 La formulación requerida para ser probada en este ensayo fue de 1 mL de dosis que contiene 60 µg de Iscomatrix™, 200 µg del conjugado de toxoide de LHRH-difteria, con tiomersal (0.01%) agregado como conservante en solución salina amortiguada de fosfato estéril.

50 El adyuvante para esta vacuna, Iscomatrix™, se prepara como se describe en el Ejemplo 2A utilizando Quil A como el derivado de saponina, junto con colesterol, dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) y Mega 10 como el detergente. El proceso se desarrolla bajo condiciones estériles con todos los componentes esterilizados antes de la adición. La concentración de Quil A se determinó por ser 2.24 mg/ml.

55 El péptido LHRH (2-10 LHRH) se conjuga al toxoide de difteria como se describe en el Ejemplo 1. La preparación del conjugado se filtra estéril y la concentración de proteína se determina mediante métodos estándar, por ejemplo, el ensayo de proteína BCA. La preparación utilizada para este estudio fue de 5.7 mg de proteína/mL.

c. Iscomatrix™ + dextrano DEAE

60 La formulación requerida para ser probada en este ensayo fue de 1 mL de dosis que contiene 60 µg de Iscomatrix™ + 10 mg de dextrano DEAE, 200 µg del conjugado de toxoide de LHRH-difteria, con tiomersal (0.01%) agregada como preservativo, en una solución salina amortiguada de fosfato estéril.

65 El adyuvante para esta vacuna es un adyuvante de compuesto, obtenido al combinar las proporciones adecuadas de Iscomatrix™ y dextrano DEAE. El Iscomatrix™, se prepara como se describe en el Ejemplo 2A. El dextrano DEAE se prepara como se describió anteriormente.

El péptido LHRH (2-10 LHRH) se conjuga al toxoide de difteria como se describe en el Ejemplo 1. La preparación del conjugado se filtra estéril y la concentración de proteína se determina por métodos estándar, por ejemplo, el ensayo de proteína BCA. La preparación utilizada para este estudio fue de 4.9 mg de proteína/mL.

ES 2 317 708 T3

B. Vacunación de perros

Todos los ensayos se condujeron de una forma idéntica.

5 Los perros de 6-12 meses de edad y de sexo mezclado se colocaron en corrales al interior con acceso libre con corridas al exterior. Se alimentaron con una dieta balanceada comercialmente disponible.

10 Los perros (grupos de 7) se vacunaron subcutáneamente en el pescuezo a las 0 y 4 semanas con 1 mL de dosis de vacuna. Todas las vacunas se administraron de una jeringa de 2 mL ajustada con una aguja calibre 23.

15 Los perros se sangraron a intervalos regulares para monitorear los niveles de anticuerpo a LHRH. La reactogenicidad de las vacunas se determinó mediante examen cercano a los perros después de la vacunación.

El examen fue mediante inspección visual y a través de palpación manual del sitio de vacuna y el área circundante.

15 Las reacciones del sitio se calificaron mediante examen visual y palpación física del sitio de inyección y el área circundante.

20 Las reacciones en el sitio se calificaron mediante examen visual cercano y palpación física del sitio de inyección y el área circundante. Las reacciones se calificaron como:

- 0 Reacción no visible o detectable
- 1 Reacción solo detectable mediante palpación
- 25 2 Reacción visible detectable sin palpación
- 3 Reacción con absceso severo

30

Calificaciones de reacción del sitio

35

Formulación de Vacuna	1 Semana PB			2 Semanas PB			4 Semanas PB		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Dextrano DEAE (50mg)	3/7	2/7	2/7	3/7	4/7	-	7/7	-	-
Iscomatrix™ (60µg)	7/7	-	-	7/7	-	-	7/7	-	-
40 Dextrano DEAE (10mg) + Iscomatrix™ (60µg)	5/7	1/7	1/7	7/7	-	-	7/7	-	-
(Nota: PB = post-refuerzo)									

45

50 Estos resultados muestran que la formulación de dextrano DEAE es mucho más reactiva que la formulación de Iscomatrix™ o la formulación de Iscomatrix™ + dextrano DEAE. Con el dextrano DEAE solo, las reacciones significativas (Calificación 1 o mayor) persistieron durante por lo menos 2 semanas. Con la formulación de Iscomatrix™, las reacciones no se detectaron y con la formulación de dextrano DEAE + Iscomatrix™, las reacciones menores en 2/7 perros persistieron solamente durante 1 semana.

