

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 569**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06820577 .2**

96 Fecha de presentación: **19.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1963484**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA PRODUCIR CEPAS RUGOSAS DE BACTERIAS Y SUS USOS.**

30 Prioridad:
21.12.2005 GB 0526033

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

73 Titular/es:
Immodulon Therapeutics Limited
Suite 82, Warnford Court 29 Throgmorton Street
London EC2N 2AT, GB

72 Inventor/es:
STANFORD, John, Lawson;
STANFORD, Cynthia, Ann;
MCINTYRE, Graham y
BOTTASSO, Oscar, Adelmo

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 569 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

Método para producir cepas rugosas de bacterias y sus usos

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a cepas rugosas de bacterias, tales como las del género *Mycobacterium*. En particular, la presente invención se refiere a métodos para obtener cepas rugosas de bacterias. La presente invención se refiere además a una nueva cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* y al uso de esta cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los métodos para obtener cepas rugosas de bacterias, tales como las del género *Mycobacterium*, que son conocidos en la técnica incluyen el cultivo en placa de bacterias, tales como las del género *Mycobacterium*, y la búsqueda de cualquier colonia rugosa. Sin embargo, típicamente, ninguna cepa rugosa identificada de este modo es estable.

- 15 Otros métodos incluyen cultivar en placa micobacterias sobre un medio que contiene Tween o glicerol y fomentar el crecimiento de película. Este método ha sido satisfactorio para inducir colonias rugosas de algunas especies de micobacterias. Sin embargo, este método no ha sido capaz de inducir variantes rugosas en todas las micobacterias.

Ningún método ha sido capaz hasta la fecha de inducir cepas rugosas de *Mycobacterium obuense*.

De acuerdo con esto, hay una necesidad de un método mejorado que sea capaz de producir cepas rugosas, particularmente cepas rugosas estables, de *Mycobacterium*. Tal método podría usarse ventajosamente para producir por primera vez cepas rugosas de algunas especies de *Mycobacterium* tales como *Mycobacterium obuense*.

- 20 Ventajosamente, la presente invención ha proporcionado tal método mejorado que ha inducido por primera vez una cepa rugosa, particularmente una cepa rugosa estable, de *Mycobacterium obuense*.

Las cepas rugosas de micobacterias de crecimiento rápido tienen un número de ventajas:

- las cepas rugosas estables no reversionan a cepas lisas;
 - las cepas rugosas tienen una presentación de antígenos diferente y tienden a ser menos virulentas en causar una enfermedad que las cepas lisas;
 - los reactivos para pruebas cutáneas elaborados a partir de cepas rugosas son más eficaces que los elaborados a partir de cepas lisas;
 - las cepas rugosas son muy eficaces cuando se usan en experimentos inmunológicos mediados por células in vitro; y
 - los pequeños agregados o partículas de varios bacilos pueden ser más eficaces para estimular células fagocíticas que organismos individuales de cepas lisas.
- 25
- 30

Por otra parte, la presente invención ha encontrado ventajosamente que se puede usar una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para modular la respuesta inmune de un sujeto.

- 35 Aunque se sabía que *M. vaccae* modula la respuesta inmune de un sujeto - *M. obuense* nunca se ha considerado antes adecuada para el uso como un inmunomodulador.

Las vacunas y otros inmunomoduladores tienen un impacto importante en la reducción de la morbilidad y mortalidad por enfermedad. La inmunidad primaria producida por la mayoría de las vacunas actuales parece estar mediada por la respuesta inmune humoral. Para enfermedades que pueden requerir una respuesta celular inmune, tales como tuberculosis y leishmaniasis, actualmente no hay vacunas disponibles que sean uniformemente eficaces.

- Típicamente, se añaden adyuvantes a las vacunas. El papel del adyuvante es potenciar la respuesta inmune del cuerpo a antígenos específicos de la vacuna. Los adyuvantes comúnmente usados producen típicamente una respuesta inmune humoral pero no producen una respuesta inmune mediada por células. Además, los adyuvantes de aluminio, por ejemplo, pueden provocar efectos secundarios negativos, tales como abscesos estériles, eritema, hinchazón, nódulos subcutáneos, inflamación granulomatosa e hipersensibilidad por contacto.
- Se busca una vacuna u otro inmunomodulador que modifique una respuesta celular inmune y en particular la respuesta de células T auxiliares, por ejemplo, la respuesta de células T auxiliares 1 (Th1) y células T auxiliares 2 (Th2).
- Hay muchas enfermedades autoinmunes diferentes, y cada una puede afectar al cuerpo de diferentes modos. Muchas de las enfermedades autoinmunes son raras. Sin embargo, como grupo, las enfermedades autoinmunes afectan a millones de personas.
- Se sabe que algunas enfermedades autoinmunes comienzan o empeoran con ciertos activadores tales como infecciones virales, parasitarias y bacterianas crónicas. Otras influencias menos comprendidas que afectan al sistema inmunológico y al curso de enfermedades autoinmunes incluyen envejecimiento, estrés crónico, hormonas y embarazo.
- Las enfermedades autoinmunes a menudo son crónicas, requiriendo cuidado y control de por vida, incluso cuando la persona pueda parecer o sentirse bien. Actualmente, pocas enfermedades autoinmunes pueden curarse o hacerse remitir con tratamiento.
- Muy a menudo, los médicos ayudan a los pacientes a manejar las consecuencias de la inflamación provocada por la enfermedad autoinmune. En algunas personas, un número limitado de medicaciones inmunosupresoras puede dar como resultado una remisión de la enfermedad. Sin embargo, incluso si su enfermedad remite, los pacientes raramente son capaces de suspender la medicación. Los efectos secundarios a largo plazo de la medicación inmunosupresora pueden ser sustanciales.
- La iniciación y la progresión de una lesión vascular es un proceso multifactorial complejo, pero hay una evidencia creciente de que las respuestas inflamatorias representan un papel clave. La lesión vascular está implicada en el desarrollo de la aterosclerosis, y en procesos trombóticos que conducen a síndromes isquémicos agudos tales como infarto de miocardio, apoplejía y oclusión de arterias periféricas.
- Los mecanismos inmunes pueden ser importantes en el desarrollo y el mantenimiento de la aterosclerosis y la hiperplasia mioíntima (MIH).
- La hiperplasia mioíntima (MIH) puede considerarse una respuesta de curación exagerada a una lesión tal como angioplastia con globo. Una cascada de episodios da como resultado: pérdida de la membrana de basamento, migración de células del músculo liso vascular (VSMC) del medio hacia la íntima, proliferación de VSMC y cambio fenotípico hasta un tipo de célula fibroblástica más secretora y producción incrementada de matriz extracelular, que finalmente conduce a estenosis u oclusión del vaso. Se produce después de injerto de baipás y angioplastia con globo y afecta a aproximadamente 30% de tales casos en la práctica clínica. Es la principal causa de fallo de tales procedimientos y el tratamiento de los vasos/injertos estenosados y bloqueados es problemático. Los mecanismos celulares subyacentes que conducen a MIH no son bien comprendidos y hasta ahora no se ha desarrollado una terapia que pueda prevenirla eficazmente. La relevancia clínica de la presente patente se refiere a los números muy grandes de angioplastias de arterias coronarias que se realizan anualmente en el Reino Unido y en todo el mundo. Aunque las prótesis endovasculares ("stents") liberadoras de fármacos están produciendo actualmente resultados prometedores, es improbable que eviten completamente la reestenosis. Cualquier terapia accesoria segura relativamente económica, tal como la inmunoterapia propuesta en esta patente, tendría un importante impacto clínico.
- Los mecanismos implicados en la inmunoterapia contra la reestenosis son complejos y no están completamente aclarados. La lesión endotelial provocada por la angioplastia puede ser exacerbada por la respuesta inmune del huésped a hsp. Las hsp son proteínas producidas por células estresadas que se han relacionado con la patogénesis y la patofisiología de diversos trastornos inmunológicos incluyendo la aterosclerosis (Xu Q et ál. Arterioscler Thromb 1992; 12: 789-799). Es probable que estén presentes sobre células endoteliales y del músculo liso en la región de una angioplastia. En efecto, la hsp actúa como un autoantígeno que puede ser atacado por el sistema inmunológico. Esta situación puede inducirse experimentalmente al inmunizar con una hsp micobacteriana reactiva cruzadamente (hsp65) que conduce a daño endotelial en conejos y ratones (Xu Q et ál. Arterioscler Thromb 1992; 12: 789-799 y George J, et ál. Circ. Res. 2000; 86: 1203-1210). El efecto parece depender de IL-4 secretada por linfocitos Th2, y probablemente está mediado por anticuerpo (George J, et ál. Circ. Res. 2000; 86: 1203-1210 y Schett G, et ál. J. Clin. Invest. 1995; 96: 2569-2577). La relevancia de estas observaciones para el ser humano se sugiere por la

capacidad para dañar células endoteliales humanas estresadas del anticuerpo humano purificado por afinidad eluido de columnas de hsp65 in vitro. Este hallazgo sugiere que el anticuerpo reacciona cruzadamente con hsp60, que es el homólogo humano de hsp65, y puede ser accesible al anticuerpo cuando se expresa sobre las membranas de células endoteliales estresadas. Se ha sugerido que tales anticuerpos que se unen a células endoteliales estresadas pueden ser un factor en la producción de una enfermedad de las arterias coronarias después de un trasplante de corazón (Crisp SJ et ál. J Heart Lung Transplant 1994; 81-91). Mukherjee et ál (Thromb Haemost 1996; 75: 258-60) mostraron que no había asociación entre los niveles de anticuerpo preoperatorios para hsp65 y la reestenosis coronaria, pero sí mostraron que aquellos pacientes en los que los niveles de tales anticuerpos caían después de la angioplastia eran menos propensos a sufrir reestenosis. De hecho, el papel de los anticuerpos para hsp podía ser complejo, debido a que los pacientes con enfermedad vascular no solo tienen anticuerpos elevados, sino que también tienen niveles elevados de la hsp por sí mismos (Wright BH, et ál Heart Vessels 2000; 15: 18-22). Así, una aparente caída de los niveles de anticuerpo puede reflejar meramente un incremento de los niveles de la proteína. Es más, las hsp tienen efectos reguladores, y se unen a células del músculo liso arterial, conduciendo a una supervivencia mejorada sin requerir ingreso hospitalario (Johnson AD et ál. Atherosclerosis 1990; 84: 111-119).

Los documentos WO2004/022093 y WO 2005/049056 describen una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula entera de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioide*s.

Además, el documento US 2006/0013830 describe el uso de una célula entera de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioide*s en una fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del síndrome de debilitamiento multisistémico posdestete (PMWS) y/o el síndrome de dermatitis y nefropatía porcinas (PDNS).

El documento WO91/02562 describe el uso de material antigénico y/o inmunorregulador derivado de *Mycobacterium vaccae* para el uso en la fabricación de un agente terapéutico para el tratamiento de afecciones patológicas en un paciente.

El documento CA 1054055 describe un procedimiento para preparar un cultivo de micobacterias al cultivar micobacterias en un medio líquido capaz de disociar las micobacterias en fenotipos, llevándose a cabo el cultivo bajo condiciones aeróbicas parciales y a un pH entre 4,5 y 8,5.

Rightsel, W.A., et al. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, [1978] vol. 13, 3, p 509-513) describe el efecto de derivados de sulfona sobre *M. lepraemurium* e indica que estos compuestos bien suprimen el crecimiento o bien no tienen efecto sobre el crecimiento de la bacteria.

Colwell, W.T., et al. (J. Medicinal Chemistry [1974] vol. 17, 1, p 142-144) describe el efecto inhibidor de un número de diarilsulfonas de *M. leprae*.

Girdhar, B.K., et al. (Leprosy in India [1978] vol. 50, 3, p 352-355) analiza el uso de D.D.S. para el tratamiento de infección por *M. leprae* y la aparición de cepas resistentes.

Sin embargo, ninguno de estos documentos enseña o sugiere el uso de células enteras de una cepa rugosa, preferiblemente una cepa rugosa estable, de *M. obuense* para modular una respuesta celular inmune.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que se puede inducir una cepa rugosa de una bacteria, tal como una cepa rugosa de una bacteria del género *Mycobacterium*, mediante exposición a una sulfona y/o una sulfonamida.

Desde el nacimiento hasta la muerte, el sistema inmunológico es educado, estimulado y regulado constantemente mediante el contacto con el medioambiente. La urbanización moderna y las medidas de salud pública para prevenir enfermedades infecciosas han eliminado virtualmente esta exposición conduciendo a un aumento de las enfermedades sin precedentes – tales como alergias y enfermedades neoplásicas. Restaurar los efectos beneficiosos del medioambiente mediante el uso de suspensiones destruidas de bacterias medioambientales beneficiosas inocuas puede restablecer el equilibrio normal del sistema inmunológico actuando así, terapéuticamente y/o profilácticamente, en el tratamiento de enfermedades y/o en la promoción de un sistema inmunológico sano.

Así, además o como una alternativa al método para inducir cepas rugosas de bacterias (tales como *Mycobacterium*, p. ej. *M. obuense*), la presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* administrada a un sujeto de prueba es particularmente eficaz para originar una modificación del sistema inmunológico, en particular el sistema inmunológico celular, de ese sujeto de prueba.

La expresión "sistema inmunológico celular", según se usa en la presente memoria, incluye una respuesta inmune mediada por células que depende de la presencia de linfocitos T. El término "linfocitos T" incluye linfocitos T citotóxicos, células T auxiliares, células T supresoras y células T reguladoras. La modificación de una respuesta inmune mediada por células se puede usar, por ejemplo, para vencer trastornos inmunes mediados por células, incluyendo, por ejemplo, un desequilibrio del sistema inmunológico e hipersensibilidad inmunitaria.

