

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 535**

51 Int. Cl.:
A01N 37/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07825710 .2**
96 Fecha de presentación: **21.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2096914**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **ANTAGONISTA DE POLI-TLR.**

30 Prioridad:
23.11.2006 IN MU19312006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.12.2011

73 Titular/es:
**CADILA PHARMACEUTICALS LIMITED
CADILA CORPORATE CAMPUS SARKHEJ-
DHOLKA ROAD BHAT
AHMEDABAD 382210 GUJ, IN**

72 Inventor/es:
**MODI, Indravadan, Ambalal y
KHAMAR, Bakulesh Mafatial**

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

ES 2 370 535 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

Antagonista de poli-TLR

Campo de la invención

La presente invención proporciona *Mycobacterium w* para su utilización en el tratamiento de la septicemia.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención proporciona antagonista de poli receptores tipo Toll (TLR). Los receptores de tipo Toll (TLR) son familias de proteínas. El sistema inmunitario innato reconoce patógenos e inicia una respuesta eficaz y apropiada mediante los TLR. Los TLR son parte de la superfamilia IL-1R/TLR mayor, que incluye las IL-1R, las IL-18R, y un grupo de receptores huérfanos. La familia está definida por la presencia de un dominio citoplásmico, con resistencia a IL-1 tipo Toll (TIR) que es responsable de mediar en la señalización aguas abajo. Hasta ahora, se han identificado 13 TLR; los TLR 1 a 9 son comunes para ratón y especie humana, mientras que TLR10 es sólo funcional en los seres humanos, y TLR 11, 12 y 13 sólo se han encontrado en ratones. A muchos de estos receptores pero no a todos se les ha asignado una función en la detección inicial de, y la respuesta a, moléculas asociadas a patógenos específicos (MAP).

15 En los macrófagos y neutrófilos, esto conduce a respuestas inmunitarias innatas, tales como la inflamación y la inducción de la actividad microbicida, mientras que la activación de los TLR expresados en los dendrocitos conduce a la iniciación de la inmunidad adaptativa mediante la inducción de IL-12 y moléculas co-estimuladoras.

Aunque los TLR son parte del sistema de protección del cuerpo, su sobreexpresión se asocia a una variedad de enfermedades. La septicemia es una de esas enfermedades. La incidencia de septicemia debida a infección en los Estados Unidos se ha estimado en aproximadamente 750.000 casos al año, con una tasa media de mortalidad de alrededor del 30% (Angus *et al.*, *Crit. Care Med.* vol. 29, (2001), págs. 1303 a 1310). Endotoxina, o lipopolisacárido (LPS), que es un componente importante de la pared celular de bacterias gram-negativas, es el agente etiológico de la septicemia gram-negativa. La endotoxina provoca una respuesta inmunitaria innata, principalmente mediante el receptor 4 tipo Toll (TLR4) (Medzhitov *et al.*, *Nature* vol. 388 (6640), (1997), págs. 394-397) en hospedadores infectados, mediante la cual el cuerpo es advertido de la infección bacteriana, lo que conduce a un ataque antimicrobiano por el sistema inmunitario del hospedador. Dicha respuesta inmunitaria suele ser beneficiosa para los hospedadores infectados, sin embargo, una respuesta inmunitaria abrumadora a la endotoxina puede ser patológica, lo que conduce al síndrome de respuesta inflamatoria generalizada (SIRS), insuficiencia orgánica, varias septicemias y, posiblemente, al choque séptico y la muerte. Los síntomas de estas enfermedades incluyen fiebre, inflamación generalizada, y las enfermedades más graves, tales como la coagulación intravascular diseminada (CID), hipotensión, insuficiencia renal aguda, síndrome de disnea respiratoria aguda (SDRA), la destrucción hepatocelular y la insuficiencia cardíaca.

Los receptores tipo Toll expresados por LPS incluyen TLR 2, 9, otros, además de TLR4. Mientras que la propia endotoxina es una molécula muy heterogénea, la expresión de muchas de las propiedades tóxicas de la endotoxina se atribuye a la fracción de lípido A hidrófobo muy conservado. Un fármaco eficaz que actúa como antagonista del TLR4, y que es un antagonista para esta estructura conservada del lípido A, se conoce como E5564 (también conocido como compuesto 1287, SGEA y Eriforán) (Mullarkey *et al.*, *J. Exp Pharmacol. Ther.* 304 (3): 1193-1102, 2003). Este fármaco se describe como compuesto 1 en la Pat. de EE.UU. n° 5.681.824, WO/2004/071465 (Procedimientos y kits para su utilización en el diagnóstico y el tratamiento de la endotoxemia) describe un procedimiento para determinar si un paciente podría beneficiarse o seguir beneficiándose del tratamiento con un antagonista receptor 4 tipo Toll (TLR4). También se sabe que la inhibición del receptor 4 tipo Toll con eritorán atenúa la isquemia de miocardio con lesión por reperfusión. *Circulation* 114 (Supl. 1), (2006), págs. 1270-4

Las demás enfermedades en las que se sobreexpresan uno o más TLR incluyen, pero no se limitan a las siguientes:

- 45 1. Empeoramiento de infecciones virales latentes o activas (por ejemplo, la infección por VIH, citomegalovirus, herpes simple y virus de la gripe),
2. Predisposición innata o adquirida a la infección pulmonar bacteriana,
3. Insuficiencia cardíaca congestiva con edema pulmonar,
4. Neumonía obstructiva crónica
5. Mieloma múltiple
- 50 6. Lupus eritematoso diseminado (LED)
7. Lupus

- 8. Colitis ulcerosa
- 9. Enfermedad de Crohn
- 10. Enfermedades autoinmunitarias
- 11. Enfermedades reumáticas
- 5 12. Hepatitis crónica
- 13. Paludismo (*P. falciparum*)
- 14. Esclerosis múltiple
- 15. Neuritis óptica
- 16. Encefalitis vírica (virus del Nilo occidental)
- 10 17. Candidiasis
- 18. Aterosclerosis

Algunos de estos trastornos son susceptibles a la terapia convencional, mientras que no existe un tratamiento definitivo para la mayoría de las enfermedades.

15 Terapias complementarias antibacterianas, antiinflamatorias e inmunomoduladoras seleccionadas, investigadas en pacientes con septicemia grave y choque séptico.

Tipo de terapia	Objetivo (s)	Agentes
Neutralización de toxinas microbianas	Endotoxina	Anticuerpos antiendotoxina, anticuerpos anti-lípido A, análogos de lipopolisacáridos, eliminación de lipopolisacáridos
Fármacos inmunomoduladores, antiinflamatorios e inespecíficos	Mediadores inflamatorios múltiples e inmunitarios	Corticosteroides en altas dosis, corticosteroides en bajas dosis, pentoxifilina, inmunoglobulinas, interferón gamma
Inhibición de mediadores específicos	Citocinas pro-inflamatorias: Factor de necrosis tumoral	Anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral, receptores solubles del factor de necrosis tumoral, antagonista receptor de interleucina-1,
	Interleucina-1	
	Componentes fosfolipídicos: Fosfolipasa A2	Inhibidor de la fosfolipasa A2
	Ciclooxigenasa	Ibuprofeno
	Tromboxano	Dazoxibeno, cetoconazol
	Factor activador de plaquetas	Antagonistas del factor activador de plaquetas Factor activador de plaquetas
		Acetilhidrolasa
		Radicales libres de oxígeno
	Óxido nítrico	N-metil-L-arginina
	Bradicinina	Antagonista de la bradicinina
Corrección de la coagulopatía en cascada de coagulación	Antitrombina III, inhibidor de la ruta del factor tisular	Proteína C activada

A pesar de todas estas morbilidades asociadas a la septicemia no se ha reducido. Por lo tanto hay necesidad de proporcionar mejores opciones terapéuticas para estas enfermedades.

