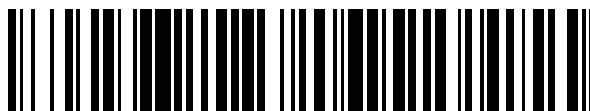


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 180**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/39** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03723085 .1**  
96 Fecha de presentación: **30.04.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1617867**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **COMPOSICIÓN INMUNOMODULADORA QUE CONTIENE UNA FRACCIÓN DE PARTÍCULAS DE LISADOS BACTERIANOS MECÁNICOS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.02.2012**

73 Titular/es:  
**MEDI SERVICE S.R.L.**  
**VIA MATTEOTTI, 43/B**  
**20041 AGRATE BRIANZA, IT**

72 Inventor/es:  
**MELIOLI, Giovanni y**  
**FASANI, Roberto**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 375 180 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

Composición inmunomoduladora que contiene una fracción de partículas de lisados bacterianos mecánicos

5 Ámbito de la invención

La presente invención se refiere a preparaciones bacterianas antigénicas y composiciones farmacéuticas inmunes que contienen fracciones de partículas de lisados bacterianos mecánicos y métodos para su obtención preparación.

10 Estado de la técnica

En el estado de la técnica se conocen composiciones inmunomoduladoras de de diferentes tipos, p.ej. composiciones que contienen endotoxinas LPS, o el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que es una cepa atenuada del *Mycobacterium tuberculosis*, o los RNA de doble hebra (DS-RNA) o, finalmente, composiciones inmunomoduladoras que contienen lisados bacterianos. Los inconvenientes de los tres primeros tipos de composiciones guardan una relación directa con la seguridad, de hecho las LPS pueden utilizarse solamente "in vitro"; el BCG, aunque se emplea en la terapia humana, ha provocado varios casos de enfermedades infecciosas llamadas BGCitis y el DS-RNA no puede utilizarse en personas humanas debido a su alto potencial toxicológico y oncogénico.

20 Los lisados bacterianos solubles obtenidos por tratamiento alcalino, por ejemplo el producto comercial Broncovaxon<sup>(R)</sup>, son también conocidos en el estado de la técnica. Las composiciones bacterianas de este tipo carecen de moléculas intactas capaces de interaccionar con los receptores de tipo TOLL expresados en células de macrófagos y, por consiguiente, en las células precursoras de dendritas. De hecho, la maduración de las células dendríticas depende también de la interacción de dichos receptores con estructuras superficiales de bacterias patógenas.

25 Las composiciones inmunomoduladoras divididas en partículas se conocen también en el estado de la técnica. Son composiciones bacterianas polivalentes que contienen fracciones de lisados mecánicos divididas en partículas de diferentes cepas bacterianas. Se dispone de productos comerciales, por ejemplo el Ismigen<sup>(R)</sup>, Immubron<sup>(R)</sup>, que contienen una mezcla de escombros obtenidos por fragmentación mecánicas de bacterias específicas: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae - ozaenae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes - viridans*, *Neisseria catarrhalis*. En el documento FR 2307542A se describe una composición inmunoestimulante que contiene lisados mecánicos de 6 bacterias. En la terminología más reciente, el *Diplococcus pneumoniae* y la *Neisseria catarrhalis* se denominan también *Streptococcus pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*, respectivamente.

35 Sin embargo, las composiciones que contiene material de tantas cepas bacterianas son difíciles de producir y no están exentas de problemas en relación a la estandarización de la producción, la estandarización del régimen de administración y la consistencia de los efectos obtenidos. Además, aunque los compuestos conocidos ya despliegan una considerable actividad inmunoestimulante, tienen una actividad predeterminada definida, que no permite flexibilidad alguna en la adaptación del efecto a las necesidades clínicas específicas. El estado de la técnica, por tanto, mantiene varias necesidades sin resolver en lo que respecta a las inmunocomposiciones del tipo antes mencionado; entre ellas, la necesidad de proporcionar composiciones que puedan producirse y estandarizarse con mayor facilidad; y la necesidad de proporcionar productos inmunomoduladores incluso más eficaces, capaces de estimular o de inhibir la respuesta inmune, pero sobre todo capaces de adaptarse a cualquier necesidad clínica específica, siendo por tanto idóneos para un tratamiento personalizado.

45 Resumen de la invención

50 La presente invención resuelve todos los aspectos de los problemas recién mencionados proporcionando composiciones polivalentes que contengan fracciones de partículas de lisados obtenidos por lisis mecánica de diferentes especies bacterianas, un método para seleccionar dichas especies bacterianas y un método para preparar dichas composiciones. Estas composiciones poseen inmunoestimulación o actividad inmunomoduladora, en el sentido de que inducen la maduración de células dendríticas inmaduras.

55 Por consiguiente es objeto de la presente invención un método para seleccionar las bacterias o una combinación de bacterias adecuadas para preparar inmunocomposiciones que contengan fracciones de lisados obtenidos por lisis mecánica divididas en partículas de tales bacterias para el tratamiento personalizado de los pacientes, que consta de los pasos siguientes:

60 seleccionar las bacterias o combinaciones de bacterias de los géneros siguientes: *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Diplococcus*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria*,  
determinar el nivel de expresión de los cuatro marcadores de membrana: DC80, DC83, DC86 y HLA-II inducidos por cada bacteria o combinación de bacterias en células dendríticas inmaduras;  
calcular para cada bacteria o combinación de bacterias la puntuación acumulada, que es la suma de las cantidades  
65 de los cuatro marcadores expresados,  
confeccionar el listado de todas bacterias o combinación de bacterias aumentando las puntuaciones acumuladas,

con lo cual: cuanto mayor sea la puntuación acumulada, tanto mayor será el efecto de inmunoestimulación.

