

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 490**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.1998 E 08020939 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2050465**

54 Título: **Composiciones que comprenden el adyuvante QS-21 y polisorbato o ciclodextrina como excipiente**

30 Prioridad:

29.08.1997 US 57255 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.09.2014

73 Titular/es:

**ANTIGENICS INC. (100.0%)
3 Forbes Road
Lexington MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**KENSIL, CHARLOTTE y
BELTZ, GERALD A.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 500 490 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 que comprenden el adyuvante QS-21 y polisorbato o ciclodextrina como excipiente

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de los adyuvantes inmunológicos y al uso de los mismos como adyuvantes inmunológicos en vacunas. Las composiciones de la presente invención exhiben propiedades significativamente mejoradas, relevantes para el efecto lítico, la tolerancia al dolor asociado con QS-21 y la estabilidad del producto de QS-21, y mantienen una actividad adyuvante completa.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Saponinas adyuvantes han sido identificadas y purificadas a partir de un extracto acuoso de la corteza del árbol de América del Sur, *Quillaja saponaria* Molina. Entre los 22 picos que eran separables y mostraban actividad saponina, QS-21 era una de las saponinas purificadas más predominantes. Esta saponina ha sido purificada sustancialmente mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía en sílice líquida de baja presión y cromatografía interactiva hidrófila (HILIC). Se ha encontrado que QS-21 es útil como un adyuvante inmunológico para potenciar respuestas inmunológicas en individuos a una concentración mucho más baja que las preparaciones de saponina heterogéneas previamente disponibles, sin los efectos tóxicos asociados con preparaciones de saponina bruta.

QS-21 es una saponina glucósido de triterpeno lítica de la membrana. Forma micelas de aproximadamente el mismo radio que la albúmina de suero bovina (Kensil, patente de EE.UU. N° 5.057.540) y tiene una concentración micelar crítica de aproximadamente 50 µg / ml en PBS (Soltysik, S., et al., 1995, Vaccine **13**: 1403-1410).

La potencia de una formulación adyuvante que contiene un antígeno más QS-21 puede evaluarse en experimentos que abordan la relación de la dosis de adyuvante a la función inmunológica (experimentos de dosis-respuesta). Se espera que una disminución en la potencia adyuvante aumente la dosis mínima (dosis umbral) requerida para la potenciación de la respuesta inmune. Se espera que una composición deseable mantenga una potencia equivalente o mejor que la formulación que se utiliza como una referencia. Para QS-21, la formulación de referencia es una solución simple en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina.

La actividad adyuvante de QS-21 se evalúa en modelos de animales tales como ratones. Las respuestas primarias medidas son aumentos en anticuerpos específicos de antígenos y linfocitos T citotóxicos (CTL - siglas en inglés) específicos de antígenos. La dosis umbral de QS-21 que potenciará la respuesta inmune murina (anticuerpo o CTL) ha sido medida en solución tampón simple tal como PBS. Una dosis de 2,5 µg ha demostrado ser la dosis umbral para los anticuerpos (Kensil, C.R., et al, 1993, Vaccine Research **2**: 273-281) y para CTL (Newman, M.J., et al, 1992, J. Immunology **148**: 2357-2362) para el antígeno ovoalbúmina (OVA) en ratones C57BL/6 en PBS. Se observaron dosis umbrales similares cuando se incluía hidróxido de aluminio en la formulación de PBS (Kensil, C.R., et al, 1993, Vaccine Research **2**: 273-281). Sin embargo, se espera que pueda haber diferencias en la potencia entre las diferentes composiciones de un adyuvante dado.

A pesar de estas cualidades beneficiosas, QS-21 posee también algunas cualidades no deseadas. Por ejemplo, QS-21 se asocia con bicapas de fosfolípidos y provoca un efecto lítico sobre determinadas membranas celulares (es decir, eritrocitos). QS-21 se absorberá a la bicapa fosfolípida de eritrocitos de oveja y determinará que los glóbulos rojos liberen la hemoglobina. Esta liberación de hemoglobina, que es conocida como hemólisis, se produce a una concentración de aproximadamente 5-7 µg/ml en un tampón simple tal como solución salina o PBS (Kensil, C.R., et al, 1991, J. Immunology **146**: 431-437). A concentraciones más altas (por encima de la concentración micelar crítica de QS-21), se produce la lisis total de la membrana de glóbulos rojos. El efecto lítico de QS-21 es, por lo tanto, una propiedad indeseable para una composición.

En estudios *in vivo*, no se observa hemólisis. Sin embargo, después de la inyección intramuscular de QS-21/soluciones salinas en conejos New Zealand blancos, se observa en algunos animales una lesión de leve a moderada de fibroblastos o necrosis cuando el sitio de inyección se analiza histopatológicamente (Kensil, C.R., et al, 1995, En: Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell, M.F. y Newman, M.J., Comps., Plenum Press, NY). Además, la creatina quinasa, un marcador de la lesión muscular, se incrementa después de la inyección con QS-21 en solución salina o PBS. Se piensa que este aumento es debido al efecto lítico de QS-21 en las membranas celulares.

Además de ello, en ensayos clínicos, algunos individuos han experimentado un dolor inmediato transitorio después de la inyección con QS-21 en soluciones tampón simple (solución salina o PBS). Este dolor, descrito por la mayoría de los individuos como un dolor ardiente, puede ser una reacción secundaria correlacionada con el efecto lítico del adyuvante QS-21. El dolor del paciente es igualmente una propiedad desagradable para una composición.

La estabilidad del producto es otra preocupación para composiciones que contienen QS-21. La vida útil de un producto de vacuna se define típicamente por la extensión de tiempo para alcanzar un bajo nivel definido y aceptable de degradación (tal como el tiempo para una degradación de 10%, también conocido como t_{90}). La mayoría de los productos de vacunas comerciales tienen una vida útil de por lo menos 18 a 24 meses si se almacena en un refrigerado a 4°C. Adyuvantes, que son componentes esenciales de vacunas, por lo tanto, también deben tener vidas útiles igualmente largas. Sin embargo, la vida útil de 50 µg/ml de solución de QS-21 a pH 7,0 a 4°C se alcanza en aproximadamente 3 meses. La razón de la corta vida útil es porque el enlace éster de QS-21 es cada vez más lábil a pH creciente y porque los monómeros de QS-21, en oposición a las micelas, son sometidos a hidrólisis. La necesidad de estabilizar composiciones de adyuvante QS-21 es significativa.

El documento EP 0187286 A1 se refiere a vacunas constituidas por un antígeno, una saponina y un aceite. De Souza et al., *Infection and Immunity*, 64: 3532-3536 (1996) se refiere a citoquinas y a una subclase de anticuerpos asociada con una inmunidad protectora frente a la malaria en la fase de sangre en ratones vacunados con el extremo C de la proteína 1 de la superficie de merozoitos fusionada a glutatión-S-transferasa, combinada con una formulación de adyuvante que contiene escualano, Tween 80 y pluronic L121. Ten Hagen et al., *J. Immunol.* 151: 7077-7085 (1993) se refiere al papel de los adyuvantes en la modulación del isotipo de anticuerpos, especificidad e inducción de la protección mediante vacunas de *Plasmodium yoelii* en fase de sangre entera. Los ratones fueron inmunizados con parásitos de *Plasmodium yoelii* en fase de sangre entera exterminados en 15 formulaciones de adyuvantes, y luego fueron estimulados y se les enfrentó a sangre parasitada. Reybrouck, *Zentralbl. Bakteriologie*. B. 168: 480-492 (1979) discute la eficacia de inactivadores frente a 14 sustancias desinfectantes. Se sometió a ensayo a más de 24 inactivadores en cuanto a su idoneidad frente a 14 sustancias desinfectantes mediante un ensayo en suspensión cuantitativo.

SUMARIO DE LA INVENCION

Existe una necesidad de composiciones del adyuvante de saponina QS-21 que puedan ser utilizadas para estimular la respuesta inmune antigénica en una dosis relativamente baja con bajas reacciones locales y efectos secundarios, pero también cuenta con un reducido efecto lítico, una tolerancia mejorada a QS-21 y una estabilidad incrementada. Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevas composiciones de QS-21 que tienen estas características mejoradas en comparación con una solución sencilla de QS-21 en un tampón tal como solución salina o PBS. Sorprendentemente, la potencia adyuvante completa de QS-21 en las composiciones descritas no está comprometida en comparación con una formulación control de QS-21 en PBS.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa una gráfica que muestra la potencia adyuvante de diversas composiciones. La Figura 1A muestra el efecto de polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80 sobre la respuesta inmune de ratones Balb/c a la ovoalbúmina a diferentes concentraciones de QS-21. La Figura 1B muestra el efecto de metil-β-ciclodextrina sobre la respuesta inmune de ratones Balb/c a la ovoalbúmina a diferentes concentraciones de QS-21.

