

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038667- -00009-0000

Fecha: 2008-02-05 16:34:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 18

Re: P1.-WYETH HOLDINGS CORPORATION.-Solicitud de Patente de
Invencción en Fase Nacional PCT para "FORMULACIONES DE
COMBINACIÓN DE ADYUVANTES".-Clase A61K 39/39.- Expediente
número 03-038.667.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 9 de Noviembre de 2007.

2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones presentadas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico No. **2022** bajo los acápites de Suficiencia de la Descripción, Claridad de las reivindicaciones, excepciones a la patentabilidad y Nivel Inventivo de la presente solicitud, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. **Suficiencia de la descripción**

El Señor Examinador objeta la claridad de la presente solicitud argumentando lo siguiente:

3.1. *"El capítulo descriptivo carece de suficiencia al no sustentar el efecto técnico sorprendente de la misma. Los resultados presentados no son evidencia de una ventaja comparativa frente al estado de la técnica y no existe prueba experimental del desarrollo de todas las composiciones reclamadas () por lo tanto existe una inconsistencia entre la descripción y el capítulo reivindicatorio"*

Con respecto a ese particular me permito manifestar que el capítulo descriptivo de la presente solicitud si contiene resultados que comparan la formulación materia de la presente invención con respecto a otros adyuvantes que se encuentran en el estado de la técnica. Dichos resultados revelan de manera clara que la formulación de la solicitud en estudio presenta ventajas frente al estado de la técnica tal como me permito ejemplificar a continuación:

- En el ejemplo 4, se inmunizaron ratones Swiss-Webster con el péptido A β 1-42 empleando diferentes tipos de adyuvantes. Se observó que los anticuerpos en el suero de los ratones que recibieron la formulación materia de la presente invención, que contiene como adyuvante la mezcla del fosfato de aminoalquil glucosamina en suspensión estable (529-SE) combinado con el factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), elevaron su nivel de anticuerpos en el suero, y en la mayoría de los casos dichos anticuerpos se elevaron más rápidamente en comparación con los que recibieron, por ejemplo, la formulación que contenía como adyuvante 529-SE sola (Página 28 de la descripción).

Me permito llamar la atención del Señor Examinador para que observe la tabla No. 3 (Página 48 de la descripción) en donde se consignan dichos resultados y donde se observa claramente que **la composición objeto de la presente invención presenta títulos de anticuerpos mucho más altos con respecto a las demás formulaciones**. Estos títulos pueden llegar a ser casi 40 veces mayores, por ejemplo si se compara con la formulación que no emplea adyuvante o con las que contiene una emulsión estable o 529-SE como adyuvantes. De igual forma dichos títulos son mucho más altos que los producidos por la formulación que contiene un adyuvante convencional como lo es el QS-21 (casi 150 veces mayores). Para su pronta referencia me permito incluir como anexo a este memorial una copia transcrita de la mencionada tabla 3.

- En otro experimento se emplearon de igual forma ratones Swiss-Webster y esta vez fueron inmunizados con el péptido A β 1-42 empleando formulaciones con diferentes adyuvantes: 529-SE solo, 529-SE combinado con GM-CSF, QS-21 solo (un adyuvante convencional) y QS-21 combinado con GM-CSF; con cantidades variables de GM-CSF. Los resultados (Tabla 9) mostraron cómo **los títulos de IgG fueron más altos para todas las combinaciones de 529-SE con GM-CSF con respecto a los demás grupos** (Páginas 29 y 54 de la descripción). Para su pronta referencia me permito incluir como anexo a este memorial una copia transcrita de la mencionada tabla 9.

Estos ejemplos, junto con los demás consignados en la descripción, **muestran de manera sorprendente** que las propiedades adyuvantes de 529-SE y GM-CSF o IL-12 parecen ser sinérgicas cuando se formulan conjuntamente (Página 31 de la descripción). De esta forma **se obtiene una respuesta inmune mejorada, con respecto al uso de otros adyuvantes convencionales**, al usar una formulación de

un antígeno junto con la combinación adyuvante de AGP y citocina o linfocina como la considerada en la presente invención.

3.2. Por otra parte, el señor examinador también resalta que *"no existe prueba experimental del desarrollo de todas las composiciones reclamadas"*.

A ese respecto me permito manifestar que las composiciones reclamadas **si tienen pleno sustento en la descripción** toda vez que allí se consignan de manera clara todos los posibles antígenos que son considerados dentro de la formulación materia de la presente invención (páginas 5 y 34 a 38 de la descripción). Allí se revela:

"El antígeno seleccionado puede ser un polipéptido, péptido o fragmento derivado (1) de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, o (2) de una célula de cáncer o tumor, o (3) de un alérgeno para interferir con la producción del IgE para modular las respuestas alérgicas del alérgeno, o (4) de una proteína precursora amiloidea para prevenir o tratar una enfermedad caracterizada por una deposición amiloidea en un hospedero vertebrado."

simple
mencion!

Más adelante (páginas 34-38) se enumeran los posibles virus, bacterias, hongos, parásitos, tipos de cáncer, alérgenos y moléculas que son preferidas en las formulaciones contempladas en la solicitud en estudio.