Un segundo objeto de la invención es la inmunocomposición para utilizar en el inmunotratamiento médico, que contiene las fracciones de lisados obtenidas por lisis mecánica de las bacterias o combinaciones de bacteria seleccionadas, divididas en partículas. La inmunocomposición estimuladora de la maduración de células dendríticas inmaduras que contiene las fracciones de lisados obtenidas por lisis mecánica de bacterias, divididas en partículas, de cinco géneros o menos, elegidos entre el grupo formado por el *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Diplococcus*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria* y dichas bacterias se eligen entre el *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp, y *Neisseria catarrhalis*. Se entiende por *Klebsiella* spp la *K. pneumoniae* y/o *ozaenae*, y por *Streptococcus* spp se entiende el *S. pyogenes* y/o *viridans*.

La composición de la invención puede contener de modo ventajoso por lo menos una de las especies *Klebsiella* spp, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria catarrhalis* e inducir la maduración completa de las células dendríticas inmaduras, con expresión completa de las moléculas coestimuladoras CD83, CD80, CD86 y/o HLA de la clase II.

Las diferentes formas de realización de la invención comprenden las composiciones polivalentes que contienen combinaciones específicas de dos, tres, cuatro o cinco componentes del grupo formado por el *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp, *Neisseria catarrhalis*.

Otro objeto de la presente invención es un método para preparar inmunocomposición dividida en partículas, que contiene las bacterias seleccionadas o la combinación de bacterias, dichas células de cultivo bacteriano elegidas entre el *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp, *Neisseria catarrhalis* se lisan mecánicamente, después se recogen las fracciones de partículas de los lisados y opcionalmente se liofilizan. El material antigénico liofilizado o suspendido puede formularse en composiciones farmacéuticas idóneas. En función de las bacterias elegidas se preparan composiciones que producen la inducción de una maduración completa de las células dendríticas inmaduras. Cuando la composición contiene material de dos, tres, cuatro o cinco cultivos bacterianos, los lisados en cuestión se preparan de modo individual y después se mezclan para obtener la actividad deseada.

Otro objeto adicional de la invención es una composición adecuada para el uso en el inmunotratamiento médico, con ventaja, en un tratamiento personalizado del paciente.

La composición antes descrita se administra en una dosis terapéuticamente eficaz, a ser posible una dosis adaptada al paciente, para obtener el efecto necesario.

Las composiciones de la invención ofrecen ventajas indiscutibles. Pueden producirse, y su efecto médico estandarizarse, de modo más fácil y eficaz que las de la técnica anterior, debido que se emplea un número reducido de cepas. Además, en función del tipo de bacterias elegidas y de las combinaciones específicas, estas composiciones son capaces de modular la respuesta inmune del paciente. Esta propiedad ofrece amplias posibilidades de adaptación de las composiciones y del tratamiento a cualquier necesidad clínica específica, permitiendo de este modo la realización de tratamientos personalizados de los pacientes.

Otra ventaja de las composiciones de la invención es que pueden desplegar la misma actividad inmunoestimulante de las composiciones ya conocidas o incluso una actividad inmunoestimulante mucho mayor, a pesar de contener material de un número reducido de géneros bacterianos.

#### Descripción de las figuras

La figura 1 es una representación gráfica de las puntuaciones calculadas para diferentes combinaciones de bacterias. Las puntuaciones son la suma de las cantidades determinadas por inmunofluorescencia de los cuatro marcadores de membrana CD83, CD86, CD80 y HLA-II expresados por todas las especies de bacterias de cada combinación. Todas las combinaciones son resumen en cuatro conglomerados.

La figura 2 es una representación gráfica de las puntuaciones del conglomerado 1.

La figura 3 es una representación gráfica de las puntuaciones del conglomerado 2.

La figura 4 es una representación gráfica de las puntuaciones del conglomerado 3.

La figura 5 es una representación gráfica de las puntuaciones del conglomerado 4.

En la figura 6 se ilustra un diagrama de puntos: distancias entre el centro del conglomerado frente a la puntuación de cada caso.

En la figura 7 se ilustra la puntuación promedio del conglomerado.

Descripción detallada de la invención

Las células dendríticas son células especializadas que presentan antígenos. Su maduración es un primer paso necesario para inducir de la inmunidad de adaptación. La función de las células dendríticas es transportar los antígenos patógenos hasta órganos linfoides periféricos y allí presentarlos a los linfocitos T. Cuando una célula dendrítica recoge un patógeno de un tejido infectado, entonces se convierte en actividad y se desplaza hasta un nódulo linfático próximo. Después de la activación, la célula dendrítica madura para convertirse en una célula muy eficaz que presenta antígeno (APc) y sufre cambios que le permiten activar a los linfocitos específicos del patógeno, existentes en los nódulos linfáticos. La respuesta inmune realizada a través de las células dendríticas necesita varias moléculas coestimuladoras, a saber la CD80, CD83 y CD86. Estas están conjugadas con los ligandos correspondientes de los linfocitos efectores, a los que se presenta el péptido relevante mediante la HLA de la clase I o de la clase II: cuanto mayor es la expresión de las moléculas coestimuladoras en la superficie de células dendríticas, tanto más eficaz será la capacidad de presentar el antígeno y de reclutar linfocitos efectores. El efecto final es una intensificación de la respuesta inmune, es decir de la estimulación inmune. Al contrario, cuanto más baja sea la expresión de las moléculas coestimuladoras, tanto menor será la eficacia de la presentación del antígeno.

El material dividido en partículas según la invención es capaz de realizar las dos funciones recién indicadas, dependiendo de las bacterias y/o las combinaciones bacterianas seleccionadas. En particular, la estimulación de la maduración completa de las células dendríticas inmaduras va acompañada de la expresión no solo de la CD83, sino también de la CD80 y/o CD86 y/o HLA de clase II.