5 *Mycobacterium w* es una micobacteria no patógena, cultivable, atípica, con propiedades bioquímicas y características de crecimiento rápido parecidas a las que pertenecen al grupo Runyons clase IV de *Mycobacterium*. Se ha descubierto que comparte antígenos con *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha observado que proporciona profilaxis contra la lepra en seres humanos convirtiendo individuos negativos a la lepromina en positividad a la lepromina. Se ha observado que proporciona profilaxis contra la tuberculosis en los animales. En la lepra se observa también que reduce la duración de la terapia de destrucción bacteriana, la depuración, así como el cuidado clínico cuando se utiliza junto con la multiterapia. La composición farmacéutica que contiene *Mycobacterium W* está aprobada para uso humano desde 1998 en la India.

10 Esto se ha descrito en varias patentes y publicaciones. *Mycobacterium w* destruida térmicamente está disponible como preparación comercial en la India. Contiene $0,5 \times 10^9$ células destruidas térmicamente de *Mycobacterium w* por 0,1 ml de composición farmacéutica.

Objeto de la invención

Es deseable reducir la actividad inducida por TLR utilizando *Mycobacterium w* o sus componentes.

15 Es deseable proporcionar actividad antagonista de poliTLR de *mycobacterium* o sus componentes cuando es inducida por agonistas sintéticos de TLR conocidos como CPG, ODN o de origen natural como lipopolisacáridos.

Es deseable proporcionar actividad de antagonistas de *mycobacterium w* y sus componentes a efectos de los ligandos de TLR, como lipopolisacáridos, *E. coli*, etc.

Otro objeto de la invención consiste en proporcionar utilidad de *Mycobacterium w* para su utilización en el tratamiento de la septicemia.

20 También se da a conocer *Mycobacterium w* o sus componentes en el tratamiento de enfermedades como el mieloma múltiple, el paludismo, la esclerosis múltiple, la neuritis óptica, la neumonía obstructiva crónica para mejorar la morbilidad y la mortalidad asociada a ellos.

Breve descripción de los dibujos

Figura. 1 Efecto de *Mycobacterium w* sobre TLR inducido por LPS

25 Figura. 2 Efecto de *Mycobacterium w* sobre el ligando poli TLR en TLR inducidas

Figura. 3 Efecto de *Mycobacterium w* sobre el ligando LPS en fiebre provocada (prueba de pirógeno)

Figura. 4 Efecto de *Mycobacterium w* que contiene la composición de la septicemia provocada por *E. coli* (intraperitoneal + alta dosis de antibiótico)

30 Figura. 5 Efecto de *Mycobacterium w* que contiene la composición de la septicemia inducida por *E. coli* (intraperitoneal + baja dosis de antibiótico)

Figura. 6 Efecto de *Mycobacterium w* que contiene la composición de la septicemia inducida por *E. coli* (vía intravenosa)

Descripción detallada de la invención

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen *Mycobacterium w* y/o sus componentes se sabe que proporcionan respuesta Th1. También son conocidas por compartir antígenos con *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*. Encuentran utilidad en el tratamiento de la lepra para mejorar la destrucción de organismos y su eliminación del cuerpo dando como resultado una curación más rápida. Se ha encontrado útil como profilaxis contra la tuberculosis y también la lepra.

40 Sorprendentemente, se observa que también poseen propiedades únicas de reducción de la actividad de TLR. Su efecto inhibitor/antagonista es visto por lo menos agonista TLR 3, 4, 5, 6, 9. La reducción en la actividad de TLR se observa cuando las TLR se expresan a través de gran variedad de ligandos TLR *in vitro* así como *in vivo*. También se encuentra útil en el tratamiento de enfermedades provocadas por ligandos de TLR, como por ejemplo, lipopolisacáridos (citocinas y pyroxisia). También se encuentra útil en el tratamiento de enfermedades en las que se sobreexpresan en varios receptores tipo Toll p. ej. en la septicemia, el mieloma múltiple, el paludismo, la esclerosis

45 múltiple, neuritis óptica, neumonía obstructiva crónica, etc.

Por consiguiente, la invención proporciona *Mycobacterium w* para su utilización en el tratamiento de la septicemia.

La invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos, sin limitar el alcance de la invención.

I. De acuerdo con la invención, la composición de una composición farmacéutica, el método de preparación, características HPLC, su seguridad y tolerancia, los métodos de utilización y los resultados de los tratamientos se

describen en los siguientes ejemplos. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención y el alcance de la presente invención no debe estar limitada por ellos.

Ejemplo 1

Las composiciones farmacéuticas:

5

A. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

<i>Mycobacterium W.</i> , (destruidas térmicamente)	$0,50 \times 10^9$
Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Tween 80	0,1% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

B. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

<i>Mycobacterium w.</i> , (destruidas térmicamente)	$0,50 \times 10^9$
Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Triton x 100	0,1% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

10

C. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

<i>Mycobacterium w.</i> , (destruidas térmicamente)	$0,50 \times 10^9$
Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

D. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto de <i>Mycobacterium w</i> después del tratamiento con ultrasonidos de 1×10^{10} <i>Mycobacterium w</i>	
Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

15

E. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto de metanol de 1×10^{10} de *Mycobacterium w*

ES 2 370 535 T3

Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

F. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto de cloroformo 1×10^{10} de <i>Mycobacterium w</i>	
Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

5 G. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto de acetona de 1×10^{10} de <i>Mycobacterium w</i> :	
Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

H. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

10	Extracto en etanol de 1×10^{10} de <i>Mycobacterium w</i>	
	Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
	Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
	Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

I. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

15	Extracto de Liticasa de 1×10^{10} de <i>Mycobacterium w</i>	
	Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
	Tiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
	Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

J. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

$0,5 \times 10^7$ de *Mycobacterium w* (destruida térmicamente)

20	Extracto de <i>Mycobacterium w</i> obtenido de 1×10^3 de <i>Mycobacterium w</i> por destrucción, extracción con disolventes o extracción enzimática.	
----	---	--

Cloruro de sodio IP	0,90% p/v
Thiomerosal IP	0,01% p/v (como conservante)
Agua para inyectables IP	c.s.p. 0,1 ml

Ejemplo 2

Procedimiento de preparación de una composición farmacéutica:

A. Cultivo de *Mycobacterium w.*

i) Preparación del medio de cultivo.

5 *Mycobacterium w* se cultiva en medio sólido como medio de LJ o medio líquido como el medio Middlebrook o medio líquido de Sauton.

10 Para un mejor rendimiento se enriquece el medio Middlebrook. Puede enriquecerse preferentemente mediante adición de glucosa, bactotripton y BSA. Se utilizan preferentemente en una proporción de 20:30:2. El medio de enriquecimiento se añade al medio Middlebrook. Se lleva a cabo preferentemente en proporción de 15:1 a 25:1 con mayor preferencia en proporción de 20:1.

ii) Operación en biorreactor

a) Preparación del recipiente:

15 Las partes en contacto internas del recipiente (juntas, sellos mecánicos, acanaladuras para anillo en o/empaque etc.) deben limpiarse de manera apropiada para evitar cualquier contaminación. Se llena el recipiente con NaOH 0,1 N y se deja como tal durante 24 horas para retirar los materiales pirógenos y otros contaminantes. El recipiente se limpia primero con agua acidulada, luego con agua corriente. Por último, se enjuaga el recipiente con agua destilada (3 veces) antes de preparar el medio.

b) Esterilización del biorreactor

20 El biorreactor que contiene 9 l de agua destilada se esteriliza con vapor recalentado (indirecto). Asimismo, el biorreactor se esteriliza una vez más con medio Middlebrook. Las demás botellas de adición, entrada/salida de los filtros de aire, etc. se esterilizan en autoclave (dos veces) a 121°C durante 15 minutos. Antes de su utilización, estos se secan a 50°C. en la estufa.

c) Parámetros del medio

i. Temperatura: 37 ± 0,5°C.