Adicionalmente, me permito resaltar que los ejemplos consignados en la parte final de la descripción **no se constituyen ni pueden ser entendidos por las oficinas de patentes como restricciones a la invención**. Estos ejemplos muestran estudios "modelo" que sirven para ilustrar los resultados obtenibles con la materia patentable. La realización de estudios que permitan demostrar con casos específicos cada uno de los elementos que componen la reivindicación de una patente implican por regla general largos periodos de tiempo en ensayos que de tenerse que practicar de manera tan específica, necesariamente implicarían costos desmesurados, y afectarían al mismo tiempo en la mayoría de los casos la novedad de las solicitudes.

sosten
to!

Teniendo esto en consideración, me permito manifestar que el capítulo descriptivo de la solicitud en estudio **es claro y explica de manera suficiente el objeto de la presente invención**.

3.3. Por último el Señor Examinador señala que *"no deben utilizarse marcas comerciales en la definición de la invención desarrollada."*

Atendiendo dicha objeción, es deseo del solicitante modificar el capítulo descriptivo para **eliminar las referencias hechas a marcas comerciales**. Me

permito manifestar que **dichas modificaciones no amplían de manera alguna la descripción** y se destinan simplemente a evitar el uso de referencias a marcas comerciales, respetando así los términos del Artículo 34 de la Decisión 486 de 2000.

De esta forma, en la página 10 se reemplaza la frase "*Stimulon^{SR} QS-21 (QS-21) (Antigenics Inc. Framingham, Ma (2))*" por la expresión "**una saponina**". Por otra parte en la página 11 se elimina la frase "*el cual es producido por Corixa (Hamilton, Mt)*". En la misma pagina se ha reemplazado la expresión "*Corixa también ha formulado...*" por "**También se ha formulado...**".

Finalmente me permito resaltar que los argumentos anteriormente expuestos, sumados a las modificaciones ya mencionadas hacen que el capítulo descriptivo sea claro y suficiente para describir la invención materia de la presente solicitud, y por tanto se supera la objeción que a este respecto hizo el Señor Examinador.

4. **Reivindicaciones – Modificaciones**

Por otra parte, el señor Examinador objeta la claridad del capítulo reivindicatorio resaltando que "*Después del análisis del capítulo reivindicatorio no es posible establecer el alcance de la invención reclamada*". Adicionalmente, el Señor Examinador señala que las reivindicaciones 29-50 y 56-60 reclaman un método, lo cual se constituye en una excepción a la patentabilidad.

Teniendo en consideración las objeciones mencionadas, me permito manifestar que es deseo del solicitante **presentar un nuevo capítulo reivindicatorio que reemplaza al anterior**, constituido por 21 reivindicaciones que definen de manera clara el objeto de la invención y no contemplan métodos ya que las reivindicaciones 29-50 y 56-60 han sido eliminadas.

De igual forma, me permito resaltar que **las nuevas reivindicaciones no amplían de manera alguna el alcance de la invención toda vez que las mismas encuentran pleno sustento en la descripción de la solicitud**, tal como me permito señalar a continuación:

- **Reivindicación 1.** La Nueva Reivindicación 1 define la composición antigénica reclamada en la presente solicitud por sus componentes principales, como se lee a continuación:

"Una composición antigénica que comprende un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico, o de una célula de cáncer o célula de tumor, o de un alérgeno, o de una molécula misma, y una cantidad

efectiva como adyuvante de la combinación de: (1) un compuesto de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP) o un derivado o análogo del mismo y (2) una citocina o linfocina, o un agonista de dicha citocina o linfocina."

Esta reivindicación se encuentra plenamente sustentada a lo largo de la descripción donde se revela que la composición antigénica materia de la presente solicitud puede contener diferentes tipos de antígenos (Página 5). Sumado a esto, como ya se ha mencionado anteriormente, la descripción especifica los tipos de virus, bacterias, hongos, células de cáncer o de tumor, alérgenos y moléculas que son preferidas en la composición de la solicitud en estudio (Páginas 34-38).

- Reivindicaciones 2 y 3. Consideran que el AGP empleado en la composición de la reivindicación 1 se encuentra como una emulsión estable de aceite en agua, y definen el compuesto al que puede corresponder el AGP.
- Reivindicación 4. Se considera que la composición de la reivindicación 1 puede incluir además un diluyente o portador.
- Reivindicación 5. Define la composición de la reivindicación 1 cuando el antígeno es un péptido, polipéptido o un fragmento de una proteína.
- Reivindicaciones 6. Considera el caso cuando el antígeno al que se hace referencia en la reivindicación 5 es derivado del virus de inmunodeficiencia humano (HIV).
- Reivindicaciones 7 y 8. Muestran la composición considerada en la reivindicación 5 donde el antígeno es una proteína, polipéptido o péptido derivado del HIV y considera las posibles secuencias peptídicas.
- Reivindicación 9. Define las posibles citocinas o linfocinas que pueden ser empleadas en la composición de la reivindicación 1.
- Reivindicaciones 10 y 11. Consideran el caso cuando la citocina o linfocina mencionadas en la reivindicación 9 son un factor de estimulación de colonias de macrófagos o interleucina-12.
- Reivindicación 12. Define la composición antigénica materia de la presente solicitud cuando el antígeno es una molécula o una porción de la misma. La nueva reivindicación 12 se lee como sigue:

"Una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado de una molécula o una porción de la misma que representa aquellas producidas por un hospedero al incluir una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de: (1) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (2) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina."