La Figura 2 representa una gráfica que muestra el efecto de polisorbato 80 e hidroxipropil-β-ciclodextrina en la respuesta de anticuerpos IgG3 Tipo 14 a un antígeno polisacárido T-independiente.

La Figura 3 muestra un histograma de la tolerancia al dolor de los pacientes para diversos excipientes en composiciones de adyuvante QS-21 del ensayo 1. Esta figura muestra cómo las puntuaciones de dolor se clasifican como sin dolor, dolor leve, dolor moderado o dolor grave, en donde 0 = sin dolor, 1-3 = dolor leve, dolor 4-7 = moderado, y 8-10 = dolor grave.

La Figura 4 muestra las puntuaciones individuales para la tolerancia de los pacientes al dolor en la Figura 3. Esta figura muestra las puntuaciones del dolor inmediato individuales tras la inyección de una formulación dada en una escala de 0-10, en donde 0 es ausencia de dolor y 10 es el máximo dolor.

La Figura 5 muestra un histograma de la tolerancia de los pacientes al dolor para diversos excipientes en composiciones de adyuvantes QS-21 del ensayo 2. Esta figura muestra cómo las puntuaciones de dolor se clasifican como sin dolor, dolor leve, dolor moderado o dolor grave, en donde 0 = sin dolor, 1-3 = dolor leve, dolor 4-7 = moderado, y 8-10 = dolor grave.

La Figura 6 muestra las puntuaciones individuales para la tolerancia de los pacientes al dolor en la Figura 5. Esta figura muestra las puntuaciones del dolor inmediato individuales tras la inyección de una formulación dada en una escala de 0-10, en donde 0 es ausencia de dolor y 10 es el máximo dolor. Las puntuaciones media y mediana para cada una de las formulaciones se listan debajo de cada una de las formulaciones.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención proporciona una composición que comprende (a) QS-21 y (b) polisorbatos, en donde la composición es una disolución.

5 También se describe una composición que comprende (a) un adyuvante de saponina, en donde el adyuvante de saponina se deriva de *Quillaja saponaria*, (b) un polisorbato y (c) un antígeno o un ácido nucleico que codifica un péptido o proteína antigénico, en donde la composición es una disolución, y en donde la composición es una vacuna adecuada para la administración a un ser humano.

10 Las saponinas se pueden obtener del árbol *Quillaja saponaria* Molina.

El término "saponina", tal como se utiliza en esta memoria, incluye compuestos triterpenoides glucosídicos que producir espuma en disolución acuosa, tiene actividad hemolítica en la mayoría de los casos, y poseen actividad adyuvante inmunológica. Esto abarca la saponina per se, así como fragmentos biológicamente activos de la misma.

15 También se describen composiciones tales como composiciones inmunológicas, que comprenden uno o más fracciones de saponina sustancialmente puras, y métodos de utilizar estas composiciones como adyuvantes inmunológicos.

20 Más particularmente, las composiciones pueden reducir los efectos líticos *in vitro* de una formulación que contiene el adyuvante de saponina. Otra composición es aquella que puede mantener la máxima actividad adyuvante de una saponina. Todavía otra composición puede aumentar la estabilidad de un adyuvante de saponina que contiene la composición frente a una hidrólisis alcalina. Otras composiciones pueden mejorar la tolerancia de un individuo al dolor asociado al adyuvante de saponina a partir de una formulación que contiene un adyuvante de saponina.

25 Tal como se describe en Kensil, et al., Patente de EE.UU. N° 5.057.540, la actividad adyuvante de estas saponinas puede determinarse mediante cualquiera de un cierto número de métodos conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. El aumento del título de anticuerpos frente a un antígeno específico tras la administración de un adyuvante puede utilizarse como un criterio para la actividad adyuvante. (Dalsgaard, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 69: 1 (1978); Bomford, *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.* 77: 409 (1985). En síntesis, un ensayo de este tipo consiste en inyectar a ratones CD-1 por vía intradérmica un antígeno (por ejemplo, es decir, albúmina de suero bovino, BSA) mezclado con cantidades variables del adyuvante potencial. Se recogió suero de los ratones dos semanas más tarde y se ensayó mediante ELISA en cuanto al anticuerpo anti-BSA.

30 "QS-21" designa la mezcla de componentes isoméricos QS-21-V1 y QS-21-V2 que aparecen como un único pico en HPLC de fase inversa sobre Vydac C₄ (tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D.I. 4,6 mm x 25 cm) en ácido acético 40 mM en metanol/agua (58/42, v/v). A las fracciones de componentes se las alude específicamente como QS-21-V1 y QS-21-V2 cuando se describen experimentos realizados en los componentes purificados adicionalmente.

35 La expresión "sustancialmente puro" significa sustancialmente libre de compuestos normalmente asociados con la saponina en su estado natural y que exhiben una respuesta cromatográfica, perfiles de elución y actividad biológica constantes y reproducibles. La expresión "sustancialmente puro" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas de la saponina con otros compuestos.

40 La saponina QS-7 sustancialmente pura (a la cual también se alude como QA-7 en la patente de EE.UU. N° 5.057.540) se caracteriza por tener actividad adyuvante inmune, por contener aproximadamente 35% de hidratos de carbono (tal como se ensayó mediante antrona) por peso seco, por tener un máximo de absorción UV de 205-210 nm, un tiempo de retención de aproximadamente 9-10 minutos en RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D. I. 4,6 mm x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM en metanol/agua (58/42; v/v) a un caudal de 1 ml / min, eluyendo con metanol al 52-53% a partir de una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, 10 mM D. I. x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM con un gradiente de elución de 50 a 80% de metanol, que tiene una concentración micelar crítica de aproximadamente 0,06% (p / v) en agua y de 0,07% (p / v) en solución salina tamponada con fosfato, sin provocar una hemólisis detectable de glóbulos rojos de oveja a concentraciones de 200 µg / ml o menores, y que contiene los residuos de monosacáridos ramnosa terminal, xilosa terminal, glucosa terminal, galactosa terminal, 3-xilosa, 3,4-ramnosa, 2,3-fucosa y ácido 2,3-glucurónico, y apiosa (enlace no determinado).

45 La saponina QS-17 sustancialmente pura (a la que también se alude como QA-17 en la patente de EE.UU. N° 5.057.540) se caracteriza por tener actividad adyuvante inmune, por contener aproximadamente 29% de hidratos de carbono (tal como se ensayó mediante antrona) por peso seco, por tener un máximo de absorción UV de 205-210 nm, un tiempo de retención de aproximadamente 35 minutos en RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D. I. 4,6 mm x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM en metanol/agua (58/42; v/v) a un caudal de 1 ml / min, eluyendo con metanol al 63-64% a partir de una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, 10 mM D. I. x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40

mM con un gradiente de elución de 50 a 80% de metanol, que tiene una concentración micelar crítica de aproximadamente 0,06% (p / v) en agua y de 0,03% (p / v) en solución salina tamponada con fosfato, provocando una hemólisis de glóbulos rojos de oveja a concentraciones de 25 µg / ml o mayores, y que contiene los residuos de monosacáridos ramnosa terminal, xilosa terminal, 2-fucosa, se caracteriza por tener actividad adyuvante inmune, por contener aproximadamente 35% de hidratos de carbono (tal como se ensayó mediante antrona) por peso seco, por tener un máximo de absorción UV de 205-210 nm, un tiempo de retención de aproximadamente 9-10 minutos en RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D. I. 4,6 mm x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM en metanol/agua (58/42; v/v) a un caudal de 1 ml / min, eluyendo con metanol al 52-53% a partir de una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, 10 mM D. I. x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM con un gradiente de elución de 50 a 80% de metanol, que tiene una concentración micelar crítica de aproximadamente 0,06% en agua y de 0,07% en solución salina tamponada con fosfato, sin provocar una hemólisis detectable de glóbulos rojos de oveja a concentraciones de 200 µg / ml o menores, y que contiene los residuos de monosacáridos ramnosa terminal, xilosa terminal, 2-fucosa, 3-xilosa, 3,4-ramnosa, ácido 2,3-glucurónico, glucosa terminal, 2-arabinosa, galactosa terminal y apiosa (enlace no determinado).