25 ii. pH: 6,7 a 6,8 inicialmente.

B. Recolección y concentración

Por lo general se realiza al final del 6º día después de cultivar en condiciones asépticas. La concentración de células (paletización) se hace por centrifugación.

C. Lavado de las células

30 La paleta así obtenida se lava un mínimo de tres veces con solución salina normal. Se pueden lavar con cualquier otro líquido que sea preferentemente isotónico.

D. Se agrega vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Se añade a la paleta solución salina normal sin pirógenos. Puede utilizarse cualquier otro líquido isotónico sin pirógenos como vehículo farmacéutico. El vehículo se añade en cantidad para obtener la concentración deseada de sustancia activa en la forma final.

E. Adición de conservantes

Para mantener el producto exento de otras bacterias contaminantes para su periodo de conservación, se añade conservante. El conservante preferido es tiomesol que se utiliza en la concentración final de 0,01% p/v.

F. Esterilización terminal

La esterilización terminal se puede hacer por varios métodos físicos, como la aplicación de calor o radiación ionizante o filtración estéril.

5 El calor puede ser en forma de calor seco o calor húmedo. También puede ser en forma de ebullición o pasteurización. Las radiaciones ionizantes pueden ser rayos ultravioleta, gamma o microondas o cualquier otra forma de radiación ionizante. Es preferible esterilizar al autoclave el producto final. Esto se puede hacer antes o después de llenar en un envase final.

G. Control de Calidad

i. Se evalúa en el material la pureza y esterilidad.

10 ii. Se comprueba la solidez al ácido en los organismos después de la tinción de Gram.

iii. Prueba de inactivación: Ésta se hace cultivando el producto en medio LJ para descubrir cualquier organismo vivo.

iv. Poder patógeno y/o la contaminación con patógenos.

Los organismos cultivados se infectan a ratones Balb/c.

15 Ninguno de los ratones debe morir y todos deben permanecer sanos y con ganancia de peso. No debe haber ninguna lesión macroscópica o microscópica apreciada en el hígado, bazo, pulmón o cualquier otro órgano cuando se sacrifican los animales hasta 8 semanas después del tratamiento.

v. Ensayo bioquímico:

Se somete el organismo a los siguientes ensayos bioquímicos:

20 a) Ureasa

b) Hidrólisis con Tween 80

c) Ensayo de niacina

d) Ensayo de reducción de nitratos

25 El organismo da resultados negativos en ureasa, hidrólisis con Tween 80 y ensayo de niacina. Es positivo por el ensayo de reducción de nitratos.

H. Preparación de los constituyentes de *Mycobacterium w*.

Los constituyentes de *Mycobacterium w* se puede preparar para la invención por:

I. Rotura celular

II. Extracción con disolventes

30 III. Extracción enzimática.

La rotura celular se puede hacer por medio de ultrasonidos o la utilización de fraccionómetro de alta presión o mediante la aplicación del ingrediente de presión osmótica.

La extracción con disolvente se puede hacer con cualquier disolvente orgánico como cloroformo, etanol, metanol, acetona, fenol, alcohol isopropílico, ácido acético, urea, hexano, etc.

35 La extracción enzimática se puede hacer con enzimas que pueden digerir la pared celular/membranas. Por lo general son de naturaleza proteolítica. Las enzimas liticasa y pronasa son las enzimas preferidas. A los efectos de la invención pueden utilizarse los componentes celulares de *Mycobacterium w* solos en lugar de organismos de *Mycobacterium w* o pueden añadirse al producto que contiene *Mycobacterium w*.

Además los componentes celulares dan como resultado una mayor eficacia del producto.

40 En todos los ejemplos *Mycobacterium w* se utilizan tal como se describe en el ejemplo 1 c, que contiene $0,50 \times 10^9$ por 0,1 ml de *Mycobacterium w* destruida térmicamente.

II. Ejemplos que demuestran la reducción en TLR inducido utilizando composiciones farmacéuticas comprende Mw.

Ejemplo 1

La estimulación de TLR se prueba evaluando la activación de NF-κβ en las células HEK293 que expresan un TLR dado. La actividad antagonista de la composición farmacéutica que contiene 0,5 x 10⁹ células de *Mycobacterium w* destruida térmicamente en 0,1 ml de solución salina normal se prueba en TLR humanos: 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9.

5 Ligandos de TLR utilizados en el estudio:

hTLR2: HKLM (*Listeria monocytogenes* destruida térmicamente) a 2 x 10⁷, 1 x 10⁷, 2 x 10⁶ y 1 x 10⁶ células/ml

hTLR3: Poli(I:C) a 20 y 10 ng/ml

hTLR4: lípido por LPS de *E. coli* K12 a 2 y 1 ng/ml

hTLR5: Flagelina de *S. typhimurium* a 20 y 10 ng/ml

10 hTLR7: Loxoribina a 1 y 0,5 mM

hTLR8: ssRNA40 a 5 y 3 μg/ml

hTLR9: CpG ODN 2006, a 50 y 20 ng/ml

Procedimiento General

15 El indicador de fosfatasa alcalina secretada está bajo el control de un activador inducible por el factor de transcripción NF-κB. La estimulación de TLR en la detección se prueba evaluando la activación de NF-κB en las células HEK293 que expresan una TLR dada. Este gen indicador permite el seguimiento de la señalización a través de la TLR, basándose en la activación de NF-κB. En una placa de 96 pocillos (200 μl de volumen total) que contiene las células HEK293 adecuadas (25.000-50.000 células/pocillo), se añaden 20μl de *Mycobacterium w* así como los ligandos de TLR a los pocillos. El medio añadido a los pocillos se diseña para la detección de la expresión de SEAP inducida por NF-κB. Después de una incubación de 16 a 20 horas para encontrar la actividad de NF-κB inducida por se lee la D.O. a 650 nm en un detector de absorbancia Beckman Coulter AD 340C.

20 Los resultados se presentan en forma de tabla como se menciona a continuación. Columna (A) demuestra actividad inducida por ligandos de TLR. Columna (B) demuestra una actividad inducida por ligando TLR en presencia de la composición que contiene *Mycobacterium w* (Mw). La última columna proporciona el % de antagonismo inducido por *Mycobacterium w* en relación con el ligando TLR solo.

25

TLR	REFERENCIA	REFERENCIA	B/A%	Antagonismo %
	POSITIVA (Ligando TLR) (A)	POSITIVA+Mw (B)		
TLR3	1,881	1,445	76,8%	23,2%
TLR4	1,207	0,602	49,87%	50,13%
TLR5	2,227	1,134	50,92%	49,08%
TLR7	1,503	1,141	74,57%	25,43%
TLR8	0,591	0,431	72,92%	27,08%
TLR9	1,979	0,135	0,07%	99,93%
TLR2	2,21	2,17	98,19%	1,81%

Los descubrimientos sugieren antagonismo de TLR cuando son estimuladas por un ligando TLR para TLR 3, 4, 5, 7, 8, 9. El antagonismo no se observa en TLR2 en este experimento.