Los términos "modular", "modificar", "modificación" y otros de sus derivados, según se usan en la presente memoria, significan regular a la baja, inhibir, inducir, estimular, regular al alza, alterar o afectar de otro modo a un componente o componentes del sistema inmunológico celular.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* administrada a un sujeto de prueba es particularmente eficaz para ocasionar una modificación del sistema inmunológico, en particular el sistema inmunológico celular de ese sujeto de prueba, que ejerce un efecto preventivo y/o terapéutico sobre enfermedades autoinmunes o trastornos autoinmunes, particularmente, por ejemplo, los que implican la inflamación de la íntima de vasos sanguíneos.

Una ventaja del uso de composiciones que comprenden una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *M. obuense* para tratar y/o prevenir eficazmente enfermedades autoinmunes y trastornos autoinmunes, particularmente, por ejemplo, los que implican la inflamación de la íntima de vasos sanguíneos, puede ser que este tratamiento y/o prevención se efectúa con producción de menos efectos secundarios a largo plazo que en las quimioterapias, es decir la medicación inmunosupresora, actualmente usada de forma rutinaria.

ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una cepa rugosa de una bacteria, comprendiendo dicho método exponer dicha bacteria a una sulfona y/o una sulfonamida.

Adecuadamente, en un método para producir cepas rugosas de una bacteria de acuerdo con la presente invención, la cepa rugosa puede aislarse.

En el método para producir cepas rugosas de una bacteria de acuerdo con la presente invención, la bacteria crece sobre un medio que contiene 4,4'-diaminodifenilsulfona a una concentración de más de o igual a 7,5 µg/ml y menos de 20 µg/ml.

Adecuadamente, en un método para producir cepas rugosas de una bacteria de acuerdo con la presente invención, dicha bacteria es del género *Mycobacterium*. Preferiblemente de *Mycobacterium obuense*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa rugosa de una bacteria del género *Mycobacterium* producible, preferiblemente producida, mediante un método de la presente invención.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* producible, preferiblemente producida, mediante un método de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* que ha sido depositada por BioEos Limited de 67 Lakers Rise, Woodmansterne, Surrey, SM7 3LA bajo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes en la National Collection of Type Cultures (NCTC), Central Public Health Laboratory, 61 Colindale Avenue, Londres, NW9 5HT), bajo el Número de Registro NCTC 13365 el 14 de julio de 2005.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*.

El término "inmunomodulador", según se usa en la presente memoria, significa una sustancia que modula un sistema inmunológico celular de un sujeto.

El término “célula entera”, según se usa en la presente memoria, significa una bacteria que está intacta, o sustancialmente intacta. En particular, el término “intacta”, según se usa en la presente memoria, significa una bacteria que está comprendida por todos los componentes presentes en una célula entera, particularmente una célula viable entera, y/o una bacteria que no se ha tratado específicamente para serle retirado uno o más componentes. Por el término “sustancialmente intacta”, según se usa en la presente memoria, se entiende que, aunque el procedimiento de aislamiento y/o purificación usado al obtener la bacteria pueda dar como resultado, por ejemplo, una ligera modificación de la célula y/o la retirada de uno o más de los componentes de la célula, el grado al que se produce tal modificación y/o retirada es insignificante. En particular, una célula sustancialmente intacta de acuerdo con la presente invención no se ha tratado específicamente para retirar uno o más componentes de ella.

Antes de la presente invención no se contemplaba el uso de células enteras de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para modular una respuesta celular inmune. Sorprendentemente, se ha encontrado que al usar una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, puede efectuarse la modulación de un sistema inmunológico celular. La modulación de una respuesta celular inmune provocada por la administración de dicha célula entera de dicha cepa rugosa puede ser ventajosamente duradera en comparación con la respuesta ocasionada por la administración de un componente individual de la bacteria.

Preferiblemente, la composición de acuerdo con la presente invención comprende más de una célula entera, y más preferiblemente comprende una pluralidad de células enteras.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, composición inmunomoduladora que al usarla modifica una respuesta celular inmune.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende un antígeno y un adyuvante, en la que dicho adyuvante comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, composición inmunomoduladora que al usarla modifica una respuesta celular inmune.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora y/o una composición farmacéutica que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* y al menos un antígeno o determinante antigénico.

Adecuadamente, el antígeno o determinante antigénico puede ser un antígeno o determinante antigénico procedente de uno o más de los siguientes: vacuna de BCG (bacilo de Calmette y Guérin), vacuna de toxoide de la difteria, vacuna de difteria/tétanos/pertussis (DTP o Triple), vacuna de pertussis, vacuna de toxoide del tétanos, vacuna del sarampión, vacuna de las paperas, vacuna de la rubeola, OPV (vacuna oral de la poliomielitis), *Mycobacterium vaccae*, o una de sus partes (según se enseña en el documento GB0025694.1) y un antígeno de plasmodium genérico, por ejemplo un antígeno del parásito de la malaria.

Adecuadamente, la composición inmunomoduladora comprende dos o más de tales antígenos o determinantes antigénicos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende un antígeno o un determinante antigénico y un adyuvante, en la que dicho antígeno o determinante antigénico comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*.

Cuando es el caso que la célula entera de la bacteria funciona como un antígeno o determinante antigénico, la composición puede comprender adecuadamente al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, antígenos o determinantes antigénicos adicionales.

La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de: una infección (p. ej. bacteriana, viral, por ejemplo una infección provocada por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello, o infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección; una enfermedad autoinmune (p. ej. un trastorno vascular, tal como

- trastorno vascular obliterativo, y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia mioíntima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos.); estrés (por ejemplo, estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico); una alergia (p. ej. asma, incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos)); huélfago; COPD; PMWS; PDNS; SIPH; cáncer (por ejemplo melanoma o adenocarcinoma); un desequilibrio del sistema inmunológico (p. ej. un desequilibrio del sistema inmunológico en niños y ancianos); y estrés e infección posoperatorios. Un desequilibrio del sistema inmunológico en ancianos puede denominarse inmunosenescencia.
- 5
- 10 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una o más infecciones virales, por ejemplo una infección provocada por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello.
- 15 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, y al menos un antígeno o determinante antigénico, en la que dicho antígeno o determinante antigénico es un antígeno viral de papilomavirus bovinos.
- 20 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una o más de una infección parasitaria, tal como, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con la especie *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis.
- 25 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una o más de una enfermedad autoinmune, un trastorno vascular, tal como un trastorno vascular obliterativo, y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia mioíntima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos.
- 30 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del estrés, tal como, por ejemplo, estrés traumático grave, estrés psicosocial y/o estrés crónico y/o estrés posoperatorio (incluyendo el estrés relacionado con la administración de anestésicos).
- 35 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de asma (incluyendo asma alérgica), fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos).
- 40 Preferiblemente, la composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* se usa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de asma, incluyendo asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos).
- 45 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de huélfago y/o COPD, particularmente en caballos.
- La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de PMWS y/o PDNS.
- 50 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de hemorragia pulmonar inducida por estrés (SIPH), preferiblemente hemorragia pulmonar inducida por ejercicio (EIPH).

La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de melanoma y/o adenocarcinoma.

5 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico en ancianos. Típicamente, una composición inmunomoduladora de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede ser un inmunopotenciador.

10 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para potenciar el sistema inmunológico que puede dar como resultado, por ejemplo, una potenciación del crecimiento o un incremento en la eficacia de utilización de alimentos. Típicamente, la composición inmunomoduladora de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede ser un inmunopotenciador. Ventajosamente, la composición inmunomoduladora de la presente invención se puede usar para reemplazar
15 antibióticos que se usan actualmente para promover el crecimiento de ganado. Adecuadamente, la composición inmunomoduladora de la presente invención se puede usar bien sola o bien en combinación con otros tratamientos. El término "ganado", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, el ganado es uno o más de caballos, aves de corral, cerdos (incluyendo cochinitos), ovejas (incluyendo corderos), vacas o toros (incluyendo terneros). Más preferiblemente, ganado significa cerdos – incluyendo cochinitos.

20 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico en niños.

La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una reacción adversa a vacunas infantiles – tales como
25 vacunaciones para la tos ferina y las vacunaciones para MMR actuales - y/o sus consecuencias. El término "reacción adversa", según se usa en la presente memoria, significa una respuesta perjudicial local o generalizada provocada por o iniciada por la vacuna o su administración, que se produce típicamente en un corto espacio de tiempo, pero que puede retrasarse (por ejemplo en 6 meses). Una "reacción adversa" puede incluir la muerte del niño. La
30 reacción adversa puede estar provocada como una consecuencia de un episodio separado, la respuesta al cual ha sido iniciada negativamente por la vacuna o su administración.

La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* en la fabricación de un medicamento para modificar una respuesta celular inmune.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en o
40 como una vacuna.

Adecuadamente, la vacuna puede ser una vacuna profiláctica o una vacuna terapéutica.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso como un inmunopotenciador.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de: una infección (p. ej. bacteriana, viral, por ejemplo una infección provocada por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello, o infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en
50 aves de corral y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección; una enfermedad autoinmune (p. ej. un trastorno vascular, tal como trastorno vascular obliterativo, y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia mioíntima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como

- arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos.); estrés (por ejemplo, estrés traumático grave mayor, estrés psicosocial y estrés crónico); una alergia (p. ej. asma, incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos)); huélfago; COPD; PMWS; PDNS; SIPH y cáncer (por ejemplo melanoma o adenocarcinoma), o cánceres relacionado con virus tales como, por ejemplo, cánceres cervicales, por ejemplo); un desequilibrio del sistema inmunológico (p. ej. un desequilibrio del sistema inmunológico en niños y ancianos) y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.
- 5
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de una infección parasitaria, tal como, por ejemplo, una o más de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis.
- 10
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de una infección viral, por ejemplo una infección provocada por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello.
- 15
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, para el uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de una enfermedad autoinmune, un trastorno vascular, tal como un trastorno vascular obliterativo, y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia neoíntima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos.
- 20
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de estrés, tal como, por ejemplo, uno o más de estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico y/o estrés posoperatorio.
- 25
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de asma (incluyendo asma alérgica), fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos). Preferiblemente, la composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* es para el uso en el tratamiento o la prevención de asma, incluyendo, por ejemplo, asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos).
- 30
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de uno de más de huélfago y/o COPD, particularmente en caballos.
- 35
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de PMWS y/o PDNS, particularmente en cerdos.
- 40
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de SIPH, particularmente en peces (tales como koi) y/o animales de carreras (tales como caballos, camellos, galgos y seres humanos).
- 45
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer (por ejemplo melanoma y/o adenocarcinoma y/o cánceres relacionados con virus tales como, por ejemplo, cáncer cervical).
- 50
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico, particularmente inmunosenescencia, en ancianos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de una infección posoperatoria.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en la potenciación del sistema inmunológico que puede dar como resultado, por ejemplo, una potenciación del crecimiento o un incremento en la eficacia de utilización de alimento en, por ejemplo, ganado.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico en niños.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* para el uso en el tratamiento o la prevención de una reacción adversa a vacunas infantiles – tales como vacunaciones contra la tos ferina y las vacunaciones contra MMR actuales - y/o sus consecuencias.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* en una vacuna o un medicamento, en el que dicha célula entera de dicha bacteria modifica una respuesta celular inmune.

En un aspecto, la célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* de acuerdo con la presente invención puede regular a la baja una respuesta Th2.

20 En otro aspecto, la célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* de acuerdo con la presente invención puede regular al alza una respuesta Th1.

Adecuadamente, la célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* de acuerdo con la presente invención puede regular a la baja una respuesta Th2 y regular al alza una respuesta Th1.

25 Alternativamente, la célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* de acuerdo con la presente invención puede regular al alza una respuesta Th1 mientras que no afecta a una respuesta Th2.

Alternativamente, la célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* de acuerdo con la presente invención puede regular a la baja una respuesta Th2, mientras que también regula a la baja una respuesta Th1.

Alternativamente, la célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* de acuerdo con la presente invención puede regular al alza una respuesta Th2, mientras que también regula al alza una respuesta Th1.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una afección en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición inmunomoduladora a un sujeto, en el que dicha composición modula una respuesta celular inmune.

Adecuadamente, la cantidad eficaz de la composición inmunomoduladora puede administrarse en una sola dosis. Alternativamente, la cantidad eficaz de la composición inmunomoduladora puede administrarse en dosis múltiples (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más o veinte o más dosis repetidas.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para inmunizar a un sujeto, que comprende administrar una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención a un sujeto.

40 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para proteger, incluyendo inmunizar, a un sujeto, que comprende administrar una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención.

45 Preferiblemente, un sujeto es protegido, por ejemplo es inmunizado, contra uno o más de: una infección (p. ej. bacteriana, viral, por ejemplo una infección provocada por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello, o una infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección; una enfermedad autoinmune (p. ej. un trastorno

- 5 vascular, tal como trastorno vascular obliterativo, y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia neoíntima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos); estrés (por ejemplo, estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico); una alergia (p. ej. asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias a ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos)); huélfago; COPD; PMWS; PDNS; cáncer (por ejemplo melanoma o adenocarcinoma o cánceres relacionados con virus, tales como cáncer cervical); un desequilibrio del sistema inmunológico (p. ej. un desequilibrio del sistema inmunológico en niños y ancianos); y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.
- 10 Preferiblemente, un sujeto es inmunizado contra una o más de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis. Preferiblemente, un sujeto es inmunizado contra infecciones virales, por ejemplo contra infecciones por papilomavirus, incluyendo contra sarcoide equino, verrugas genitales o displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello.
- 15 Preferiblemente, una sujeto es inmunizado contra uno o más de una enfermedad autoinmune, un trastorno vascular, tal como un trastorno vascular obliterativo, y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia neoíntima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos.

Preferiblemente, un sujeto es protegido contra estrés, tal como, por ejemplo, uno o más de estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico y/o estrés posoperatorio.
- 20 Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra uno o más de asma (incluyendo asma alérgica), fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos). Más preferiblemente, un sujeto es inmunizado contra asma, incluyendo, por ejemplo, asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos).
- 25 Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra uno o más de COPD y/o huélfago, particularmente cuando el sujeto es un caballo.

Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra uno o más de PMWS y/o PDNS, particularmente cuando el sujeto es un cerdo.
- 30 Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra SIPH, particularmente cuando el sujeto es un pez (tal como koi), incluyendo EIPH, particularmente cuando el sujeto es un animal de carreras (tal como un ser humano, caballo, camello o galgo).

Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra estrés e infección posoperatorios.

Preferiblemente, un sujeto es protegido contra el desarrollo y/o el avance de un cáncer, por ejemplo melanoma y/o adenocarcinoma y/o cánceres relacionados con virus tales como, por ejemplo, cánceres cervicales.
- 35 Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra un desequilibrio del sistema inmunológico en ancianos. En particular, la composición de acuerdo con la presente invención se puede usar para regular el sistema inmunológico del sujeto.

Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra un desequilibrio del sistema inmunológico en niños. En particular, la composición de acuerdo con la presente invención se puede usar para regular el sistema inmunológico del sujeto, particularmente el sistema inmunológico del niño.
- 40 Preferiblemente, un sujeto es protegido (incluyendo inmunizado) contra una reacción adversa a vacunas infantiles y/o sus consecuencias. En particular, el sistema inmunológico del sujeto se regula, particularmente un sistema inmunológico de niño, antes y/o durante y/o después de la administración de la vacuna infantil.
- 45 El término “protegido”, según se usa en la presente memoria, significa que el sujeto es menos propenso a la enfermedad/el trastorno en comparación con un sujeto no tratado con o al que no se han administrado las composiciones de acuerdo con la presente invención y/o que el sujeto es más capaz de contrarrestar o vencer la enfermedad/el trastorno en comparación con un sujeto no tratado con o al que no se han administrado las composiciones de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona la administración de una cantidad eficaz de una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención a un sujeto, en la que dicha composición se coadministra con un antígeno o determinante antigénico.

5 Cuando la composición se coadministra con un antígeno o determinante antigénico de acuerdo con la presente invención, el antígeno o determinante antigénico puede ser adecuadamente un antígeno o determinante antigénico procedente de uno o más de los siguientes: vacuna de BCG (bacilo de Calmette y Guérin), vacuna de toxoide de la difteria, vacuna de difteria/tétanos/pertussis (DTP o Triple), vacuna de pertussis, vacuna de toxoide del tétanos, vacuna del sarampión, vacuna de las paperas, vacuna de la rubeola, OPV (vacuna oral de la poliomielitis), *Mycobacterium vaccae*, o una de sus partes (según se enseña en el documento GB0025694.1), y un antígeno de plasmodium genérico, por ejemplo un antígeno del parásito de la malaria. Adecuadamente, dos o más, o tres o más, de tales antígenos o determinantes antigénicos pueden coadministrarse con una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención.

15 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de uno o más de: una infección (p. ej. bacteriana, viral, por ejemplo una infección provocada por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello, o una infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección; una enfermedad autoinmune (p. ej. un trastorno vascular, tal como trastorno vascular obliterativo, artritis y rechazo de injertos); estrés (por ejemplo, estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico); una alergia (p. ej. asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos - tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos)); huélfago; COPD; PMWS; PDNS; SIPH y cáncer (por ejemplo melanoma o adenocarcinoma o un cáncer relacionado con virus tal como, por ejemplo, cánceres cervicales); un desequilibrio del sistema inmunológico (p. ej. un desequilibrio del sistema inmunológico en niños y ancianos); y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de una o más de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis.

30 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de infecciones virales, por ejemplo infecciones por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales o displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello, por ejemplo.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de uno o más de una enfermedad autoinmune, un trastorno vascular obliterativo y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia neointima y/o la formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), artritis y rechazo de injertos.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de estrés, tal como, por ejemplo, estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico.

40 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de uno o más de asma (incluyendo asma alérgica), fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias - tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos - tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos). Más preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de asma, incluyendo asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos - tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos).

45 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de una o más de COPD y huélfago.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de uno o más de PMWS y PDNS.

50 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de SIPH.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de cánceres (por ejemplo melanoma y/o adenocarcinoma y/o cánceres relacionados con virus, tales como, por ejemplo, cánceres cervicales).

- 5 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico en ancianos.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de estrés o infección posoperatorios.

Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico en niños.

- 10 Preferiblemente, un medicamento de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento o la prevención de una reacción adversa a vacunas infantiles y/o sus consecuencias.

La composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención comprende bacterias procedentes de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*. Adecuadamente, la composición puede comprender dos o más, o tres o más, bacterias procedentes de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*.

- 15 Adecuadamente, la bacteria para el uso de acuerdo con la presente invención se puede usar junto con otras bacterias inmunopotenciadoras tales como bacterias procedentes de cualquiera de los siguientes géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardiodides*, incluyendo cualquier especie de cualquiera de estos géneros, tales como, por ejemplo, *Gordonia bronchialis*, *G. amarae*, *G. sputti*, *G. terrae*, *Nocardia asteroides*, *Dietzia maris*, *Tsukamurella paurometabola*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodnii*, *R. coprophilus*, *Nocardiodides albus* y *Tsukamurella inchoensis*.
- 20

Adecuadamente, las especies usadas de cada género particular son las que pueden crecer sobre medio, que es un medio poco, preferiblemente no, antigénico. Solamente a modo de ejemplo, un medio no antigénico adecuado es medio de Sauton.

- 25 Más preferiblemente, las bacterias que han de usarse junto con las bacterias para el uso de acuerdo con la presente invención son del género *Rhodococcus*, incluyendo *Rhodococcus ruber* (previamente conocida como *Nocardia rubra*), *Rhodococcus rhodocrous*, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodococcus coprophilus*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus erythropolis*.

Más preferiblemente, una bacteria que ha de usarse junto con las bacterias para el uso de acuerdo con la presente invención es *Rhodococcus ruber*.

- 30 Solamente a modo de ejemplo, uno o más de los organismos *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodocrous*, *Rhodococcus rhodnii*, *Dietzia maris* y *Gordonia terrae* junto con las bacterias para el uso en la presente invención pueden ser eficaces en el tratamiento y/o la prevención de infecciones parasitarias.

- 35 Solamente a modo de ejemplo, uno o más de los organismos *Tsukamurella inchoensis*, *Gordonia amarae* y *Nocardia asteroides* junto con las bacterias para el uso en la presente invención pueden ser particularmente eficaces en el tratamiento y/o la prevención de alergias, tales como alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo, y/o el tratamiento y/o la prevención de cánceres, incluyendo neoplasmas cutáneos tales como sarcoide equino.

- 40 Solamente a modo de ejemplo, *Rhodococcus coprophilus* junto con las bacterias para el uso en la presente invención pueden ser particularmente eficaces en la modulación de infecciones, en particular infecciones parasitarias, y/o la potenciación del crecimiento en ganado.

En una realización de la presente invención, células enteras de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* se pueden usar junto con *Rhodococcus coprophilus* en la prevención o el tratamiento de PMWS y/o PDNS.

- 45 En una realización de la presente invención, células enteras de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* se pueden usar junto con *Tsukamurella inchoensis* en la prevención o el tratamiento de SIPH.

Preferiblemente, la bacteria de acuerdo con la presente invención se mata antes del uso.

- 5 Preferiblemente, la bacteria de acuerdo con la presente invención se mata mediante tratamiento térmico de la misma, por ejemplo, tratamiento térmico en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Otros tratamientos adecuados para destruir la bacteria pueden incluir radiación ultravioleta o ionizante o tratamiento con productos químicos tales como fenol, alcohol o formalina. Adecuadamente, la radiación ionizante puede llevarse a cabo mediante exposición a 2,5 Mrads desde una fuente de CO₆₀.

Preferiblemente, la bacteria de acuerdo con la presente invención se purifica y/o se aísla.

Preferiblemente, la bacteria de acuerdo con la presente invención se suspende en agua o disolución salina tamponada, adecuadamente borato tamponado a pH 8.

- 10 El término "sujeto", según se usa en la presente memoria, significa un animal. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, un ave, un pez o un crustáceo, incluyendo, por ejemplo, ganado y seres humanos. En algunos aspectos de la presente invención, el sujeto puede ser adecuadamente un ser humano.

En un aspecto de la presente invención, por ejemplo en el tratamiento de PMWS y/o PDNS, el sujeto puede ser un cerdo.

- 15 En otro aspecto de la presente invención, por ejemplo en el tratamiento de COPD, huélfago y/o *Culicoides*, el sujeto puede ser un caballo.

En otro aspecto de la presente invención, por ejemplo en el tratamiento de SIPH, el sujeto puede ser un pez (tal como koi) o un animal de carreras (tal como un ser humano, un caballo, un camello o un galgo). Preferiblemente, el sujeto es un animal de carreras.

- 20 El término "inmunomodulador", según se usa en la presente memoria, incluye una vacuna.

En algunas realizaciones de la presente invención, el término "cepa rugosa" se refiere a una cepa rugosa estable. Por "estable" se entiende que una cepa rugosa retiene su morfología colonial rugosa durante más de o igual a 20 cultivos sucesivos.

- 25 El término "morfología colonial" o "morfología de las colonias", según se usa en la presente memoria, significa las características de cultivo de una bacteria sobre una placa de agar.

El término "rugosa", según se usa en la presente memoria, significa distinto de lisa. El término "rugosa", según se usa en la presente memoria, puede incluir características tales como morfología irregular de las colonias y puede incluir, por ejemplo, morfología ondulada y/o lobulada.

- 30 En otra realización de la presente invención, el término "rugosa", según se usa en la presente memoria, significa que la cepa es incapaz y/o sustancialmente incapaz de producir O-polisacárido.

PRODUCCIÓN DE CEPAS RUGOSAS

Algunos aspectos de la presente invención se refieren a métodos para producir una cepa rugosa de bacterias mediante exposición de las bacterias a 4,4'-diaminodifenilsulfona o al uso de esta sulfona para producir cepas rugosas.

- 35 Tales métodos y usos se basan en el hallazgo sorprendente de que la exposición de una bacteria (tal como una variante lisa de *Mycobacterium*) a la sulfona da como resultado la producción de variantes rugosas.

La bacteria para uso en un método de la presente invención es del género *Mycobacterium*. Adecuadamente, dicha bacteria es de *Mycobacterium obuense*.

- 40 Adecuadamente, una bacteria para uso en el método de la presente invención puede hacerse crecer sobre cualquier medio adecuado, tal como medio Middlebrook 7H11.

La bacteria para uso en la presente invención se expone a una concentración de la sulfona en una concentración de más de o igual a 7,5 µg/ml y menos de 20 µg/ml. Preferiblemente, en una concentración de más de o igual a 10 µg/ml. Preferiblemente en aproximadamente 12 µg/ml..

5 Adecuadamente, la sulfona puede mezclarse con un medio adecuado y se puede hacer crecer una bacteria sobre el mismo.

Además pueden aislarse las colonias rugosas de una bacteria producida por un método de la presente invención

Adecuadamente, las colonias rugosas de una bacteria producida mediante un método de la presente invención pueden ser estables.

10 En algunas realizaciones de la presente invención, el término "cepa rugosa" se refiere a una cepa de bacterias que es capaz de retener una morfología rugosa durante al menos 3 cultivos repetidos en ausencia de su sulfona y/o sulfonamida.

SULFONA

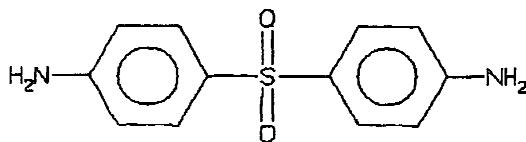
El término sulfona se refiere a

4,4'-diaminodifenilsulfona y/o uno de sus análogos.

15 La 4,4'-diaminodifenilsulfona es comúnmente comercializada por Sigma bajo la marca comercial Dapsone™.

20 Sinónimos de 4,4'-diaminodifenilsulfona incluyen N,N'-difenilsulfonadiamida; 4,4'-sulfonildianilina; di(p-aminofenil)sulfona; Novophone; Diaphenilsulfon; Dumitone; Diphone; 4-aminofenilsulfona; bis(p-aminofenil)sulfona; WR 448; F 1358; Croysulfone; Diphenasone; metabolito C; Dapsone (USAN); 1,1'-sulfonilbis[4-aminobenceno]; diaminodifenilsulfona; di(4-aminofenil)sulfona; p,p'-sulfonildianilina; bis(4-aminofenil)sulfona; 4,4'-sulfonilbisbenzamina; Eporal; DADPS; diafenilsulfona; dapsona; Avlosulfon; 4,4'-sulfonilbisbencenamina; 4,4'-sulfonildianilina; Udolac; DDS, pharmaceutical; DSS; DDS; p,p'-diaminodifenilsulfona; Sulfadione; Disulone; Avlosulfone; p-aminofenilsulfona; Dapson; Sulfona; NSC 6091D y diaminodifenilsulfona.

En término "Dapsone™", según se usa en la presente memoria, se refiere a N,N'-difenilsulfonadiamida y se refiere a cualquier compuesto que tenga la siguiente fórmula:



25 USOS TERAPÉUTICOS

Los inmunomoduladores de la presente invención se pueden usar en terapia. En particular, tales compuestos se pueden usar para modular respuestas de linfocitos T *in vivo* y/u otras células implicadas en una respuesta inmunitaria *in vivo*.

30 Las composiciones inmunomoduladoras capaces de modular, en particular bloquear, la proliferación y/o la diferenciación y/o la actividad de células T se pueden usar frente a cualquier trastorno que sea susceptible de prevención o tratamiento mediante la modulación de una respuesta inmunitaria adaptativa, es decir, una respuesta celular inmune.

