



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 308**

51 Int. Cl.:
A61K 38/24 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98931835 .7**
96 Fecha de presentación : **09.07.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1007084**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2000**

54 Título: **Composiciones inmunógenas de LHLR y procedimiento que se refieren a las mismas.**

30 Prioridad: **09.07.1997 AU PO7768**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2010

73 Titular/es: **Pfizer Inc.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017, US

72 Inventor/es: **McNamara, Michael, Kerin**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 339 308 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 inmunógenas de LHLR y procedimiento que se refieren a las mismas.

5 La presente invención se refiere, en general, a una composición inmunógena de LHLR. La presente invención es útil, entre otros, como agente profiláctico y/o terapéutico para la modificación de la fertilidad y los patrones de comportamiento de animales, la consecución de ganancias en la producción de ganado, tales como aumento del crecimiento, disminución de las proporciones de conversión de alimentos o el control de características organolépticas no deseadas o el tratamiento de trastornos de los órganos reproductores.

10 Detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia por autores en esta memoria se recogen al final de la descripción. Los Números de Identidad de Secuencia (SEQ ID NOs.) para las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la memoria se definen a continuación de la bibliografía.

15 A lo largo de esta memoria y las reivindicaciones que siguen, salvo que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "comprendiendo", se entenderá que implica la inclusión de una unidad completa o etapa o grupo de unidades completas o etapas declarados pero no la exclusión de cualquier otra unidad completa o etapa o grupo de unidades completas o etapas.

20 La vacunación contra la hormona hipotalámica hormona liberadora de hormona luteinizante (a la que se hace referencia en este documento como "LHRH", también conocida como GnRH) se ha demostrado que es un método inmunológico de controlar la reproducción desde principio de los años 1970 (Faser 1975, Jeffcoate y col. 1982). Suscitando una respuesta inmunitaria a LHRH se previene la liberación desde la pituitaria anterior de las hormonas LH y FSH, que se requieren para el desarrollo y mantenimiento de las gónadas - los testículos en el macho y los ovarios en la hembra -. De este modo, la reducción de los niveles de LH y FSH conduce a la pérdida de la función reproductora.

30 Las operaciones de des-sexuación (o castración) son las operaciones quirúrgicas más ampliamente practicadas en medicina veterinaria y en gestión de explotación ganadera. Una proporción significativa de ambos sexos de ganado doméstico y animales de compañía se somete con regularidad a extirpación quirúrgica del sexo para prevenir diversas características no deseables que acompañan a la madurez sexual. Los caracteres incluyen combatividad, inquietud, comportamiento sexual, pérdida de salud, tumores de los órganos reproductores y preñez.

35 El control del comportamiento de apareamiento mediante vacunación con vacunas de conjugado de LHRH en animales de compañía tales como perros, gatos y caballos, y en el ganado específicamente en cerdos machos y en reses de vacuno machos y hembras, ha sido identificado por el inventor como una meta tan significativa como el control de la fertilidad.

40 De modo similar, el control y tratamiento de trastornos de las gónadas y otros órganos reproductores, tanto de seres humanos como de animales, tales como cáncer testicular, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer ovárico, agrandamiento o endometriosis de próstata son importantes.

45 El primer informe publicado sobre vacunación con vacuna de conjugado de LHRH en conejos mostró que se logró un efecto drástico en el desarrollo de los testículos. Los primeros informes de la aplicación de una vacuna de LHRH en cerdos (Falvo y col., 1986, Caraty and Bonneau 1986), mostraron que formulaciones eficaces basadas en LHRH 1-10 conjugada con globulina de suero humano o albúmina de suero bovino podían controlar el desarrollo de los testículos y el olor a verraco. Awonyl y col., (1988), mostraron que el efecto de la vacunación de cerdos contra LHRH afectó principalmente al desarrollo de los testículos. Todas estas pruebas se hicieron sobre un número pequeño de animales, sin informes de eficacia.

50 Se ha intentado resolver los problemas de variabilidad de vacunas de conjugados de LHRH para controlar el olor a verraco incorporando genéticamente secuencias de aminoácidos de LHRH en proteínas vehículo, que incluyen el gen pilin de *E. coli* (Zee y col., 1995) y en un gen truncado de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* (Potter y col., 1997). Estas proteínas de fusión se producen como moléculas recombinantes y no por acoplamiento bioquímico. Las pruebas han mostrado que estas proteínas recombinantes funcionan como vacunas de inmunocastración. Sin embargo, no han dado como resultado vacunas comercialmente disponibles y los informes de las revistas especializadas dan a entender menos eficacia de la deseada.

60 En consonancia con la naturaleza menos que perfecta de las vacunas subunitarias altamente desarrolladas y ampliamente aplicadas para la prevención de enfermedades, las vacunas de inmunocastración basadas en conjugados específicos de LHRH-proteína también se ha mostrado que son menos que perfectas para inducir anticuerpo para LHRH o para reducir hormonas u otros parámetros asociados con funciones reproductoras. Ha habido un reconocimiento general de una amplia variación en la inducción eficaz de anticuerpo para LHRH con una diversidad de vacunas de conjugados de LHRH (Meloan y col., 1994).

65 La vacunación de reses con conjugado de péptido LHRH 1-10 - albúmina de suero humano en adyuvante de Freund (Robertson y col., 1982), dio buenas respuestas de anticuerpo a LHRH después de 2 vacunaciones en sólo 5 de 10 reses vacunadas. Incluso en vacunaciones de refuerzo, las que respondieron de modo mediocre no mantuvieron

ES 2 339 308 T3

concentraciones de anticuerpos o han suprimido la testosterona. Una vacuna desarrollada comercialmente para reses (Vaxstrate), solamente fue eficaz al 80% (Hoskinson y col., 1990).