Ejemplo 2

Se sacrificaron ratones de 8 a 10 semanas y se aislaron esplenocitos del bazo. Las células del bazo se cultivaron con diferentes concentraciones de LPS y la combinación de LPS con células *Mycobacterium w* destruidas térmicamente. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640.

5 Después de 48 horas las células se recogen y se comprueba la expresión de diferentes TLR. La expresión de TLR se comprueba ampliando el ARNm específico del lisado celular (kit Cell-cDNA II, Ambion) utilizando cebadores específicos de TLR (R & D systems).

Los productos ampliados se comprueban en gel de agarosa al 1,5% utilizando tinción de bromuro de etidio.

10 Se ha observado que la expresión de TLR 3, 4, 5, 6 y 9 se reduce cuando las células están expuestas a *Mycobacterium w* + LPS en comparación con LPS solo. No se aprecia ningún efecto sobre TLR1. (Figura 1). Así, la composición farmacéutica que contiene *Mycobacterium w* demuestra la actividad antagonista de inducción inducida por LPS de TLR 3, 4, 5, 6 y 9. No tiene ningún efecto sobre TLR1 inducida por liposoma.

Ejemplo 3

15 La administración de un ligando poliTLR a ratones da como resultado la expresión de TLR 1, 3, 5, 6, 9 en esplenocitos. Luego se recoge y se analiza 7 días después.

Esplenocitos que expresan TLR 1, 3, 5, 6, 9 cuando son estimulados *in vitro* durante 48 horas con $0,5 \times 10^5$ o más de *Mycobacterium w* destruida térmicamente, se traduce en ausencia de expresión de TLR 3, 5 y 6. (100% de reducción en la expresión de TLR 3, 5 y 6). Los resultados se demuestran en la figura 2.

20 Por lo tanto los ejemplos anteriores demuestran la reducción en las TLR inducida por la composición farmacéutica de la presente invención.

III. Ejemplos que demuestran actividad antagonista a efecto de ligandos TLR.

Ejemplo 1

Efecto sobre citocinas inducidas por LPS

25 Se sacrificaron ratones de 8 a 10 semanas y se aislaron esplenocitos del bazo. Se cultivaron los esplenocitos con diferentes concentraciones de LPS y la combinación de LPS con células de *Mycobacterium w* destruidas térmicamente. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640.

Se analizaron Superstant en citocinas como TNF-alfa e IFN-gamma.

30 Los estudios *in vitro* de *Mycobacterium w* cuando se utilizan junto con lipopolisacáridos (LPS) reducen FNT/Alfa inducido por LPS y también reducen la secreción de IFN gamma. La cantidad de inhibición observada es significativa y es tan buena como el nivel basal (inhibición completa).

Ejemplo 2

Efecto sobre la fiebre provocada por LPS

35 Se prepararon conejos para las pruebas de pirógenos y se controló la temperatura. Se administró a los conejos una inyección intravenosa de lisado de *E. coli* para simular la fiebre provocada por endotoxina/LPS. Dos horas más tarde se dividieron en grupo de referencia y grupo de tratamiento. El grupo de tratamiento recibió una inyección de 2 ml de la composición farmacéutica que contenía $0,5 \times 10^9$ células de *Mycobacterium w* destruidas térmicamente por 0,1 ml. Los descubrimientos se han reproducido tres veces. Los animales en el grupo tratado mostraban una disminución de la temperatura, mientras que los animales de referencia seguían teniendo aumento de temperatura. El efecto continuado hasta el final del experimento está representado en la figura. 3.

40 Así, ejemplos anteriores demuestran efecto antagonista a efectos de los ligandos de TLR por la composición farmacéutica que comprende Mw.

IV Ejemplos que demuestran utilidad en enfermedades en las que los TLR son conocidos por sobreexpresarse

(A) Mejor supervivencia en septicemia provocada por *E. coli* en ratones:

45 La inyección de *E. coli* vivas a los ratones por vía parenteral produce septicemia con un 100% de mortalidad. Se evaluó la eficacia de las composiciones farmacéuticas que contienen $0,5 \times 10^9$ células de *Mycobacterium w* (Mw) destruidas térmicamente en este modelo de ratones.

Se administró la suspensión de *E. coli* a los animales seguida de *Mycobacterium w* por vía IV o ID en varias combinaciones con y sin dexametasona y amoxicilina. Se observa mayor aumento de supervivencia en los animales tratados con *Mycobacterium w* junto con los glucocorticoides y la amoxicilina.

Experimento 1 (intraperitoneal)

5 Se administró a los ratones 1 ml de *E. coli* vivas (20 D.O.) por vía intraperitoneal. Se trataron los ratones con diferentes combinaciones de terapias de amoxicilina (500 mg) y dexametasona (2,0 mg) (Fig. 2). En cada grupo había 10 animales. En el grupo de referencia todos los animales murieron en 48 horas (Grupo I). Con las intervenciones ha mejorado la supervivencia (Grupo II-VII). Se observó el 100% de supervivencia cuando se combinó dexametasona + amoxicilina con 0,1 ml de *Mycobacterium w* por vía intradérmica (Grupo IV). Esto fue seguido por los mismos fármacos, pero *Mycobacterium w* administrada por vía intravenosa (Grupo V). Los resultados se representan gráficamente en la figura. 2.

Experimento 2 (intraperitoneal)

15 En el segundo experimento la dosis de amoxicilina se redujo de 500 mg/kg a 70 mg/kg (Fig. 3). Una vez más los mejores resultados se observaron con el grupo II de *Mycobacterium w* administrado por vía intradérmica junto con esteroides y antibióticos seguido del grupo III por vía intravenosa. Los resultados se representan gráficamente en la figura. 3.

La comparación del experimento 1 y 2 pone de manifiesto que la cantidad de antibiótico es importante. Esto es clínicamente relevante dado que la septicemia se trata con dosis masivas de antibióticos y dosis no convencionales utilizadas para el tratamiento de otras infecciones.

20 Experimento 3 (vía intravenosa)

25 En el tercer experimento se provocó septicemia por vía intravenosa y los niveles de dexametasona se redujeron a 0,5 mg/kg desde 2 mg/kg. Los resultados sugieren que la combinación de esteroides + antibióticos + *Mycobacterium w* (grupo VII) proporciona una mejor supervivencia. Estos tres experimentos demostraron que la utilización de *Mycobacterium w* mejora la supervivencia en la septicemia. Los resultados se representan gráficamente en la figura 4.

(B) Modelo *P. berghei* de paludismo:

30 La desregulación del sistema inmunitario en el escenario del paludismo de *P. Falciparum* se sabe que provoca síndromes de pseudo-septicemia. En los animales infectados con una forma fulminante de paludismo ocasionada por la cepa ANKA de *P. berghei* se observa idéntica situación. En un trabajo preliminar realizado en IISc., Bangalore se observa que la administración de *Mycobacterium w* + Artether da como resultado el 70% de supervivencia frente al 0% en el grupo de referencia que recibió Artether o placebo sólo. Por lo tanto, *Mycobacterium w* tiene capacidad para invertir los síndromes pseudosepticémicos ocasionados en las infecciones de paludismo.

Así, los ejemplos anteriores (IV-A y IV-B) demuestran la utilidad de la composición farmacéutica que contiene Mw en las enfermedades en animales en los que se sobreexpresan los TLR.

35 (C) Septicemia en seres humanos

El principal producto ha demostrado su utilidad en el tratamiento de las enfermedades infecciosas crónicas. También se ha encontrado utilidad en la resolución de los granulomas resistentes a esteroides, derrame pleural, hidroneumotórax, neuritis óptica, etc.