35 Adecuadamente, las composiciones de acuerdo con la presente invención se usan para modular una respuesta celular inmune para tratar o prevenir uno o más de: una enfermedad infecciosa (tal como una infección bacteriana, p. ej. *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, tuberculosis, incluyendo tuberculosis resistente a múltiples fármacos, y lepra; infecciones virales crónicas, por ejemplo hepatitis, HIV e infecciones provocadas por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello; infecciones virales latentes, tales como, por ejemplo, herpes (*Herpes zoster*) o calenturas (*Herpes simplex*); o infecciones parasitarias, por ejemplo malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis, infección con

40

especies de *Eimeria* en aves de corral y toxoplasmosis); una alergia (tal como dermatitis alérgica o asma alérgica); una enfermedad autoinmune (p. ej. un trastorno vascular, tal como trastorno vascular obliterativo, artritis y rechazo de injertos); estrés (tal como estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico); PMWS, PDNS, SIPH y cáncer (por ejemplo, la composición puede administrarse regularmente a lo largo de toda la vida del adulto para contrarrestar los efectos del tabaco).

En el documento WO-A-98/09985 se proporciona una lista más exhaustiva de trastornos. Para que sirva de referencia, se proporciona ahora parte de esa lista: inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, inflamación asociada con ulceración aftosa, colitis ulcerativa, fibrosis hepática, cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas, dermatitis, en particular dermatitis atópica, p. ej. eczema, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, p. ej. leucemia, otros cánceres.

Enfermedades infecciosas

Las composiciones capaces de modular, en particular estimular (es decir, inducir o potenciar) la proliferación y/o la diferenciación de células T o de prevenir la inducción de o invertir la anergia de células T se pueden usar generalmente para reforzar o inducir respuestas inmunitarias de células T. Virtualmente todas las respuestas inmunitarias adaptativas requieren la activación de células T y su diferenciación en células que producen citoquinas. Así, estas composiciones se pueden usar generalmente para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas – tales como virales o bacterianas. Adecuadamente, estas composiciones se pueden usar para prevenir y tratar infecciones parasitarias, p. ej. malaria, leishmaniasis, toxoplasmosis y tripanosomiasis). Adecuadamente, estas composiciones se pueden usar para prevenir o tratar infecciones virales, por ejemplo infecciones provocadas por papilomavirus, incluyendo sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello.

En un aspecto de la presente invención, la infección es preferiblemente tripanosomiasis.

En otro aspecto de la presente invención, la infección es preferiblemente una provocada por papilomavirus, particularmente papilomavirus bovino 1 y 2. En un aspecto adicional de la presente invención, la infección es preferiblemente una o más de sarcoide equino, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello.

Sarcoide Equino

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para prevenir y tratar el sarcoide equino.

El sarcoide equino es el neoplasma cutáneo más común de los caballos y está asociado con infección con papilomavirus bovino 1 y 2 (Chambers et ál J. Gen. Virol. 2003: 84: 1055-1062). Esta afección no tiene actualmente un tratamiento eficaz, aunque la cirugía, un tratamiento inmunitario no específico y los fármacos citotóxicos pueden tener algún efecto.

Las composiciones de la presente invención se administran preferiblemente en el mismo área de drenaje del nódulo linfático que una lesión o neoplasma.

PMWS y PDNS

El síndrome de debilitamiento multisistémico posdestete (PMWS) afecta a cochinitos después del destete de 4 a 16 semanas de edad (15-50 kg). Típicamente, el PMWS afecta a los cochinitos de una a dos semanas después del destete y es muy diferente del destetado debilitado/delicado que no come o bebe adecuadamente después del destete. Los cochinitos con PMWS son destetados que han empezado a crecer y a continuación se debilitan rápidamente y a menudo tienen una respuesta a antibióticos extremadamente pobre.

El síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS) afecta a cerdos de 8 a 18 semanas de edad y los signos más obvios son ronchas en la piel de color rojo-púrpura, que se vuelven marrones y se encostran después de unos pocos días. Los cerdos están aletargados y pueden tener las patas hinchadas como resultado de la nefropatía. Además, este síndrome responde débilmente a antibióticos.

Los agentes causales tanto del PMWS como del PDNS son actualmente desconocidos. La sospecha más probable en ambos síndromes es un circovirus porcino "tipo II" que es antigénicamente distinto de los circovirus porcinos "tipo I" no patógenos normales ampliamente distribuidos. Un circovirus II (PCV II) se ha identificado serológicamente en

granjas del Reino Unido. El PDNS, que se cree que es una enfermedad mediada por un complejo inmunitario, también puede implicar en su etiología bacterias, aunque no está claro el papel que representan.

Adecuadamente, las composiciones de la presente invención también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de PMWS y/o PDNS.

5 SIPH

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para prevenir y tratar SIPH. La invención también se puede usar para tratar el edema pulmonar de gran altitud (HAPE). La hemorragia pulmonar inducida por estrés (SIPH) es una afección que provoca sangrado de los vasos sanguíneos dentro del pulmón cuando el animal está estresado. El término "SIPH", según se usa en la presente memoria, puede abarcar la afección HAPE (edema pulmonar de gran altitud), que es una afección provocada por fallo por estrés de los capilares pulmonares que permite la captación de fluido en el pulmón (también conocido como pulmón húmedo). Además, el término "SIPH", según se usa en la presente memoria, también puede abarcar hemorragia pulmonar inducida por ejercicio (EIPH), que es una afección común que provoca sangrado de los vasos sanguíneos dentro del pulmón durante un ejercicio intensivo.

El HAPE es una afección potencialmente letal que típicamente se produce 2 a 4 días después de ascender hasta altitudes por encima de 3000 m. Con las velocidades de ascensión habituales, la incidencia es aproximadamente 1% a 2%, pero tanto como 10% de las personas que ascienden rápidamente hasta 4500 m pueden desarrollar la afección. El HAPE puede estar precedido por mal de montaña agudo, pero no siempre es el caso. El síntoma predominante es disnea con tolerancia al ejercicio reducida. A menudo hay una tos seca en primer lugar, pero esta puede avanzar hasta una tos que produce esputo espumoso manchado de sangre. La taquipnea y la taquicardia son comunes durante el examen.

Se sabe que la EIPH afecta a mamíferos, particularmente mamíferos de carreras, tales como caballos, galgos, camellos y seres humanos. Se sabe que la EIPH afecta a mamíferos, particularmente mamíferos de carreras, después de un ejercicio intenso.

La EIPH se describe muy ampliamente en caballos de pura sangre, en los que se cree que provoca una pérdida de rendimiento, pero también se ha observado en caballos de carreras de raza estándar (trote o paso), polo, concursos de saltos, campo a través y de carreras de barriles. La EIPH es una afección común que se cree que afecta hasta a 85% de los atletas equinos.

Los síntomas de la EIPH varían de sangrado menor detectado al observar los glóbulos rojos en fluido broncoalveolar obtenido mediante fibroscopía, a sangre que aparece en la espuma mucosa alrededor de las fosas nasales al final de una carrera. Aunque en la mayoría de los casos graves, la EIPH se manifiesta como sangrado de las fosas nasales (epistaxis), muchos caballos no muestran signos. El uso de endoscopia ha mostrado que 40-75% de caballos de pura sangre tiene sangre en la tráquea después de correr. La diagnosis también puede alcanzarse mediante lavatorio traqueal y mediante lavado broncoalveolar (BAL).

35 Alergia

Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para prevenir y tratar alergias (p. ej. asma, incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias – tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos).

La picazón dulce es una de las enfermedades cutáneas más comunes observadas en caballos, particularmente en caballos salvajes y/o ponis. Aproximadamente 3% de los caballos en el Reino Unido están afectados en algún grado. La mayoría de los caballos muestran signos entre 1 y 4 años de edad y la afección generalmente empeora durante el verano. Ciertas razas son particularmente propensas a la enfermedad. Shires, Hackneys y los ponis escoceses e islandeses se han sugerido todos como razas propensas. La picazón dulce está provocada por hipersensibilidad a las picaduras de la diminuta mosca *Culicoides*. En el Reino Unido, la mosca está presente de abril a octubre pero alcanza un máximo en los números de mayo a septiembre. Las moscas se alimentan del caballo en zonas específicas habitualmente alrededor de la cabeza de la cola y bajo la crin. Hay 20 especies de *Culicoides* presentes en el Reino Unido y algunas se alimentan bajo el abdomen de los caballos.

Solamente a modo de ejemplo, las composiciones de la presente invención también se pueden usar para prevenir y/o tratar el choque anafiláctico al administrarlas a un sujeto, sujeto que tiene una predisposición a sufrir choque anafiláctico (por ejemplo, un sujeto que se sabe que tiene una alergia, tal como, por ejemplo, una alergia a los

cacahuetes) con una composición de acuerdo con la presente invención, para reducir así la predisposición del sujeto a choque anafiláctico si entra en contacto (accidentalmente) con el antígeno, p. ej. cacahuetes, pongamos por caso, hacia los que puede reaccionar adversamente.

Huélfago/COPD

- 5 Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para prevenir y tratar el huélfago y/o COPD (enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

El huélfago es una enfermedad pulmonar equina con similitudes con el asma y la COPD humanas. Los signos clínicos en el caballo se inician por una respuesta alérgica a las partículas del polvo del heno en pulmones ya dañados con un grado de fibrosis. Se observa muy a menudo en caballos viejos (más de seis años de edad) que
10 están estabulados durante los meses de invierno. El heno contiene microorganismos – tales como bacterias y hongos – así como partículas diminutas de granos de pienso, plantas, heces, caspa y polen. Estas partículas diminutas se convierten en aerosol en el polvo de heno y ocasionan una respuesta alérgica y fibrosis cuando son inhaladas por caballos con huélfago. Se cree que los principales microorganismos que están implicados en la etiología del huélfago son *Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris* y *Faenia rectivirgula*. Tanto la
15 reducción del broncoespasmo del asma como de la fibrosis de COPD están dentro del alcance de la patente.

Enfermedades autoinmunes

Las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir una enfermedad autoinmune mecánicamente relacionada con una pobre regulación de células T y/o desregulación de células T. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen una o más de las siguientes: reacciones inmunitarias no deseadas e
20 inflamación, incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoide, psoriasis, artropatía psoriásica, trastornos vasculares, en particular un trastorno vascular en el que hay inflamación de la íntima del vaso sanguíneo, ejemplos de trastornos vasculares son formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), uveitis anterior e hiperplasia mioíntima después de angioplastia; tiroiditis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, perturbaciones de la conducción cardíaca, infarto de miocardio, aborto habitual, retinitis pigmentosa, componentes inmunitarios e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fundus, inflamación asociada con enfermedades o
25 afecciones o trastornos autoinmunes en los que, tanto en el sistema nervioso central (CNS) como en cualquier otro órgano, sería beneficiosa la supresión inmunitaria y/o de la inflamación, enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, síndrome de Guillain-Barre, miastenia grave, rechazo de injertos en casos de trasplante de células, tejidos y órganos naturales o artificiales tales como córnea, médula ósea, órganos, cristalino, marcapasos, tejido cutáneo natural o artificial.
30

Con más detalle: las enfermedades autoinmunes específicas de órganos incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple y enfermedades inflamatorias del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa).

Las enfermedades autoinmunes sistémicas incluyen: artritis reumatoide.

35 Los trastornos vasculares incluyen trastornos vasculares en los que hay inflamación de la íntima de los vasos sanguíneos.

Adecuadamente, los trastornos vasculares de acuerdo con la presente invención pueden incluir cualquier enfermedad o trastorno vascular que comprenda un elemento autoinmune, por ejemplo uno que está provocado por una respuesta autoinmune.

40 Adecuadamente, los trastornos vasculares de acuerdo con la presente invención pueden incluir uno o más de enfermedad y fenómeno de Raynaud, uveitis anterior, trastorno vascular obliterativo, formación de ateromas (conocida de otro modo como arteriosclerosis), arteritis, hiperplasia mioíntima (natural o después de angioplastia), engrosamiento inflamatorio y autoinmune de la íntima y/o la capa muscular de los vasos sanguíneos, lesiones inflamatorias de los vasos sanguíneos, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, perturbaciones de la conducción cardíaca, infarto de miocardio.

45 Adecuadamente, el rechazo de injertos de acuerdo con la presente invención puede ser rechazo de injerto crónico, particularmente en ausencia de un inmunosupresor. Así, la composición de acuerdo con la presente invención se puede usar como un sustituto del inmunosupresor convencional administrado antes de, durante y/o después del trasplante. Las composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden usar cuando se trasplantan células, tejidos y órganos naturales o artificiales, tales como uno o más de los siguientes: córneas, médula ósea, órganos (p. ej. riñón, hígado), cristalino, marcapasos, tejido cutáneo natural o artificial, células de los islotes.
50

Preferiblemente, las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar las siguientes enfermedades autoinmunes: un trastorno vascular, artritis, rechazo de injertos y los aspectos inmunológicos que subyacen a la hiperplasia neoíntima y la formación de ateromas.