Experimentos en ratones (Sad y col., 1991) han mostrado que las respuestas a conjugados de LHRH tienen base genética. La vacuna fue un péptido de LHRH 1-10, con la sustitución de D-lisina en lugar de L-glicina en la posición 6, conjugado con toxoide de difteria y adyuvado con alúmina. Algunas razas de ratones respondieron bien, mientras que otras mostraron supresión de anticuerpo de LHRH. Estos resultados condujeron a los expertos en la técnica de formulación de vacunas a esperar que una proporción significativa de una población no consanguínea fallaría en responder o respondería mediocrementemente a la vacuna de tipo subunitario de conjugado de LHRH.

La vacunación de cerdos macho ha dado resultados variables de supresión de desarrollo de testículos y supresión de olor a verraco. Bonneau y colaboradores han mostrado (Bonneau y col., 1994) que un conjugado de LHRH 1-10 - α globulina administrado en emulsión oleosa para vacunación primaria y adyuvante de saponina para vacunación de refuerzo dio respuesta de anticuerpo solamente en 90% de 20 cerdos vacunados. Los niveles de testosterona se suprimieron solamente en 16/20 vacunados (75%). Así pues, la calidad tanto como la cantidad de anticuerpo es importante para determinar la eficacia de una vacuna basada en conjugado de LHRH. Hagen y col., (1988) reivindicaron que la vacunación de 6 verracos con un conjugado de LHRH-albúmina de suero bovino (BSA) en adyuvante de Freund podía reducir el olor a verraco. Sin embargo, 2/6 verracos tuvieron respuestas de anticuerpos bajas y tuvieron espermatogénesis y función testicular normales. Los niveles de escatol no fueron afectados por la vacunación contra LHRH. Por consiguiente, hay necesidad de desarrollar una vacuna de LHRH que sea sistemáticamente mucho más eficaz que las utilizadas hasta la fecha.

Finnerty y colaboradores (J. Reprod. Fertil. 101: 333-343 (1994)) han mostrado que un protocolo para la inmunización de toros es 1,0 mg de conjugado de LHRH-HSA en adyuvante de DEAE-dextrano con un intervalo primaria-refuerzo de 56 días.

En el trabajo que ha conducido hasta la presente invención, el inventor ha determinado que la eficacia de la vacunación contra LHRH se mejora significativamente cuando se administra LHRH como conjugado con toxoide de difteria y un polisacárido iónico.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición que comprende un conjugado de LHRH-toxoide de difteria adsorbido en un polisacárido iónico, en el que dicha LHRH es el péptido representado por SEQ ID NO:2.

La referencia a un "polisacárido iónico" debería entenderse como una referencia a cualquier polisacárido cargado positiva o negativamente o derivado o equivalente químico del mismo. La referencia a "derivado" y "equivalente químico" debería entenderse que tiene el mismo significado que se explica a continuación. Dicho polisacárido iónico puede estar en forma soluble o insoluble. Preferiblemente, dicho polisacárido iónico es un dextrano iónico. Incluso más preferiblemente dicho dextrano iónico es DEAE-dextrano, sulfato de dextrano o QAE-dextrano. Lo más preferiblemente, dicho dextrano iónico es DEAE dextrano. Preferiblemente, el componente dextrano de dicho dextrano exhibe un peso molecular en el intervalo de 250.000 a 4.000.000 Da e incluso más preferiblemente 500.000 a 1.500.000 Da.

En una realización preferida, el conjugado de LHRH-toxoide de difteria se adsorbe en DEAE-dextrano.

La referencia a una respuesta inmunitaria "eficaz" debería entenderse como una referencia a una respuesta inmunitaria que conduce directa o indirectamente a la reducción o al bloqueo completo de la función reproductora (es decir, reduce o impide el funcionamiento de una o más de las actividades del órgano reproductor o modula los niveles hormonales de un animal de tal modo que una o más de reproducción o actividad reproductora se reducen) al menos en un 90%, y preferiblemente al menos en un 95%, de los animales tratados. Se debería entender que la eficacia es una medida funcional y no se define mediante referencia a concentración del anticuerpo anti-LHRH solo puesto que la presencia de anticuerpo que circula solo no es necesariamente indicativa de la capacidad de dicho anticuerpo que circula para bloquear la función reproductora. La expresión "órgano reproductor" debería entenderse en su sentido más amplio para referirse a las gónadas de machos y hembras y órganos sexuales accesorios. Los "órganos sexuales accesorios" también deberían entenderse en su sentido más amplio e incluyen, por ejemplo, la próstata, mamas, y el útero.

Los "derivados" incluyen fragmentos, piezas, porciones, equivalentes químicos, mutantes, homólogos y análogos de fuentes naturales, sintéticas o recombinantes, incluyendo proteínas de fusión. Los equivalentes químicos se pueden sintetizar químicamente o se pueden descartar, siguiendo, por ejemplo, selección de productos naturales.

Los "derivados" también pueden derivarse a partir de inserción, supresión o sustitución de aminoácidos. Derivados por inserción de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxílico terminales así como inserciones intrasecuencia de aminoácidos sencillos o múltiples. Variantes por inserción de secuencia de aminoácidos son aquellas en las que se introducen uno o más aminoácidos o residuos de aminoácidos no naturales en un sitio predeterminado en la proteína aun cuando también es posible la inserción aleatoria con selección adecuada del producto resultante. Las variantes por supresión se caracterizan por la retirada de uno o más aminoácidos de la secuencia. Variantes por sustitución de aminoácidos son aquellas en las que se ha retirado al menos un residuo en la secuencia y se ha insertado en su lugar un residuo diferente natural o no natural. Sustituciones típicas son aquellas que se hacen en conformidad con la Tabla 1:

ES 2 339 308 T3

TABLA 1

Residuos adecuados para sustituciones de aminoácidos

	Residuo original	Sustituciones ejemplares
5	Ala	Ser
	*Arg	Lys
10	Asn	Gln; His
	Asp	Glu
15	Cys	Ser
	Gln	Asn
	*Glu	Ala
20	*Gly	Pro
	*His	Asn; Gln
	Ile	Leu; Val
25	*Leu	Ile, Val
	Lys	Arg; Gln; Glu
	Met	Leu; Ile
30	Phe	Met; Leu; Tyr
	*Ser	Thr
	Thr	Ser
35	*Trp	Tyr
	*Tyr	Trp; Phe
	Val	Ile; Leu
40	Clave: Los residuos de aminoácidos marcados con asterisco indican residuos presentes en la secuencia de LHRH del mamífero.	