También se ha evaluado en el tratamiento de la septicemia.

40 **Ejemplo 1**

45 Un paciente de 65 años de edad con mieloma refractario se observó que padecía septicemia y se le conectó al respirador durante 6 semanas. Estuvo tomando antibióticos superiores (penems), EPO, GM CSF transfusión diaria de plaquetas para tratamiento. A pesar de éstos, estaba teniendo un curso cuesta abajo con disminución progresiva del recuento de CD4. Se le administraron 0,2 ml de *Mycobacterium w* por vía intradérmica en dos dosis divididas en el deltoides. A las 48 horas se le retiró el respirador. No necesitó infusión de plaquetas.

Ejemplo 2

Un joven delicado con tuberculosis pulmonar avanzada desarrolló infección bacteriana de pulmón que conduce a septicemia. No estaba respondiendo a la terapia convencional. Se le administró IV 5 ml. de *Mycobacterium w* durante 5 días.

Esto dio como resultado la curación de la septicemia y la infección lo que condujo al alta hospitalaria. Se observó que era estable sin recaída 6 semanas después. Ambos ejemplos sugieren que *Mycobacterium w* es útil en el tratamiento de la septicemia en seres humanos.

(D) Neuritis óptica

5 A paciente de 56 años con neuritis óptica se observó que padecía insuficiencia visual residual después del tratamiento con 1 g diario de metil-prednisolona por vía intravenosa durante 3 días. La visión se mantuvo estable en 6/36 y 6/18, respectivamente, en el ojo derecho e izquierdo respectivamente. Se le administraron 5 ml de *Mycobacterium w* (preparado como para la invención) en 500 ml de solución salina normal en infusión una vez más por vía intravenosa. La mejora de la visión llegó a 6/12 y 6/9, respectivamente, en el ojo derecho e izquierdo 10 días después del inicio del tratamiento.

(E) Esclerosis múltiple

Una paciente de 28 años de edad tenía parálisis en ambas extremidades inferiores debido a (grado 0 de potencia) esclerosis múltiple. Ésta no respondió a la terapia durante 6 meses. Ella no recibió ninguna otra terapia durante el período.

15 Se le administraron 2 ml diarios de *Mycobacterium w* en 100 ml de solución salina normal por vía intravenosa durante tres días. Presentó signos de recuperación cuando se evaluó 15 días después con un grado II de potencia ambas extremidades inferiores.

(F) Neumonía obstructiva crónica

20 El uso de la composición farmacéutica que contiene *Mycobacterium w* en el tratamiento de la neumonía obstructiva crónica dio como resultado la disminución de las secreciones, la disminución de la cantidad de infección, la disminución del número de agravamientos que requieren hospitalizaciones según los ejemplos demuestra su efecto sobre el VEF1 y FEM.

Experimento 1

25 Se administró a pacientes con neumonía obstructiva crónica 0,1 ml de *Mycobacterium w* por vía intradérmica cada quince días durante 2 meses. Esto dio como resultado una mejoría en el volumen de expiración forzada en un segundo (FEV1) en más del 50% en 5 de los 9 pacientes mejoró en más del 25% en el resto. La mejoría en el flujo expiratorio máximo (FEM) también siguió el mismo patrón.

Experimento 2

30 A 16 pacientes con neumonía obstructiva crónica se les administraron $0,5 \times 10^9$ células de *Mycobacterium w* destruidas térmicamente por vía intramuscular después de ponerlas en suspensión en 1 ml de solución salina normal.

Después de una sola inyección se observó mejora en FEV1 en 13 de 16 pacientes al ser examinados después de la inyección el día 15 (más del 50% 7, más del 25% 6). Esta mejora alcanzó su máximo en 4 a 6 semanas. Del mismo modo la mejora del FEM se observó en 11 de 16 pacientes.

35 Experimento 3

En 6 pacientes con neumonía obstructiva crónica $0,5 \times 10^9$ células de *Mycobacterium w* destruidas térmicamente se administraron a la mucosa nasal en aerosol nasal (0,1 ml). La mejoría en el VEF1 en más del 25% se observó en 5 de 6 pacientes consiguiendo en 3 de ellos más del 50% de mejora.

40 La mejora de la FEM en más del 25% se observó en 4 de 6 pacientes consiguiendo en 2 de ellos alcanzar más del 50% de mejora.

Experimento 4

En diez pacientes con neumonía obstructiva crónica $0,5 \times 10^9$ células de *Mycobacterium w* destruidas térmicamente en suspensión en 3 ml de diluyente se administraron a los pulmones por nebulización como una única administración. Se observó mejoría en los 10 pacientes en el VEF1 (más del 25%).

45 El efecto parece persistir durante más de 6 semanas. La mejora del FEM fue más del 25% en 8 pacientes, logrando en 4 de ellos más del 50% de mejora.

(G) Mieloma múltiple

Una mujer de 70 años con mieloma se volvió resistente al tratamiento convencional y continuó avanzando la enfermedad. Tenía dolores óseos intensos. El dolor era tan intenso que era incapaz de caminar. Se le administró 0,1 ml de *Mycobacterium w* por vía intradérmica cada mes. Se logró que remitiera la enfermedad. Después de tres meses de terapia no tenía síntomas y podía caminar con soltura. Su hemoglobina mejoró de 5,5% gm a 7,5% gm.

Así, los ejemplos anteriores (IV-C a IV-G) demuestran efectos positivos de la composición farmacéutica de la presente invención en el tratamiento de las enfermedades en seres humanos en los que se sobreexpresan los TLR.

Los ejemplos (Ejemplo nº II-1 a III-3) ilustran, la actividad antagonista de poli-TLR de *Mycobacterium* o sus componentes cuando es inducido por agonistas TLR sintéticos conocidos como CPG, ODN o de origen natural como lipopolisacáridos. Los ejemplos (Ejemplo nº II-1 a 11-2) ilustran aún más la actividad de los antagonistas de *Mycobacterium w* y sus componentes a efectos de los ligandos de TLR, como lipopolisacárido, *E. coli*, etc. Los ejemplos (Ejemplo nº IV-a, IV-b) ilustran aún más la utilidad de *Mycobacterium w* o sus componentes en el manejo de enfermedades en las que se sobreexpresan los TLR. Los ejemplos (Ejemplo nº IV-c, IV-d) ilustran más los efectos positivos de *Mycobacterium w* o sus componentes en el tratamiento de enfermedades como la septicemia, neuritis óptica, esclerosis múltiple, neumonía obstructiva crónica, mieloma múltiple.

Referencias

Akira Shimamoto, Albert J. Chong, Masaki Yada, Shin Shomura, Hiroo Takayama, Ani J. Fleisig, Matthew L. Agnew, Craig R. Hampton, Christine L. Rothnie, Denise J. Spring, Timothy H. Pohlman, Hideto Shimpo, y Edward D. Vernier, "Inhibición of Toll-like Receptor 4 With Eritoran Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury", *Circulación*, vol. 114, (2006), I-270-I-274

Anders H.J. *et al.* "a Toll for lupus," *Lupus* vol. 14 (6), (2005), págs. 417-22

Anders H.J., Zeche D., Pawar RD., Patole P. S., "Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection," *Arthritis Res Ther.*, vol. 7 (5), (2005), págs. 215-24

Angus, Derek C., Linde-Zwirble, Walter T.; Lidicker, Jeffrey, Clermont, Gilles, Carcillo, Joseph, Pinsky, Michael R., "Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome and associates costs of care," *Critical Care Medicine*. Vol. 29 (7), (2001), págs. 1303-1310.