55 Con el fin de suministrar una indicación más cuantitativa de la reactogenicidad, los volúmenes aproximados de las reacciones del sitio, cuando se detectaron, se midieron como ancho x largo x alto, en cm. Los resultados para 1 y 2 semanas post-refuerzo (PB) de la tabla anterior se dan adelante. Los volúmenes de reacción de sitio no se dan para el grupo de formulación de vacuna Iscomatrix™, en razón a que no se detectaron reacciones de sitio.

60

65

ES 2 317 708 T3

Volúmenes de la reacción de sitio

Formulación de Vacuna	Volúmenes de Reacción de Sitio 1 Semana PB (cm ³)			Volúmenes de Reacción de Sitio 2 Semanas PB (cm ³)		
	Calificación 0	1	2	Calificación 0	1	2
Dextrano DEAE (50mg)	-	32,4	40,8	-	6.25,1 0.5,0.5	-
Iscomatrix™ (60µg) + Dextrano DEAE (10mg)		1.1	6	-	-	-

Estos resultados muestran como el grado de reactogenicidad es mucho menor en la formulación de Iscomatrix™ + dextrano DEAE que con la formulación de dextrano DEAE sola como se muestra por el tamaño de las reacciones.

Ejemplo 4

Vacunación de perros con proporciones variantes de dextrano DEAE e Iscomatrix™

Perros cruzados Beagle foxhound (grupos de 8 o 13) se vacunaron con las formulaciones de 2-10 LHRH ligadas a DT. El componente activo se formuló en dextrano DEAE solo, Iscomatrix solo o en la combinación dextrano DEAE adyuvante más Iscomatrix.

- A) Vacunas de dextrano DEAE: Cada dosis estaba contenida en un volumen de 1 mL formulado para contener 10 mg o 50 mg de dextrano DEAE con 200 µg de conjugado LHRH-DT 2-10.
- B) Iscomatrix: Cada dosis se formuló en 1 mL con 60 µg o 150 µg de Iscomatrix con 200 µg de conjugado LHRH-DT 2-10.
- C) Adyuvante de Combinación: Cada dosis estaba contenida en un volumen de 1 mL formulado para contener dextrano DEAE e Iscomatrix en las proporciones indicadas adelante con 200 µg de conjugado LHRH-DT 2-10.

El adyuvante de combinación contenía:

1. 10 mg de dextrano DEAE con 60 µg de Iscomatrix - denominada como vacuna 10/60
2. 12.5 mg de dextrano DEAE con 60 µg de Iscomatrix - denominada como vacuna 12.5/60
3. 10 mg de dextrano DEAE con 80 µg de Iscomatrix - denominada como vacuna 10/80

Programación de Vacunación

Estas formulaciones se administraron a perros mediante inyección subcutánea a las 0 y 4 semanas. Las muestras de sangre se tomaron a las 2 semanas después de la segunda vacunación y se ensayaron para anticuerpos a LHRH.

Las reacciones del sitio se determinaron mediante la palpación cuidadosa del sitio de inyección y el tejido circundante a intervalos semanales. Los datos de reacción de sitio presentados están en la vacunación post-refuerzo (PB). La reacción a la vacunación puede en ciertas circunstancias incrementarse con la vacunación continua, y así la reactogenicidad post refuerzo se puede considerar como la prueba más exigente que la vacunación post primaria.

Calificaciones de la reacción de sitio

Las reacciones de sitio se califican mediante la inspección cercana y la palpación, con una calificación en la siguiente escala:

- 0 Reacción no visible o detectable
- 1 Reacción solo detectable mediante palpación
- 2 Reacción visible detectable sin palpación
- 3 Reacción con absceso severo

ES 2 317 708 T3

Formulación de Vacuna	1 Semana PB			2 Semanas PB 4 Semanas PB					
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Dextrano DEAE (10mg)	1/8	2/8	4/8	4/8	2/8	1/8	7/8	0/8	0/8
Vacuna Dextrano DEAE + Iscomatrix™ 12.5/60	5/8	1/8	2/8	5/8	1/8	2/8	7/8	1/8	0/8
Vacuna Dextrano DEAE + Iscomatrix™ 10/80	11/13	2/13	0/13	10/13	3/13	0/13	12/13	1/13	0/13

Volúmenes de reacción de sitio

Los volúmenes se calculan de un tamaño medido de la reacción local determinada mediante palpación, y los volúmenes se expresan en mL. Esta medida da una mejor indicación de la severidad de las reacciones del sitio.