45 Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen, pero sin limitación los isómeros-D de dichos aminoácidos. Las "adiciones" a secuencias de aminoácidos incluyen fusión con otros péptidos, polipéptidos o proteínas.

50 La referencia a toxoide de difteria debería entenderse como una referencia a todas las formas de toxoide de difteria y derivados de las mismas. El término "derivados" tiene el mismo significado que se ha definido anteriormente. Los derivados pueden incluir, por ejemplo, moléculas que comprenden epítomos de células T de toxoide de difteria o dichos epítomos de células T en aislamiento.

55 El autor describe LHRH que comprende la secuencia de aminoácidos según se expone sustancialmente en SEQ ID NO:2 y en la que el término carboxilo de dicha secuencia de aminoácidos está amidado. Esta LHRH se denomina en este documento "forma LHRH 2-10".

LHRH que comprende la secuencia de aminoácidos según se expone sustancialmente en SEQ ID NO:4 se denomina en este documento "forma modificada LHRH 2-10".

60 Aun cuando no se pretende limitar la invención a un procedimiento, dicho péptido se puede sintetizar mediante química de Fmoc y se puede acoplar el péptido resultante al toxoide de difteria de proteína vehículo. Dicho acoplamiento se puede realizar según se describe en Ladd y *col.*, 1990, o en Bonneau y *col.*, 1994, y el conjugado de péptido y proteína vehículo resultante (denominado en este documento "conjugado de péptido") se procesa para que esté exento de péptido sin unir y de otros subproductos de conjugación. Dicho procesamiento se puede conseguir mediante diálisis convencional o mediante ultrafiltración. El conjugado de péptido resultante se adsorbe en el adyuvante de polisacárido iónico.

ES 2 339 308 T3

Sin limitar la presente invención a una teoría o modo de acción, la administración de una cantidad eficaz de la preparación de LHRH de la presente invención induce una respuesta inmunitaria significativamente más eficaz contra LHRH que las composiciones de LHRH-vehículo-adyuvante que se describen en la técnica anterior. Dicha eficacia mejorada se observa cuando la composición inmunógena de LHRH comprende específicamente el toxoide de difteria de vehículo y un adyuvante de polisacárido iónico.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el conjugado de LHRH-toxoide de difteria adsorbido en un polisacárido iónico junto con uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Preferiblemente dicho polisacárido iónico es DEAE dextrano.

Según se usa en este documento, el término "farmacéutico" incluye "veterinario".

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (en los casos solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para preparación improvisada de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. Tienen que ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y tienen que conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser aportada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. Se puede aportar absorción prolongada o liberación retrasada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan disoluciones estériles inyectables incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes anteriormente enumerados, según se requiera, a lo que sigue esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de los anteriormente enumerados.

En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones estériles inyectables, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío, la técnica de secado por congelación y la técnica de secado por pulverización que producen un polvo de los ingredientes activos más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de la disolución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Cuando los ingredientes activos se protegen adecuadamente, se pueden administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o se pueden encerrar en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, o se pueden prensar en forma de comprimidos, o se pueden incorporar directamente con la comida de la dieta. Para administración oral, el compuesto activo se puede incorporar en excipientes y usar en forma de comprimidos tragables, comprimidos bucales, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deberían contener al menos 1% en peso de compuesto activo. Evidentemente, el porcentaje de las composiciones y preparaciones se puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en dichas composiciones útiles es tal que se obtenga una dosificación adecuada. Se preparan composiciones o preparaciones preferidas según la presente invención de tal manera que una forma farmacéutica unitaria oral contenga entre aproximadamente 0,1 μg y 2000 μg de compuesto activo.

Los comprimidos, pastillas para chupar, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener los componentes que se relacionan a continuación: Un aglutinante tal como goma, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; y un lubricante tal como estearato de magnesio. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales de los tipos anteriores, un vehículo líquido. Otros materiales diversos pueden estar presentes como revestimientos o para modificar de alguna otra manera la forma física de la unidad posológica. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, metil y propilparabenos como conservantes, y un colorante. Evidentemente, cualquier material usado para preparar cualquier forma farmacéutica unitaria debería ser puro desde el punto de vista veterinario y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el (los) compuesto(s) activo(s) se puede(n) incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación retardada.

Vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción y similares. El uso de medios y agentes de este tipo para sustancias activas desde el punto de vista veterinario es muy conocido en la técnica. Excepto en el caso en que un medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar a las composiciones ingredientes activos suplementarios.

ES 2 339 308 T3

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Para administración al ganado es particularmente ventajoso usar un contenedor multidosis conectado a una pistola de vacunación repetitiva. La forma farmacéutica unitaria según se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que han de ser tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para que produzca el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las nuevas formas farmacéuticas unitarias de la presente invención viene dictada por, y es directamente dependiente de, (a) las características únicas del material activo y el particular efecto terapéutico que se ha de conseguir, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica para combinar en un compuesto dicho material activo para el tratamiento de enfermedades en sujetos vivientes que tienen una dolencia en que la salud corporal esté perjudicada como se describe en este documento con detalle.

El ingrediente activo principal se combina en un compuesto para administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma farmacéutica unitaria como se ha descrito hasta aquí. Por ejemplo, una forma farmacéutica unitaria puede contener el compuesto activo principal en cantidades que oscilan desde 0,5 μg hasta aproximadamente 2000 μg . Expresado en proporciones, el compuesto activo está presente en general desde aproximadamente 0,5 μg hasta aproximadamente 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de vehículo. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan mediante referencia a la dosis y manera habituales de administración de dichos ingredientes.