Ann-Marshak Rothstein, "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 6 (11), (2006), págs. 823-35

Barrat, F.J. *et al.* "Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands of Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus," *J. Exp. Med.* Vol. 202, (2005), págs. 1131-1139

Christ, William J., Rossignol, Daniel P., Kobayashi, Seiichi, Kawata, Tsutomu, (Eisai Co., Ltd.), "Substituted liposaccharides useful in the treatment and prevention of endotoxemia" Patente de EE.UU. nº 5.681.824 (fecha de publicación: 28 de octubre 1997)

Donald N. Cook, David S. Pisetsky y David Schwartz, "Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease," *Nature Immunology*, vol. 5 (10), (2004), págs. 975-979

Emer Bourke, Daniela Bosisio, Jose'e Golay, Nadia Polentarutti, y Mantovani Alberto, "The Toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells," *Blood*. Vol. 102, (2003), p 956-963

Foo Y. Liew, Damo Xu, Elizabeth K. Brint y Luke A.J. O'neil, "Negative Regulation of Toll like receptor Mediated Immune Responses," *Nature Reviews Immunology* vol. 5, (2005), págs. 446-458

Fumiko Nomura, Sachiko Akashi, Yoshimitsu Sakao, Shintaro Sato, Taro Kawai, Makoto Matsumoto, Kenji Nakanishi, Masao Kimoto, Kensuke Miyake, Kiyoshi Takeda y Shizuo Akira, "Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression1," *The Journal of Immunology*, vol. 164, (2000), págs. 3476-3479.

G. Jego, R. Bataille, A. Geffroy-Luseau, G. Descamps, C. Pellat-Deceunynck, "Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors", *Leucemia* 20, (2006), págs. 1130 -1137

Gewirtz AT, Vijay Kumar M, Brant SR, Duerr RH, Nicolae DL, Cho JH., "Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* Vol. 290 (6), (2006), págs. 1157-1163

- Gilchrist M., Thorsson V., Li B., Rust antígeno., Korb M., Kennedy K., Hai T., Bolouri H., Aderem A., "Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4," *Natur.* Vol. 441 (7090), (2006), págs. 173-8
- 5 Gowen BB, Hoopes JD, Wong MH, Jung KH, Isakson KC, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW, "TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection," *J. Immunol.* Vol. 177 (9), (2006), págs. 6301-7
- Ishii Ken *et al.*, "Toll gates for future immunotherapy," *Current pharmaceuticals design*, vol. 12, (2006), págs. 4135-4142
- 10 J. Bohnhorst, T. Rasmussen, SH Moen, M FlÃ, ttum, L Knudsen, M BÃ, rset, T Espevik, A Sundan, "Toll-like receptors mediate la proliferation and survival of multiple myeloma cells," *Leukemia.* Vol. 20, (2006), págs. 1138-1144
- Julianne Stack, Ismar R. Haga, Martina Schröder, Nathan W. Bartlett, Geraldine Maloney, Patrick C. Reading, Katherine A. Fitzgerald, Geoffrey L. Smith y Andrew G. Bowie, "Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence", *J. Exp. Med.* Vol. 201 (6), (2005), págs. 1007-1018
- 15 Ken J .Ishii, Satoshi Uematsu y Shizuo Akira,. "Toll-Gates for Future Immunotherapy", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 12, (2006), págs. 4135-4142
- Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M. J., Marshak-Rothstein, A., "Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM y Toll-like receptors," *Natur*, Vol. 416, (2002), págs. 603-607.
- 20 Lene Malmgaard, Jesper Melchjorsen, Andrew G. Bowie, Søren C. Mogensen y Søren R. Paludan, " Viral Activation of Macrophages through TLR-Dependent and -Independent Pathways1," *The Journal of Immunology* , vol. 173, (2004), págs. 6890-6898
- Lenert PS *et al.* "Targeting Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells and autoreactive B cells as a therapy for lupus." *Arthritis resultado. Ther.* Vol. 8 (1), (2006), pág. 203
- 25 Liew, Foo Y.; Xu, Damo; Brint, Elizabeth K.; O'Neill, Luke A.J., "Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses," *Nature Reviews Immunology* , vol. 5 (6), (2005), págs. 446-458
- Maureen Mullarkey, Jeffrey R. Rose, John Bristol, Tsutomu Kawata, Akufumi Kimura, Seiichi Kobayashi, Melinda Przetak, Jesse Chow, Fabian Gusovsky, William J. Christ y Daniel P. Rossignol, "Inhibitin of Endotoxin Response by E5564, a Novel Toll-Like Receptor 4-Directed Endotoxin Antagonist," *J. Pharmacol. Exp. Thera.* , vol. 304 (3), (2003), págs. 1093-1102
- 30 Papadimitraki ED., Choulaki C., Koutala E., Bertias G., Tsatsanis C., Gergianaki I., Raptopoulou A., Kritikos HD., Mamalaki C., Sidiropoulos P., Boumpas DT., "Expansion for Toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for induction and maintenance of the autoimmune process," *Arthritis Rheum.* Vol. 54 (11), (2006), págs. 3601-11
- 35 RC Bone, RA Balk, FB Cerra, RP Dellinger, AM Fein, WA Knaus, RM Schein, y WJ Sibbald, "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines fórmula the use of innovative therapies in sepsis," *Chest* vol. 101, (1992), págs. 1644-1655
- Rossignol, D.P. y Lynn, M. TLR 4 antagonists for endotoxemia and beyond, "TLR4 antagonist eritoran (E5564) and TAK-242 afe found useful in management of sepsis", *Curr. Opin. Investig. Drugs* vol. 6, (2005), págs. 496-502
- 40 Ruslan Medzhitov, Paula Preston-Hurlburt y Charles A. Janeway, Jr., "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptative immunity," *Nature* Vol. 388, (1997), págs. 394-397
- Shizuo Akira y Kiyoshi Takeda, "Toll-Like Receptor signaling," *Nature Reviews Immunology* vol. 4, (2004), págs. 499
- Subramanian S., Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, Liang C, Bartov G, McDaniel LD, Zhou XJ, Schultz RA, Wakeland EK, "A TLR7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 103 (26), (2006), págs. 9970-5
- 45 Sukkar MB., Xie S., Khorasani NM., Kon OM., Stanbridge R., Issa R., Chung KF., "Toll-like receptor 2, 3, 4 expression and function in human airway smooth muscle," *J. Allergy Clin. Immunol.* Vol. 18 (3), (2006), págs. 1641-8
- Togbe D., Schnyder Candrian S., Schnyder B., Couillin I., Maillet I., Bihl F., Malo D., Ryffel B., Quesniaux VF., "TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation," *J. Leukoc. Biol.* Vol. 80 (3), (2006), págs. 451-7

Toiyama Y., Araki T., Yoshiyama S., Hiro J., Miki C., Kusunoki M., "The expression patterns of toll-like receptors in the ileal pouch mucosa of postoperative ulcerative colitis patients," *Surg. Today* Vol. 36 (3), (2006), págs. 287-90

Wang T., Town T., Alexopoulou L., Anderson JF., Fikrig E., Flavell RA., "Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis", *Nat. Med.* Vol. 10 (12), (2004), págs. 1366-1373

5 Wei Jiang, Rui Sun, Haiming Wei y Tian Zhigang, "Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of Toll-like receptor 4 expression on macrophages," *PNAS*, vol. 102 (47), (2005), págs. 17077-17082

Xiong J., Zhu ZH., Liu JS., Wang Y., Wu H S., "The expression of Toll-like receptor 2, 4 of livers in mice with systemic inflammatory response syndrome", *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* Vol. 5 (1), (2006), págs. 143-6

REIVINDICACIONES

1. *Mycobacterium w* para su utilización en el tratamiento de la septicemia.
2. Utilización de *Mycobacterium w* en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la septicemia.