- Reivindicación 13. Considera el caso cuando el antígeno de la composición de la reivindicación 12 es un polipéptido, péptido o un fragmento derivado de la proteína amiloidea.
- Reivindicaciones 14 y 15. Definen el péptido que puede contener la formulación de la reivindicación 12 como un péptido A β y muestran su secuencia.
- Reivindicación 16. Define a qué molécula puede corresponder el AGP incluido en la formulación de la reivindicación 12.
- Reivindicación 17. Define por sus componente una formulación de adyuvantes como sigue:

"Una formulación adyuvante que comprende la combinación de: (1) un compuesto un compuesto de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP) o un derivado o análogo del mismo y (2) una citocina o linfocina, o un agonista de dicha citocina o linfocina."

- Reivindicación 18. Considera el caso cuando el AGP de la formulación de la reivindicación 17 se encuentra en forma de una emulsión estable aceite en agua.
- Reivindicación 19. Define los tipos de citocina o linfocina que puede incluir la formulación de la reivindicación 17.
- Reivindicación 20. Considera el caso en el que la formulación de la reivindicación 17 además incluye un diluyente o portador.
- Reivindicación 21. Define el compuesto al que puede corresponder el AGP en la formulación de la reivindicación 17.

Me permito manifestar que este nuevo capítulo reivindicatorio contiene reivindicaciones que corresponden a modificaciones de las originalmente presentadas, de forma que se delimita más claramente el objeto de la invención; y que, junto con los

argumentos antes expuestos con respecto al capítulo descriptivo, permiten superar completamente las objeciones de claridad de la presente solicitud realizadas por el Señor Examinador.

5. **Excepciones a la patentabilidad**

Manifiesta el Señor Examinador que las reivindicaciones 29-50 y 56-60 reclaman un método para tratamiento enmarcado dentro de las excepciones a la patentabilidad consagradas en el Artículo 20 de la Decisión 486 de 2000.

Atendiendo a las objeciones realizadas por el señor examinador y tal y como se resaltó en el punto 4 de este memorial, **las reivindicaciones 29-50 y 56-60 han sido eliminadas del nuevo capítulo reivindicatorio**. De esta forma se entiende superada la objeción del Señor Examinador en torno a la inclusión de métodos de tratamiento no patentables de acuerdo a la legislación vigente.

6. **Nivel Inventivo**

Para objetar el nivel inventivo de la solicitud en estudio el Señor Examinador cita las enseñanzas de los documentos **WO9850399 (D1)** y **US5980911 (D2)**.

A este respecto me permito señalar que los documentos citados no contienen todos los elementos técnicos incluidos en la composición objeto de la presente invención y que la persona versada en la materia no llegaría de manera obvia a dicha composición a partir de las enseñanzas de dichos documentos, como se muestra a continuación:

- Documento WO9850399 (D1). Este documento hace referencia a compuestos de fosfatos de aminoalquil glucosamina (AGPs) empleados como adyuvantes. Describe la síntesis de dichos compuestos y muestra su utilidad como adyuvantes con diferentes antígenos.

Me permito resaltar que, aunque el documento **D1 muestra la utilidad de los compuestos de fosfatos de aminoalquil glucosamina (AGPs) como adyuvantes**, sin embargo este, **no presenta ningún ejemplo específico, así como ninguna sugerencia directa sobre el empleo dichos AGPs en combinación con otro tipo de adyuvantes con el fin de mejorar la respuesta inmune**, y mucho menos que estos adyuvantes podrían ser citocinas o linfocinas y en particular GM-CSF, tal como se consideran en la solicitud en estudio.

De esta manera la persona versada en la materia no podría llegar a la composición contemplada solicitud en estudio a partir de las enseñanzas del citado documento (D1) porque este **no contempla la posibilidad de que la combinación de los AGPs con otros adyuvantes puedan derivar en un incremento de la respuesta inmune.**

- Documento US5980911 (D2). Por su parte, el documento D2 revela el uso de citocinas como adyuvantes, teniendo en consideración composiciones de adyuvantes que contienen al menos dos citocinas o partes funcionales derivadas de ellas.