La saponina QS-18 sustancialmente pura (a la cual también se alude como QA-18 en la patente de EE.UU. N° 5.057.540) se caracteriza por tener actividad adyuvante inmune, por contener aproximadamente 25-26% de hidratos de carbono (tal como se ensayó mediante antrona) por peso seco, por tener un máximo de absorción UV de 205-210 nm, un tiempo de retención de aproximadamente 38 minutos en RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D. I. 4,6 mm x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM en metanol/agua (58/42; v/v) a un caudal de 1 ml / min, eluyendo con metanol al 64-65% a partir de una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, 10 mM D. I. x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM con un gradiente de elución de 50 a 80% de metanol, que tiene una concentración micelar crítica de aproximadamente 0,04% (p / v) en agua y de 0,02% (p / v) en solución salina tamponada con fosfato, provocando una hemólisis de glóbulos rojos de oveja a concentraciones de 25 µg / ml o mayores, y que contiene los residuos de monosacáridos arabinosa terminal, apiosa terminal, xilosa terminal, glucosa terminal, galactosa terminal, 2-fucosa, 3-xilosa, 3,4-ramnosa y ácido 2,3-glucurónico.

La saponina QS-21 sustancialmente pura (a la cual también se alude como QA-21 en la patente de EE.UU. N° 5.057.540) se caracteriza por tener actividad adyuvante inmune, por contener aproximadamente 22% de hidratos de carbono (tal como se ensayó mediante antrona) por peso seco, por tener un máximo de absorción UV de 205-210 nm, un tiempo de retención de aproximadamente 51 minutos en RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D. I. 4,6 mm x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM en metanol/agua (58/42; v/v) a un caudal de 1 ml / min, eluyendo con metanol al 69-70% a partir de una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, 10 mM D. I. x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM con un gradiente de elución de 50 a 80% de metanol, que tiene una concentración micelar crítica de aproximadamente 0,03% (p / v) en agua y de 0,02% (p / v) en solución salina tamponada con fosfato, provocando una hemólisis de glóbulos rojos de oveja a concentraciones de 25 µg / ml o mayores. Las fracciones del componente, saponinas QS-21-V1 y QS-21-V2 sustancialmente puras, tienen el mismo peso molecular y espectros idénticos mediante FAB-MS. Difieren únicamente en que QS-21-V1 tiene una apiosa terminal, que es xilosa en QS-21-V2 (la cual, por lo tanto, tiene dos xilosas terminales y ninguna apiosa). Los dos componentes contienen adicionalmente los monosacáridos arabinosa terminal, apiosa terminal, xilosa terminal, 4-ramnosa, galactosa terminal, 2-fucosa, 3-xilosa, 3,4-ramnosa y ácido 2,3-glucurónico.

También se describen formas impuras de los adyuvantes de saponina. Por ejemplo, una realización preferida es el adyuvante de saponina heterogéneo conocido como "Quil A". Las preparaciones comerciales de Quil A están disponibles de Superfos (Vedbaek, Dinamarca) y se han aislado de la corteza del árbol de América del Sur, *Quillaja saponaria* Molina. Quil A se caracteriza químicamente como restos de hidratos de carbono en enlace glucosídico al ácido quillaico triterpenoide. Quil A posee actividad adyuvante inmune y se separa en 20 picos discretos mediante RP-HPLC en una columna Vydac C₄ que tiene un tamaño de partícula de 5 µm, poros de 300 Å, D. I. 4,6 mm x 25 cm L en un disolvente de ácido acético 40 mM en metanol-agua (patente de EE.UU. N° 5.057.540).

La invención también se refiere a una composición que comprende un adyuvante de saponina de la presente invención, un antígeno y polisorbato. Preferiblemente, el adyuvante es QS-21. El polisorbato es polisorbato 80, pero también se han descrito polisorbato, 20, polisorbato 40 y polisorbato 60.

La expresión "adyuvante inmune", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a compuestos que, cuando se administran a un individuo o se ensayan *in vitro*, aumentan la respuesta inmune a un antígeno en el individuo o sistema de ensayo al que se administra dicho antígeno. Preferiblemente, dichos individuos son seres humanos, sin embargo, la invención no pretende ser tan limitante. Cualquier animal que pueda experimentar los efectos beneficiosos de las vacunas de la invención cae dentro del alcance de los animales que pueden tratarse de acuerdo con la invención reivindicada. Algunos antígenos son débilmente inmunogénicos cuando se administran solos o son tóxicos para el individuo a concentraciones que evocan respuestas inmunes en dicho individuo. Un adyuvante inmunológico puede

potenciar la respuesta inmune del individuo al antígeno, haciendo al antígeno más fuertemente inmunogénico. El efecto adyuvante también puede disminuir la dosis de dicho antígeno necesaria para lograr una respuesta inmune en dicho individuo.

5 Las saponinas se pueden utilizar para potenciar la respuesta inmune a cualquier antígeno. Antígenos típicos adecuados para las composiciones de la presente invención que provocan una respuesta inmune incluyen antígenos derivados de cualquiera de los siguientes: virus tales como influenza, virus de la leucemia felina, virus de la inmunodeficiencia felina, VIH-1, VIH-2, rabia, sarampión, hepatitis B, o la fiebre aftosa, bacterias tales como ántrax, difteria, enfermedad de Lyme o tuberculosis; o protozoos tales como *Babesiosis bovis* o Plasmodium. Los antígenos pueden ser proteínas, péptidos, polisacáridos, lípidos o ácidos nucleicos que codifican la proteína o péptido. Las proteínas, péptidos, lípidos o ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de una fuente natural, sintetizarse por medio de síntesis en fase sólida, o se pueden obtener por medio de genética recombinante.

15 La administración de los compuestos útiles en el método de la presente invención puede ser por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal, oral o cualquier otro medio adecuado. La dosificación administrada puede depender de la edad, peso, especie, tipo de tratamiento concurrente, en todo caso, vía de administración, y naturaleza del antígeno administrado. En general, la saponina y el antígeno pueden administrarse a una dosis de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg / kg de adyuvante de saponina o antígeno por peso del individuo. La dosis inicial puede ser seguida de una dosificación de refuerzo después de un período de aproximadamente cuatro semanas para mejorar la respuesta inmunogénica. También se pueden administrar dosis de refuerzo adicionales.

25 El compuesto eficaz, útil en el método de la presente invención, puede emplearse en formas tales como cápsulas, disoluciones líquidas, suspensiones o elixires para administración oral, o formas líquidas estériles tales como disoluciones o suspensiones. La vacuna de la presente invención se puede administrar por vía parenteral, intranasal o por vía oral.

30 Otra realización preferida es un método para reducir el efecto lítico *in vitro* de una composición adyuvante inmune, que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de QS-21 y polisorbato 80. Alternativas que no se reivindican incluyen polisorbato, 20, polisorbato 40 y polisorbato 60.

Otros métodos incluyen un método para mantener la máxima actividad adyuvante de QS-21, que comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de QS-21 y un polisorbato y un método para mejorar la tolerancia al dolor asociado adyuvante de saponina en un individuo a quien se administra, que comprende administrar una cantidad eficaz de QS-21 y un polisorbato.

35 EJEMPLOS

Se evaluó una diversidad de excipientes en combinación con QS-21 como nuevas composiciones. Éstas incluían diversos agentes tensioactivos no iónicos (Triton X-100, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y polisorbato 80), polivinilpirrolidona (Plasdone C15), albúmina de suero humana, hidróxido de aluminio, agentes con acción anestésica (alcohol bencílico), y diversas ciclodextrinas no modificadas y derivatizadas (hidroxipropil-β-ciclodextrina, hidroxipropil-γ-ciclodextrina, metil-β-ciclodextrina). Las formulaciones finales fueron evaluadas en cuanto a su capacidad para reducir el efecto lítico de QS-21, para mejorar la tolerancia al dolor asociado al adyuvante QS-21 en seres humanos, para estabilizar QS-21 en disolución acuosa, y/o para mantener la potencia adyuvante máxima con relación a una formulación de control de QS-21 en PBS.

Ejemplo 1

Composiciones que Reducen el Efecto Lítico de QS-21

50 Se utilizó un simple ensayo *in vitro* para el rastreo de excipientes para reducir el efecto lítico de QS-21. El efecto lítico de QS-21 se puede determinar en un ensayo de hemólisis de eritrocitos de oveja. En síntesis, diversas diluciones en serie dobles de QS-21 en un excipiente dado se preparan en una placa de microtitulación de fondo redondo (100 µl/pocillo). Todas las placas contienen pocillos de control que contienen excipiente, pero nada de QS-21. La concentración de QS-21 oscila entre 1,56 y 200 µg/ml. Un volumen total de 25 µl de eritrocitos de oveja (lavados con PBS) se añadió a cada uno de los pocillos, se mezcló con la disolución de QS-21/excipiente, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después del final de la incubación, la placa de fondo redondo se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para sedimentar cualesquiera células no lisadas. Un volumen total de 75 µl de sobrenadante (que contiene la hemoglobina liberada) se transfiere al pocillo equivalente de una placa de fondo plano de 96 pocillos. La placa de fondo plano se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para romper cualesquiera burbujas de aire. La absorbancia a 570 nm se lee en un lector de placas de microtitulación. La absorbancia a 570 nm se representa en el eje y frente a la concentración de QS-21 representada en el eje x. La absorbancia de la hemoglobina en el sobrenadante de un pozo en donde no se observó sedimento de células intactas alguno se define como la hemólisis máxima. El índice hemolítico de

QS-21 se define como la concentración de QS-21 que produce una absorbancia equivalente a 50% de la absorbancia máxima. Se espera que un excipiente que reduce el efecto lítico de QS-21 aumente el índice hemolítico.