Aun cuando no se pretende limitar la invención a ninguna teoría o modo de acción, la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz contra LHRH da como resultado la prevención de la liberación de las hormonas LH y FSH desde la pituitaria anterior. Dado que se requieren estas hormonas para el desarrollo y mantenimiento de las gónadas, la reducción de los niveles de estas hormonas conduce a una disminución o pérdida de las funciones reproductoras. Por lo tanto, los animales vacunados son castrados eficazmente lo que da como resultado la pérdida de las características asociadas con la madurez sexual tales como combatividad, inquietud, comportamiento sexual, pérdida de salud, características organolépticas, tumores de los órganos reproductores y preñez.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de suscitar, en un animal no humano, una respuesta inmunitaria eficaz a LHRH comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

La referencia a “conjugado de LHRH” debería entenderse como una referencia a la preparación de LHRH de la presente invención.

La referencia a “animal” debería entenderse como la referencia a todos los animales incluyendo primates (por ejemplo, monos), animales de granja (por ejemplo, ovejas, vacas, caballos, burros, cabras, cerdos), animales para pruebas de laboratorio (por ejemplo, ratas, cobayas, conejos hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos), animales salvajes cautivos (por ejemplo emúes, canguros, ciervos, zorros), aves (por ejemplo, pollos, patos, gallinitas de Bantam, faisanes emúes, avestruces), reptiles (por ejemplo, lagartos, serpientes, ranas) y peces (por ejemplo, trucha, salmón). Dichos animal puede ser macho o hembra.

En una realización más preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento de suscitar, en un animal no humano, una respuesta inmunitaria eficaz a LHRH comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de conjugado de LHRH en el que dicha respuesta inmunitaria inhibe la capacidad reproductora de dicho animal.

La referencia a “inhibir la capacidad reproductora de un animal no humano” debería entenderse como la reducción parcial o completa del funcionamiento de una o más de las actividades de los órganos reproductores o modulación de los niveles hormonales de dicho animal de modo que la actividad reproductora, tal como la actividad sexual, se reduce.

Inhibir la capacidad reproductora de un animal no humano puede dar como resultado un cierto número de consecuencias tales como, pero sin limitación, la castración de dicho animal o la reducción o eliminación de características asociadas con la madurez sexual (por ejemplo combatividad, inquietud, comportamiento sexual, pérdida de salud, características organolépticas no deseadas, tumores de los órganos reproductores y preñez. La “castración” debería entenderse como una referencia a castración de animales tanto machos como hembras. Inhibir la capacidad reproductora de un animal también puede dar como resultado el cese de la proliferación celular tumoral (por ejemplo, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer ovárico o células de cáncer testicular), la inhibición o inversión de hiperplasia, tales como agrandamiento de próstata, endometriosis o respuestas inflamatorias.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de castrar a un animal no humano comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para retrasar o inhibir el ciclo estral en un animal no humano hembra comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

ES 2 339 308 T3

Todavía otro aspecto más de la presente invención se refiere a un procedimiento para inhibir características inducidas por la maduración sexual de un animal no humano comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

5 La referencia a “inhibir características inducidas por la maduración sexual de un animal” debería entenderse como una referencia a la reducción o completa eliminación de una o más características físicas y/o de comportamiento inducidas, directa o indirectamente, por la maduración sexual. Dichas características físicas y/o de comportamiento incluyen, por ejemplo, combatividad, inquietud, comportamiento sexual, pérdida de salud, características organolépticas no deseadas, ciclo estral, fertilidad, preñez, tumores de los órganos reproductores. Por consiguiente, inhibir dichas características incluye inhibir la actividad sexual (por ejemplo prevenir que las reses hembra monten a otras reses hembra) prevenir o retrasar la ovulación, reducir el comportamiento agresivo o reducir las características organolépticas no deseadas tales como el olor a verraco. En una realización particularmente preferida, dichas características son agresividad y actividad sexual.

15 Según esta realización preferida se proporciona un procedimiento para inhibir la agresividad en un animal no humano comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz del conjugado de LHRH.

20 En otra realización más preferida se proporciona un procedimiento para inhibir actividad sexual en un animal no humano comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz del conjugado de LHRH.

25 La vacunación con conjugado de LHRH en perros y gatos macho se puede usar para controlar el comportamiento no deseado, particularmente agresividad y urgencia de escaparse. En perros y gatos hembra, los efectos deseados son el control de la fertilidad y del comportamiento no deseado en el momento del estro, comúnmente denominado “que están calientes”, o “en celo”. El comportamiento no deseado en hembras incluye aumento de desobediencia, marcado de territorios, inquietud y otros comportamientos asociados con el estro.

30 Según esta realización más preferida, se proporciona un procedimiento para inhibir características inducidas por la maduración sexual de gatos y/o perros comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho gato y/o perro una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

35 Lo más preferiblemente dichas características son agresividad y tendencia a escaparse en los gatos y/o perros macho y desobediencia, marcado de territorio, inquietud y comportamiento estral en gatos y/o perros hembra.

40 En la industria de los caballos pura sangre, la carrera de sementales está asociada con la dificultad en el manejo y en la tranquilidad y coherencia del entrenamiento. Una gran proporción de potros jóvenes son castrados y criados como castrados para hacerlos más dóciles. Esto parece que no tiene significativamente impacto sobre su potencial en la carrera. Una vacuna para controlar los problemas de comportamiento no deseado permitiría desarrollar el potencial completo en la carrera de los caballos macho, con el beneficio añadido de reversibilidad y obteniendo de este modo el beneficio genético como semental después de que se termina su actividad en las carreras.

45 Las carreras de potras y yeguas (caballos hembra) están en su apogeo en la primavera y en cierta medida en el otoño en los climas templados del mundo. En estos períodos del año es cuando las yeguas entran en celo. Esto causa dificultades en el entrenamiento, manejo y un rendimiento en la carrera irregular y mediocre. Una vacuna de LHRH para controlar el estro tendría un mercado grande y preparado en la industria de las carreras de caballos. Actualmente hay disponibles productos, basados en análogos de hormonas, para controlar el estro en potras y yeguas de carreras. Se ha reseñado que tienen un efecto duradero sobre la capacidad para criar de las yeguas tratadas.