Me permito señalar que el citado documento **D2 enseña específicamente el uso de citocinas como posible alternativa a los adyuvantes químicos y muestra su utilidad en la formulación de vacunas en este sentido.** Sin embargo **no revela de manera puntual, ni sugiere, que la combinación de las citocinas con otros adyuvantes, específicamente con AGPs, pueda producir un efecto mejorado en la función adyuvante.**

Como se ha mostrado anteriormente, la formulación objeto de la presente invención combina antígenos con una mezcla de citocinas y AGPs obteniendo, de manera inesperada, un aumento en la respuesta inmunológica del hospedero. Dicha combinación no puede ser derivada directamente de las enseñanzas del documento D2 porque **no existe ninguna referencia en dicho documento que haga pensar que la combinación de las citocinas con otros adyuvantes pueda a producir efectos mejorados en la respuesta inmune.**

Además, **el resultado que obtenible por la combinación de adyuvantes no es predecible;** en este sentido al mezclar adyuvantes convencionales con citocinas no necesariamente se va a producir un **aumento significativo** en dicha respuesta inmune. Esto es claramente visible en la Tabla 9 (Página 53 de la descripción y anexo a este memorial para su pronta referencia) en donde la combinación de un adyuvante convencional (QS-21) con GM-CSF **no produce un incremento significativo en la respuesta inmune,** como si lo hace la combinación del AGP (529-SE) con la misma citocina, que es revelada en la presente solicitud.

Finalmente, me permito manifestar que ninguna las enseñanzas de los documentos citados (D1 y D2) por separado, ni la combinación de los dos, podrían llevar a la persona versada en la materia a emplear un antígeno en combinación con la

mezcla de AGP y GM-CSF, como lo hace la solicitud en estudio, **porque no hay ninguna insinuación en dichos documentos sobre la posible utilidad de dicha composición**. De esta manera la persona versada en la materia no estaría motivada a realizar la formulación materia de la presente invención, bajo las enseñanzas del estado del arte más próximo, y tendría que realizar más de dos pasos que no resultan obvios para identificar las posibles ventajas de hacer una formulación de antígeno empleando como adyuvante una combinación de AGP y citocinas o linfocinas.

Finalmente, debe tenerse en cuenta el Señor Examinador que de acuerdo al artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, "una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente en el estado de la técnica"

De acuerdo con el Manual Andino de Patentes, para determinar si una invención es obvia o no, conviene dar respuesta a tres interrogantes básicos:

- (a) "Estaba un técnico con conocimientos medios en la materia en condiciones de plantearse el problema?
- (b) Estaba en capacidad esa persona "de resolverlo en la forma que se reivindica?
- (c) Estaba en capacidad esa persona "de prever el resultado?

El examinador podrá concluir que la invención es obvia si y sólo **"si la respuesta es afirmativa en los tres casos"**¹ En el caso que nos ocupa, lo único que se podría concluir del arte previo delimitado por D1 y D2, es que una persona versada en la materia puede plantearse el problema técnico de la necesidad de determinar composiciones anfígenicas con capacidad de activación de la respuesta inmune humoral y cerebral en vertebrados, pero nunca, que con las enseñanzas de D1 o D2 o D1 y D2, pueda deducir la combinación adyuvante derivada de la presente invención.

En este mismo sentido, deberá tener en cuenta el Señor Examinador que de acuerdo con las enseñanzas del Manual Andino de Patentes², el estudio del nivel inventivo de una solicitud no debe basarse en apreciaciones personales, sino que toda objeción respecto a la falta de nivel inventivo de una invención debe probarse a partir del estado de la técnica.

¹ SECRETARÍA GENERAL DE LA COMUNIDAD ANDINA. Manual Andino de Patentes. Lima, Perú, 2004, página 78.

²: Ibid., pp 76-78.

197

Con base en lo anterior, y tal como se había analizado previamente en el presente memorial, la materia revelada en la presente invención no puede resultar obvia para una persona versada en la materia a partir del estado de la técnica, -incluyendo D1 y D2-, toda vez que ninguno de ellos, independientemente o como fruto de su combinación, sugiere un antígeno en combinación con la mezcla de AGP y GM-CSF, como lo hace la solicitud en estudio, **porque no hay ninguna insinuación en dichos documentos sobre la posible utilidad de dicha composición.**

Por todo lo anterior, respetuosamente considero que es completamente claro el carácter inventivo que presenta la materia revelada en la presente invención respecto a las enseñanzas del documento D1 y D2, en los términos del Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000.

7. **Conclusión**

Por último, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio presentado, junto con los argumentos técnicos expuestos anteriormente han mostrado que la presente solicitud es lo suficientemente clara al describir la invención reclamada.

Los argumentos técnicos igualmente mostraron de manera incontrovertible que la persona versada en la materia no podría llegar de manera obvia a la formulación materia de la presente invención a partir de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, demostrando así el nivel inventivo que tiene la solicitud en estudio frente al estado del arte más próximo.

8. Anexo me permito presentar:

- (a) Recibo número 08-7.644, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- (b) Copia del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 21 reivindicaciones, **que reemplaza al anteriormente presentado**, en el cual se han realizado las modificaciones expuestas anteriormente;
- (c) Nuevas páginas 10 y 11 de la descripción donde se realizaron las correcciones antes mencionadas; y
- (d) Copia de las Tablas 3 y 9 consignadas en la descripción.

198

9. En vista de lo anterior, atentamente me permito solicitar a ese Despacho, proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones realizadas y de los argumentos aquí expuestos y con base en ellos conceder el privilegio de patente solicitado.