5 La Tabla 1 recoge los índices hemolíticos de QS-21 en diversos excipientes. Todos los excipientes se ensayaron en ausencia de QS-21. En ausencia de QS-21, no se observó hemólisis alguna, lo que indica que las formulaciones de excipientes eran isotónicas. Los excipientes que mostraron ser eficaces para reducir al mínimo el efecto lítico (aumentan el índice hemolítico) de QS-21 eran hidroxipropil-β-ciclodextrina, hidróxido de aluminio y polisorbato 80 en solución salina.

10 Tabla 1:

Excipiente	Índice Hemolítico (µg/ml)
PBS	5
α-ciclodextrina (2 mg/ml)	1,5
β-ciclodextrina (2 mg/ml)	10
metil-β-ciclodextrina (2 mg/ml)	36
hidroxipropil-γ-ciclodextrina (2 mg/ml)	5
hidroxipropil-β-ciclodextrina (1 mg/ml)	9
hidroxipropil-β-ciclodextrina (2 mg/ml)	11
hidroxipropil-β-ciclodextrina (4 mg/ml)	18
hidroxipropil-β-ciclodextrina (8 mg/ml)	32
hidroxipropil-β-ciclodextrina (16 mg/ml)	51
hidroxipropil-β-ciclodextrina (32 mg/ml)	93
albúmina de suero humano (40 mg/ml)	9
QS-7 (250 µg/ml)	30
hidróxido de aluminio (2 mg/ml) en PBS	5
hidróxido de aluminio (2 mg/ml) en solución salina	13
Monofosforil lípido A (25 µg/ml)	4,9
Monofosforil lípido A (50 µg/ml)	7,7
Monofosforil lípido A (100 µg/ml)	6,5
Triton X-100 (50 µg/ml)	1
Triton X-100 (100 µg/ml)	1
Polisorbato 80 (2 mg/ml)	9
Polisorbato 80 (4 mg/ml)	18
Polisorbato 80 (10 mg/ml)	38

Ejemplo 2

15 Composiciones que Reducen los Efectos Líticos de Otras Saponinas

Otros adyuvantes de saponina también son conocidos por ser hemolíticos, aunque en diferente medida que QS-21. Estas saponinas incluyen QS-7 sustancialmente puro, QS-17 y QS-18. Además, saponinas adyuvantes heterogéneas tales como Quil A son hemolíticas. Un ejemplo del efecto del polisorbato 80 e hidroxipropil-β-ciclodextrina sobre los índices hemolíticos de QS-7 sustancialmente pura y Quil A heterogénea se muestra en la Tabla 2. Hidroxipropil-β-ciclodextrina ha demostrado ser eficaz en la reducción del efecto lítico (aumentando el índice hemolítico) de QS-7. Polisorbato 80 e hidroxipropil-β-ciclodextrina mostraron ser eficaces para minimizar el efecto lítico (aumentando el índice hemolítico) de Quil A.

25 Tabla 2:

Saponina	Excipiente	Índice Hemolítico (µg/ml)
QS-7	PBS	650
QS-7	Polisorbato 80 (8 mg/ml)	60
QS-7	Hidroxipropil-β-ciclodextrina (32 mg/ml)	> 1000
Quil A	PBS	18
Quil A	Polisorbato 80 (8 mg/ml)	43
Quil A	hidroxipropil-β-ciclodextrina (32 mg/ml)	200

Ejemplo 3

30 Composiciones que estabilizan QS-21

5 QS-21 es una saponina triterpeno bidesmódica acilada. Tiene un éster de ácido graso enlazado a los residuos hidroxilo de la fucosa. En disolución acuosa, este éster de ácido graso migra entre dos grupos hidroxilo vecinos adyacentes (fucosa 3,4) para formar dos isómeros de equilibrio (Jacobsen, N.E., Fairbrother, W.J., et al, 1996, Carbohydrate Research **280**: 1-14). El isómero predominante está acilado en fucosa 4 y el isómero secundario está acilado en fucosa 3. Este enlace éster es el enlace más lábil en QS-21 y se hidrolizará bajo condiciones alcalinas para formar una saponina desacilada y un dominio de ácido graso-arabinosa. La saponina desacilada y el dominio del ácido graso son ambos inactivos como adyuvantes inmunológicos (Kensil, C.R., et al, 1996, En: Saponines Used in Traditional and Modern Medicine, Waller y Yamaski, Comps., Plenum Press, NY, 165-172). Diversas condiciones afectan a la estabilidad de este enlace éster (Cleland, J.L., et al, 1996, J. Pharmaceutical Sciences **85**:22-28). Además de ello, la forma monómera de QS-21 es más susceptible a la hidrólisis que la forma micelar.

15 En la Tabla 3 se muestran ejemplos de la vida útil de QS-21. La vida útil acuosa para una disolución de 50 µg/ml de QS-21 a pH 7,0 a 4°C demostró ser sólo de 94 días o aproximadamente 3 meses. Esto es representativo de una formulación de vacuna clínica típica que contiene el adyuvante QS-21 (que consiste en QS-21 a una concentración de 50-200 µg/ml en un tampón de pH fisiológico (pH 7,0-7,5)). Por lo tanto, en disoluciones tampón y salinas simples a baja concentración, el producto QS-21 no mantiene un perfil de estabilidad deseable. Sin embargo, se puede lograr alguna mejora en la estabilidad mediante una concentración incrementada del producto de QS-21. Por ejemplo, la vida útil de una disolución de 500 µg/ml de QS-21 a pH 7,0 a 4°C demostró ser de 717 días, o 23,9 meses. Pero una disolución concentrada de QS-21 no es necesariamente un método práctico de administrar una dosis baja de adyuvante. Por ejemplo, la administración de 25 µg a partir de una disolución de 500 µg/ml requeriría la retirada de la jeringa de 0,05 ml de dosis. Adicionalmente, se puede alcanzar una cierta estabilidad mejorada mediante el uso de un pH bajo, es decir, a pH 6,0. Sin embargo, un pH sustancialmente menor que el intervalo de pH fisiológico puede no ser bien tolerado ni ser compatible con el antígeno.

25 Tabla 3:

Concentración de QS-21	pH	t ₉₀ (días)
50 µg/ml	pH 7,0	94
50 µg/ml	pH 6,0	679
500 µg/ml	pH 7,0	717

30 Otra forma de evaluar la estabilidad de QS-21 en disolución acuosa era someter a ensayo la disolución mediante HPLC en un ensayo de estabilidad acelerada a 37°C. Aunque esta no es la temperatura utilizada para el almacenamiento de vacunas (4°C), se espera que este ensayo a 37°C muestre el poder estabilizador relativo de un excipiente dado. Por ejemplo, un excipiente que amplíe el valor t₉₀ al doble a 37°C también sería de esperar que amplíe el valor t₉₀ al doble a 4°C.

35 Específicamente, QS-21 (100 µg/ml) se preparó en diversos excipientes en PBS a pH 7,0. Las disoluciones se incubaron a 37°C durante 7 días. Al final de los 7 días, las disoluciones se analizaron mediante HPLC de fase inversa para determinar el grado de degradación. Los datos se representaron gráficamente como log (fracción de QS-21 t = 7 / QS-21 t = 0 días) frente al tiempo en el eje x. El tiempo de degradación del 10% (t₉₀) fue extrapolado a partir de esta gráfica.

40 La Tabla 4 muestra los valores t₉₀ de QS-21 en diversos excipientes. La estabilización de QS-21 se muestra mediante un incremento en t₉₀. Los excipientes que estabilizaban QS-21 en al menos dos veces son polisorbato 20, polisorbato 80, la saponina QS-7 de *Quillaja* nativa, y la desacil-saponina resultante de la hidrólisis alcalina de QS-21 (DS-1).