Las fracciones divididas en partículas o corpúsculos dentro del sentido de la presente invención son fracciones de lisados bacterianos que contienen antígenos insolubles divididos en partículas. En esta forma, los antígenos no pueden filtrarse ni centrifugarse a alta velocidad sin sufrir modificaciones significativas en sus características inmunológicas. A diferencia de los antígenos divididos en partículas, los antígenos solubles conocidos de la técnica anterior, una vez solubilizados en cualquier disolvente apropiado, pueden filtrarse o centrifugarse a alta velocidad sin verse afectadas sus características inmunológicas.

Otra característica importante de la invención es que la preparación de las fracciones de partículas no requiere pasos drásticos de solubilización, como ocurre en el caso de los antígenos solubles conocidos de la técnica anterior. Por esta razón, las proteínas antigénicas de la invención conservan todas sus estructuras nativas, es decir, las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, virtualmente intactas. Por consiguiente, la respuesta de anticuerpo provocada por una fracción de antígenos dividida en partículas no se dirige solamente contra los antígenos simples resultantes de las estructuras primaria y secundaria, sino también contra los antígenos complejos o repetidos resultantes de las estructuras primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. Esto es muy importante para la eficacia de la respuesta inmune del anticuerpo, que se dirige principalmente (aprox. en un 80 %) contra sitios antigénicos de conformación tridimensional.

Existe también una diferencia dramática en el mecanismo de acción entre el antígeno soluble de la técnica anterior y el antígeno de la invención. La respuesta causada por los antígenos divididos en corpúsculos está mediada por la actividad citotóxica de la CD4 y CD8. Esto se traduce en una respuesta del anticuerpo de un espectro mucho más amplio. Finalmente, la activación de células dendríticas, que es el punto de partida de los procesos de maduración celular y de presentación del antígeno, interviene en la co-estimulación de muchas otras células que contribuyen a la respuesta inmune completa. Esta activación se realiza eficazmente por los antígenos divididos en partículas, pero en un grado muy pobre por los antígenos solubles. De hecho, la activación viene mediada por los receptores de tipo Toll, que son específicos de estructuras de polisacárido, por ejemplo los protidoglicanos y los lipopolisacáridos, que son peculiares de la pared bacteriana intacta. Otro efecto es que la respuesta inmune a los fragmentos de pared bacteriana está acompañada de una actividad opsonizadora eficaz, que no se observa en el caso de los antígenos solubles.

La capacidad de los antígenos divididos en partículas de disparar una respuesta inmune muy eficaz permite preparar composiciones inmunes libres de cualquier tipo de inmunoadyuvantes, por ejemplo el *Mycobacterium tuberculosis*, aceites minerales o cualquier otro adyuvante potencialmente nocivo para la salud humana, pero que normalmente está presente en las composiciones de antígenos solubles.

Las fracciones de lisados bacterianos divididas en partículas de la invención se obtienen por lisado mecánico. Puede aplicarse cualquier método físico conocido apropiado para fragmentar las células bacterianas y producir escombros de membrana con estructuras antigénicas inalteradas. Los medios apropiados son el prensado, la válvula de alta presión, el molino de bolas, la molienda, la exposición a ultrasonidos, la ósmosis, la criólisis (congelación y descongelación). La fracción insoluble del lisado bacteriano dividida en partículas se somete después a la separación de los componentes solubles del lisado. Este paso se realiza con arreglo a técnicas ya conocidas, apropiadas para separar las fases insolubles, por ejemplo el lavado, la filtración, la centrifugación o la combinación de estas técnicas.

El proceso de preparación de la fracción antigénica insoluble puede constar de uno cualquiera de los siguientes pasos:

- a. Identificación de la especie bacteriana elegida;
- b. Cultivo y propagación en medio de cultivo de las cepas elegidas;
- c. Recogida de las células bacterianas del medio de cultivo y lavado;
- d. Fijación con formaldehído o inactivación por calor;
- 5 e. Lisis mecánica de las células bacterianas;
- f. Lavado de la fracción dividida en partículas y eliminación de la fracción soluble;
- g. Liofilización de la fracción dividida en partículas que contiene los escombros celulares;
- h. Mezclado del material liofilizado de dos o más especies elegidas para producir las combinaciones antigénicas deseadas.

10 Es obvio que, con excepción de la lisis mecánica y el aislamiento de la fracción insoluble, los demás pasos son opcionales y pueden llevarse a cabo en cualquier orden de proceso que sea prácticamente aceptable y con arreglo a cualquier técnica adecuada conocida.

15 Se formulan las fracciones insolubles obtenidas de este modo, en forma de suspensión líquida o de material sólido liofilizado, en una composición farmacéutica adecuada para la administración a personas humanas o animales.

20 Estas composiciones son formulaciones líquidas estériles o no estériles, en forma de gotas, gotas micronizadas, esprays y aerosoles, para la administración oral, intranasal o en general a las mucosas. La suspensión estéril puede utilizarse para la inyección endovesical, endotorácica, endoperitoneal, hipodérmica o intramuscular. El material liofilizado sólido puede formularse en formas farmacéuticas sólidas, por ejemplo tabletas, píldoras o rombos. Las formas preferidas son las tabletas y los rombos para administración sublingual. Como alternativa se liofiliza la suspensión líquida en viales, en una cantidad monodosis apropiada para la reconstitución con un medio líquido estéril, según convenga. Si las composiciones de la invención se emplean como adyuvante inespecífico para la inmunización específica, entonces, aparte del antígeno dividido en partículas de la invención, pueden contener otros antígenos o alérgenos deseados.

30 Las cantidades de los materiales antigénicos divididos en partículas y las selecciones de combinaciones específicas de bacterias dependerán de la necesidad y del estado patológico del paciente. Si se emplea como adyuvante para la estimulación inmune inespecífica, la cantidad se situará entre 0,1 µg/día y 10 mg/día, con preferencia entre 10 µg/día y 1 mg/día o en torno a 0,5 mg/día. Si se emplea como adyuvante para la estimulación inmune específica, la cantidad se situará entre 100 µg/día y 10 mg/día, con preferencia entre 1 mg/día y 5 mg/día. Si se emplea para la inmunomodulación, la cantidad se situará entre 0,1 µg/día y 10 mg/día, con preferencia entre 10 µg/día y 1 mg/día. Las cantidades recién mencionadas son independientes de la vía de administración.