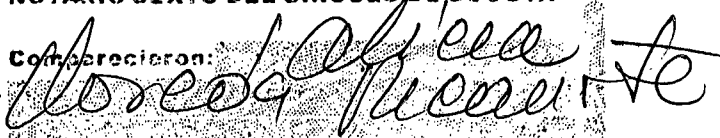
Señor Superintendente,



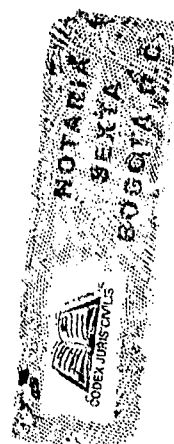
ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C. **05 FEB 2008**
 Ante mí **JUAN MANUEL BOTERO MEDINA**
NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ

Comparecieron: 

quien (es) exhibió(n) la(s) C.C. No. **39690713**
 y declaró(n) que tal(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es(son) tal(es) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto. En constan-
 cia se firma esta diligencia





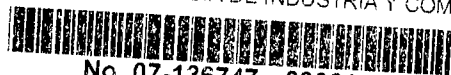
ALICIA LLOREDA RICAURTE

C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



199

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-136747- -00001-0000

Fecha: 2008-02-05 16:34:42 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 7,644
FECHA : ENERO 29 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	663943	29/01/2008	1,030,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12		MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones.

1. Una composición antigénica que comprende un antígeno seleccionado de un virus, bacteria, hongo o parásito patológico, o de una célula de cáncer o célula de tumor, o de un alérgeno, o de una molécula misma, y una cantidad efectiva como adyuvante de la combinación de: (1) un compuesto de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP) o un derivado o análogo del mismo y (2) una citocina o linfocina, o un agonista de dicha citocina o linfocina.
2. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el AGP es usado en la forma de una emulsión estable de aceite en agua.
3. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el AGP es:
2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoilamino]-β-D-glucopiranosido (529)
4. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende un diluyente o portador.
5. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antígeno seleccionado es un polipéptido, un péptido o un fragmento derivado de una proteína.
6. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 5, donde el antígeno seleccionado es del virus de inmunodeficiencia humana (HIV).
7. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 6, donde el antígeno de HIV seleccionado es una proteína de HIV, polipéptido, péptido, o fragmento derivado de dicha proteína.
8. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 7, donde los antígenos seleccionados son péptidos de HIV seleccionados del grupo que

consiste de péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5.

9. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, donde la citocina o linfocina se selecciona del grupo que comprende un factor de estimulación de colonias de macrófagos o interleucina-12.
10. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 9, donde la citocina o linfocina es un factor de estimulación de colonias de macrófagos.
11. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 9, donde la citosina o linfocina es interleucina-12.
12. Una composición antigénica que contiene un antígeno seleccionado de una molécula o una porción de la misma que representa aquellas producidas por un hospedero al incluir una cantidad adyuvante, efectiva de la combinación de: (1) un AGP, o un derivado o análogo del mismo, y (2) una citocina o linfocina, o un agonista para la citocina o linfocina.
13. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 12, donde el antígeno seleccionado es un polipéptido, péptido o fragmento derivado de una proteína precursora amiloidea, o un anticuerpo para el mismo.
14. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 12, donde el antígeno seleccionado es el péptido A β , el que es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos del precursor de la proteína amiloidea, o un fragmento del péptido A β .
15. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 14, donde el antígeno seleccionado es el péptido A β teniendo la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO:6.
16. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 12, donde el AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoilamino]- β -D-glucopiranosido (529).

17. Una formulación adyuvante que comprende la combinación de: (1) un compuesto un compuesto de fosfato de aminoalquil glucosamina (AGP) o un derivado o análogo del mismo y (2) una citocina o linfocina, o un agonista de dicha citocina o linfocina.
18. La formulación adyuvante de la reivindicación 17, donde el AGP es usado en forma de una emulsión estable de aceite en agua.
19. La formulación adyuvante de la reivindicación 17, donde la citocina o linfocina se selecciona del grupo que comprende un factor de estimulación de colonias de macrófagos o Interleucina-12.
20. La formulación adyuvante de la reivindicación 17 que además comprende un diluyente o vehículo.
21. La formulación adyuvante de la reivindicación 17, don de el AGP es 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etil 2-Deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoilamino]-β-D-glucopiranosido (529).

y citocinas/linfocinas proporcionan estímulos que no son proporcionados por la mayoría de preparaciones de antígenos.

Numerosos estudios han evaluado diferentes formulaciones de adyuvantes en modelos animales, pero el alumbre (hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio) es actualmente el único adyuvante autorizado para el uso difundido en humanos. Otro adyuvante empleado es una saponina. Un grupo de adyuvantes, emulsiones estables, que consisten de diversas combinaciones de agua en aceite o aceite en agua, ha recibido atención considerable por su habilidad para aumentar la potencia de la inmunidad. Estas formulaciones consisten generalmente de diversas combinaciones de aceites metabolizables o inertes que actúan para estabilizar y depositar el antígeno en el sitio de inyección. Uno de tales adyuvantes es el adyuvante incompleto de Freund (IFA), el cual incluye aceite mineral, agua y un agente emulsionante. El adyuvante completo de Freund (CFA) es IFA más micobacterias neutralizadas con calor. Un problema particular en el uso de estos tipos de adyuvantes ha sido la irritación asociada con el sitio de la inyección, frecuentemente el resultado de infiltraciones de células mononucleares que causan lesiones granulomatosas. Por lo tanto, otros compuestos y formulaciones están siendo investigados como adyuvantes potenciales.