Formulación de Vacuna	1 Semana PB			2 Semanas PB			4 Semanas PB		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Dextrano DEAE (10mg)	-	0.12 5 0.75	24, 12, 9, 3	-	0.25	1.7	-	-	-
Vacuna Dextrano DEAE + Iscomatrix™ 12.5/60	-	-	32,2	0	1.5	1.8, 3	-	0.03	-
Vacuna Dextrano DEAE + Iscomatrix™ 10/80	-	0.25		0	0.06 0.5 2	-	-	-	-

Resumen

Estos datos en perros con un conjugado toxoide de difteria LHRH 2-10 muestran que los adyuvantes de combinación con proporciones variantes de dextrano DEAE a Iscomatrix tienen grados variantes de reactogenicidad. La comparación de la reactogenicidad de sitio de las varias formulaciones indica que, comparado con el dextrano, el adyuvante combinado formulado a una proporción de 12.5mg de dextrano DEAE a 60 μ g de Iscomatrix es reactogénica si no es más reactogénica que la misma dosis de dextrano DEAE sola. Esta es una proporción en masa de 208.

En contraste, la formulación que contiene 10mg de dextrano DEAE a 80 μ g de Iscomatrix tiene una reactividad significativamente menor que el dextrano DEAE solo o la formulación 12.5/60. Esta formulación no da reacciones visibles en ningún momento después de la inyección, y la comparación de los volúmenes de reacción indican que todos los momentos después de la inyección, la formulación 10/80 muchas más pocas reacciones y aquellas pocas que ocurran, con un pico de 3 de 13 perros a las 12 semanas post más aceptable y de más corta duración. Esta tiene una proporción en masa de 125.

La efectividad inmunoestimuladora de un adyuvante se puede juzgar por la magnitud de la duración de la respuesta de anticuerpo lograda. Los títulos de anticuerpo a las 8 semanas post refuerzo se muestran adelante por el dextrano DEAE y los adyuvantes de combinación.

ES 2 317 708 T3

Títulos de anticuerpo a LHRH (8 semanas post refuerzo)

Formulación de Vacuna	Título medio geométrico	Rango
Iscomatrix (150 µg/dosis)	12244	3761 - 58097
Iscomatrix™ (60 µg/dosis)	3965	3322 - 7343
Dextrano DEAE (50 mg/ dosis)	38913	23166 - 50377
Dextrano DEAE (10 mg/ dosis)	6917	2007 - 24477
Dextrano DEAE + Iscomatrix™ Vacuna 10/60	11686	4149 - 35112
Dextrano DEAE + Iscomatrix™ Vacuna 12.5/60	9670	4191 - 54737
Dextrano DEAE + Iscomatrix™ Vacuna 10/80	19456	9730 - 50644

Resumen

Los títulos en la tabla anterior muestran que la Vacuna 10/80 (proporción en masa) es un inmunoestimulante más fuerte que el adyuvante de combinación de la vacuna 12.5/60 (proporción en masa 208) o la vacuna adyuvante sola de 10 mg de dextrano DEAE.

De particular notoriedad es la efectividad de la vacuna 10/80 para elevar el título mínimo de los perros que responden más bajo. La eficacia de la vacuna es en muchos casos reducida por la respuesta inefectiva en una proporción pequeña de la población de prueba y no se determina usualmente por una respuesta máxima y efectiva en la proporción de la población de prueba.

Ambas de las vacunas adyuvantes combinadas son más efectivas que la formulación sola de dextrano DEAE o la vacuna basada en Iscomatrix. La respuesta del adyuvante de combinación es mayor que el efecto aditivo y así los dos componentes se pueden juzgar por actuar en sinergia. La proporción en masa de 125 es más efectiva para incrementar los perros que responden de manera más baja.