50 Por consiguiente, todavía en otra realización preferida se proporciona un procedimiento para inhibir características inducidas por la maduración sexual de caballos comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho caballo una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

55 Lo más preferiblemente, dichas características son agresividad en potros y comportamiento estral y rendimiento irregular en yeguas.

60 En reses de vacuno, el comportamiento indómito de los toros es muy conocido. La agresividad de los toros se puede dirigir hacia los cuidadores, objetos inanimados tales como vallados y bebederos y puede dar como resultado graves peleas entre reses. Así pues, en la mayoría de los países productores de carne de vacuno, los toros destinados a producción cárnica son castrados cuando son todavía terneros, y se crían los novillos castrados resultantes. La cría de novillos castrados con preferencia a machos enteros tiene un impacto negativo significativo sobre el rendimiento de la producción, aunque se juzga que esto es un compromiso aceptable, incluso necesario por la cría de novillos castrados más dóciles.

65 Se crían terneras para producción cárnica de vacuno en EE.UU. y Australia. El ciclo de las terneras en las explotaciones ganaderas de engorde causa pérdidas de producción significativas. La ternera en ciclo tiene un gran aumento en niveles de actividad, lo que da como resultado crecimiento mediocre o negativo durante los 5-7 días del ciclo. Los niveles de actividad intensificada de las terneras en estro tienen impacto sobre otras terneras en el mismo corral, de modo que resulta afectado el rendimiento de la producción del corral entero de 50-100 animales. En EE.UU. las terneras son alimentadas con una dieta que contiene acetato de melengestrol (MGA), un esteroide sintético, para controlar el

ES 2 339 308 T3

estros. En Australia, y otros países en los que están prohibidos los suplementos hormonales en la alimentación, se crían las terneras en las explotaciones ganaderas de engorde sin MGA en la alimentación con rendimiento de producción mediocre.

5 Por consiguiente, la inmunocastración del ganado, si bien reduce o elimina características asociadas con la madurez sexual, en general da como resultado un impacto negativo sobre las ganancias de producción en animales inmunocastados respecto a animales no castrados. Esta teoría se basa en el hecho bien establecido de que los animales enteros crecen considerablemente con más rapidez y más eficazmente que los animales castrados. Sin embargo, el inventor ha determinado que administrar la preparación de LHRH de la presente invención al ganado da como resultado no obstante la consecución de ganancias de producción. La referencia en este documento a “ganancias de producción” incluye, pero sin limitación, un aumento en el peso final del ganado en el sacrificio, rebaja de los requisitos de alimentos por kilogramo de peso en canal que se gana, aumento de velocidad de crecimiento de dicho ganado en comparación con el ganado sin castrar, mejora de la calidad de la carne que se deriva de dicho ganado (por ejemplo, controlando las características organolépticas no deseadas de dicha carne) o disminución de los niveles de estrés de ganado estabulado intensivamente, reduciendo las interacciones agresivas de los animales estabulados intensivamente o, con respecto a los cerdos, control del olor a verraco.

Por consiguiente, todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para conseguir ganancias de producción en ganado comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho ganado una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

Preferiblemente, dicha ganancia de producción es la reducción o eliminación de características organolépticas no deseadas de la carne procedente de ganado macho.

25 El conjugado de LHRH se puede administrar al ganado en una dosis sencilla, por ejemplo una administración sencilla de una vacuna de liberación lenta o pulsátil o en dosis múltiple.

Por consiguiente, se proporciona un procedimiento para conseguir ganancias de producción en ganado comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho ganado una cantidad eficaz del conjugado de LHRH.

30 Preferiblemente, dicha ganancia de producción es la reducción o eliminación de características organolépticas no deseadas de la carne procedente de ganado macho.

35 El término “ganado” incluye, pero sin limitación, mamíferos tales como cerdos, reses de vacuno, ovejas; animales salvajes cautivos tales como ciervos; y aves tales como emús y avestruces. Lo más preferiblemente, dicho ganado son cerdos y reses de vacuno.

Según esta realización más preferida, se proporciona un procedimiento para conseguir ganancias de producción en cerdos comprendiendo dicho procedimiento administrar a dichos cerdos una cantidad eficaz del conjugado de LHRH.

40 Preferiblemente, dicha ganancia de producción es la reducción o eliminación de olor a verraco.

En otra realización más preferida, se proporciona un procedimiento para conseguir ganancias de producción en reses de vacuno comprendiendo dicho procedimiento administrar a dichas reses de vacuno una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

En animales, y particularmente en seres humanos, se puede usar la vacunación con conjugado de LHRH como tratamiento profiláctico o terapéutico para trastornos que se modulan directa o indirectamente por LHRH. Estros trastornos incluyen malignidades de células que se regulan por LHRH o que se regulan por hormonas que están ellas mismas reguladas por LHRH, por ejemplo, cáncer testicular, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata y cánceres de células oncofetales o de células que son inducidas a expresar antígenos oncofetales cuando ocurre la malignidad. Estos trastornos también incluyen trastornos proliferativos no malignos tales como hiperplasias, por ejemplo hiperplasia prostática o hiperplasia endometrial. Sin limitar la presente invención a una teoría o modo de acción, algunas células tumorales expresan receptores para hormonas de la reproducción, cuya síntesis está regulada por LHRH. Vacunando contra LHRH es posible prevenir la liberación de estas hormonas. El conjugado de LHRH de la presente invención también se puede usar para tratar o prevenir trastornos tales como policistitis ovárica, endometriosis y dolencias inflamatorias.

60 También los inventores describen un procedimiento para inhibir el crecimiento de células que se regulan directa o indirectamente por LHRH comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

Preferiblemente, dichas células son células humanas.