Un grupo de tales compuestos son los

compuestos de fosfato aminoalquil-glucosamina (AGPs), los cuales son descritos en la patente norteamericana número 6,113,918, por ejemplo en la columna 2, línea 14-columna 3, línea 38, la cual es incorporada por este acto a manera de referencia (3). Los AGPs tienen un grupo aminoalquilo (aglicon), el cual está enlazado por un glicósido a una 2-desoxi-2-amino- α -D-glucopiranososa (glucosamina) para formar la estructura básica. Los sustituyentes adicionales incluyen la fosforilación del carbono 4 o 6 en el anillo de glucosamina y tres residuos 3-alcanoiloxialcanoilo.

Uno de tales AGP es el compuesto designado 529 (cuyo nombre químico completo es 2-desoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoioxitetradecanoilamino]- β -D-glucopiranosida) de 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino]etilo.

También se ha formulado una formulación de aceite en agua metabolizable la cual, cuando se combina con 529, da por resultado la formación de una emulsión estabilizada designada 529-SE. La emulsión estabilizada es generada a través de la microfluidización de 529 con aceite de escualeno, glicerol y fosfatidil-colina. La formulación actual es una emulsión microfluidizada de calidad GMP. Las emulsiones que contienen 1% de aceite (aunque se pueden utilizar otras concentraciones) se describen en los experimentos posteriormente.

La 529-SE no dio por resultado una patología

205

Tabla 3
Títulos a Punto Final de IgG en la Semana 5 Anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Media Geométrica	Error Estándar
Ninguno	12,976	+/- 14,386
529 SE (50)	16,204	+/- 225,221
529 SE (50) + GM-CSF (10)	608,474	+/- 623,575
GM-CSF (10)	214,497	+/- 609,067
SE (1%)	33,342	+/- 15,493
SE (1%) + GM-CSF (10)	453,367	+/- 162,750
QS-21 (50)	4,076	+/- 9,036

Tabla 9
Títulos a Punto Final de IgG en la Semana 6 Anti-Aβ1-42

Adyuvantes	Media Geométrica	Error Estándar
529 SE (25) + GM-CSF (10)	353,660	+/- 148,940
529 SE (25) + GM-CSF (1)	150,935	+/- 218,332
529 SE (25) + GM-CSF (0.1)	86,145	+/- 91,724
529 SE (25) *	25,365	+/- 54,083
QS-21 (25)	1,866	+/- 18,430
QS-21 (25) + GM-CSF (10)	48,970	+/- 116,106

* primera dosis 529 SE (25) + GM-CSF (10); segunda dosis 529 SE (25) solo

uptake, processing and presentation of soluble antigens by macrophage. Alum, however, is not without side-effects and enhances humoral (antibody) immunity only.

An effective adjuvant potentiates both a humoral and cellular immune response in vaccinated animals. Further, an adjuvant must enhance a host's natural immune response and not aggravate the host system. A well-defined synthetic adjuvant free from extraneous matter which is stable and easy to manufacture would provide these qualities. Compounds that have been prepared and tested for adjuvanticity (Shimizu *et al.* 1985, Bulusu *et al.* 1992, Ikeda *et al.* 1993, Shimizu *et al.* 1994, Shimizu *et al.* 1995, Miyajima *et al.* 1996), however, often display toxic properties, are unstable and/or have unsubstantial immunostimulatory effects.

The discovery and development of effective adjuvants is essential for improving the efficacy and safety of existing vaccines. Adjuvants impart synthetic peptide and carbohydrate antigens with sufficient immunogenicity to insure the success of the synthetic vaccine approach. There remains a need for new compounds having potent immunomodulating effects.

Summary of the Invention

The compounds of the subject invention are aminoalkyl glucosamine phosphate compounds (AGPs) which are adjuvants and immunoeffectors. An aminoalkyl (aglycon) group is glycosidically linked to a 2-deoxy-2-amino- α -D-glucopyranose (glucosamine) to form the basic structure of the claimed molecules. The compounds are phosphorylated at the 4 or 6 carbon on the glucosamine ring. Further, the compounds possess three 3-alkanoyloxyalkanoyl residues.

The compounds of the subject invention are immunoeffector molecules augmenting antibody production in immunized animals, stimulating cytokine production and activating macrophage. In accordance with the subject invention, methods for using these compounds as adjuvants and immunoeffectors are disclosed.

Detailed Description of the Invention

The compounds of the subject invention are adjuvant and immunoeffector molecules which are aminoalkyl glucosamine phosphates (AGPs). The compounds

1

ADJUVANT

This application is a 371 of PCT/AU95/00261 filed May 4, 1995.