Estrés

- 5 El estrés se presenta a menudo como un síntoma de la vida moderna, el estilo de vida de alta presión de los ejecutivos, cuyas consecuencias se percibe ampliamente que conducen a afecciones patológicas importantes tales como úlceras gástricas, hipertensión, enfermedad cardíaca y apoplejías. Otros episodios estresantes principales de la vida tales como un divorcio, un duelo y una mudanza se observan como factores de alto riesgo para la enfermedad cardíaca.
- 10 Estos no son conceptos equivocados, la industria ganadera conoce bien las pérdidas económicas resultantes de someter al ganado a estreses importantes tales como superpoblación, confinamiento y transporte que conducen a una propensión incrementada a infección y a la precipitación de una patología subyacente. La investigación por parte de doctores y científicos está produciendo un volumen creciente de trabajo publicado que muestra que estreses definibles tales como el confinamiento pueden dar como resultado cambios significativos en la actividad
- 15 endocrina (hormonal) que subsiguientemente pueden afectar a las funciones inmunitarias del cuerpo. Esto puede demostrarse notablemente en el estrés traumático grave (incluyendo estrés quirúrgico) en el que la respuesta inmunitaria mediada por células se paraliza drásticamente, Faist (1996).
- 20 Elenkov U (1999) presenta una evidencia reciente que indica que los glucocorticoides y las catecolaminas, los productos finales del sistema de estrés, y la histamina, un producto de células cebadas activadas, podrían suprimir selectivamente la inmunidad celular, y favorecen las respuestas inmunitarias humorales. Esto está mediado por un efecto diferencial de las hormonas de estrés y la histamina, sobre los patrones de Th1/Th2 y la producción de citoquinas tipo 1/tipo 2. Así, sistémicamente, el estrés podría inducir un cambio de Th2, mientras que, localmente, bajo ciertas condiciones, podría inducir actividades proinflamatorias a través de la activación neural del eje periférico factor de liberación de corticotrofina-célula cebada-histamina.
- 25 Paik (2000) y Kay (2001), en estudios independientes de estrés académico, examinaron los perfiles inmunológicos de los estudiantes durante períodos sin exámenes y con exámenes. Presentan una reducción significativa en la producción de IL-2 e interferón gamma y un incremento en IL-6.
- Esto indica que el sistema inmunológico del cuerpo responde a episodios estresantes mediante una regulación a la baja de citoquinas de Th-1 y una regulación al alza selectiva de las citoquinas de Th2.
- 30 Iwakabe (1998), usando un modelo de ratón de estrés por confinamiento, presenta la desviación de la respuesta inmunitaria hacia una inmunidad dominante para Th2.
- Este cambio inducido por hormonas de estrés hacia el desequilibrio inmunitario de Th2 también se presenta en situaciones de estrés crónico no graves tales como estrés psicosocial entre trabajadores que pasan el invierno en las estaciones de la Australian National Antarctic Research Expedition, (Mehta (2000)). También presentan un
- 35 incremento asociado en reactivaciones de virus latentes.
- Se presentan cambios en hormonas de estrés e inmunológicos similares a partir del estrés crónico en cuidadores de pacientes con demencia (Bauer (2000)) y en astronautas durante la misión Euromir 95 (Norbiato (1998)). De particular interés era que los astronautas incrementaban la sensibilidad a la infección.
- 40 El cuerpo está diseñado para recuperarse del estrés y en el estrés agudo lo hace claramente, ya que el riesgo de infección disminuye con la recuperación del paciente del trauma grave.
- Sin embargo, el estrés crónico parece mantener el desequilibrio inmunitario dominado por Th2. Esta es una consecuencia muy importante ya que todos los autores apuntados aluden a que el estrés a través de los mecanismos anteriores influye posiblemente en el comienzo y/o el curso de enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y neoplásicas.
- 45 Esta consecuencia también es apoyada por Lawrence (2000).
- Un inmunorregulador, preferiblemente, un inmunorregulador administrado oralmente, de acuerdo con la presente invención, que estimula la respuesta Th1 y regula a la baja Th2 puede restaurar el equilibrio sano del sistema inmunológico y así reducir el riesgo incrementado de una dolencia grave asociada con el estrés crónico.

Preferiblemente, la composición de acuerdo con la presente invención se usa para tratar y/o prevenir el estrés, en particular estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico.

Preferiblemente, la composición de acuerdo con la presente invención se usa para tratar y/o prevenir el estrés en animales, adecuadamente en seres humanos y/o ganado.

5 Desequilibrio del sistema inmunológico

Un desequilibrio del sistema inmunológico – tal como una regulación al alza, una regulación a la baja o una respuesta celular inmune inapropiadamente regulada – puede producirse en cualquier momento en la vida de un sujeto. Adecuadamente, las composiciones que han de usarse para modular un desequilibrio del sistema inmunológico, es decir, las composiciones de acuerdo con la presente invención, se pueden usar para tratar y/o

(a) En niños

Adecuadamente, la composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica se puede usar para modular un desequilibrio del sistema inmunológico, en niños, incluyendo bebés, infantes y jóvenes. Un desequilibrio del sistema inmunológico - tal como una regulación al alza, una regulación a la baja o una respuesta celular inmune inapropiadamente regulada – puede producirse en niños después de la vacunación, por ejemplo después de vacunas infantiles. Tal desequilibrio del sistema inmunológico puede dar como resultado afecciones tales como el comienzo de alergias, es decir dermatitis alérgica y asma alérgica.

Con el objetivo de proteger a los niños de infecciones, se suministran inyecciones repetidas contra difteria, tétanos, pertussis, polio, sarampión, paperas y rubeola. Todas estas se consideran necesarias y las autoridades sanitarias ejercen presión para asegurar que los niños se presenten a la vacunación en el momento apropiado. Sin embargo, la mayoría de las vacunas suministradas al principio de la vida contienen un adyuvante de alumbre, que tiene importantes consecuencias inmunológicas. El alumbre es un potente estímulo para el patrón de respuesta Th2 y la desregulación inmunitaria consecuente hace que los niños se vuelvan vulnerables, por ejemplo, al desarrollo de alergias y posiblemente cáncer.

Es posible reeducar al sistema inmunológico para un reconocimiento, una regulación y una respuesta apropiados tanto a sí mismo como al resto del mundo.

Adecuadamente, la composición inmunomoduladora se puede usar también para el tratamiento o la prevención de una reacción adversa a vacunas infantiles – tales como vacunas contra la tos ferina y las recientes vacunas contra MMR - y/o sus consecuencias.

30 (b) Desequilibrio del sistema inmunológico en ancianos

Se puede producir en personas mayores, generalmente por encima de 60 años, un desequilibrio del sistema inmunológico – tal como una regulación al alza, una regulación a la baja o una respuesta celular inmune inapropiadamente regulada, en particular regulación a la baja, por ejemplo un deterioro de la función inmunitaria –. En las personas mayores, una regulación a la baja en la respuesta celular inmune se denomina generalmente inmunosenescencia. Típicamente, el deterioro de la función inmunitaria puede conducir a una propensión incrementada, por ejemplo, a enfermedades infecciosas y neoplasia. El número de personas mayores como una proporción de la población está incrementándose drásticamente y la medicina geriátrica se está convirtiendo en un aspecto importante de la práctica clínica. Por lo tanto, no es sorprendente que la investigación se haya enfocado a los mecanismos de inmunosenescencia y las conexiones entre la salud del sistema inmunológico y la longevidad. Goronzy (2001) examinó la eficacia variable de la vacunación contra la gripe en ancianos. En este estudio, solo 17% de los sujetos mostraba un aumento en la concentración para las 3 hemaglutininas (vacunación satisfactoria) 1 mes después de la vacunación y que 46% no mostraba en absoluto una respuesta demostrable. Se propuso que la sensibilidad a la gripe es un marcador biológico de inmunosenescencia útil. Un número de investigadores ha estudiado diversos aspectos de la función inmunitaria en ancianos. Por ejemplo, Lio (2000) estudió respuestas de citoquinas, Solana (2000) estudió células NK y NKT y Ginaldi (1999) sugirió que un cambio de producción de citoquinas de Th1 a Th2 y una producción incrementada de citoquinas proinflamatorias podían explicar muchos aspectos de episodios patológicos asociados con la edad, tales como aterosclerosis y osteoporosis. De acuerdo con esto, se requiere una estimulación no patológica del sistema inmunológico que lleve una respuesta de citoquinas desde la Th2 proinflamatoria hacia Th1. Preferiblemente, tal inmunomodulador reduce la mortalidad por infección aguda, contrarresta el comienzo y reduce la morbilidad de una enfermedad autoinmune relacionada con la edad y posiblemente reduce el grado de enfermedad neoplásica, todos los cuales están relacionados con la inmunosenescencia.

Típicamente, una composición inmunomoduladora de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede ser un inmunopotenciador.

Se ha investigado en este área el papel potencial de bacterias intestinales o lácteas comensales probióticas. Por ejemplo, se ha presentado que los productos lácteos suplementados con 5×10^9 o 5×10^{10} *Bifidobacterium lactis* o *Lactobacillus rhamnosus* por dosis tomados diariamente durante 3 semanas incrementan los números de células NK, CD4 y CD25 en sangre periférica y refuerzan generalmente la inmunidad celular sistémica en ancianos (Gill, (2001)).

Actualmente se están promoviendo activamente como “potenciadores del estilo de vida” un número de productos que contienen altos números de lactobacilos y otra flora comensal intestinal. Una revisión de Sanders (2001) sobre los efectos probióticos reivindicados de *Lactobacillus acidophilus*, disponible como un fármaco desde 1950, sugiere que sus efectos requieren una validación y clarificación adicionales del mecanismo de acción. Aunque hay un efecto beneficioso procedente de reemplazar la flora del intestino después de una enfermedad diarreica y combatir la candidiasis después de una terapia con antibióticos, la inmunoestimulación parece poco fiable y de corta duración. Sin embargo, este trabajo identifica claramente un papel para un potente inmunomodulador administrado oralmente, preferiblemente destruido a fin de evitar las dificultades de mantener productos vivos.

La vacunación oral es un mecanismo satisfactorio establecido desde hace mucho tiempo para inducir inmunidad protectora local contra patógenos orales/fecales – tales como polio. Sin embargo, se ha mostrado que las vacunas administradas oralmente ocasionan respuestas inmunitarias protectoras sistémicas tanto mediadas por células como humorales. Sharpe (2002) usaba un constructo de adenovirus administrado oralmente que contenía antígeno del virus del sarampión para inducir respuestas de anticuerpos sistémicos y linfocitos esplénicos al antígeno del sarampión. Manube (2002) ha desarrollado un modelo para mostrar que *Mycobacterium microti* atenuado administrado oralmente proporciona un nivel de protección superior a una incitación en forma de aerosol con tuberculosis que BCG administrado subcutáneamente tradicional.

Kim (2001) mostraba que alimentar con polen de cedro japonés producía tolerancia oral a una alergia específica inducida por la inyección subsiguiente de polen en aceite. Esto se asoció con niveles de inmunoglobulina específica disminuidos y una reducción significativa en la producción de interleuquina-4, es decir, la respuesta TH2 se regulaba a la baja.

Por lo tanto, una respuesta inmunitaria sistémica puede tanto estimularse como modularse mediante la administración – tal como la administración oral – de un inmunomodulador adecuado.

Adecuadamente, en un aspecto de la presente invención, se prevé que una célula entera de la bacteria de acuerdo con la presente invención pueda incluirse en una preparación alimenticia y/o pueda suministrarse como un tipo de “remedio”, preferiblemente oralmente.

Potenciación del sistema inmunológico

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en la fabricación de un medicamento para potenciar el sistema inmunológico en un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente ganado y/o animales de carreras, que puede dar como resultado, por ejemplo, una potenciación (p. ej. promoción) del crecimiento y/o un incremento en la eficacia de utilización de alimento y/o un bienestar generalmente incrementado (es decir, la salud global del sujeto se mejora) en el sujeto. La salud global de un sujeto puede determinarse mediante uno o más de los siguientes parámetros, por ejemplo: datos de peso (siendo la ganancia de peso un determinante positivo), alerta (siendo la alerta total un determinante positivo), movimiento (siendo el movimiento enérgico en oposición al movimiento letárgico un determinante positivo) y malestar (siendo una cantidad reducida de malestar un determinante positivo). Típicamente, la composición inmunomoduladora de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede ser un inmunopotenciador.

Ventajosamente, la composición inmunomoduladora de la presente invención se puede usar para reemplazar antibióticos que se usan actualmente para promover el crecimiento de ganado.

El término “ganado”, según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, el ganado es uno o más de aves de corral (incluyendo pollos), cerdos (incluyendo cochinitos), ovejas (incluyendo corderos), vacas y toros (incluyendo terneros). Más preferiblemente, ganado significa cerdos – incluyendo cochinitos.

La presente invención también contempla que los géneros de la presente invención se administren en combinación con bacterias conocidas, para la modificación de la respuesta celular inmune.

Los antibióticos actualmente comercialmente disponibles se usan comúnmente como aditivos alimentarios potenciadores dietéticos (o promotores del crecimiento) y se incorporan en el pienso para animales. Sin embargo, se espera que la UE introduzca una prohibición completa sobre el uso no clínico de antibióticos en la cría de ganado. Por lo tanto, el mercado requiere alternativas eficaces.

- 5 Una ventaja de la presente invención es que se puede usar (opcionalmente junto con buenas prácticas de cría de ganado) como un sustituto de un aditivo alimentario potenciado dietético (o promotores del crecimiento).

Las composiciones inmunomoduladoras de la presente invención pueden administrarse como un aditivo alimentario cuando se usan para potenciar el sistema inmunológico.

Cáncer

- 10 Adecuadamente, las composiciones de acuerdo con la presente invención se usan para modular una respuesta celular inmune para tratar y/o prevenir el cáncer. En particular, se prevé que las composiciones de acuerdo con la presente invención puedan usarse para proteger a un sujeto contra el desarrollo y/o el avance de un cáncer. En particular, el sujeto con una respuesta celular inmune modulada puede ser menos sensible al desarrollo de cáncer.

En particular, durante el crecimiento del cáncer se observa un incremento no regulado en Th2.

- 15 El cáncer es una enfermedad que afecta a muchas personas, produciéndose el 65 por ciento de los casos en aquellas por encima de 65 años. Como la esperanza de vida en el Reino Unido casi se ha doblado desde mediados del siglo diecinueve, la población con riesgo de cáncer ha crecido. Han caído en los últimos años las tasas de mortalidad de otras causas de muerte, tales como enfermedad cardíaca, mientras que las muertes por cáncer han permanecido relativamente estables. El resultado es que 1 de cada 3 personas será diagnosticada de cáncer durante su vida y 1 de cada 4 personas morirá de cáncer.

Los ejemplos de cáncer incluyen de vejiga urinaria, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de colon y rectal, adenocarcinoma, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, mieloma, linfoma no Hodgkin, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de tejidos blandos y de estómago.

- 25 Además, fumar tabaco de forma persistente y, en menor medida, fumar pasivamente, se han asociado con carcinomas de las partes directamente en contacto con el humo, orofaringe, tráquea, pulmones, esófago y estómago. Además de estos, tumores distantes tales como los de riñón, vejiga, páncreas, hígado y leucemia mieloide pueden incrementarse por el fumado de tabaco. En la presente invención, se prevé que las composiciones de acuerdo con la presente invención puedan administrarse a fumadores de tabaco en un intento de reducir el riesgo de los fumadores de desarrollar carcinomas asociados con el fumado de tabaco.