Ejemplo 5

Vacunación de Ovejas con Virus de Diarrea Viral Bovina (BVDV) en Adyuvante de Combinación

1. Crecimiento e inactivación del virus de diarrea viral bovina (BVDV)

Crecimiento del antígeno viral:

Se utilizaron dos cepas de virus BVDV, Trangie y Bega, aisladas de ganado infectado en Australia. El medio de crecimiento utilizado fue el medio esencial mínimo Eagles que no contiene una concentración única de aminoácidos esenciales y 3% de bicarbonato, 2% HEPES y 2% de suero bovino de adulto.

Se inoculó una botella de rollo de 1 x 1700 cm² con Trangie (AJ050) a una multiplicidad de infección (MO) de 0.1. La botella se incubó con un enrollamiento durante 5 días a 37°C, luego se congeló. Una botella de rollo de 1 x 1700 cm² inoculada con Bega (WVS p3) a un MOI de 1.0 y se incubó con un rollo durante 5 días a 37°C, luego se congeló. Las botellas de rollo se descongelaron y el contenido del antígeno probado mediante ensayos ELISA específicos de antígeno. Las características de las preparaciones utilizadas en la formulación de vacuna son como sigue:

Trangie: nivel E2 (glicoproteína de superficie) = 1/8

Nivel NS3 (proteína no estructural) = 1/8

Bega: Nivel E2 = 1/8

Nivel NS3 = 1/4

ES 2 317 708 T3

Inactivación:

50 mls de cada virus se dispensó en una botella de 500 ml

- 5 Agregar 50 mls/litro e 2.8% de bicarbonato de sodio = 5 mls
 Agregar 20 mls/litro de amortiguador HEPES 1M = 2.1 mls
10 Agregar 1 ml/litro de β propiolactona (BPL) = 107 μ l

Los contenidos se transfirieron a una nueva botella de 500 ml que contiene un agitador magnético y agitada a 2-8°C durante 21 horas. El material inactivo se transfirió a 37°C y agitado durante otras 3 horas para hidrolizar cualquier BPL restante.

15

2. Formulación de vacuna

Adyuvante de combinación: Cada dosis comprendía 2 mls de virus inactivo y 1 ml de adyuvante de combinación.

20 La vacuna en masa se formuló como:

30 mls de Bega y Trangie inactivos

25 15 mls de adyuvante de combinación, (111 mg de dextrano DEAE y 880 μ g de Iscomatrix/mL, Igual a la proporción en masa de 125) 450 μ l de tiomersal como conservante.

Adyuvante IscomTM: Cada dosis comprendió ambas cepas de virus y 2 mg de IscomTM como equivalente Quil A, en volumen total de 2 mL.

30 Las vacunas se dispensaron en un paquete de almohada plástica en masa después de mezclarse al girar y sumergir y almacenar a 2-8°C.

Programación de Vacunación:

35

Ambas vacunas se administraron como se indicó adelante:

Día 0: Las ovejas estuvieron con 3 mls cada una de un vacunador de adyuvante de combinación 2 mls de vacuna IscomTM administrada subcutáneamente en el cuello.

40

Día 28: A cada animal se le da una segunda dosis de vacuna administrada como anteriormente.

Grupos: 10 ovejas se vacunaron con la vacuna adyuvada con IscomTM. Se vacunaron 4 ovejas con la vacuna adyuvante de combinación.

45

Reacciones de Sitio:

50 Adyuvante de combinación: se examinaron las ovejas a intervalos de 7 días después de la vacunación primaria y secundaria. Una de las 4 ovejas desarrolló una reacción de sitio con calificación 1 (pequeño hinchamiento palpable, no visible) después de vacunación primaria. Esto se resolvió mediante una post-vacunación a las 2 semanas.

IscomTM: Las ovejas se examinaron a los 6 días después del refuerzo. 7 de 10 ovejas tuvieron reacciones grandes en el sitio de la inyección.

55

Resumen: El adyuvante de combinación tuvo reacciones de sitio más pequeñas y menos frecuentes, indicando que éste inducía niveles más bajos de reactogenicidad.