65 La referencia a “crecimiento” celular es una referencia a la proliferación, diferenciación o actividad funcional de dichas células. La referencia a crecimiento celular que se “regula directa o indirectamente por LHRH” debería entenderse como una referencia al crecimiento celular que se regula por la propia LHRH o crecimiento celular que se regula por hormonas distintas de LHRH que se regulan ellas mismas directa o indirectamente por LHRH.

ES 2 339 308 T3

La referencia a “inhibir” debería entenderse como una referencia a la prevención de crecimiento celular, el cese de crecimiento celular o la regulación a la baja del crecimiento celular. Dichas células se pueden situar dentro del órgano del que se derivan o en alguna otra situación dentro del cuerpo del animal, tal como, por ejemplo, cuando una célula maligna de mama se ha metastatizado en el hígado.

En una realización particularmente preferida, dichas células son células malignas y lo más particularmente células malignas testiculares, células malignas de mama, células malignas ováricas o células malignas de próstata.

Todavía en otra realización preferida, dichas células son células hiperplásticas tales como células prostáticas hiperplásticas o células endometriales hiperplásticas.

Todavía en otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de regular a la baja la libido de un animal no humano comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de conjugado de LHRH.

Rasgos adicionales de la presente invención se describen más completamente en los siguientes Ejemplos. Sin embargo, ha de entenderse que esta descripción detallada se incluye solamente para los fines de ejemplificar la presente invención. No debería entenderse de ninguna manera como restricción sobre la descripción general de la invención como se ha expresado anteriormente.

Ejemplo 1

Preparación de composición de conjugado de LHRH

El conjugado de LHRH se basa en una forma sintética 2-10 del péptido de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) acoplado a una proteína vehículo. El péptido por sí mismo es demasiado pequeño para ser antigénico, y se requiere el acoplamiento a una proteína vehículo de modo que el péptido actúa como un hapteno y se induce inmunidad a LHRH. La proteína vehículo es toxoide de difteria.

El péptido se sintetiza mediante química de Fmoc y el péptido de LHRH de forma 2-10 resultante se acopla con toxoide de difteria. El acoplamiento se puede realizar según se describe en Ladd y col., 1990 o en Bonneau y col., 1994, y se procesa el conjugado de péptido y toxoide de difteria resultante para que esté exento de péptido sin unir y de otros subproductos de conjugación. Se puede conseguir el procesamiento de este tipo mediante diálisis convencional o mediante ultrafiltración.

La preparación resultante de LHRH-vehículo se puede usar para preparar una composición para administración mediante formulación con, o en, un adyuvante (denominados conjugado de LHRH). El adyuvante es un polisacárido iónico tal como DEAE-dextrano, sulfato de dextrano o QAE-dextrano. La formulación adyuvante puede incluir una combinación de dos o más de los adyuvantes listados. Estas listas no han de tomarse como exhaustivas. La selección de adyuvante depende en parte de las especies que constituyen el objetivo y se basa en el nivel y duración de la respuesta inmunitaria requerida y en la ausencia de reactogenicidad (es decir compatibilidad del tejido). Los niveles de componente activo y adyuvante se eligen para conseguir el nivel y la duración deseados de la respuesta inmunitaria.

Formulaciones adecuadas de conjugado de LHRH para uso en la presente invención están preferiblemente en el intervalo de 5-500 μ g de LHRH-toxoide de difteria en 5-500 mg de DEAE-dextrano.

Ejemplo 2

La vacuna de LHRH (LHRH 2-10 con toxoide de difteria y adyuvante de DEAE dextrano según se describe en el Ejemplo 1) se dio a cerdos según:

Grupo 1: 2 dosis a las 14 y 18 semanas de edad, 10 cerdos macho por grupo.

Grupo 2: 3 dosis a las 14, 18 y 22 semanas de edad, 10 cerdos macho por grupo.

Grupo 3: los controles recibieron adyuvante de DEAE-dextrano solo, 10 cerdos macho por grupo.

Las dosis de vacuna de LHRH se dieron subcutáneamente. La vacuna de LHRH está preferiblemente en el intervalo de 50-500 μ g de LHRH-toxoide de difteria en 5-500 mg de DEAE-dextrano.

Los cerdos fueron sacrificados a las 22 semanas de edad (grupos 1 y 3) o a las 24 semanas (grupo 2).

ES 2 339 308 T3

Parámetros medidos

Se midieron las concentraciones de anti-LHRH a las 2 semanas después de la segunda dosis. Se midieron los compuestos del olor a verraco escatol y androstenona en muestras de grasa tomadas en el momento del sacrificio.

Resultados

Concentraciones de anti-LHRH 2 semanas después de vacunación de refuerzo. Se muestran las concentraciones medias del grupo.

Grupo	Concentración
Grupo 1	4300
Grupo 2	2760
Grupo 3	< 20

* Los compuestos del olor a verraco se midieron en muestras tomadas en el momento del sacrificio.

Se muestran los valores medios del grupo.

Grupo	Escatol*	Androstenona*
Grupo 1	0,06	0,18
Grupo 2	0,05	0,23
Grupo 3	0,07	0,51

* Los compuestos del olor a verraco se expresan como $\mu\text{g/g}$ de tejido graso.

Conclusiones

La vacuna de LHRH indujo altos niveles de anticuerpo en todos los cerdos vacunados según se determinó a las dos semanas después de la vacunación de refuerzo.

La vacuna de LHRH pudo controlar los compuestos del olor a verraco en todos los cerdos vacunados.

Ejemplo 3

Ratones

Se vacunaron 10 ratones con formulaciones que estaban constituidas por análogos de LHRH, conectados a toxoides de difteria y adyuvados con DEAE dextrano. Se vacunaron ratones los días 0 y 14 y fueron sometidos a extracción de sangre el día 21 para demostrar la inducción de anticuerpo de LHRH.