Adecuadamente, el cáncer puede ser un adenocarcinoma o un melanoma.

- 35 Adecuadamente, el cáncer puede ser cánceres relacionados con virus tales como, por ejemplo, el cáncer cervical. Sin querer limitarse por una teoría, en algunos casos se ha encontrado que una infección provocada por papilomavirus, tal como displasia del cuello uterino, precede al carcinoma del cuello. Así, el cáncer cervical se considera en la presente memoria un "cáncer relacionado con virus". Sin embargo, el término "cáncer relacionado con virus", según se usa en la presente memoria, significa cualquier cáncer que pueda estar provocado por o relacionado con una infección viral.

Recuperación, estrés e infección posoperatorias

Después de cualquier operación importante surge potencialmente un número de situaciones:

- 40 El estrés asociado con una operación quirúrgica incluye uno o más de los siguientes: aprensión antes de la operación, estrés a los tejidos debido a los procedimientos quirúrgicos, el dolor que habitualmente acompaña a la recuperación, preocupación acerca de la significación de los hallazgos quirúrgicos.

Estos tipos de estrés están asociados con la desviación de la función de células T hacia Th2.

- 45 Los efectos inmunosupresores de la premedicación y los anestésicos pueden persistir durante días o semanas después de la propia operación.

Para evitar dudas, el término “estrés posoperatorio”, según se usa en la presente memoria, incluye el estrés asociado con la anestesia.

Además, la exposición de la carne cortada a infección directa en el momento de la operación y de la herida a una infección en la habitación de recuperación y las salas de cirugía antes de abandonar el hospital también es un problema.

Una combinación de estos factores expone al paciente a una serie de infecciones bacterianas potenciales, que:

Puesto que el paciente está hospitalizado, incluyen infecciones hospitalarias muy conocidas tales como aquellas con *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Las operaciones del intestino exponen al paciente a infecciones Gram negativas debido a la exposición de los tejidos cortados al contenido del intestino. Las operaciones en los miembros inferiores también están sometidas a infecciones con miembros normales de la flora intestinal.

Las infecciones menores de la herida retrasan la curación e incrementan las posibilidades de contraer infecciones más graves.

Para contrarrestar estas influencias, la regulación inmunitaria hacia Th1 y una regulación a la baja de Th2 como resultado de la aplicación de la invención deben hacer uno o más de lo siguiente: incrementar la resistencia no específica a infecciones bacterianas posoperatorias; ayudar en la curación de heridas y/o reducir el estrés.

CÉLULAS T AUXILIARES

El término 'Th1', según se usa en la presente memoria, se refiere a una célula T auxiliar tipo 1 (Th1). El término también se puede usar en la presente memoria para referirse a la respuesta mediada por o a través de tal tipo de célula. Tal respuesta puede incluir uno o más de la secreción de interleuquina-2 (IL-2), la secreción de interferón-gamma (IFN-γ), la activación de macrófagos, la activación de células T citotóxicas o cualquier otro episodio asociado con Th1. Así, el término 'Th1' puede incluir una célula o células Th1 así como la respuesta o respuestas inmunitarias que producen tales célula o células.

El término 'Th2', según se usa en la presente memoria, se refiere a una célula T auxiliar tipo 2 (Th2). El término también se puede usar en la presente memoria para referirse a la respuesta mediada por o a través de tal tipo de célula. Tal respuesta puede incluir uno o más de la secreción de interleuquina-4 (IL-4), la secreción de la variante de escisión interleuquina IL-4β2, la secreción de interleuquina-5 (IL-5), el incremento en los niveles del determinante celular 30 (CD30) en linfocitos, el incremento en los niveles de inmunoglobulina-E (IgE) en la sangre o eosinófilos en la sangre, o cualquier otro episodio asociado con Th2. Así, el término 'Th2' puede incluir una célula o células Th2 así como la respuesta o respuestas inmunitarias que producen tales célula o células.

Se sabe que diversas afecciones pueden dar como resultado o resultar de una respuesta celular inmune desregulada o regulada inapropiadamente, en particular la activación y/o proliferación de Th1 y/o Th2, que se ha encontrado que si se deja desregulada o regulada inapropiadamente da como resultado uno o más efectos perjudiciales en el sujeto.

En particular, se ha encontrado que tal respuesta celular inmune desregulada o regulada inapropiadamente se produce después de una vacunación, p. ej. después de vacunaciones infantiles, y se cree que da como resultado afecciones tales como el comienzo de alergias, es decir, dermatitis alérgica y asma alérgica. A modo de ejemplo, Lewis D Curr Opin Immunol 2002; 14: 644 presentan que las respuestas inmunitarias de Th2 mediadas por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 son clave en la patogénesis de trastornos atópicos, incluyendo asma inducida por alérgenos, rinoconjuntivitis y anafilaxis. Aunque tales respuestas son reguladas a la baja en algún grado por la inmunoterapia específica convencional, este enfoque sólo es parcialmente eficaz y tiene un riesgo sustancial de efectos adversos. Muchas estrategias para la profilaxis inmunoterapéutica y para el tratamiento de enfermedades atópicas se han ideado sobre la base de modelos de alergia en ratones, incluyendo la regulación a la baja de respuestas Th2 mediante la inducción de la actividad de células T reguladoras, la desviación inmunitaria de Th2 a Th1, la regulación cruzada con Th1 de respuestas inmunitarias de Th2, la anergia y citoquinas inmunosupresoras. Choi & Koh Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 88: 584-91 examinaron si la vacunación con BCG de pacientes adultos con asma, una enfermedad alérgica asociada a Th2, es clínicamente eficaz. Se observó que la vacunación con BCG mejoraba la función pulmonar y reducía el uso de medicación en adultos con asma de moderada a grave. Esta mejoría estaba acompañada por una respuesta inmunitaria tipo Th2 suprimida, sugiriendo que la vacunación con BCG podría ser una modalidad terapéutica eficaz contra el asma. von Hertzen J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 923-8 esbozó la posibilidad de que el estrés materno prolongado asociado con una secreción de cortisol excesiva sostenida podría afectar al desarrollo del sistema inmunológico – especialmente la diferenciación de células Th1/Th2

– lo que puede incrementar adicionalmente la sensibilidad al asma y la atopía en individuos genéticamente predispuestos.

Además, una respuesta celular inmune desregulada o inapropiadamente regulada se ha observado durante el avance de la enfermedad. En particular, durante el crecimiento del cáncer se observa un incremento desregulado en Th2. A modo de ejemplo, Maraveyas et ál. Ann Oncol 1999; 10: 817-24 han estudiado la eficacia de la vacuna SRL 172 en pacientes con cáncer, es decir melanoma maligno avanzado en fase IV (AJCC). La inducción de citoquinas intracelulares (IL-2 e INF-gamma) en linfocitos de sangre periférica (PBLC) procedentes de estos pacientes se ensayó y se correlacionó con los resultados clínicos. Se demostró que SRL 172 era eficaz para inducir respuestas de IL-2 intracelulares en un número significativo de pacientes con melanoma en fase IV (AJCC). Stanford et ál. International Journal of Pharmaceutical Medicine 1999; 13: 191-195 presentan que hay una evidencia creciente de que es probable que las respuestas inmunitarias antitumorales eficaces estén mediadas por citoquinas tipo 1. Investigaciones recientes indican que *Mycobacterium vaccae* destruida térmicamente es un adyuvante de Th1 fiable y los experimentos clínicos preliminares indican efectos beneficiosos en el melanoma y el cáncer de próstata y pulmón. Estudios controlados más exhaustivamente se están efectuando actualmente para confirmar estos hallazgos.

Una respuesta celular inmune desregulada o inapropiadamente regulada se ha observado durante una infección y particularmente una infección crónica, por ejemplo durante tuberculosis progresiva, lepra lepromatosa, lexis visceral e infección por HIV y durante las alergias. A modo de ejemplo, Clerici & Shearer GM Immunol Today 1993; 14: 107-11 proponen que un cambio de Th1 a Th2 es una etapa crítica en la etiología de la infección por HIV. Clerici & Shearer Immunol Lett 1996; 51: 69-73 muestran que la inmunidad mediada por células específica de HIV puede ser la principal correlación de la protección contra infección por HIV y contra el avance de la infección por HIV hasta sida. Abbot NC et ál. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2002 24:202-8 evaluaron la inmunoterapia como un medio para mejorar el flujo de sangre periférica en pacientes con lepra crónica mediante la administración de *Mycobacterium vaccae* destruida térmicamente. Se observó que la inmunoterapia, suministrada 18 meses antes, mejoraba significativamente el flujo de sangre y la sensación de temperatura, en pacientes crónicos de lepra totalmente tratados.

De acuerdo con esto, un objetivo de la presente invención es promover y establecer la regulación de una respuesta celular inmune, incluyendo la regulación o modulación de Th1 y/o Th2, de tal modo que se venzan los efectos negativos de la respuesta celular inmune desregulada o inapropiadamente regulada.

Adecuadamente, el uso de una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención modula la respuesta Th1 o Th2, es decir, una respuesta Th1 o Th2 que da como resultado, por ejemplo, daño tisular.

Una respuesta inmunitaria desregulada o regulada inapropiadamente puede representar un papel en el establecimiento de una enfermedad debido al hecho de que algunas enfermedades provocan respuestas Th1 y/o Th2 cambiadas. Acompañando a estas reacción de Th1 y Th2 atípicas hay una serie de respuestas inflamatorias anormales, que pueden tomar parte en los mecanismos subyacentes a la patología tisular.

Solamente a modo de ejemplo, la composición inmunomoduladora y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contrarrestar las desventajas de un contacto reducido con influencias ambientales (por ejemplo, antígenos) correspondiente a la vida moderna, puede contrarrestar la influencia del tratamiento de una infección (p. ej. una infección parasitaria, tal como, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección, estrés, tal como, por ejemplo, estrés traumático grave, estrés psicosocial y estrés crónico, una alergia (p. ej. asma, incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eczema), choque anafiláctico, alergias al contacto o la ingestión de plantas, urticarias - tales como urticarias por ortigas e insectos, y alergias a picaduras de insectos – tales como mosquitos, por ejemplo, *Culicoides* (que provoca la picazón dulce en caballos), huélfago, COPD y cáncer (por ejemplo melanoma o adenocarcinoma); un desequilibrio del sistema inmunológico (p. ej. un desequilibrio del sistema inmunológico en niños, p. ej. el efecto no deseable de vacunas infantiles, y ancianos); y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.

VACUNAS

La preparación de vacunas que contienen una o más sustancias como un ingrediente o ingredientes activos es conocida para un experto en la técnica. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o el ingrediente o los ingredientes activos pueden encapsularse en liposomas. Los ingredientes activos se mezclan a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y sus combinaciones.

Alternativamente, la vacuna se puede preparar, por ejemplo, para que se ingiera oralmente y/o sea capaz de inhalarse.

Además, si se desea, la vacuna puede contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes y agentes tamponadores del pH.

5 ADMINISTRACIÓN

Típicamente, un médico determinará la dosificación real de una vacuna, una composición inmunomoduladora y una composición farmacéutica que será la más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones posteriores son ejemplares del caso medio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se consideran intervalos de dosificación superiores o inferiores.

10 Preferiblemente, la dosificación real que se usa da como resultado una toxicidad mínima al sujeto.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante inyección directa. La composición puede formularse para administración parenteral, mucosal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, intradérmica o transdérmica.

15 Adecuadamente, la composición de acuerdo con la presente invención puede administrarse a una dosis de 10^3 - 10^{11} organismos, preferiblemente 10^4 - 10^{10} organismos, más preferiblemente 10^6 - $10^5 \times 10^9$ organismos, e incluso más preferiblemente 10^6 - 10^9 organismos. Típicamente, la composición de acuerdo con la presente invención puede administrarse a una dosis de 10^8 - 10^9 bacterias para uso en seres humanos y animales.

20 Si las composiciones de la presente invención han de administrarse como inmunopotenciadores, entonces se pueden administrar a intervalos regulares 10^3 - 10^{11} organismos por dosis, preferiblemente 10^4 - 10^{10} organismos por dosis, más preferiblemente 10^6 - $10^5 \times 10^9$ organismos por dosis, y aún más preferiblemente 10^6 - 10^9 organismos por dosis, y aún más preferiblemente, 10^8 - 10^9 bacterias por dosis para uso en seres humanos y animales.

Como será fácilmente apreciado por un experto, la dosificación administrada dependerá del organismo al que se esté administrando la dosis.

25 El término "administrado" incluye el aporte mediante mecanismos de aporte que incluyen inyección, transacción mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfifilinas faciales catiónicas (CFA) y sus combinaciones, o incluso aporte viral. Las rutas de tales mecanismos de aporte incluyen, pero no se limitan a, rutas mucosal, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

30 El término "administrado" incluye, pero no se limita a, aporte mediante una ruta mucosal, por ejemplo, como una pulverización o aerosol nasal para inhalación o como una disolución ingerible; una ruta parenteral en la que el aporte es mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, una ruta intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea.

35 El término "coadministrado" significa que el sitio y el momento de la administración de cada uno de los adyuvante o adyuvantes, antígeno o antígenos y/o determinante o determinantes antigénicos de la presente invención son tales que se consigue la modulación necesaria del sistema inmunológico. Así, mientras que el antígeno o antígenos y el adyuvante o adyuvantes pueden administrarse en el mismo momento y en el mismo sitio, puede haber ventajas en la administración del antígeno o antígenos y/o el determinante o determinantes antigénicos en un momento diferente y en un sitio diferente que el adyuvante o adyuvantes. El antígeno o antígenos y/o el determinante o determinantes antigénicos y el adyuvante o adyuvantes pueden aportarse incluso en el mismo vehículo de aporte – y el antígeno o antígenos y/o el determinante o determinantes antigénicos y el adyuvante o adyuvantes pueden estar acoplados y/o desacoplados y/o genéticamente acoplados o desacoplados. Solamente a modo de ejemplo, la composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de uno o más antígenos o antígenos adicionales.