45 Tabla 4:

Excipiente	T ₉₀ (días) a 37°C
PBS	1,2
Polisorbato 20 (720 µg/ml)	2,9
Polisorbato 80 (250 µg/ml)	3,2
Polisorbato 80 (500 µg/ml)	4,3
Polisorbato 80 (1,0 mg/ml)	5,2
Polisorbato 80 (2,0 mg/ml)	7,2
Fenol (2,5 mg/ml)	2,3
Pluronic F68 (1,0 mg/ml)	1,4
QS-7 (100 µg/ml)	1,8
QS-7 (250 µg/ml)	2,6
QS-7 (500 µg/ml)	9,0
QS-7 (1,0 mg/ml)	16,0

DS-1 (100 µg/ml)	2,2
DS-1 (250 µg/ml)	3,3
DS-1 (500 µg/ml)	7,2
DS-1 (1,0 mg/ml)	6,2
Monocaproil-rac-glicerol (1,0 mg/ml)	1,7
α-ciclodextrina (5 mg/ml)	0,8
β-ciclodextrina (5 mg/ml)	0,7
metil-β-ciclodextrina (5 mg/ml)	1,5
hidroxipropil-γ-ciclodextrina (5 mg/ml)	1,0
hidroxipropil-β-ciclodextrina (5 mg/ml)	1,0

Además, alcohol bencílico al 0,9% y Plasdone C15 se evaluaron por su capacidad para estabilizar QS-21 (Tabla 5). Todas las concentraciones de QS-21 y las condiciones de incubación eran equivalentes en este experimento, excepto que las formulaciones de QS-21 se prepararon en PBS de Dulbecco (sin calcio ni magnesio) a pH 7,5. Como era de esperar, el pH elevado dio como resultado una degradación más rápida de QS-21 en PBS. Sin embargo, Plasdone C15 estabilizaba QS-21.

Tabla 5:

Excipiente	t ₉₀ (días) a 37°C, pH 7,5
PBS de Dulbecco	0,6
Alcohol bencílico al 0,9% en PBS de Dulbecco	0,7
Plasdone C15 en PBS de Dulbecco (25 mg/ml)	1,6
Plasdone C15 en PBS de Dulbecco (50 mg/ml)	7,7

Ejemplo 4

Potencia Adyuvante de las Composiciones

Las Figuras 1A y 1B muestran el efecto de polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, y metil-β-ciclodextrina sobre la respuesta inmune de ratones Balb/c a OVA más diversas dosis de QS-21. Ratones hembras (10/grupo, de 8-10 semanas de edad en la primera inmunización) se inmunizaron por vía subcutánea con 5 µg de OVA y la dosis indicada de QS-21 en PBS solo o en 2 mg/ml de excipiente en PBS. Se administró una inmunización de refuerzo por la misma vía en la semana 2. Los sueros se recogieron en la semana 4 para un análisis EIA de la respuesta anti-OVA. Los ratones se analizaron en cuanto a IgG2a específica para OVA mediante un análisis EIA estándar (Kensil, C.R., et al, 1993, *Vaccine Research* 2:273-281). QS-21 era activa en todos los excipientes dentro de dos veces el valor umbral determinado en PBS. Se alcanzó el mismo nivel máximo de respuesta de anticuerpos a la dosis óptima de adyuvante (típicamente 10 µg y superior).

La Figura 2 muestra el efecto de los excipientes sobre la respuesta de anticuerpos a un antígeno polisacárido-T independiente. Ratones Balb/c fueron inmunizados por vía subcutánea con una vacuna de polisacárido de *S. pneumonia* 23-valente comercial (Pnu-Imune, 0,5 µg/serotipo) y diferentes dosis de QS-21 en PBS, en 4 mg/ml de polisorbato 80 en PBS, o en 16 mg/ml de hidroxipropil-β-ciclodextrina en PBS. La IgG anti-Tipo 14 se determinó mediante EIA en sueros recogidos el día 7 después de una sola inmunización. Ni el polisorbato 80 ni hidroxipropil-β-ciclodextrina en la formulación redujo la potencia de la vacuna para estimular una respuesta de IgG3 específica para el serotipo de polisacárido Tipo 14.

Ejemplo 5

Estudios Clínicos de Composiciones – Ensayo 1

Se administraron diversas composiciones de QS-21 a los pacientes con el fin de someter a ensayo la tolerancia al dolor de las composiciones. Se reclutó a quince voluntarios para que recibieran cuatro inyecciones intramusculares, administrándose cada una de las inyecciones a intervalos de una semana. El estudio se realizó como un estudio aleatorio, doble ciego. Tres de las formulaciones contenían 50 µg de QS-21 en PBS de Dulbecco (sin calcio o magnesio) en 4 mg/ml de polisorbato 80 en PBS o en 1 mg/ml de hidróxido de aluminio en solución salina. La cuarta formulación era un control de PBS sin QS-21. Se pidió a los voluntarios que calificaran el dolor inmediato en los primeros cinco minutos después de la inyección en una escala de 0 a 10 (0 = sin dolor, 1-3 = leve, 4-7 = moderado, 8-10 = serio). Los resultados se muestran en la Figura 3. Las puntuaciones acumulativas representadas en la Figura 3 de la tolerancia de los pacientes al dolor se representan en la Figura 4 como puntuaciones individuales. La formulación de QS-21 que contiene 4 mg/ml de polisorbato 80 dio como resultado una tolerancia al dolor mejorada en comparación con QS-21 en PBS. La puntuación más alta para esta formulación particular fue clasificada como 5.

Ejemplo 6

Estudios Clínicos de Composiciones – Ensayo 2

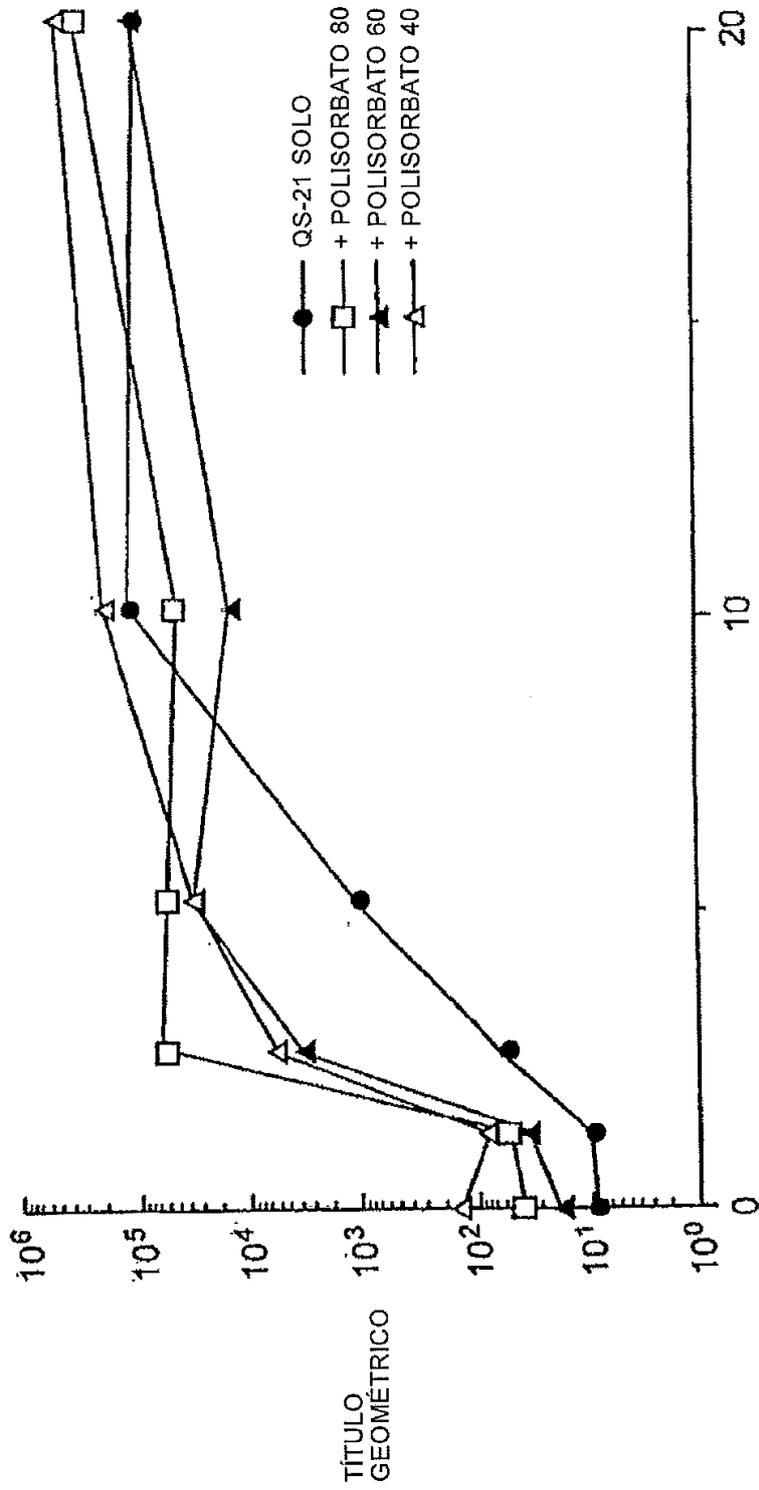
5 Diversas otras composiciones de QS-21 fueron administradas a pacientes con el fin de someter a ensayo la tolerancia al dolor de las composiciones. Se reclutó a quince voluntarios para que recibieran cuatro inyecciones intramusculares, administrándose cada una de las inyecciones a intervalos de una semana. El estudio se realizó como un estudio aleatorio, doble ciego. Los excipientes evaluados eran alcohol bencílico, hidroxipropil-beta-ciclodextrina y una dosis elevada de polisorbato 80, que había demostrado ser más eficaz que 4 mg/ml de polisorbato 80 en la reducción de la lisis por QS-21 de glóbulos rojos *in vitro*. Las cinco formulaciones sometidas a ensayo eran (1) 1 mg/ml de hidróxido de aluminio, que sirvió como control placebo; (2) 50 µg de QS-21 en alcohol bencílico al 0,72% en solución salina; (3) 50 µg de QS-21 en 30 mg/ml de hidroxipropil-β-ciclodextrina; (Encapsina, Janssen Biotech N.V., Olen, Bélgica) (4) 50 µg de QS-21 en 8 mg/ml de polisorbato 80; y (5) 50 µg de QS-21 en PBS (PBS de Dulbecco sin calcio ni magnesio), que sirvió como una formulación de control positivo. Se pidió a los voluntarios que calificaran el dolor inmediato en los primeros cinco minutos después de la inyección en una escala de 0 a 10 (0 = sin dolor, 1-3 = leve, 4-7 = moderado, 8-10 = serio). Los resultados se muestran en la Figura 5. Las puntuaciones acumulativas representadas en la Figura 5 de la tolerancia de los pacientes al dolor se representan en la Figura 6 como puntuaciones individuales. Se demostró que todos los excipientes reducían las puntuaciones media y mediana del dolor asociado con QS-21 en PBS. La puntuación individual más alta para la formulación de QS-21/encapsina fue clasificada como un 5, la cual se comparaba más favorablemente con la formulación de QS-21/polisorbato 80 que fue calificada con un solo 6 y dos 5.