60 Ejemplo 6

Vacunación de Ratones con Ovalbúmina en Adyuvante de Combinación

65 Los ratones C57/Blk6 (n=3 por grupo) se vacunaron subcutáneamente con albúmina de huevo de pollo (ovalbúmina, OVA) formulada en:

1. 0.625 mg de dextrano DEAE

ES 2 317 708 T3

2. 5 μg de Iscomatrix
3. 0.625 mg de dextrano DEAE con 5 μg de Iscomatrix. Esta es una vacuna que contiene el adyuvante combinado preferido de una formulación de proporción en masa de 125.

5 Cada dosis de las vacunas anteriores contenía 12.5 μg de ovalbúmina en un volumen de 100 μL , el volumen y la concentración de los componentes se ajusta con agua estéril para inyección.

10 Los ratones se vacunaron solamente una vez subcutáneamente y se tomaron muestras de sangre 14 días más tarde después de la vacunación primaria a la eutanasia. El suero así obtenido se ensayo para respuestas a IgM e IgG al OVA.

Los ratones se monitorearon para salud y signos de reactividad sistémica.

15 *Reactogenicidad*

Los ratones en el dextrano DEAE y los grupos adyuvantes de combinación permanecieron bien durante los 14 días después de vacunación primaria.

20 Sin embargo, 2 de 3 ratones vacunados con Iscomatrix murieron con 8 días de vacunación. La toxicidad de IscomatrixTM, saponinas e Iscomatrix a los ratones es bien conocida. Los ratones en el grupo adyuvante de combinación permanecieron bien, indicando que el adyuvante de combinación es menos reactogénico sistemáticamente.

25 *Títulos de Anticuerpo*

El suero obtenido 14 días después de las inmunizaciones primarias se ensayó para los títulos de anticuerpo IgG e IgM a la ovalbúmina mediante ensayo ELISA.

30 Títulos IgM de Ratón a Ovalbúmina, 14 días post vacunación primaria.

Todos los títulos mostrados como densidad óptica ELISA a 1/200 de dilución de suero.

35

		Formulación de Vacuna						
		Dextrano DEAE	Dextrano DEAE	Dextrano DEAE	Iscomatrix ¹ M	Adj. Comb.	Adj. Comb.	Adj. Comb.
40	OD a 1/200	0.581	0.895	0.487	0.275	0.778	0.571	0.414

45 Títulos IgG de Ratón a Ovalbúmina, 14 días post vacunación primaria.

Todos los títulos mostrados son de densidad óptica ELISA a una dilución de suero 1/200.

50

		Formulación de Vacuna						
		Dextrano DEAE	Dextrano DEAE	Dextrano DEAE	Iscomatrix ¹ M	Adj. Comb.	Adj. Comb.	Adj. Comb.
55	OD a 1/200	0.753	0.771	0.745	0.493	0.495	0.618	0.716

60 *Resumen*

Los datos anteriores muestran que la inmunización de ratones con el antígeno soluble OVA en todos los adyuvantes probados induce respuestas de anticuerpo en ambos de los isotipos IgM e IgG 14 días después de una vacunación única.

65 El adyuvante de combinación y la formulación de dextrano DEAE sola sacaron mayores respuestas de anticuerpo que la vacuna adyuvada con Iscomatrix.

ES 2 317 708 T3

Para aquellos expertos en la técnica, se esperaría que la vacunación única de ratones con un antígeno soluble en la presencia de un adyuvante daría origen predominantemente a una respuesta IgM.

5 El adyuvante combinado indujo una respuesta IgG fuerte en ratones vacunados con OVA 14 días después de una vacunación única. Este resultado sostiene una conclusión publicada previa (Houston *et al.* 1976) de que el adyuvante de dextrano DEAE acorta el período de cambio desde una respuesta IgM a IgG temprana e incrementa de esta manera la respuesta del IgG a la vacunación en una etapa temprana. Esta también parece ser una propiedad del adyuvante de combinación.

10

Ejemplo 7

Vacunación de Ganado con 2-10 LHRH-DT en Adyuvante de Combinación

15 *Programación de Vacunas y Vacunación*

Los Heifers (ganado hembra) se les administró por inyección subcutánea, vacunas formuladas con 200 µg del conjugado LHRH 2-10 y:

- 20 1. Dextrano DEAE (200 mg/dosis) - 50 heifers
2. Adyuvante de combinación (150 mg de dextrano DEAE con 500 µg de Iscomatrix, Proporción en masa 300) - 6 heifers.