El antígeno, el determinante antigénico, el péptido o su homólogo o mimético pueden administrarse separadamente o coadministrarse al sujeto huésped como una sola dosis o en múltiples dosis.

45 La composición inmunomoduladora de la invención puede administrarse mediante un número de rutas diferentes tales como administración por inyección (que incluye inyección parenteral, subcutánea, intradérmica e intramuscular), intranasal, mucosal, oral, intravaginal, uretral u ocular.

Preferiblemente, en la presente invención, la administración es mediante inyección. Más preferiblemente, la inyección es intradérmica.

Preferiblemente, en la presente invención, la administración es mediante una composición oralmente aceptable.

5 Para la vacunación, la composición puede proporcionarse en 0,1 a 0,2 ml de disolución acuosa, preferiblemente disolución salina fisiológica tamponada, y administrarse parenteralmente, por ejemplo mediante inoculación intradérmica. Preferiblemente, la vacuna de acuerdo con la invención se inyecta intradérmicamente. Pueden encontrarse en el sitio de inyección ligeros hinchamiento y enrojecimiento, a veces algo de picazón. El modo de administración, la dosis y el número de administraciones pueden ser optimizados por los expertos en la técnica de una manera conocida.

10 ANTÍGENOS

Según se usa en la presente memoria, un "antígeno" significa una entidad que, cuando se introduce en un huésped inmunocompetente, modifica la producción de un anticuerpo o anticuerpos específicos que pueden combinarse con la entidad, y/o modifica la respuesta Th relevante, tal como Th2 y/o Th1. El antígeno puede ser una sustancia pura, una mezcla de sustancias o material soluble o en partículas (incluyendo células o fragmentos de células o un sonificado celular). En este sentido, el término incluye cualquier determinante antigénico, antígeno que reacciona cruzadamente, aloantígeno, xenoantígeno, tolerógeno, alérgeno, hapteno e inmunógeno adecuado, o sus partes, así como cualquiera de sus combinaciones, y estos términos se usan intercambiabilmente a lo largo del texto.

20 El término "determinante antigénico o epítipo", según se usa en la presente memoria, se refiere a un sitio sobre un antígeno que es reconocido por un receptor de anticuerpo o célula T, o es responsable de ocasionar la respuesta de células T auxiliares. Preferiblemente, es un péptido corto derivado de o como parte de un antígeno proteínico. Sin embargo, el término también pretende incluir glicopéptidos y epítipos de carbohidrato. El término también incluye secuencias modificadas de aminoácidos o carbohidratos que estimulan respuestas que reconocen todo el organismo.

25 Es ventajoso que el determinante antigénico sea un determinante antigénico del agente infeccioso que provoca la enfermedad infecciosa.

Una vacuna "preventiva" o "profiláctica" es una vacuna que se administra a individuos no tratados previamente para prevenir el desarrollo de una afección, tal como al estimular la inmunidad protectora.

Una vacuna "terapéutica" es una vacuna que se administra a individuos con una afección existente para reducir o minimizar la afección o para anular las consecuencias inmunopatológicas de la afección.

30 ADYUVANTES

El término 'adyuvante', según se usa en la presente memoria, significa una entidad capaz de aumentar o participar en la influencia de una respuesta inmunitaria. Un adyuvante es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que ayude, incremente, regule a la baja, modifique o diversifique la respuesta inmunitaria a un antígeno.

35 La composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más adyuvantes que potencian la eficacia de la composición inmunomoduladora y/o las composiciones farmacéuticas. Ejemplos de adyuvantes adicionales que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: células enteras de una bacteria procedente de uno o más de los siguientes géneros *Tsukamurella*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, dipéptido muramílico, endotoxina bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium obuense*, polirribonucleótidos, alginato sódico, lanolina, lisolecitina, vitamina A, interleuquinas tales como interleuquina 2 e interleuquina-12, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes están disponibles comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo, Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ.) o adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Sólo el hidróxido de aluminio está aprobado para el uso en seres humanos. Algunos de los otros adyuvantes, tales como, por ejemplo, *M. vaccae*, han sido aprobados para experimentos clínicos.

Adecuadamente, el adyuvante puede ser una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*.

En la técnica, se sabe que las vacunas de DNA, que son esencialmente secuencias de DNA ligadas a partículas de oro y que se disparan dentro de la piel mediante una pistola de helio, son sistemas de aporte de vacunas eficaces. A diferencia de las vacunas convencionales, estas vacunas de DNA no requieren un componente adyuvante tradicional. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, la composición inmunomoduladora que se define en la presente memoria se puede usar adecuadamente junto con tales vacunas de DNA para aumentar o participar en la influencia de la respuesta inmunitaria.

COMPOSICIONES

La presente invención también proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipientes farmacéuticamente aceptables (incluyendo sus combinaciones).

La composición puede comprender dos componentes – un primer componente que comprende un antígeno y un segundo componente que comprende uno de sus adyuvantes. El primer y segundo componente pueden aportarse secuencialmente, simultáneamente o conjuntamente, e incluso mediante rutas de administración diferentes.

Adecuadamente, el antígeno incluso puede engendrarse dentro de los tejidos del huésped como parte de un proceso de enfermedad. Así, el antígeno puede originarse a partir de una invasión bacteriana, huésped o parasitaria, o puede ser una liberación de sustancia de los tejidos, tal como una proteína de estrés o un antígeno tumoral.

Las composiciones pueden ser para utilización en seres humanos o en animales en medicina humana y veterinaria y típicamente comprenderán uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección de un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la ruta de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones pueden comprender como – o además de – el vehículo, excipiente o diluyente cualesquiera aglutinante o aglutinantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de revestimiento, agente o agentes solubilizantes adecuados.

Se pueden proporcionar en la composición farmacéutica conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Hay muchos requisitos de composición/formulación diferentes en función de los diferentes sistemas de aporte. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para ser aportada usando una minibomba o mediante una ruta mucosal, por ejemplo, como una pulverización o aerosol nasal para inhalación o una disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula mediante una forma inyectable, para el aporte mediante, por ejemplo, una ruta intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para ser aportada por ambas rutas.

Preferiblemente, en la presente invención la formulación es de forma inyectable. Más preferiblemente, la formulación se inyecta intradérmicamente.

Preferiblemente, en la presente invención la formulación es una composición oralmente aceptable.

Cuando el agente ha de ser aportado mucosalmente a través de la mucosa gastrointestinal, debe ser capaz de permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones pueden administrarse mediante inhalación, en la forma de un supositorio o pesario, tópicamente en la forma de una loción, disolución, crema, pomada o polvo fino, mediante el uso de un parche cutáneo, oralmente en la forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, bien solas o mezcladas con excipientes, o en la forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo intravenosamente, intramuscularmente, intradérmicamente o subcutáneamente. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden usar mejor en la forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer una disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en la forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de una manera convencional.

COMBINACIONES FARMACÉUTICAS

El agente de la presente invención puede administrarse con una o más sustancias farmacéuticamente activas. A modo de ejemplo, la presente invención cubre los tratamientos simultáneos o secuenciales con una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención, y uno o más esteroides, analgésicos, antivirales, interleuquinas tales como IL-2, u otra sustancia o sustancias farmacéuticamente activas.

Se entenderá que estos regímenes incluyen la administración de las sustancias secuencialmente, simultáneamente o conjuntamente.

INMUNOPOTENCIADOR

El término “inmunopotenciador”, según se usa en la presente memoria, significa una o más bacterias bien aisladas o bien en cultivo que, cuando se administran a un sujeto, benefician la salud de ese sujeto. Preferiblemente, este beneficio se alcanza mediante la modificación de la respuesta celular inmune del sujeto.

De acuerdo con la presente invención, los inmunopotenciadores se pueden usar, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunológico en un sujeto, preferiblemente un niño o un sujeto anciano, o para potenciar el sistema inmunológico de un sujeto, por ejemplo de un mamífero, particularmente de ganado o de seres humanos.

Los inmunopotenciadores pueden administrarse mediante el consumo en alimento especialmente diseñado o en piensos, por ejemplo piensos para cerdos suplementados con las bacterias de la presente invención.

Los inmunopotenciadores también pueden administrarse mediante otras rutas – tales como inyección directa.

Preferiblemente, las bacterias se destruyen a fin de evitar las dificultades de mantener productos vivos.

IDENTIFICACIÓN DE UNA BACTERIA QUE MODULA UNA RESPUESTA CELULAR INMUNE

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar una o más células enteras de bacterias procedentes de una cepa rugosa de *Mycobacterium* que modulan (p. ej. modifican) una respuesta celular inmune, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un primer animal de prueba con un inmunoestimulante; (b) poner en contacto un segundo animal de prueba con un inmunoestimulante mezclado con una bacteria; (c) medir la respuesta celular inmune en cada uno de los animales de prueba; y (d) comparar la respuesta celular inmune en cada uno de los animales de prueba, en el que una respuesta celular inmune inferior del inmunoestimulante mezclado con una bacteria en comparación con el inmunoestimulante solo es indicativa de una modificación de la respuesta celular inmune por la bacteria.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar la respuesta Th1/Th2 de una cepa rugosa de bacterias seleccionadas del género *Mycobacterium*, método que comprende la utilización de la prueba cutánea de la tuberculina. En ratones, la prueba cutánea de la tuberculina se lleva a cabo preferiblemente en la almohadilla plantar. En la reacción de Th1 predominante, la respuesta inmunitaria positiva de la almohadilla plantar es máxima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas. Sin embargo, cuando la reactividad de Th2 se incrementa, entonces se incrementa la respuesta inmunitaria positiva de la almohadilla plantar a las 48 horas e incluso puede superar la respuesta inmunitaria de la almohadilla plantar a las 24 horas.

El efecto de la vacunación con BCG está bien documentado usando esta prueba cutánea de tuberculina. Así, el ensayo de prueba se puede usar para determinar si la introducción de una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención modula o no la respuesta celular inmune de BCG.

Según se usa en la presente memoria, el término “animal de prueba” se refiere a cualquier animal que ocasione una respuesta celular inmune al inmunoestimulante. Preferiblemente, el animal o los animales de ensayo son un mamífero. Más preferiblemente, el animal o los animales de ensayo son una rata, un hámster, un conejo, una cobaya o un ratón. Más preferiblemente, el animal o los animales de prueba son un ratón.

Preferiblemente, la bacteria modifica la respuesta de células T auxiliares. Adecuadamente, la bacteria puede modificar la respuesta de células T auxiliares al disminuir la respuesta Th1 y Th2. Adecuadamente, la bacteria puede modificar la respuesta de células T auxiliares al incrementar la respuesta Th1 y disminuir la respuesta Th2. Adecuadamente, la bacteria puede modificar la respuesta de células T auxiliares al incrementar la respuesta Th1 sin afectar a la respuesta Th2.

Preferiblemente, el inmunoestimulante tendrá una respuesta Th1 y Th2 conocida. Por ejemplo, con el inmunoestimulante BCG la reacción habitualmente es la mayor a las 24 h cuando es un indicador de la respuesta Th1; la reacción a las 48 h habitualmente es menor e incluye una contribución de Th2. Se sabe que el BCG estimula predominantemente una respuesta Th1.

- 5 Mediante el uso de tales inmunoestimulantes, es posible determinar la respuesta Th1/Th2 de una bacteria de prueba y, así, es posible identificar una o más bacterias que tienen una respuesta Th1/Th2 deseada para tratar y/o prevenir una enfermedad y/o trastorno particular.

Preferiblemente, la respuesta celular inmune se mide usando la prueba cutánea de la tuberculina. La vacunación con un inmunoestimulante – tal como BCG – induce una respuesta a la prueba cutánea con tuberculina (una preparación soluble de *Tubercle bacilli*), cuando se prueba más tarde. La reacción local se mide a diversos intervalos, por ejemplo, 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la inyección de tuberculina. Brevemente, se usa un inmunoestimulante (p. ej. BCG) que induce una respuesta inmunitaria positiva a tuberculina. En el animal de prueba, la prueba cutánea de tuberculina se lleva a cabo preferiblemente sobre la almohadilla plantar. En una reacción de Th1 predominante, la respuesta inmunitaria positiva de la almohadilla plantar es habitualmente máxima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas. Sin embargo, cuando la reactividad de Th2 se incrementa, entonces se incrementa la respuesta inmunitaria positiva de la almohadilla plantar a las 48 horas e incluso puede superar la respuesta inmunitaria de la almohadilla plantar a las 24 horas. Así, el ensayo se puede usar para determinar si la introducción de una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención modula o no la respuesta celular inmune.

- 20 Preferiblemente, el inmunoestimulante es BCG.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de Ejemplos, que están destinados a servir para ayudar a un experto normal en la técnica a llevar a cabo la invención y de ningún modo pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLOS

25 MÉTODOS

Prueba cutánea de tuberculina

La prueba cutánea de tuberculina es un ensayo modélico apropiado para determinar el efecto de una composición inmunomoduladora, es decir composiciones/suspensiones bacterianas que comprenden células bacterianas enteras destruidas, de acuerdo con la presente invención, sobre una respuesta celular inmune.

- 30 La vacunación con BCG induce una respuesta inmunitaria positiva a tuberculina. En ratones, la prueba cutánea de tuberculina se lleva a cabo preferiblemente sobre la almohadilla plantar. En una reacción de Th1 predominante, la respuesta inmunitaria de la almohadilla plantar positiva es máxima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas. Sin embargo, cuando la reactividad de Th2 se incrementa, entonces se incrementa la respuesta inmunitaria positiva de la almohadilla plantar a las 48 horas e incluso puede superar la respuesta inmunitaria de la almohadilla plantar a las 24 horas.

El efecto de la vacunación con BCG está bien documentado usando esta prueba cutánea de la tuberculina. Así, el ensayo de prueba se puede usar para determinar si la introducción de una composición inmunomoduladora de acuerdo con la presente invención modula o no la respuesta celular inmune a BCG.