10

15

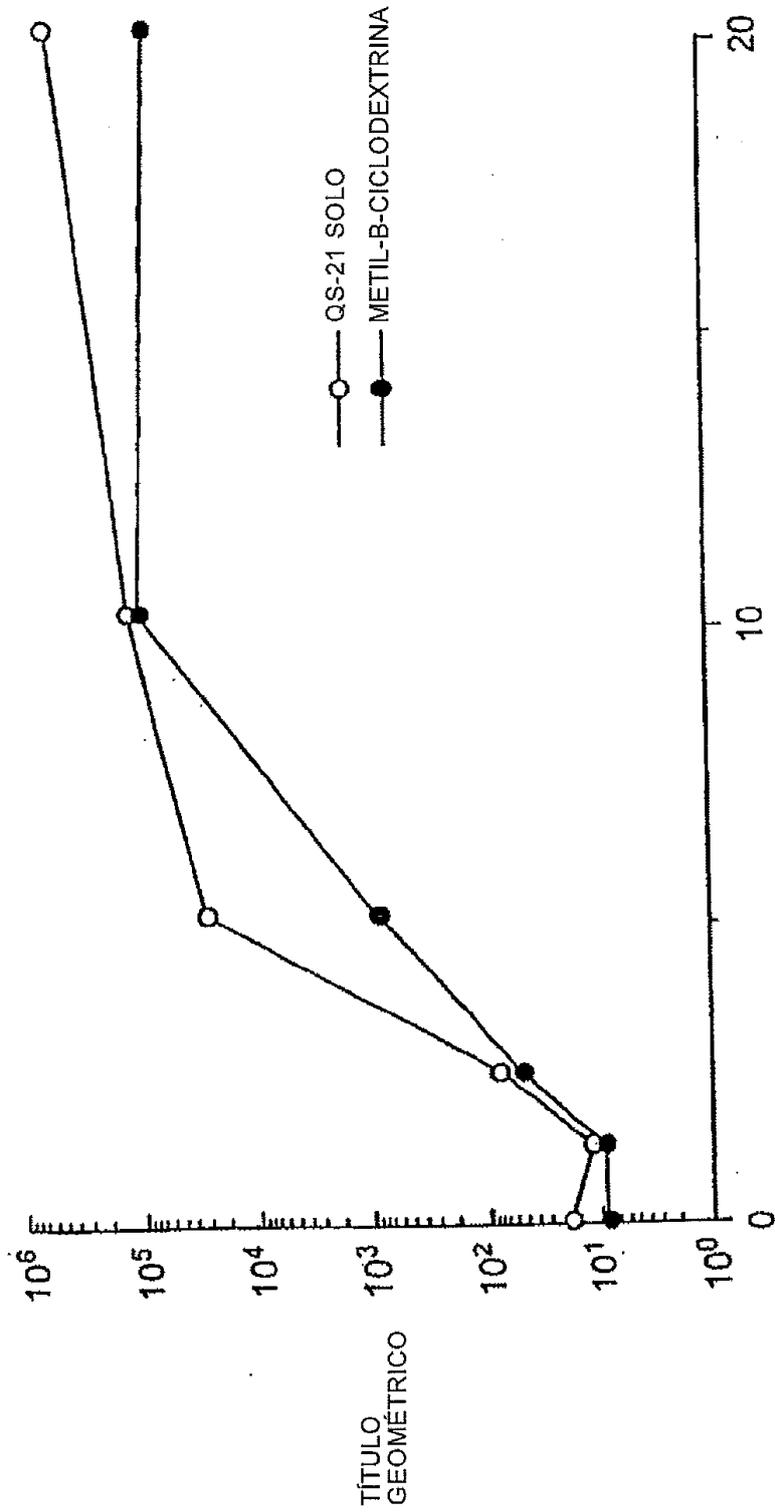
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende (a) QS-21 y (b) polisorbato 80, en donde la composición es una disolución.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en donde el polisorbato 80 se encuentra a una concentración en un intervalo de 250 µg/ml a 2 mg/ml en la disolución.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende, además, un antígeno o ácido nucleico que codifica un péptido o proteína antigénico.
- 10 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende dicho antígeno.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, para uso como un medicamento.
- 15 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, para uso para aumentar o potenciar una respuesta inmune en un sujeto.
7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el sujeto es un ser humano.
- 20 8. Uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4 para la fabricación de un medicamento para uso para aumentar o potenciar una respuesta inmune en un sujeto.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el sujeto es un ser humano.
- 25 10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, en donde el antígeno es un péptido, una proteína, un polisacárido o un lípido.
11. La composición o uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la disolución comprende solución salina o solución salina tamponada con fosfato.
- 30 12. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 ó 10 a 11, en donde la composición es para la administración por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal u oral.
13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 10 a 12 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 12, en donde la composición reduce el efecto lítico *in vitro* de la QS-21, en comparación con una disolución simple de QS-21 en un tampón tal como solución salina o PBS.
- 35 14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 10 a 13 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 13, en donde la composición mejora la estabilidad de la QS-21, en comparación con una disolución simple de QS-21 en un tampón tal como solución salina o PBS.
- 40 15. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 ó 10 a 14 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 14, en donde la composición mantiene la potencia de adyuvante máxima de la QS-21, en comparación con una formulación control de QS-21 en PBS.
- 45 16. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 10 a 15 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 15, en donde la composición mejora la tolerancia al dolor de un sujeto a la QS-21, en comparación con una disolución simple de QS-21 en un tampón tal como solución salina o PBS.
- 50 17. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4 ó 10 a 12 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 12, en donde la composición tiene las características mejoradas de un efecto lítico reducido, una tolerancia mejorada a QS-21 y una estabilidad incrementada, en comparación con una disolución simple de QS-21 en un tampón tal como solución salina o PBS.
- 55 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 10 a 17 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 17, en donde la QS-21 en la disolución se encuentra a una concentración de 100 µg/ml en la disolución.
- 60 19. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 ó 10 a 17 y la composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 - 7 ó 10 a 17, en donde la composición es una formulación de vacuna, y en donde la QS-21 se encuentra a una concentración de 50 a 200 µg/ml.