35 Las formulaciones monodosis contienen las mismas cantidades diarias o submúltiplos de las mismas. Las composiciones de la invención pueden contener opcionalmente cualquier vehículo, excipiente o adyuvante farmacéutico típico de las composiciones inmunes.

40 Las bacterias o combinaciones de bacterias preferidas se recogen en la siguiente tabla, junto con el producto comercial Ismigen. En la tabla 1 se recogen además las puntuaciones de cada bacteria o combinación de bacterias que refleja la capacidad específica de inducir la maduración de las células dendríticas inmaduras.

45 Tabla 1

|                          |                          |                          |  |  |        |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|--|--------|
| <i>S aureus</i>          | <i>Streptococcus</i> spp |                          |  |  | 23,3   |
| <i>S aureus</i>          |                          |                          |  |  | 24,0   |
| <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |  |  | 102,0  |
| <i>D pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |  |  | 131,8  |
| <i>D pneumoniae</i>      |                          |                          |  |  | 140,00 |
| <i>S aureus</i>          | <i>D pneumoniae</i>      |                          |  |  | 153,6  |
| <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |  |  | 190,2  |
| <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |  |  |        |
| <i>S aureus</i>          | <i>H influenzae</i>      |                          |  |  | 203,0  |
| <i>S aureus</i>          | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |  |  | 203,6  |
| <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |  |  | 204,9  |
| <i>Klebsiella</i> spp    | <i>H influenzae</i>      |                          |  |  | 224,2  |
| <i>S aureus</i>          | <i>Klebsiella</i> spp    |                          |  |  | 224,5  |

ES 2 375 180 T3

|                       |                          |                          |                          |                          |                      |       |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|-------|
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |                      | 232,3 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |                      | 260,5 |
| <i>S aureus</i>       | <i>D pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |                      | 268,5 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 280,6 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 285,6 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 287,6 |
| <i>H influenzae</i>   |                          |                          |                          |                          |                      | 290,0 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 302,0 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      |                          |                          |                      | 305,5 |
| <i>S aureus</i>       | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 312,9 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |                          |                      | 334,9 |
| <i>S aureus</i>       | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 336,9 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      |                          |                          |                          |                      | 346,8 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 350,4 |
| <i>H influenzae</i>   | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 350,9 |
| <i>D pneumoniae</i>   | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 361,5 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 371,1 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                      | 372,5 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                      | 375,0 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                      | 377,0 |
| <i>S aureus</i>       | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          | 377,4                | 377,4 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 378,2 |
| <i>H influenzae</i>   | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                          | 383,4                | 383,4 |
| <i>D pneumoniae</i>   | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 387,1 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>H influenzae</i>      |                          |                          |                      | 388,8 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      |                          |                      | 389,4 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                      | 396,6 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 398,2 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                          |                      | 399,9 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i> | 400,0 |
| <i>S aureus</i>       | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 403,4 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                      | 410,0 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 414,1 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 414,8 |
| <i>D pneumoniae</i>   | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 416,8 |
| <i>S aureus</i>       | <i>D pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                      | 419,2 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                      | 420,3 |
| <i>S aureus</i>       | <i>D pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 425,2 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp | <i>M catarrhalis</i>     |                      | 432,8 |
| <i>S aureus</i>       | <i>Klebsiella</i> spp    | <i>D pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                      | 441,7 |
| <i>Klebsiella</i> spp | <i>D pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus</i> spp |                          |                          |                      | 447,9 |

|                          |                      |                     |                          |                      |  |       |
|--------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|--|-------|
| <i>D pneumoniae</i>      | <i>S aureus</i>      | <i>H influenzae</i> | <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i> |  | 450,4 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>D pneumoniae</i>  |                     |                          |                      |  | 450,5 |
| <i>Klebsiella spp</i>    |                      |                     |                          |                      |  | 458,0 |
| <i>M catarrhalis</i>     |                      |                     |                          |                      |  | 463,0 |
| <i>D pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>  |                     |                          |                      |  | 470,7 |
| <i>S aureus</i>          | <i>D pneumoniae</i>  | <i>H influenzae</i> |                          |                      |  | 476,6 |
| <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i> |                     |                          |                      |  | 488,8 |
| <i>D pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i> |                     |                          |                      |  | 531,0 |
| <i>S aureus</i>          | <i>M catarrhalis</i> |                     |                          |                      |  | 533,4 |

Las puntuaciones situadas entre 23,3 y 533,4 son la suma de las cantidades de los cuatro marcadores de membrana, CD83, CD86, CD80 y HLA-II expresadas por todas las especies bacterianas de cada combinación. La cantidad de expresión de los marcadores se determina por inmunofluorescencia, del modo descrito en la sección experimental.

La puntuación obtenida por el producto comercial Ismigen (*S. aureus*, *Klebsiella spp*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Streptococcus spp*, *M. catarrhalis*) es de 400 y se toma como valor de. Las puntuaciones superiores a 400 indican una inducción mejorada de la maduración de células dendríticas inmaduras con respecto al valor de referencia, mientras que las puntuaciones inferiores a 400 indican una inducción menor de la maduración de las células dendríticas maduraciones con respecto al valor de referencia. Todas las puntuaciones observadas se han procesado con arreglo al método biométrico descrito en la sección experimental y se reúnen en cuatro conglomerados marcados como conglomerado de 1 a 4. Las bacterias y combinaciones bacterianas contenidas en cada conglomerado presentan una inmunoadividad diferente. En particular se ha observado experimentalmente que la presencia de material antigénico insoluble de la *Klebsiella spp*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria catarrhalis* intensifica la capacidad de maduración completa de células dendríticas inmaduras y se traduce en inmunoestimulación. Por el contrario, la presencia de material antigénico insoluble del *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* o *Streptococcus spp* (*pyogenes* y/o *viridans*) induce un menor grado de maduración de células dendríticas inmaduras. Esta última observación, es decir, la inmunosupresión, es extraordinariamente interesante, porque constituye la primera evidencia de que existen bacterias capaces de inhibir la respuesta inmune mediante un mecanismo de escape, hasta el momento desconocido en las bacterias. En la actualidad solamente se sabía que el herpes virus inhibe la respuesta inmune mediante una regulación decreciente de la expresión del CD83 después de la invención.