Preparación de una suspensión bacteriana

- 40 Las bacterias de una cepa rugosa del género *Mycobacteria* pueden hacerse crecer en un medio libre de antígeno, tal como medio de Sauton, en un fermentador, durante 2-28 días. Alternativamente, la especie bacteriana de interés puede hacerse crecer sobre un medio inclinado sólido. Métodos alternativos estarán fácilmente disponibles para los expertos en la técnica.

- 45 La masa bacteriana resultante puede recogerse y bien usarse directamente o bien después de lavado para elaborar una suspensión en tampón. La suspensión de células bacterianas se prepara para contener entre 100.000 y 10.000.000.000 de bacilos por dosis. Las células bacterianas se resuspenden en agua o en una disolución salina. Preferiblemente, la disolución salina se tampona a pH 8,0 con borato. Preferiblemente, los bacilos se desactivan

(destruyen), adecuadamente al calentar en un autoclave durante 15 minutos a 121 °C. La suspensión bacteriana resultante comprende células enteras.

EJEMPLO 1: Inducción de una variante rugosa estable de *Mycobacterium obuense* cepa tipo (ATCC 27023)

Mycobacterium obuense cepa tipo ATCC 27023 sólo está representada por esta cepa en las colecciones internacionales. La cepa es de carácter de cultivo liso y no se sabe que forme variantes rugosas.

Experimento 1. Cultivo sobre agar Middlebrook 7H11.

Seis subcultivos consecutivos de *Mycobacterium obuense* cepa tipo ATCC 27023 sobre agar Middlebrook 7H11 sólo producían colonias lisas.

Experimento 2. Cultivo sobre agar Middlebrook 7H11 con diferentes concentraciones de 4,4'-diaminodifenilsulfona añadida

Experimento 2, parte a

Se hizo crecer *Mycobacterium obuense* cepa tipo ATCC 27023 sobre medio Middlebrook 7H11 que comprendía diferentes concentraciones de Dapsone™. Los resultados se registran en la Tabla 1.

Tabla 1 – Crecimiento sobre diferentes concentraciones de Dapsone™/ml de medio Middlebrook 7H11.

µg de Dapsone™/ml de medio Middlebrook 7H11	Crecimiento observado
50	sin crecimiento
40	sin crecimiento
20	sin crecimiento
10	sin crecimiento
5	3 colonias lisas
0	crecimiento liso confluyente

Experimento 2, parte b

Se hizo crecer *Mycobacterium obuense* cepa tipo ATCC 27023 sobre medio Middlebrook 7H11 que comprendía diferentes concentraciones de Dapsone™. Los resultados se registran en la Tabla 2.

Tabla 2 - Crecimiento sobre diferentes concentraciones de Dapsone™/ml de medio Middlebrook 7H11.

µg de Dapsone™/ml de medio Middlebrook 7H11	Crecimiento observado
5	colonias lisas pequeñas
4	colonias lisas pequeñas
3	colonias lisas confluentes
0	colonias lisas confluentes

Experimento 2, parte c

Se hizo crecer *Mycobacterium obuense* cepa tipo ATCC 27023 sobre medio Middlebrook 7H11 que comprendía diferentes concentraciones de Dapsone™. Los resultados se registran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Crecimiento sobre diferentes concentraciones de Dapsone™/ml de medio Middlebrook 7H11.

µg de Dapsone™/ml de medio Middlebrook 7H11	Crecimiento observado
12	principalmente colonias rugosas
10	principalmente colonias rugosas
7,5	pocas colonias rugosas, principalmente colonias lisas
5	pocas colonias rugosas, principalmente colonias lisas
0	colonias lisas confluentes

- 5 Las colonias rugosas se recogieron cuidadosamente de los 12 µg de Dapsone™/ml de cultivo y se subcultivaron repetidamente sobre medio Middlebrook 7H11 sin Dapsone™ añadida.

Solo han crecido colonias rugosas después de 20 subcultivos repetidos (es decir, cultivos sucesivos).

La cepa rugosa aislada usando este experimento se ha depositado en la NCTC bajo la Convención de Budapest bajo el número de registro NCTC 13365.

10 EJEMPLO 2: Reacciones de DTH a tuberculina en ratones incitados con BCG que han sido tratados con *M. obuense*

Al grupo experimental se le suministraron 10^7 bacilos/0,1 ml del inmunomodulador, al nacer y 21 días más tarde (el tiempo de destete). Los ratones de control recibían borato tamponado bajo el mismo esquema.

- 15 Treinta días después de la última inmunización se vacunaron en el pescuezo con BCG subcutáneamente (Merieux), 10^5 bacilos/0,1 ml

Veintiocho días después los animales fueron incitados con tuberculina (almohadilla plantar de la pata trasera derecha) o disolución salina (almohadilla plantar de la pata trasera izquierda), 0,02 ml.

Alternativamente, el grosor de la almohadilla plantar también puede medirse antes de la prueba en lugar de inyectar la almohadilla plantar de la pata trasera izquierda.

- 20 Las reacciones de DTH se midieron a las 24, 48 y 72 h después de la incitación.

Datos individuales

GRUPO		24 h	48 h	72 h
Borato		0	0	0
Borato		14	3	7
Borato		12	22	25
Borato		15	12	13
Borato		4	1	6
Borato		0	0	0
Borato		0	0	0
Borato		10	4	3
Borato		13	12	14
<i>M. obuense</i> NCTC 13365		1	1	1
M obuense NCTC 13365		1	2	2
<i>M. obuense</i> NCTC 13365		2	6	4
<i>M. obuense</i> NCTC 13365		0	4	2
<i>M. obuense</i> NCTC 13365		5	6	14
M obuense NCTC 13365		6	6	9
M obuense NCTC 13365		0	0	0
M obuense NCTC 13365		1	4	4
Horas	Borato (n=9)	<i>M. obuense</i> (n=8)		
24	7,5 ± 2.16	2 ± 0.8		
48	6 ± 2.57	3,6 ± 0,85		
72	7,5 ± 2,8	4,5 ± 1,66		
Los valores son medias ± sem				

No hay diferencias significativas cuando los no respondedores y los respondedores se reúnen de este modo.

Sin embargo, cuando se analizan los respondedores solos, se describen diferencias significativas.

Horas	24	48	72
Borato	11,33±3,98	10,60±7,67	11,33±7,92
Tamaño de respuesta + media	n=6	n=5	n=6
<i>M. obuense</i>	2,50 ± 2,43	4,67 ± 1,63	5,83 ± 4,75
Tamaño de respuesta + media	n=6	n=6	n=6

Las diferencias en los tamaños de la respuesta + a tuberculina entre el control activado con borato y los resultados después de activar con una cepa rugosa de *M. obuense* son estadísticamente significativas a las 24 horas ($p < 0,005$) y, aunque la significación se pierde a las 48 y 72 horas, hay una tendencia descendente.

- 5 Una respuesta positiva a tuberculina significa que células eficaces han sido atraídas hasta el sitio de inyección y que se han liberado citoquinas inflamatorias. Así, en una respuesta negativa en la que se han reclutado células hasta el sitio, pero no se han liberado citoquinas, la hinchazón, que se debe principalmente a la respuesta a citoquinas liberadas, puede no ser apreciable, aun cuando se hayan reclutado al sitio células competentes.

- 10 En un animal que se ha inmunizado con reactivos que contienen antígenos compartidos con el reactivo de prueba, una falta de respuesta no significa que no haya respuesta, solo que la prueba no la ha detectado. Puede producirse una respuesta negativa debido a que hay una incapacidad de responder o hay una respuesta pero en un sentido negativo. Es probable que la última circunstancia suceda en reacciones de DTH en animales incitados con BCG. Sin querer limitarse por una teoría, se cree que las células sensibilizadas pueden permanecer en los nódulos linfáticos en lugar de migrar a la dermis o que pueden llegar allí pero producen citoquinas reguladoras a la baja, células inductoras de anergia. A veces, una prueba alternativa tal como la prueba de transformación de linfocitos puede
15 demostrar la presencia de células circulantes competentes que responden al antígeno de prueba, y las biopsias con sacabocados de sitios de pruebas cutáneas aparentemente negativas mostrarán infiltraciones de estas células, que no obstante no están produciendo una hinchazón perceptible. La proporción de individuos negativos a la prueba, probados en la piel o la almohadilla plantar, varía con la genética y la escala de tiempo con relación a la activación y la incitación. Hay una gran cantidad de evidencia publicada que trata de estos fenómenos en el hombre.

- 20 Así, en el análisis de datos procedentes de estas pruebas, se necesita considerar una proporción que realice una respuesta positiva y un diámetro medio de respuestas positivas, como se ha hecho. No había diferencia en el porcentaje que responde entre los 2 grupos, pero había una diferencia en los tamaños de la respuesta que realizaban los respondedores.

Conclusiones

- 25 *M. obuense* (cepa rugosa NCTC 13365) tiene un efecto inmunorregulador.

REFERENCIAS

- Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* dic 2001;75(24):12182-7
- 30 Lio D, Balistreri CR, Candore G, D'Anna C, Di Lorenzo G, Gervasi F, Listi F, Scola L, Caruso C. In vitro treatment with interleukin-2 normalizes type-1 cytokine production by lymphocytes from elderly. *Immunopharmacol Immunotoxicol* mayo 2000; 22(2): 195-203
- Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 25 feb 2000;18(16):1613-20
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res* 1999; 20(2): 117-26
- 35 Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activation in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* jul 2001; 21(4): 264-71
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.* dic 2001;74(6):833-9.
- 40 de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism, and carcinogenesis; una revisión de los documentos publicados entre 1988 y 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* feb 2000;71(2):405-11.
- Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review; the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionally as a probiotic. *J Dairy Sci* feb 2001;84(2):19-31
- Sharpe S, Fooks A, Lee J, Clegg C, Cranage M. Single oral immunisation with replication deficient recombinant adenovirus elicits long-lived transgene-specific cellular and humoral

Manabe YC, Scott CP, Bishai WR. Naturally attenuated orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG.

Kim JH, Mun YJ, Ahn SH, Park JS, Woo WH. Induction of oral tolerance to Japanese cedar pollen. *Arch Pharm Res* dic 2001;24(6):557-63

- 5 Elenkov IJ, Chrousos GP Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab* nov 1999;10(9):359-368

Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanisms of immune suppression of injury and immune modulation. *World J Surg* mayo 1996;20(4):454-9

- 10 Paik IH, Toh KY, Lee C, Kim JJ, Lee SJ. Psychological stress may induce increased humoral and decreased cellular immunity. *Behav Med* otoño 2000;26(3):139-41

Kang DH, Fox C Th1 and Th2 cytokine responses to academic stress. *Res Nurs Health* agosto 2001;24(4):245-57

Iwakabe k, Shimada m, Ohta A, Yahata T, Ohmi Y, habu S, Nishimura T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance towards Th2-dominant immunity in mice. *Immunol Lett* mayo 1998; 62(1):39-43

- 15 Mehta SK, Pierson D-L, Cooley H, Dubow R, Lugg D. Epstein-Barr virus reactivation associated with diminished cell-mediated immunity in Antarctic expeditioners. *J. Med. Virol.* jun 2000; 61(2):235-40

Bauer ME, Vedhara K, Perks P, Wilcock GK, Lightman SL, Shanks N. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* 1 feb 2000; 103(1): 84-92

- 20 Norbiato G, Vago T, Battocchio L. Microbial and fungal contamination contributes to physical stress in space flight: studies in the Euromir-95 mission. *J Gravit Physiol* jul 1998;5(1):P145-6

Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* dic 1999;13(4):583-95

Lawrence DA, Kim D. Central/peripheral nervous system and immune responses. *Toxicology* 17 enero 2000; 124(3): 189-201

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir cepas rugosas de una bacteria, comprendiendo dicho método exponer dicha bacteria a 4,4'-diaminodifenilsulfona en una cantidad que es mayor que o igual a 7,5 µg/ml y que 20 µg/ml, en el que dicha bacteria es de un género *Mycobacterium* aerobio.
- 5 2. Un método según la reivindicación 1, en el que se aísla dicha cepa rugosa.
3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha bacteria es *Mycobacterium obuense*.
4. Una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* producible mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 10 5. Una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* depositada bajo el Tratado de Budapest en la NCTC con el número de registro NCTC 13365.
6. Una composición inmunomoduladora que comprende una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense*, en donde dicha composición inmunomoduladora modifica una respuesta celular inmune durante el uso.
- 15 7. Una composición inmunomoduladora según la reivindicación 6, en donde dicha composición comprende una célula entera de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* según la reivindicación 4 o la reivindicación 5.
8. La composición inmunomoduladora según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende una célula entera de una bacteria procedente de una cepa rugosa de *Mycobacterium obuense* y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, composición modifica una respuesta celular inmune que durante el uso.
- 20 9. Una composición inmunomoduladora según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para el uso como un medicamento.
10. Una composición inmunomoduladora según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicha composición comprende además un antígeno o determinante antigénico.
- 25 11. Una composición inmunomoduladora según la reivindicación 10, en la que dicho antígeno o determinante antigénico es un antígeno o determinante antigénico seleccionado de uno o más de una vacuna de BCG (bacilo de Calmette y Guérin), una vacuna de toxoide de la difteria, una vacuna de difteria/tétanos/pertussis, una vacuna de pertussis, la vacuna del toxoide del tétanos, la vacuna del sarampión, la vacuna de las paperas, la vacuna de la rubeola, la vacuna OPV (vacuna oral de la poliomielitis) y *Mycobacterium vaccae*, o una de sus partes.
- 30 12. Una composición inmunomoduladora según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde dicha composición comprende dos o más de tales antígenos o determinantes antigénicos.
13. Una composición inmunomoduladora según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que se mata dicha bacteria.
14. Uso de 4,4'-diaminodifenilsulfona para producir una cepa rugosa de una bacteria, en el que dicha bacteria es del género *Mycobacterium* aerobio.