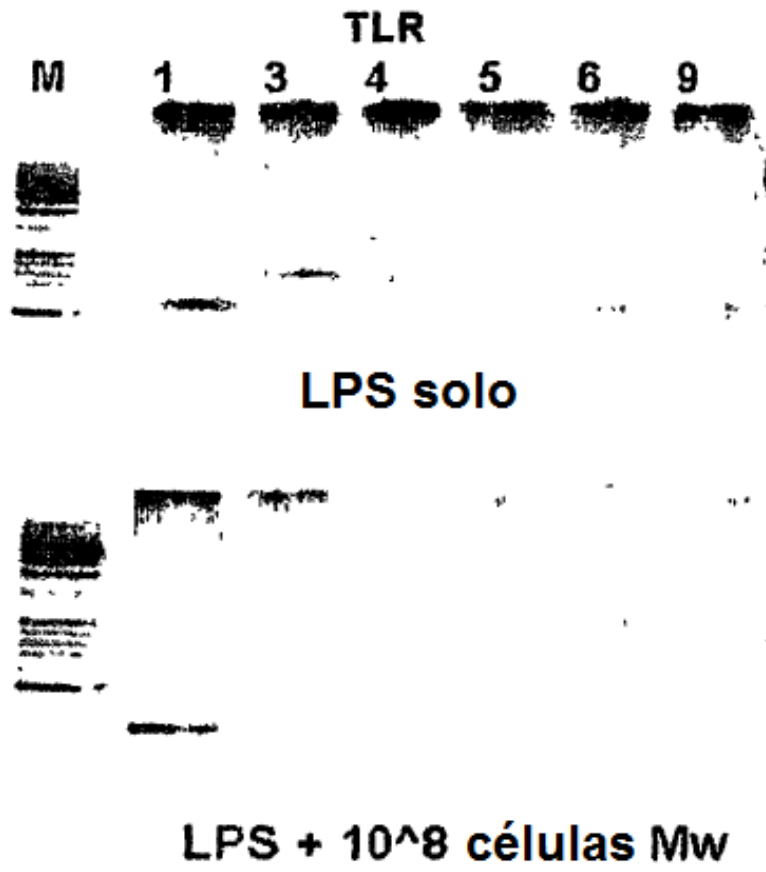


Figura 1

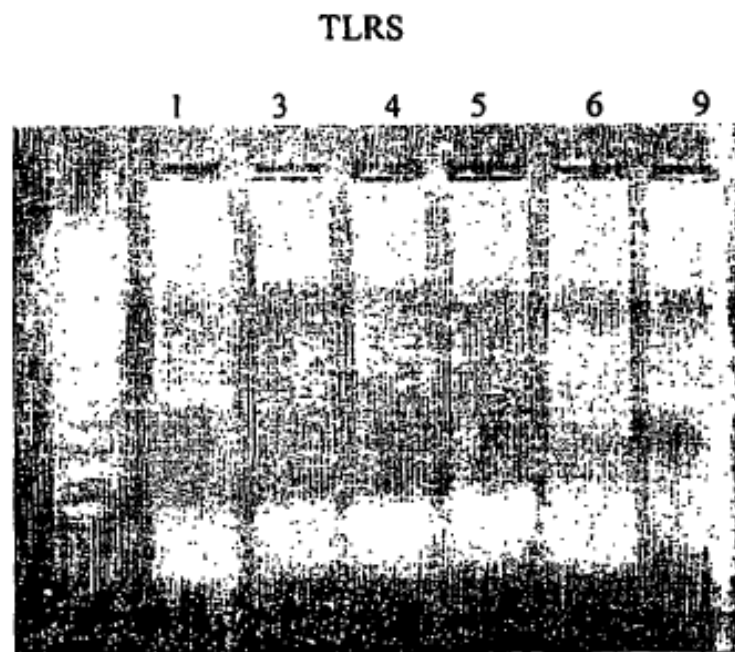
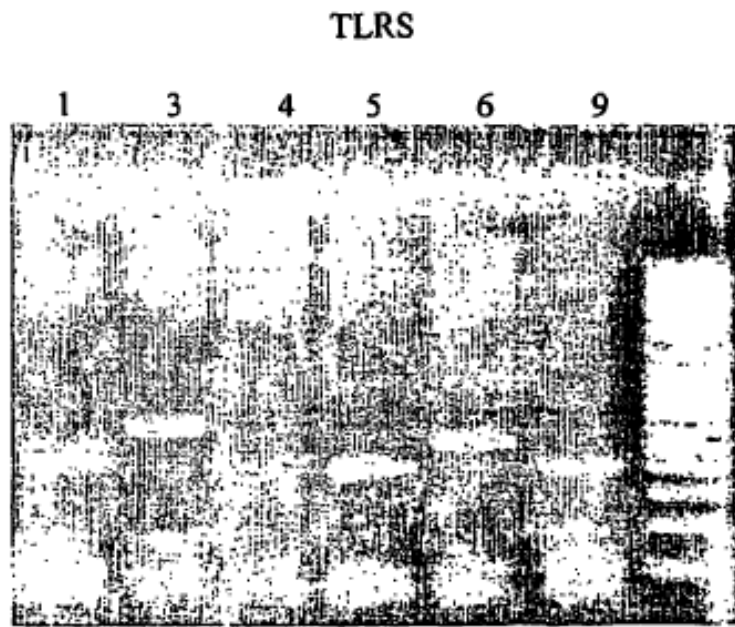