Las composiciones de la invención pueden utilizarse para tratamientos terapéuticos específicos e inespecíficos, incluida la prevención o la terapia, contra infecciones bacterianas, en especial las infecciones respiratorias. Mediante la selección cuidadosa de las bacterias o combinación de bacterias específicas es posible además adaptar las inmunocomposiciones a las condiciones y necesidades específicas del paciente a tratar, permitiendo de este modo adoptar un tratamiento personalizado del paciente.

Las composiciones inmunoestimuladoras se pueden utilizar en todos aquellos estados normales o patológicos, en los que puede ser útil o necesaria la inducción o la estimulación de la maduración completa de las células dendríticas inmaduras. Por lo tanto, las composiciones en cuestión se pueden utilizar para efectuar la estimulación inespecífica del sistema inmune; la inmunopotenciación inespecífica mediante la vacunación; la inmunoprofilaxis específica de infecciones causadas por cepas bacterianas contenidas en la composición; la inmunopotenciación de un efecto de vacuna en pacientes que "no responden"; la inmunoterapia inespecífica de tumores, por ejemplo melanoma, tumor superficial de vejiga, NSCLC; la inmunoterapia específica de tumores con antígenos asociados de peso molecular diferente o con efectores linfoides asociados o con células dendríticas cargadas; la activación del sistema de macrófago como limpiador en las enfermedades crónicas, decúbito o úlceras fagedénicas y tumores de la zona craneoencefálica.

Las composiciones inmunomoduladoras de la invención se pueden utilizar también para el tratamiento y prevención de las enfermedades autoinmunes, alergia, enfermedad del injerto contra el hospedante y el rechazo de trasplante.

La presente invención abarca también el tratamiento terapéutico de pacientes que lo necesiten. El tratamiento implica la administración diaria de dosis terapéuticamente activas del material antigénico dividido en partículas, durante un período de 1 a varios días en el caso de un tratamiento profiláctico, o durante el tiempo en el que persiste el estado patológico a tratar.

La invención se describe además con detalle mediante los ejemplos de métodos experimentales, que con todo no tienen un efecto limitador sobre el alcance de la protección.

Preparación de fracciones antigénicas divididas en partículas

Los lisados mecánicos de bacterias típicas de infecciones respiratorias (*Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus py-*

*ogenes, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria (Moraxella) catarrhalis* se obtienen del modo siguiente. Se obtienen las bacterias vivas para los estudios "in vitro" de las colecciones bacterianas disponibles. La pureza del cultivo en bruto se evalúa realizando procedimientos microbiológicos clínicos rutinarios de identificación. Después de la expansión "in vitro" de cada cepa, se lavan las bacterias profusamente y después se someten a fragmentación mecánica, empleando una válvula de alta presión. Después de otro paso de lavado se liofiliza el polvo y se almacena a 4°C. Con el examen microscópico de las bacterias fragmentadas después de la tinción Gram se documenta la presencia de escombros bacterianos que mantengan las características Gram originales.

El carácter antigénico de estas preparaciones se evalúa realizando una electroforesis de cohete (rocket electrophoresis) frente a un panel de anti-SA policlonales, anti-espías, anti-KP, anti-HI, anti-MC y anti-Spn, obtenidos en conejos con arreglo a menos ya conocidos. Para confirmar la actividad inmunológica de estos reactivos, los antígenos divididos en partículas se disuelven parcialmente manteniéndolos en agitación durante una noche con un 0,2% de Tween 20 en solución salina tamponada con fosfato y se analiza la fracción no dividida en partículas realizando una electroforesis de cohete.

#### Aislamiento y cultivo de células dendríticas humanas

Se derivan las células dendríticas humanas de células mononucleadas de sangre periférica humana con arreglo a un método ya conocido. Resumiendo, se tratan los monocitos muy purificados con GM-CSF e IL-4 durante 5 días y después se induce su maduración empleando diferentes concentraciones de PMBL. Como controles se emplean el TNF-a, LPS, BCG.

#### Método de inmunofluorescencia

La determinación del nivel de expresión de los marcadores celulares CD83, CD86, CD80 y HLA-II se efectúa con arreglo al siguiente método de inmunofluorescencia:

Se tratan las células dendríticas con un anticuerpo monoclonal específico del antígeno CD83. Se tratan otras células con anticuerpos monoclonal del CD80, CD86 y HLA de clase II. Se ajusta a priori la concentración de cada anticuerpo a un valor específico. Se marcan todos los anticuerpos con una molécula de fluorocromo, por ejemplo el diacetato de fluoresceína. Pasados 30 min se lavan las células con 2 ml de solución salina, se centrifugan y se suspenden de nuevo en un pequeño volumen de solución salina. Después se analizan las células por citometría de flujo, una técnica que permite evaluar el porcentaje de células que expresan un antígeno definido dentro del conjunto de células analizadas.

Esta técnica permite además determinar el número promedio de moléculas de antígeno que se expresan en la membrana celular, ya que este número es proporcional a la intensidad de fluorescencia, medida en el citofluorímetro. De este modo es posible evaluar la intensidad de fluorescencia de las células dendríticas inmaduras, que es extremadamente bajo, ya que los anticuerpos antes mencionados solamente reconocen los antígenos expresados durante la maduración de las mismas células y la intensidad de las células dendríticas maduras, por el contrario, es muy elevada. La evaluación de la intensidad de fluorescencia en diferentes condiciones experimentales pone de manifiesto si tal estado patológico inhibe o induce la maduración completa de las células dendríticas. Así es cuando en las células se detecta una fluorescencia muy bajo o extremadamente elevada, respectivamente.