25 Todas las vacunas se formularon como una dosis de 2 mL.

Las vacunas se dieron en la semana 0 y en la semana 4, con un sangrado post refuerzo a las 2 semanas que se toma en la semana 6.

30 Las reacciones de sitio se calificaron a las 2 semanas post refuerzo en una escala semi-cuantitativa de 0 a 3.

Las muestras de sangre se tomaron mediante venepuntura de la vena yugular o de la cola a las 2 semanas post refuerzo (semana 6). El suero se obtuvo de las muestras de sangre al permitirles coagularse y separación mediante centrifugación. Los títulos de suero del isotipo IgG se ensayaron para LHRH mediante ELISA.

35

Reacciones de sitio

Las calificaciones de reacción de sitio, calificadas sobre una escala de:

40

- 0 Ninguna reacción visible o detectable
- 1 Reacción solo detectable mediante palpación
- 45 2 Reacción visible detectable sin palpación
- 3 Reacción con absceso severo

50

Formulación de Vacuna	2 Semanas Calificación PB			
	0	1	2	3
Dextrano DEAE 50 heifers	32	7	8	3
Dextrano DEAE + Iscomatrix™ 6 heifers	1	1	4	0

55

Resumen

60 El uso de dextrano DEAE como adyuvante dio como resultado reacciones de sitio severas de calificación 3 (absceso) en 3 del ganado vacunado.

El adyuvante de combinación no indujo reacciones severas en ningún miembro del ganado, sin ocurrencia de lesiones de calificación 3.

65

ES 2 317 708 T3

Títulos de Anticuerpo

Los títulos IgG de suero al LHRH a las 2 semanas de vacunación post refuerzo se determinaron mediante ELISA.

Grupo de Vacuna	Título medio del Grupo	Rango de títulos
Dextrano DEAE	4181	100-16836
Dextrano DEAE + Iscomatrix™	15869	1841-51920

Resumen

El adyuvante de combinación indujo títulos altos en todo el ganado vacunado con un título medio de grupo de más de 15,000. Por comparación, el uso de dextrano DEAE solo como adyuvante dio como resultado un título medio de grupo inferior de 4181, con un rango de respuestas más bajo.

Bibliografía

Aguado, T. *et al. Vaccine* 17:2321-2328 (1999).

Awonyi, C.A., Chandrashekar, V., Arthur, R.D., Schanbacher, B.D. y Falvo, R.E. *J. Androl.* 9:160-171 (1988).

Azuma, I. *Vaccine* 10:1000-1006 (1992).

Beh, K. y Lascelles, A.K. *Immunol.* 54:487-495 (1985).

Bonneau, M., Dufour, R., Chouvet, C., Roulet, C., Meadus, W. y Squires, E.J. *J. Animal Science* 72: 14-20 (1994).

Caraty, A. y Bonneau, M. *C.R. Acad. Sci. Paris* 303 Series D:673-683 (1986).

Cox J.C. y Coulter, A.R., "Advances in Adjuvant Technology and Application", in *Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*, Chapter 4, Ed. Yong, W.K., *CRC Press* (1992).

Dalsgaard, K., *Arch. Gesamte Virusforsch.* 44:243.

Falvo, R.E., Chandrashekar, V. *et al. J. Animal Science* 63: 986-994 (1986).

Fraser, H.M. *Immunization with Hormones in Reproductive Research*: 07-116 (1975).

Gupta, R. *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:155-172 (1998).

Hagen, G., Andresen, O., Blichfeldt, T. y Berg, K.A. Proc. 11th Congress on Animal Production Abstract 493 (1988).

Hibma M. y Griffin, J. *Vet. Immunol. Immunopath.* 31:279-287 (1992).

Hodgkinson, R.M. *et al. Aust. J. Biotechnology* 4:166-170 (1990).

Hoskinson, R.M., Rigby, P.E., Mattner, V.L., Huynh, V.L., D'Occhio, M.D., Neish, A., Trigg, T.E., Moss, B.A., Lindsey, M.J., Coleman, G.D. y Schwartzkoff, C.L. *Aust. J. Biotechnol.* 4:166-170 (1990).

Houston, W.E. *et al. Infect. and Immun.* 13:1559-1562 (1976).