The present invention relates generally to adjuvants which comprise a combination of at least two cytokines or functional derivatives thereof. More particularly, the present invention is directed to an adjuvant such as a vaccine adjuvant comprising at least two cytokines or functional derivatives thereof wherein the cytokines are selected from IL-1 β and TNF α or IL-1 β and GM-CSF. The present invention is further directed to genetic adjuvants encoding at least two cytokines or derivatives thereof either separately or fused together. The present invention also contemplates a method for enhancing an immune response to an antigen comprising the administration of at least two cytokines which act in synergy to enhance an immune response to said antigen. The present invention is particularly useful in pharmaceutical vaccines and genetic vaccines in humans and livestock animals.

Bibliographic details of the publications referred to in this specification are collected at the end of the description. Sequence Identity Numbers (SEQ ID NOs.) for the nucleotide sequences referred to in the specification are defined following the bibliography.

Throughout this specification, unless the context requires otherwise, the word "comprise" or variations such as "comprises" or "comprising", will be understood to imply the inclusion of a stated element or integer or group of elements of integers but not the exclusion of any other element or integer or group of elements or integers.

The increasing sophistication of molecular biological and protein chemical techniques has, and continues to, revolutionise vaccine development. Frequently, however, recombinant and synthetic molecules exhibit less immunogenicity relative to the whole organism or cell from which they are derived. In order to increase the efficiency of such vaccines, considerable research has been directed to the development of immunological adjuvants.

Adjuvants promote the immune response in a number of ways (East et al, 1993). First, some adjuvants maintain a depot of antigen at the site of injection, as demonstrated by the correlation between persistence of antigen at the site of injection and maintenance of serum antibody levels. Second, adjuvants are capable of promoting accumulation of immunoreactive cells at the site of injection and in the draining lymph nodes, which ensures optimal exposure of specific immunoresponsive cells to the antigen. Adjuvants also modify the activities of cells that are concerned with generating and maintaining the immune response. Additionally, adjuvants modify the presentation of antigen to the immune system.

Cytokines such as interleukins (IL-1 to 13), colony stimulating factors (CSFs), tumour necrosis factors (TNF- α and β) and interferons (IFN- α , β and γ) are the hormones of the immune system which control and determine the nature of the immune response (Balkwill and Burke, 1989). Adjuvants with the capacity for immune modulation achieve their activity primarily by modification of cytokine production, probably by direct action upon T cells or macrophages (Cox and Coulter, 1992). Cytokines regulate various aspects of the immune response to vaccination including cellular traffic at the site of vaccination (Zimmerman et al., 1992), antigen presentation (Valle et al., 1991), the phenotype of the T helper cell response (Romagnani, 1992), maturation and differentiation of the B cell response (Snapper and Mond, 1993) and differentiation of non-specific killer cells such as

2

eosinophils and mast cells (Clutterbuck et al., 1989). Recombinant cytokines not only have the potential to enhance the immune response to a vaccine antigen but also alter the immune response leading to different effector mechanisms.

As an alternative to chemical adjuvants, the use of cytokines as natural adjuvants is attracting considerable interest (reviewed by Heath and Playfair, 1992). Various cytokines have been shown to be effective immunological adjuvants in a variety of model systems, enhancing protection induced by bacterial, viral and parasitic antigens. Some of these molecules have already been shown to enhance the immune response of immunodepressed animals to antigens delivered by viral vectors (Ramshaw et al., 1987), or when incorporated into the emulsion to enhance the antibody response to inactivated vaccines (Good, 1988; Blecha, 1990). Furthermore, in the murine model, cytokines such as IL-1, IL-2 and IFN- γ have been shown to have adjuvant effects for both cellular and humoral response (Staruch and Wood, 1983; Nunberg et al., 1989; Playfair and deSouza, 1987). Limited adjuvanticity of TNF has been reported by Ghiara et al, (1987).

The adjuvant effects of some cytokines have been studied in domestic livestock. Yilma et al., (1985) reported that bovine IFN- γ enhanced the humoral responses of cattle vaccinated with a viral glycoprotein and Reddy et al (1990) demonstrated increased neutralising antibody titres and cytotoxic cell responses to bovine herpes virus-1 when recombinant bovine IL-1 β (rBoIL-1 β) was included in the vaccine regimen. Recombinant human IL-2 has been administered to pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumonia* bacterium (Anderson et al., 1987; Nunberg et al., 1988) or a pseudorabies subunit vaccine (Kawahima and Platt, 1989) with increased levels of protection and neutralising antibodies respectively. Recently, Nash et al (1993) reported that the incorporation of recombinant ovine IL-1 β (rOvIL-1 β) in a alum based vaccine resulted in significantly higher antibody levels to their model antigens ovalbumin.

Despite the potential of using single cytokines as adjuvants in vaccine preparations, little work has been reported on adjuvants consisting of two or more cytokines. This may, in part, have been due to the high cost in preparing recombinant cytokines. Furthermore, cytokines also regulate the activity of other cytokines and, frequently, this involves a down regulation. As a result, it is not readily apparent which combinations of cytokines may work in concert. Heath and Playfair (1992) have suggested the possibility of using combinations of cytokines as adjuvants, however, their proposition contemplates a vast number of combinations and permutations of cytokines with little success in the combinations actually tried.