#### Tratamiento biométrico de los resultados

Se evalúa la actividad inmunológica de las seis especies bacterianas siguientes y de muchas de sus combinaciones posibles:

- A STAPHYLOCOCCUS AUREUS
- B KLEBSIELLA PNEUMONIAE - OZAENAE
- C DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE
- D HAEMOPHILUS INFLUENZAE
- E STREPTOCOCCUS PYOGENES - VIRIDANS
- F NEISSERIA CATARRHALIS

Para cada especie bacteriana se consideran los cuatro marcadores de membrana siguientes: HLA clase II, CD80, CD83 y CD86.

Se eligen las bacterias individuales o las combinaciones arbitrarias de bacterias y para cada selección/combinación se calcula la suma de las cantidades de los cuatro marcadores expresados con arreglo al método fluorimétrico antes descrito. Después se obtienen las puntuaciones acumuladas, que dependen de los niveles de expresión del marcador. La puntuación de la combinación de referencia de seis bacterias ya conocidas en la técnica anterior (Ismigen) es de 400.



5 Se reúnen los resultados así obtenidos en cuatro conglomerados, con arreglo al método biométrico de análisis de conglomerados (cluster analysis), en base a su homogeneidad calculada en términos de distribución alrededor del centro del conglomerado. En sentido operativo, la distancia relativa entre la puntuación de cada combinación y el centro del conglomerado se calcula por el método del valor K promedio. Para evaluar mejor las distancias relativas se adopta el método de la adaptación iterativa de los centros de los conglomerados. Finalmente, la asociación correcta de cualquier combinación con un conglomerado específico se confirma mediante un análisis de Fischer de las varianzas estadísticas.

10 Los resultados se recogen en la siguiente tabla 2, en la que se indica la distancia desde el centro del conglomerado de cada bacteria o combinación de bacterias junto con el número (de 1 a 4) del conglomerado al que se atribuye cada componente.

Tabla 2

| Bacterias | Conglomerado | Distancia desde el centro del conglomerado |
|-----------|--------------|--|
| AE        | 1            | 72,483                                     |
| A         | 1            | 71,783                                     |
| E         | 1            | 6,217                                      |
| CE        | 1            | 36,017                                     |
| C         | 1            | 44,217                                     |
| AC        | 1            | 57,817                                     |
| CDE       | 3            | 60,865                                     |
| E         | 3            | 59,065                                     |
| AD        | 3            | 48,065                                     |
| ADE       | 3            | 47,265                                     |
| DE        | 3            | 46,165                                     |
| BD        | 3            | 26,865                                     |
| AB        | 3            | 26,565                                     |
| BDE       | 3            | 18,765                                     |
| ABE       | 3            | 9,435                                      |
| ACE       | 3            | 17,435                                     |
| BEF       | 3            | 29,535                                     |
| ABF       | 3            | 34,535                                     |
| BCEF      | 3            | 36,535                                     |
| D         | 3            | 38,935                                     |
| BDF       | 3            | 50,935                                     |

15 (continuación)

| Bacterias | Conglomerado | Distancia desde el centro del conglomerado |
|-----------|--------------|--|
| ABC       | 3            | 54,435                                     |
| ADF       | 3            | 61,835                                     |
| BE        | 2            | 50,352                                     |
| ADEF      | 2            | 46,352                                     |
| BC        | 2            | 38,452                                     |
| BCDF      | 2            | 34,852                                     |
| DEF       | 2            | 34,352                                     |

ES 2 375 180 T3

|       |   |        |
|-------|---|--------|
| CDF   | 2 | 23,752 |
| ABDF  | 2 | 14,152 |
| ABCDE | 2 | 12,752 |
| ABCE  | 2 | 10,252 |
| BCDEF | 2 | 8,252  |
| ACDE  | 2 | 7,852  |
| ABEF  | 2 | 7,052  |
| DF    | 2 | 1,852  |
| CDEF  | 2 | 1,848  |
| ABD   | 2 | 3,548  |
| ABCD  | 2 | 4,148  |
| BCDE  | 2 | 11,348 |
| AEF   | 2 | 12,948 |
| BF    | 2 | 14,648 |
| ACDF  | 2 | 18,148 |
| ABCDF | 2 | 24,748 |
| BCF   | 2 | 28,848 |
| BDEF  | 2 | 29,548 |
| CEF   | 2 | 31,548 |
| ACF   | 2 | 33,948 |
| ABDE  | 2 | 35,048 |
| ACEF  | 2 | 39,948 |
| ABDEF | 4 | 37,600 |
| ABCF  | 4 | 28,700 |
| BCE   | 4 | 22,500 |
| CADEF | 4 | 20,000 |
| BCD   | 4 | 19,900 |
| B     | 4 | 12,400 |
| F     | 4 | 7,400  |
| CD    | 4 | ,300   |
| ACD   | 4 | 6,200  |

(continuación)

| Bacterias | Conglomerado | Distancia desde el centro del conglomerado |
|-----------|--------------|--|
| EF        | 4            | 18,400                                     |
| CF        | 4            | 60,600                                     |
| AF        | 4            | 63,000                                     |

Representación gráfica de la respuesta inmune provocada por diferentes conglomerados

- 5 Se evalúan experimentalmente las bacterias o combinaciones bacterianas pertenecientes a los diferentes conglomerados en forma de su nivel acumulado de expresión de los cuatro marcadores de membrana. Los componentes del conglomerado 4 presentan la expresión más eficaz de los marcadores de membrana, que resulta evidente por las

## ES 2 375 180 T3

puntuaciones correspondientes, que siempre son mayores que el valor 400 de referencia, atribuido al producto ya conocido (ver figuras de 1 a 7). Las bacterias o combinaciones bacterianas de este conglomerado son las que producen la respuesta inmunoestimuladora más alta.