Jeffcoate, I.A., Lucas, J.M. and Crighton, D.B. *Theriogenology* 18:65-77 (1982).

Ladd A., Tsong Y.Y., and Thau R.B., *American J. Reproductive Immunology* 22: 56-63 (1990).

Meloen, *et al., Vaccine* 12: 741-746 (1994).

Potter, A.A. and Manns, J.G., International Patent Application No. PCT/CA97/00559 (1997).

Robertson, I.S., Fraser, H.M., Innes, G.M. and Jones, A.S. *Vet. Record* 111:529-531 (1982).

ES 2 317 708 T3

Sad S., Gupta H., Talwar G.P., and Raghupathy R., *Immunology* 74:223-227 (1991).

Wittman et al. *Arch. Virol.* 47:225-235 (1975).

5 **Zee, A., Noordegraaf, C.V., Bosch, H., Gielen, J., Bergmans, H., Hoekstra, W. and Die, I.** *Vaccine* 13:753-758
(1995).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 317 708 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición adyuvante que comprende un componente polisacárido iónico y un componente de saponina, en donde el componente de saponina es un complejo inmunoestimulante.
2. Una composición de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el polisacárido iónico es un dextrano iónico.
3. Una composición de acuerdo a la reivindicación 2, en donde el dextrano iónico es un dextrano DEAE.
- 10 4. Una composición de acuerdo a la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el complejo inmunoestimulante es un complejo inmunoestimulante libre de proteína.
- 15 5. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el complejo inmunoestimulante comprende Quil A, colesterol y fosfolípido.
- 20 6. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la proporción en masa del componente de polisacárido iónico al componente de complejo inmunoestimulante está en el rango de 50 a 300.
- 25 7. Una composición de acuerdo a la reivindicación 6, en donde dicha proporción en masa está en el rango de 100 a 140.
- 30 8. Una composición de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la proporción en masa es 125.
- 35 9. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende 10 mg de dextrano DEAE y 80 μ g de complejo inmunoestimulante.
- 40 10. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende 100 mg de dextrano DEAE y 80 μ g de complejo inmunoestimulante.
- 45 11. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende 150 mg de dextrano DEAE y 500 μ g de complejo inmunoestimulante.
- 50 12. Una composición inmunogénica que comprende un inmunógeno y una composición adyuvante, en donde dicha composición adyuvante es una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 55 13. Una composición inmunogénica de acuerdo a la reivindicación 12, en donde dicho inmunógeno comprende LHRH.
- 60 14. Una composición inmunogénica de acuerdo a la reivindicación 13, en donde dicho inmunógeno comprende un conjugado de toxoide LHRH-difteria.
- 65 15. Una composición inmunogénica de acuerdo a la reivindicación 14, en donde dicho inmunógeno comprende LHRH de la secuencia His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly (SEQ ID NO: 2) en donde el carboxilo terminal de dicha secuencia se amina.
16. Una composición inmunogénica de acuerdo a la reivindicación 14, que comprende 5-500 μ g de un conjugado de toxoide LHRH-difteria en 5-500 mg de polisacárido iónico y 40-4000 μ g de complejo inmunoestimulante.
17. Una composición farmacéutica que comprende una composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y/o diluyentes.
18. Una composición inmunogénica de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 para uso en un método para lograr, en un animal, una respuesta inmune efectiva.
19. El uso de una composición adyuvante de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la elaboración de un medicamento para obtener una respuesta inmune efectiva en un animal.

ES 2 317 708 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSL LIMITADO

5 <120> COMPOSICIONES ADYUVANTES DE SAPONINA MEJORADAS Y MÉTODOS RELACIONADOS CON ÉSTOS

<130> N.82756 PJC

<140> 99968288.3

10 <141> 1999-12-24

<150> AU PP8073/99

<151> 1999-01-08

15 <160> 4

<170> Versión PatentIn 3.0.

<210> 1

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido

<400> 1

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly

30 1 5 10

<210> 2

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Péptido

<400> 2

45 His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly

 1 5

50 <210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> Péptido

<400> 3

60 Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly

 1 5

65 <210> 4

<211> 9

ES 2 317 708 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Péptido

<400> 4

10 Gly Ser Gly Ser Gly Leu Arg Pro Gly

1

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65