DOSIS DE QS-21 (ug)

FIG. 1A



DOSIS DE QS-21 (ug)

FIG. 1B

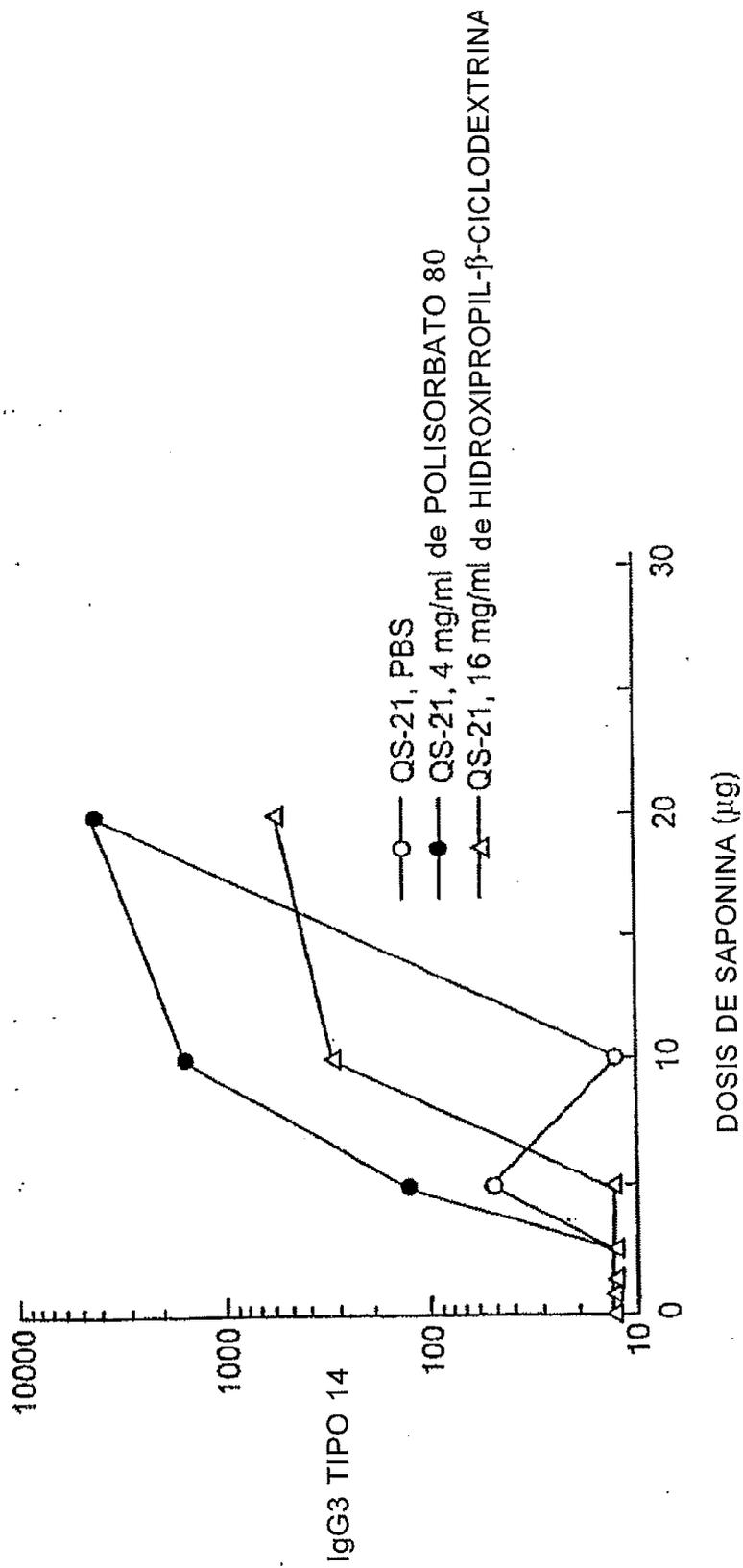


FIG. 2

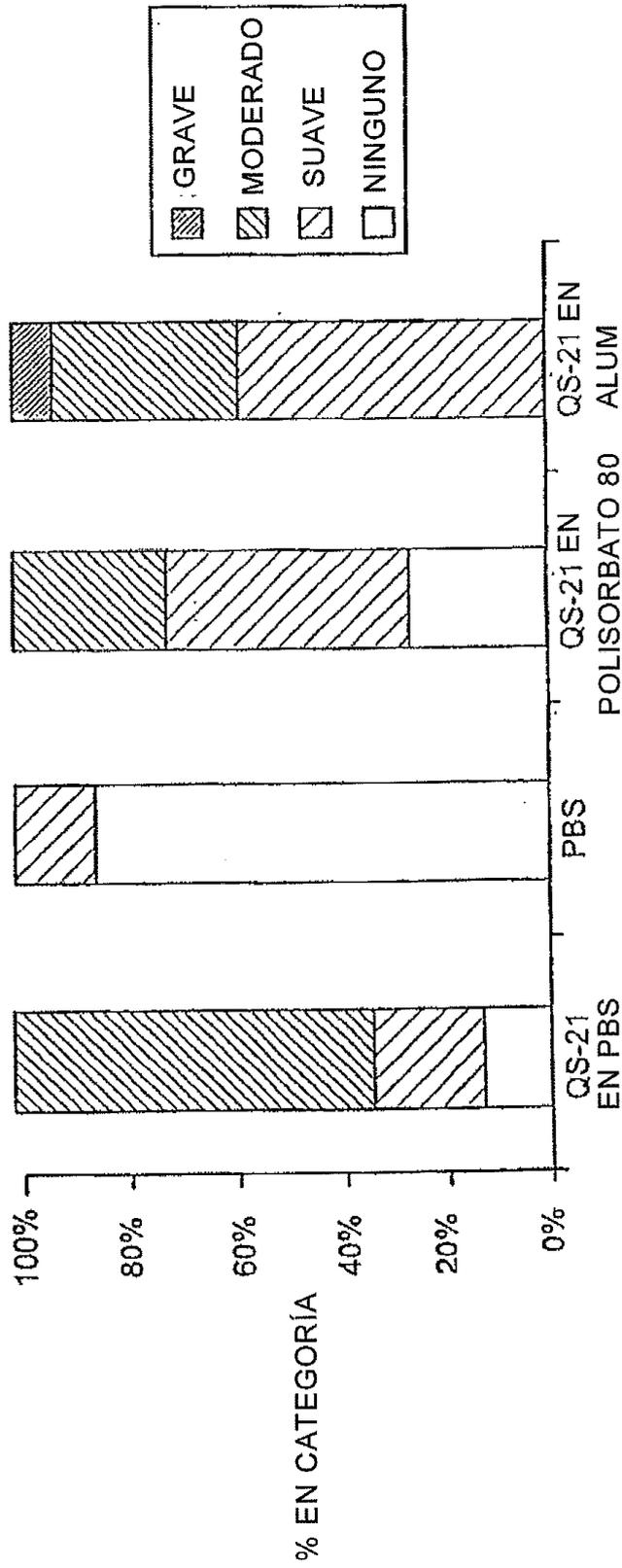