Figura 2

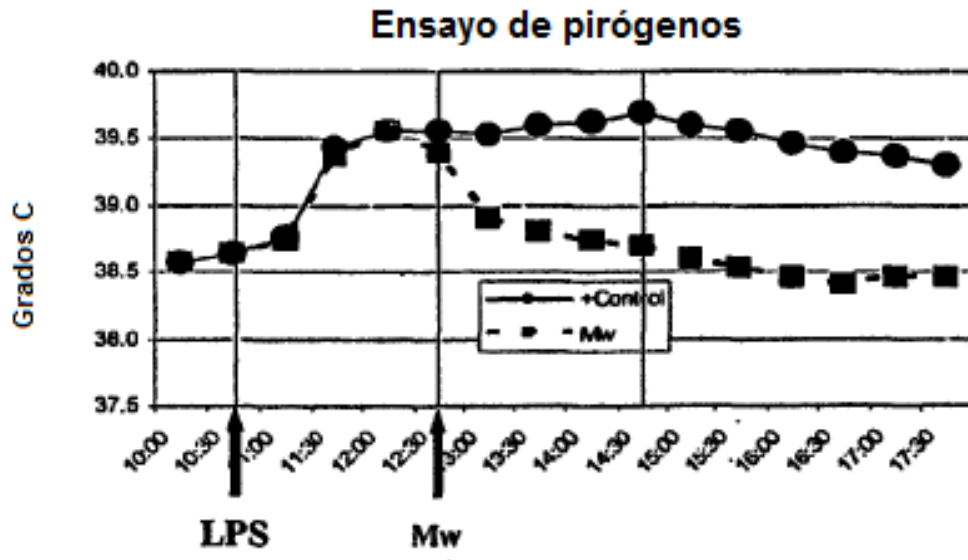


Figura 3

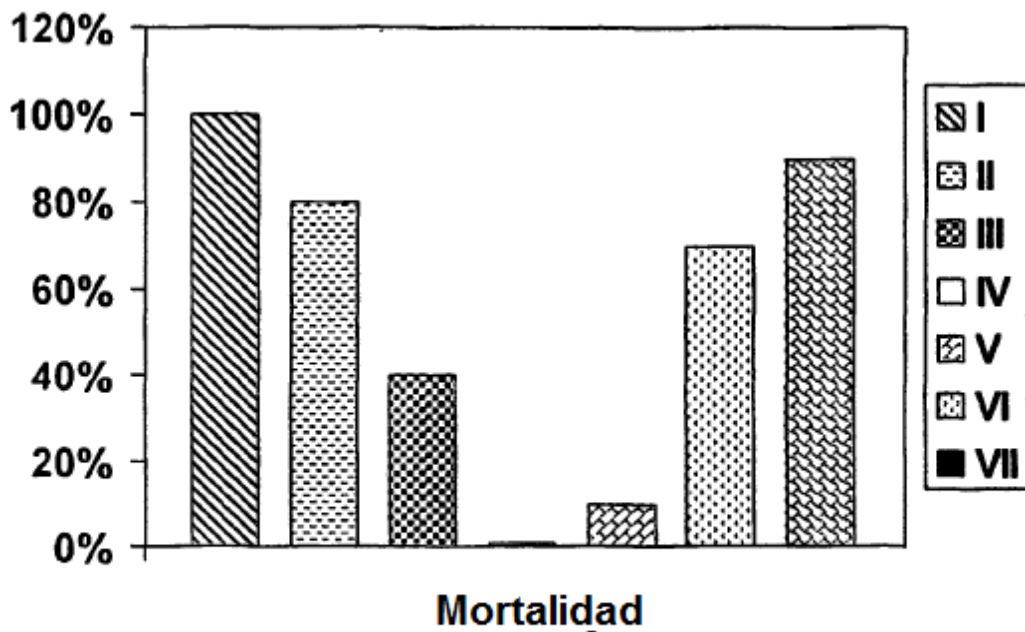


Figura 4

- I. *E. coli*
- II. *E. coli* + Dexametasona (0,5 ml de 4 mg/ml)
- III. *E. coli* + Amoxicilina (500 mg/kg)
- IV. *E. coli* + Dexametasona + Amoxicilina + 0,1 ml de *Mycobacterium* w ID
- V. *E. coli* + Dexametasona + Amoxicilina + 0,1 ml de *Mycobacterium* w IV
- VI. *E. coli* + Dexametasona + 0,1 ml de *Mycobacterium* w ID
- VII. *E. coli* + Dexametasona + 0,1 ml de *Mycobacterium* w IV

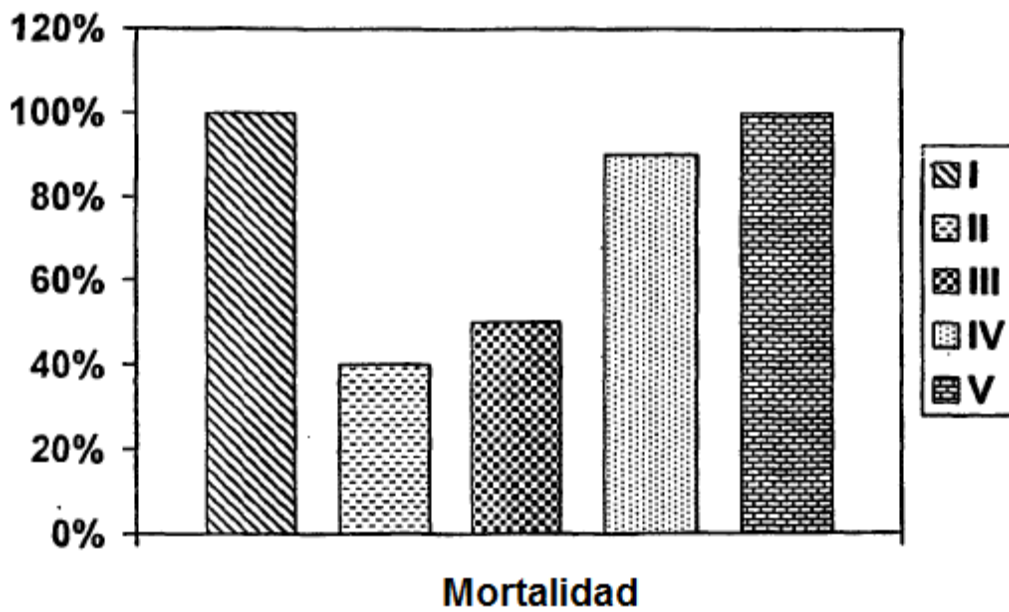


Figura 5

- I. *E. coli*
- II. *E. coli* + Dexametasona (2,0 mg) + Amoxicilina (70 mg/kg) + 0,1 ml de *Mycobacterium w ID*
- III. *E. coli* + Dexametasona (2,0 mg) + Amoxicilina (70 mg/kg) + 0,1 ml de *Mycobacterium w IV*
- IV. *E. coli* + Amoxicilina (70 mg/kg) + 0,1 ml de *Mycobacterium w ID*
- V. *E. coli* + Amoxicilina (70 mg/kg) + 0,1 ml de *Mycobacterium w IV*

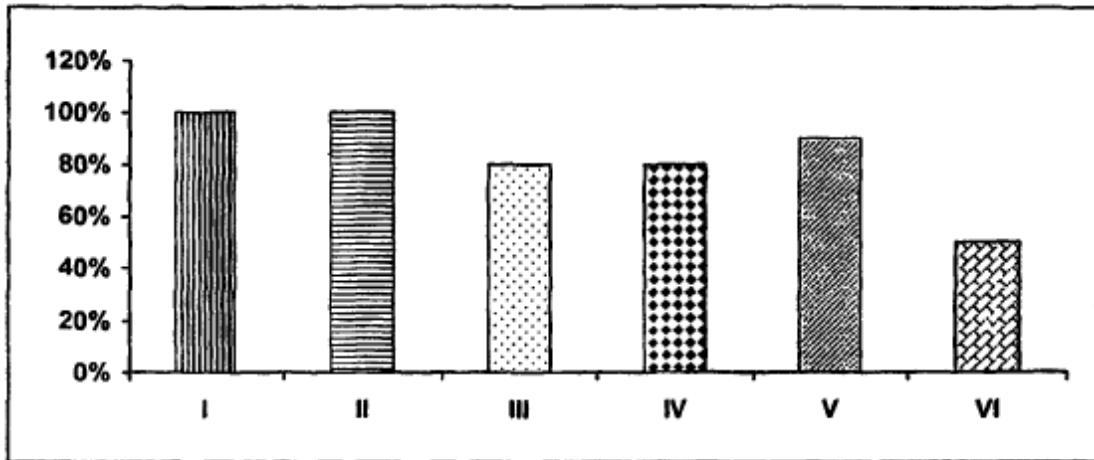


Figura 6

- I. *E. coli*
- II. *E. coli* + Dexasona (0,5 mg/kg)
- III. *E. coli* + Dexasona (0,5 mg/kg) + 0,1 ml de *Mycobacterium* w ID
- IV. *E. coli* + Amoxicilina (70 mg/kg)
- V. *E. coli* + Dexasona (0,5 mg/kg) + Amoxicilina (70 mg/kg)
- VI. *E. coli* + Dexasona (0,5 mg/kg) + Amoxicilina (70 mg/kg) + 0,1 ml de *Mycobacterium* w ID