Análogos de LHRH que se probaron en ratones incluyen:

LHRH 2-10: His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. (SEQ ID NO:2)

2-10 modificada: Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. (SEQ ID NO:4)

Se conectaron ambos constructos a toxoide de difteria mediante procedimientos bioquímicos convencionales. Los ratones recibieron entre 5-50 μg de conjugado por inyección en 5-50 mg de adyuvante de DEAE dextrano.

ES 2 339 308 T3

conjugado de LHRH	concentración 1 semana después de refuerzo
2-10 - toxioide de difteria	3005 (n=9)
2-10 modificada	1990 (n=7)

Se indujeron concentraciones para LHRH en todos los ratones vacunados con los constructos anteriores.

Ejemplo 4

Reses de vacuno

Se vacunaron reses enteras de vacuno machos y hembras con una formulación que comprendía LHRH 2-10 conjugada con toxoide de difteria, y adyuvada con DEAE dextrano. Las reses tenían 9-12 meses de edad en el momento de la vacunación inicial. Cada dosis contenía entre 50 y 500 µg de conjugado formulado en DEAE-dextrano (5-500 mg).

Las vacunaciones fueron a los 0 días con una vacunación de refuerzo a los 28 días. Se tomaron muestras de sangre a intervalos mensuales después de la vacunación de refuerzo, y se midieron las concentraciones de anticuerpos mediante ELISA.

El comportamiento de las reses hembra (terneras) fue vigilado mediante inspección diaria por personal entrenado de la granja y veterinarios. También se vigiló el comportamiento 8 semanas después de la vacunación de refuerzo, mediante fijación de almohadillas detectoras de celo (almohadillas liberadoras de colorante, Kamar Marketing Group Inc., Steamboat Springs, Colorado, EE.UU.) en los cuartos traseros de las terneras. El comportamiento ante la monta o cubrición (también llamado celo) de las terneras en ciclo romperá las cápsulas de colorante en las almohadillas, que se pueden visualizar a distancia. Esto solamente ocurre habitualmente cuando la ternera que está en pie es receptiva, es decir en estro, y cuando la ternera que monta también está en estro. De este modo las almohadillas proporcionan una vigilancia útil y continua del estro en terneras vacunadas que están con terneras de control no vacunadas.

Resultados

Concentraciones de anti-LHRH

GMT = Media geométrica de la concentración del grupo

Grupo de vacunación	GMT 3 semanas después de refuerzo (intervalo)	GMT 7 semanas después de refuerzo (intervalo)
Controles vacunadas con placebo	< 100	< 100
Conjugado de LHRH-toxioide de difteria en adyuvante de DEAE dextrano	10.357 (3623-26133)	3435 (1538-15464)

Comportamiento de monta/reactividad de almohadilla

Las terneras de control (reses hembra) exhibieron comportamiento de monta en el momento de la vacunación principal y la de refuerzo y durante las primeras 7 semanas después de la vacunación de refuerzo. Ninguna de las reses vacunadas exhibió los patrones de comportamiento asociados con la función reproductora en terneras en ciclo. La puntuación de comportamiento de ciclo por observaciones directas fue confirmada por las almohadillas detectoras de celo, ninguna de las cuales se activó en animales vacunados durante el período de 7 semanas después del refuerzo.

Los resultados confirman la capacidad de la vacuna de la formulación preferida para modificar el comportamiento de animales vacunados, en este ejemplo el control del estro y comportamientos asociados en reses hembra (terneras).

Ejemplo 5

Perros

Se vacunaron perros y perras cruzados beagle/foxhound con una formulación que comprendía LHRH 2-10 conjugada con toxoide de difteria, y adyuvada con DEAE dextrano. Los perros tenían 6-10 meses de edad en el momento de la vacunación inicial. Los perros de control no se vacunaron.

ES 2 339 308 T3

Las vacunaciones fueron a los 0 días con una vacunación de refuerzo a los 28 días. Se tomaron muestras de sangre a intervalos mensuales después de la vacunación de refuerzo, y se midieron las concentraciones de anticuerpos mediante ELISA.

- 5 La dosis de vacuna está preferiblemente en el intervalo de 50-500 μg de LHRH-toxoide de difteria en 10-100 mg de DEAE-dextrano.

Concentraciones de LHRH en suero de perro

10

Semanas después de vacunación de refuerzo	Vacunados con vacuna de LHRH	Controles sin vacunar
0	< 100	< 100
4	84.640	< 100
8	38.919	< 100
12	7.900	< 100

15

20

25 Todas las concentraciones mostradas son medias geométricas de concentraciones del grupo de 7-8 perros. Las concentraciones se midieron mediante ELISA. Los datos muestran que la formulación favorita de LHRH 2-10 conjugada con toxoide de difteria en adyuvante de DEAE-dextrano induce una fuerte respuesta de anticuerpos en el 100% de los perros vacunados. En este ejemplo es de importancia la demostración de que la formulación preferida puede dar duración de la respuesta de anticuerpos.

30

Inhibición del desarrollo de testículos

A las 16 semanas después del refuerzo, se midieron los tamaños de los testículos en animales de control y vacunados, mediante referencia a las cuentas de orquidómetro.

35

Tamaño de testículos (valores medios de grupo)

40

Semanas después de vacunación de refuerzo	Vacunados con vacuna de LHRH	Controles sin vacunar
16	0,5 cm^3	12 cm^3

45

Los datos demuestran que la formulación preferida puede prevenir el desarrollo de órganos reproductores, según se muestra en este ejemplo en la inhibición del crecimiento y mantenimiento de los testículos en perros.

50

Bibliografía

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

55

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

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

60

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

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

65

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

ES 2 339 308 T3

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. and Schwartzkoff, C.L. *Aust. J. Biotechnol.* 4: 166-170 (1990).

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

5

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

Meloan, y col., *Vaccine* 12: 741-746 (1994).

10

Potter, A.A. and Manns, J.G. Patent - International filing number PCT/CA97/00559 (1997).