In the past, substantial technical difficulties have delayed development of vaccines against commercially significant livestock parasites such as gastrointestinal nematodes. In work leading up to the present invention, the inventors sought to improve the immunogenicity of antigens such as nematode antigens by incorporating specific combinations of recombinant cytokines into vaccine formulations. Furthermore, alternative adjuvants are required for human use.

There is a need to identify particular synergistic combinations of cytokines which are capable of acting as adjuvants useful, for example, in the preparation of vaccines.

Accordingly, the present invention provides an adjuvant said adjuvant comprising at least two cytokine activities acting in synergy to enhance an immune response to an antigen. More particularly, the present invention is directed

antibodies such as IgG1 or IgE leading to increased mastocytosis and eosinophilia, hallmarks of nematode parasite infection.

The adjuvant composition of the present invention may be packaged for sale with each cytokine contained in a separate compartment with instructions to combine two or more of the cytokines with a desired antigen prior to use. The package may instead contain the adjuvant composition in a single compartment with instructions to combine the adjuvant with a desired antigen prior to use. Alternatively, the adjuvant composition may be administered subsequently or prior administration of the antigen.

Accordingly, another aspect of the present invention contemplates a method of enhancing, increasing, upwardly modulating or otherwise facilitating an immune response in an or a bird to an antigens said method comprising administering to said animal or bird an immune-enhancing effective amount of an adjuvant composition which comprises a first polypeptide having IL-1 β activity and a second polypeptide having TNF α activity. Alternatively, the first and second polypeptides have IL-1 β and GM-CSF activities, respectively. Preferably, the is a human or livestock animal. The method may further comprise the administration of an antigen such as hereinbefore described or may comprise the administration of a genetic adjuvant or genetic vaccine as described above.

An animal or bird as contemplated by is aspect of the present invention is as hereinbefore defined in relation to the source of cytokine molecules. Where the or bird is to be treated with EL-1 β , TNF α or GM-CSF from the same species, this is referred to as a "homologous" system. Where one or more of the cytokines are from a different or bird to the anal or bird being treated, then this is referred to as a "heterologous" system. Both homologous and heterologous systems are contemplated by the present invention.

In an alternative embodiment, the method comprises the sequential administration to said animal or bird of a polypeptide having one of IL-1 β activity or TNF α /GM-CSF activity followed by a polypeptide having the other of said IL-1 β activity or TNF α /GM-CSF activity.

The polypeptides contemplated above are preferably as hereinbefore defined and include fusion polypeptides.

In a most preferred embodiment, the method contemplated by the present invention comprises administering to an animal (e.g. human or livestock animal) or bird a vaccine composition comprising an antigen, and a first and second polypeptide as contemplated above. The present invention, therefore, is further directed to such a vaccine composition. In a most preferred embodiment, the vaccine composition is a vaccine against nematode infection in livestock animals. The vaccine composition may also be a genetic vaccine comprising one or more nucleic acid molecules encoding the cytokine or like molecules with or without an antigen and encoded separately or fused together.

The active ingredients of the vaccine composition of the present invention comprising one or more antigens or active immunogenic fragments thereof and an adjuvant composition comprising IL-1 β and TNF α or IL-1 β and GM-CSF as hereinbefore defined are contemplated to exhibit excellent activity in enhancing an immune response in an animal or bird when administered in an amount which depends on the particular case. The variation depends, for example, on the animal or bird, the antigen and/or the source of first and second polypeptides. For example, from about 0.5 μ g to about 20 mg of antigen or combined total of antigen per kilogram of body weight per day may be administered. Furthermore, for 10 μ g to 10 mg of IL-1 β , TNF α and/or

GM-CSF each may be administered per dose. Dosage regime may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several divided doses may be administered daily, weekly, monthly or in other suitable time intervals or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the situation. The active compound may be administered in a convenient manner such as by the oral, intravenous (where water soluble), intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal or suppository routes or implanting (e.g. using slow release molecules). Depending on the route of a administration, the active ingredients which comprise one or more antigen and first and second polypeptides as hereinbefore defined may be required to be coated in a material to protect said ingredients from the action of enzymes, acids and other natural conditions which may inactivate said ingredients. For example, the low lipophilicity of the active ingredients may allow them to be destroyed in the gastrointestinal tract by enzymes capable of cleaving peptide bonds and in the stomach by acid hydrolysis. In order to administer the vaccine by other than parenteral administration, the vaccine composition will be coated by, or administered with, a material to prevent its inactivation. For example, the vaccine composition may be co-administered with enzyme inhibitors or in liposomes. The vaccine composition may also contain other compounds such as aluminium hydroxide, resorcinols, non-ionic surfactants such as polyoxyethylene oleyl ether and n-hexadecyl polyethylene ether. Enzyme inhibitors include pancreatic trypsin inhibitor, diisopropylfluorophosphate (DFP) and trypsinol. Liposomes include water-in-oil-in-water emulsions as well as conventional liposomes. The vaccine may also comprise Freund's Complete, Freund's Incomplete Adjuvant or aluminium hydroxide.

The active compounds may also be administered in dispersions prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and/or mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the