FIG. 3

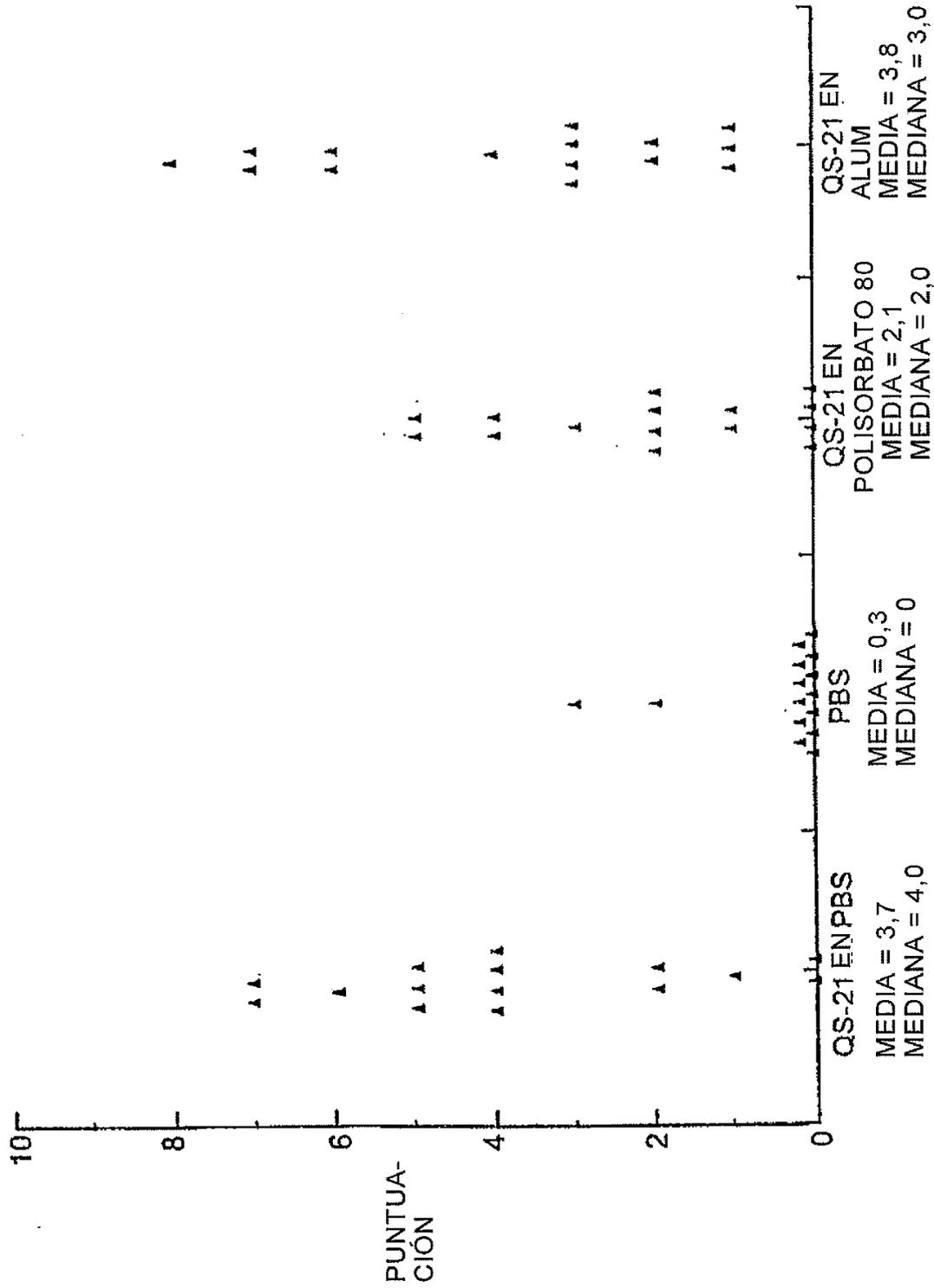


FIG. 4

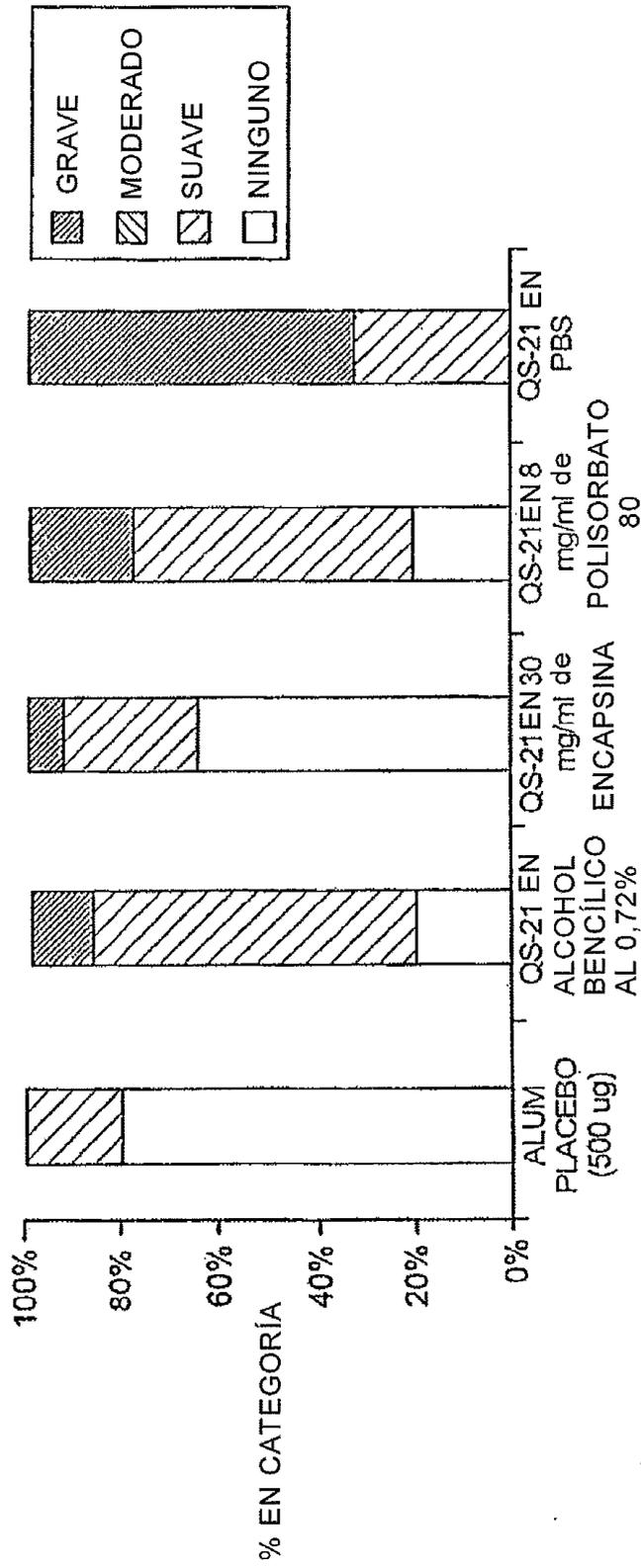


FIG. 5

**

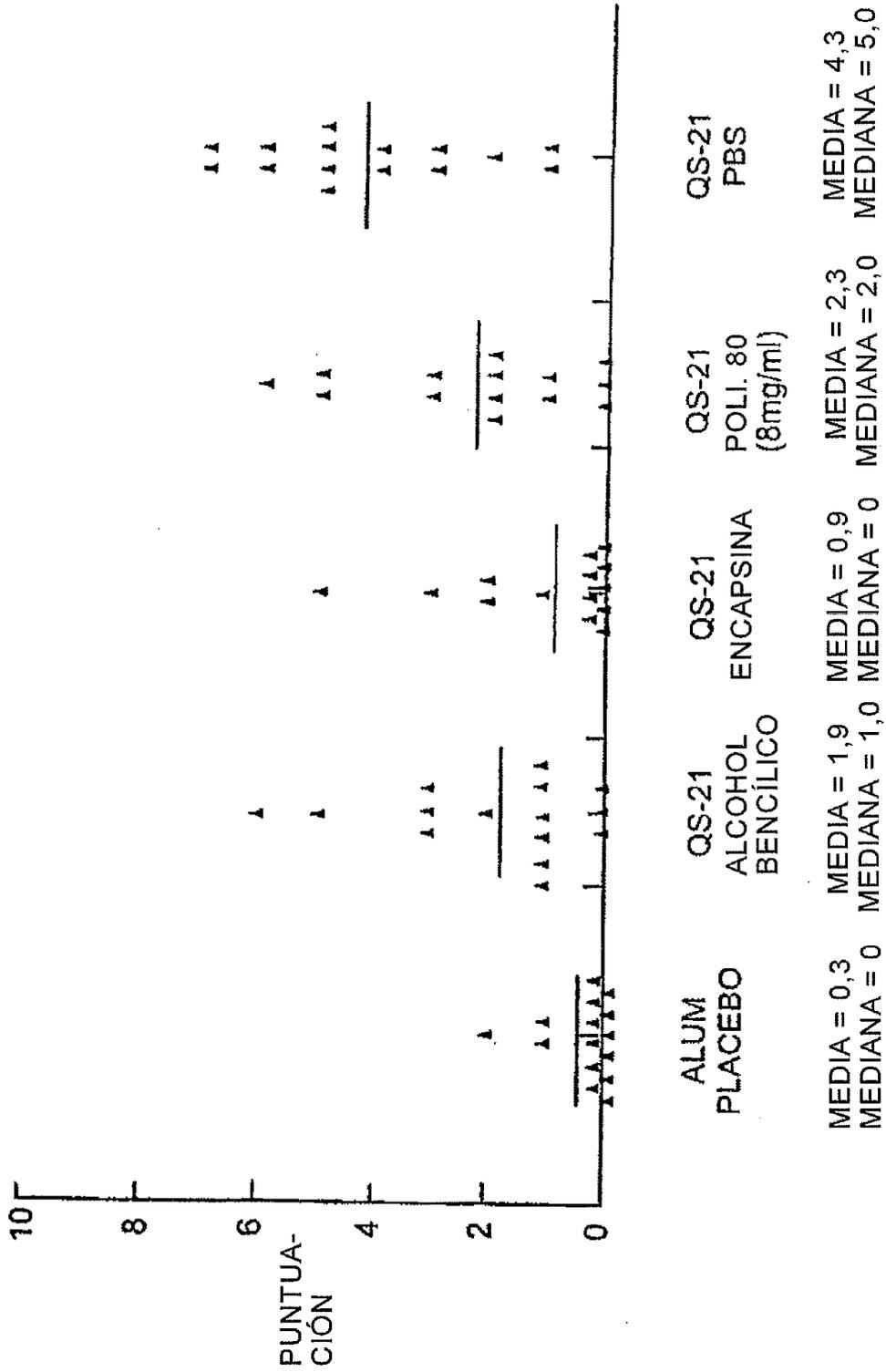


FIG. 6