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

15

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

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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 339 308 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un conjugado de LHRH-toxoide de difteria adsorbido en un polisacárido iónico, en la que dicha LHRH es el péptido representado por SEQ ID NO:2.
2. Una composición según la reivindicación 1 en la que el término carboxi de dicho péptido está amidado.
3. La composición según la reivindicación 1 ó la 2 en la que dicho polisacárido iónico es DEAE-dextrano.
- 10 4. Una composición según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones que es una composición farmacéutica que comprende (i) un conjugado de LHRH-toxoide de difteria adsorbido en un polisacárido iónico según se define en la reivindicación 1 ó la 3 junto con (ii) uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 15 5. Una composición según la reivindicación 3 que comprende 5 a 500 microgramos de conjugado de LHRH-toxoide de difteria en 5 a 500 miligramos de DEAE-dextrano.
6. Una composición según la reivindicación 3 que comprende 50 a 500 microgramos de conjugado de LHRH-toxoide de difteria en 5 a 500 miligramos de DEAE-dextrano.
- 20 7. Una composición según la reivindicación 3 que comprende 50 a 500 microgramos de conjugado de LHRH-toxoide de difteria en 10 a 100 miligramos de DEAE-dextrano.
8. Un procedimiento para suscitar, en un animal no humano, una respuesta inmunitaria eficaz no terapéutica a LHRH, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho animal una cantidad eficaz de la composición de una cualquiera de las precedentes reivindicaciones.
- 25 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha respuesta inmunitaria inhibe la capacidad reproductora de dicho animal.
- 30 10. Un procedimiento según la reivindicación 8 que se lleva a cabo con el fin de castrar a un animal no humano.
11. Un procedimiento según la reivindicación 8 que se lleva a cabo con el fin de inhibir o retrasar el estro en un animal no humano hembra.
- 35 12. Un procedimiento según la reivindicación 8 que se lleva a cabo con el fin de inhibir características que se inducen por la maduración sexual de un animal no humano.
13. El procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicha característica es la agresividad.
- 40 14. El procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicha característica es la actividad sexual.
15. El procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicho animal es un gato y/o un perro macho.
- 45 16. El procedimiento según la reivindicación 15 en el que dicha característica es la agresividad y/o tendencia al vagabundeo.
17. El procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicho animal es un gato y/o un perro hembra.
- 50 18. El procedimiento según la reivindicación 17 en el que dicha característica es la desobediencia, el marcado del territorio, inquietud y/o comportamiento estral.
19. El procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicho animal es un caballo macho.
- 55 20. El procedimiento según la reivindicación 19 en el que dicha característica es la agresividad.
21. El procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicho animal es un caballo hembra.
- 60 22. El procedimiento según la reivindicación 21 en el que dicha característica es el comportamiento estral y/o el rendimiento irregular.
- 65 23. Un procedimiento según la reivindicación 8 que se lleva a cabo con el fin de aumentar el peso final de un animal de granja en el momento del sacrificio, rebajar la exigencia de alimentos de un animal por cada kilogramo de peso en canal que se gana, aumentar la velocidad de crecimiento de un animal de granja en comparación con el ganado sin castrar, mejorar la calidad de la carne que se deriva de un animal de granja o disminuir los niveles de estrés de un animal de granja estabulado intensivamente reduciendo las interacciones agresivas con otros animales estabulados intensivamente.

ES 2 339 308 T3

24. El procedimiento según la reivindicación 23 en el que dicho procedimiento se lleva a cabo con el fin de reducir o eliminar características organolépticas no deseadas de la carne de un animal de granja.

5 25. El procedimiento según la reivindicación 24 en el que dicho animal de granja es una vaca, un cerdo, una cabra o una oveja.

26. El procedimiento según la reivindicación 23 en el que dicho animal es un cerdo y el procedimiento se lleva a cabo para reducir o eliminar el olor a verraco.

10 27. El procedimiento según la reivindicación 23 en el que dicho animal es un cerdo.

28. El procedimiento según la reivindicación 23 en el que dicho animal es una vaca.

15 29. Un procedimiento según la reivindicación 8 que se lleva a cabo con el fin de regular a la baja la libido de un animal no humano.

30. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un procedimiento de tratamiento mediante terapia del cuerpo humano o animal.

20 31. La composición según la reivindicación 30 para uso en terapia de un trastorno de células malignas o un trastorno proliferativo de células no malignas.

32. La composición según la reivindicación 31 en la que dicha terapia es de un ser humano.

25 33. La composición según la reivindicación 31 ó la 32 en la que dicha terapia es de células malignas testiculares, células malignas de mama, células malignas de próstata, células malignas ováricas o células malignas oncofetales.

34. La composición según la reivindicación 31 en la que dicha terapia es de células hiperplásticas.

30 35. La composición según la reivindicación 34 en la que dichas células hiperplásticas son células de próstata o células endometriales.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 339 308 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: CSL LIMITED
- (ii) TÍTULO DE INVENCIÓN: COMPOSICIONES INMUNÓGENAS DE LHRH Y PROCEDIMIENTOS QUE SE REFIEREN A LAS MISMAS
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- (A) DESTINATARIO: DAVIES COLLISON CAVE
- 15 (B) CALLE: 1 LITTLE COLLINS STREET
- (C) CIUDAD: MELBOURNE
- (D) ESTADO: VICTORIA
- (E) PAÍS: AUSTRALIA
- 20 (F) ZIP: 3000
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- 25 (B) ORDENADOR: PC COMPATIBLE CON IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: SOLICITUD INTERNACIONAL
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DE ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: SLATTERY, JOHN M
- 40 (C) REFERENCIA/NÚMERO DOCKET: TDO/JMS/LM
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN.
- (A) TELÉFONO: +61 3 9254 2777
- 45 (B) TELEFAX: +61 3 9254 2770
- (C) TELEX: AA 31787

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 55 (C) HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:
- Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
- 1 5 10
- 65

ES 2 339 308 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) HEBRA: sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

15 His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) HEBRA: sencilla
30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

35 Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
45 (C) HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

55 Gly Ser Gly Ser Gly Leu Arg Pro Gly
1 5

60

65