### 5 Contribución debida a cada factor de conglomerado 4

Se evalúa con arreglo al método siguiente la contribución debida a diferentes factores (bacterias o combinaciones de bacterias) pertenecientes al conglomerado número 4, en términos de aumento o disminución porcentual de la puntuación. La puntuación obtenida con una bacteria de referencia tomada individualmente se cifra arbitrariamente en 100. Después se evalúa la puntuación obtenida con las combinaciones que contienen dicha bacteria de referencia.

10

| F (NEISSERIA CATARRHALIS): 100            |      |          |     |
|---|------|----------|-----|
| añadida                                   | A    | obtenida | 115 |
|   | B    |          | 86  |
|   | C    |          | 115 |
|   | D    |          | 83  |
|   | E    |          | 105 |
| añadida                                   | AB   | obtenida | 62  |
|   | AC   |          | 90  |
|   | AD   |          | 68  |
|   | AE   |          | 86  |
|   | BC   |          | 89  |
|   | BD   |          | 65  |
|   | BE   |          | 61  |
|   | CD   |          | 78  |
|   | CE   |          | 90  |
|   | DE   |          | 76  |
| añadida                                   | ABC  | obtenida | 95  |
|   | ABD  |          | 80  |
|   | ABE  |          | 82  |
|   | ACD  |          | 87  |
|   | ACE  |          | 92  |
|   | ADE  |          | 73  |
|   | BCD  |          | 76  |
|   | BCE  |          | 62  |
|   | BDE  |          | 90  |
| añadida                                   | ABCD | obtenida | 89  |
|   | ACDE |          | 97  |
|   | ABDE |          | 94  |
|   | BCDE |          | 81  |
| B (KLEBSIELLA PNEUMONIAE - OZAENAE) : 100 |      |          |     |
| añadida                                   | A    | obtenida | 49  |
|   | C    |          | 76  |
|   | D    |          | 49  |
|   | E    |          | 73  |
| añadida                                   | AC   | obtenida | 67  |
|   | AD   |          | 85  |
|   | AE   |          | 60  |
|   | CD   |          | 98  |
|   | CE   |          | 98  |
|   | DE   |          | 51  |
| añadida                                   | ACE  | obtenida | 82  |
|   | ACD  |          | 85  |
|   | ADE  |          | 92  |
|   | CDE  |          | 87  |
| C (DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE) : 10081        |      |          |     |
| añadida                                   | A    | obtenida | 110 |
|   | D    |          | 336 |
|   | E    |          | 93  |
| añadida                                   | AD   | obtenida | 341 |
|   | DE   |          | 136 |
|   | AE   |          | 192 |
| añadida                                   | ADE  | obtenida | 269 |

La potenciación o la supresión inmunes observadas en las bacterias individuales o en las combinaciones de bacterias se ilustra también en la siguiente tabla 3. La puntuación de 400 se atribuye al producto comercial Ismigen tomado como referencia. Dado que este producto es una combinación de seis componentes, la contribución promedio de cada componente se sitúa aprox. en 66,7. El cálculo de la puntuación real observada en cada una de las especies bacterianas o combinaciones bacterianas de la invención indica una diferencia neta muy acusada, si se compara con el valor teórico resultante de las contribuciones teóricas debidas a cada uno de los componentes de la combinación, es decir, 66,7 por el número de los componentes. En particular, las siguientes bacterias o combinación de bacterias arrojan en efecto neto negativo:

5

10

Staphylococcus aureus, Streptococcus spp (-110,0);  
Staphylococcus aureus (-42,7);  
Diplococcus (Staphyloc.) pneumoniae, Streptococcus spp (-9,8);  
Diplococcus (Staphyloc.) pneumoniae, Streptococcus spp (-1,5).

15

Por el contrario, todas las demás combinaciones dan lugar a un efecto positivo claro, lo cual indica una potenciación inmune.

Tabla 3

|                   |                   |                   |                   |                   |               |  |       |   |        |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------|--|-------|---|--------|
| S aureus          | Streptococcus spp |                   |                   |                   |               |  | 23,3  | 2 | -110,0 |
| S aureus          |                   |                   |                   |                   |               |  | 24,0  | 1 | -42,7  |
| S pneumoniae      | H influenzae      | Streptococcus spp |                   |                   |               |  | 190,2 | 3 | -9,8   |
| S pneumoniae      | Streptococcus spp |                   |                   |                   |               |  | 131,8 | 2 | -1,5   |
| S aureus          | Klebsiella spp    | S pneumoniae      | H influenzae      | Streptococcus spp | M catarrhalis |  | 400,0 | 6 | 0,0    |
| S aureus          | H influenzae      | Streptococcus spp |                   |                   |               |  | 203,8 | 3 | 3,8    |
| S aureus          | S pneumoniae      |                   |                   |                   |               |  | 153,6 | 2 | 20,3   |
| Klebsiella spp    | S pneumoniae      | Streptococcus spp | M catarrhalis     |                   |               |  | 287,6 | 4 | 20,9   |
| Klebsiella spp    | H influenzae      | Streptococcus spp |                   |                   |               |  | 232,3 | 3 | 32,3   |
| Streptococcus spp |                   |                   |                   |                   |               |  | 102,0 | 1 | 35,3   |
| S aureus          | Klebsiella spp    | S pneumoniae      | H influenzae      | Streptococcus spp |               |  | 372,5 | 5 | 39,2   |
| Klebsiella spp    | S pneumoniae      | H influenzae      | Streptococcus spp | M catarrhalis     |               |  | 377,0 | 5 | 43,7   |
| S aureus          | Klebsiella spp    | Streptococcus spp |                   |                   |               |  | 260,5 | 3 | 60,5   |
| S aureus          | S pneumoniae      | Streptococcus spp |                   |                   |               |  | 268,5 | 3 | 68,5   |
| S aureus          | H influenzae      |                   |                   |                   |               |  | 203,0 | 2 | 69,7   |
| H influenzae      | Streptococcus spp |                   |                   |                   |               |  | 204,9 | 2 | 71,6   |
| S aureus          | H influenzae      | Streptococcus spp | M catarrhalis     |                   |               |  | 338,9 | 4 | 72,2   |
| S pneumoniae      |                   |                   |                   |                   |               |  | 140,0 | 1 | 73,3   |
| S aureus          | Klebsiella spp    | S pneumoniae      | H influenzae      | M catarrhalis     |               |  | 410,0 | 5 | 76,7   |
| Klebsiella spp    | Streptococcus spp | M catarrhalis     |                   |                   |               |  | 280,6 | 3 | 80,6   |
| Klebsiella spp    | S pneumoniae      | H influenzae      | M catarrhalis     |                   |               |  | 350,4 | 4 | 83,7   |
| S aureus          | Klebsiella spp    | M catarrhalis     |                   |                   |               |  | 285,6 | 3 | 85,6   |
| Klebsiella spp    | H influenzae      |                   |                   |                   |               |  | 224,2 | 2 | 90,9   |
| S aureus          | Klebsiella spp    |                   |                   |                   |               |  | 224,5 | 2 | 91,2   |
| S aureus          | Klebsiella spp    | H influenzae      | Streptococcus spp | M catarrhalis     |               |  | 432,8 | 5 | 99,5   |
| Klebsiella spp    | H influenzae      | M catarrhalis     |                   |                   |               |  | 302,0 | 3 | 102,0  |
| S aureus          | Klebsiella spp    | H influenzae      | M catarrhalis     |                   |               |  | 371,1 | 4 | 104,4  |
| S aureus          | Klebsiella spp    | S pneumoniae      |                   |                   |               |  | 305,5 | 3 | 105,5  |
| S aureus          | Klebsiella spp    | S pneumoniae      | Streptococcus spp |                   |               |  | 375,0 | 4 | 108,3  |
| S aureus          | S pneumoniae      | H influenzae      | Streptococcus spp |                   |               |  | 377,4 | 4 | 110,7  |
| S aureus          | Klebsiella spp    | Streptococcus spp | M catarrhalis     |                   |               |  | 378,2 | 4 | 111,5  |
| S aureus          | H influenzae      | M catarrhalis     |                   |                   |               |  | 312,9 | 3 | 112,9  |
| S pneumoniae      | S aureus          | H influenzae      | Streptococcus spp | M catarrhalis     |               |  | 450,4 | 5 | 117,1  |
| S pneumoniae      | H influenzae      | Streptococcus spp | M catarrhalis     |                   |               |  | 387,1 | 4 | 120,4  |

Tabla 3 (continuación)

|                          |                          |                          |                          |  |  |  |       |   |       |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|--|--|-------|---|-------|
| <i>S aureus</i>          | <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      |  |  |  | 389,4 | 4 | 122,7 |
| <i>Streptococcus spp</i> |                          |                          |                          |  |  |  | 192,0 | 1 | 125,3 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> |  |  |  | 396,6 | 4 | 129,9 |
| <i>S aureus</i>          | <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |  |  |  | 403,4 | 4 | 136,7 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i>     |  |  |  | 414,8 | 4 | 148,1 |
| <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i>     |                          |  |  |  | 350,9 | 3 | 150,9 |
| <i>S aureus</i>          | <i>Klebsiella spp</i>    | <i>H influenzae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> |  |  |  | 420,3 | 4 | 153,6 |
| <i>S aureus</i>          | <i>S pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i>     |  |  |  | 425,2 | 4 | 158,5 |
| <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |  |  |  | 361,5 | 3 | 161,5 |
| <i>S aureus</i>          | <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |  |  |  | 441,7 | 4 | 175,0 |
| <i>S aureus</i>          | <i>Klebsiella spp</i>    | <i>H influenzae</i>      |                          |  |  |  | 388,8 | 3 | 188,8 |
| <i>S aureus</i>          | <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i>     |                          |  |  |  | 398,2 | 3 | 198,2 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>Streptococcus spp</i> |                          |                          |  |  |  | 334,9 | 2 | 201,6 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      |                          |                          |  |  |  | 346,8 | 2 | 213,5 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |  |  |  | 414,1 | 3 | 214,1 |
| <i>S pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i>     |                          |  |  |  | 416,8 | 3 | 216,8 |
| <i>S aureus</i>          | <i>S pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |  |  |  | 419,2 | 3 | 219,2 |
| <i>H influenzae</i>      |                          |                          |                          |  |  |  | 290,0 | 1 | 223,3 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      | <i>Streptococcus spp</i> |                          |  |  |  | 447,9 | 3 | 247,9 |
| <i>H influenzae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |  |  |  | 383,4 | 2 | 250,1 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      |                          |  |  |  | 450,5 | 3 | 250,5 |
| <i>Klebsiella spp</i>    | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |  |  |  | 399,9 | 2 | 266,6 |
| <i>S aureus</i>          | <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      |                          |  |  |  | 476,6 | 3 | 276,6 |
| <i>S pneumoniae</i>      | <i>H influenzae</i>      |                          |                          |  |  |  | 470,7 | 2 | 337,4 |
| <i>Streptococcus spp</i> | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |  |  |  | 488,8 | 2 | 355,5 |
| <i>Klebsiella spp</i>    |                          |                          |                          |  |  |  | 458,0 | 1 | 391,3 |
| <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |                          |  |  |  | 463,0 | 1 | 396,3 |
| <i>S pneumoniae</i>      | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |  |  |  | 531,0 | 2 | 397,7 |
| <i>S aureus</i>          | <i>M catarrhalis</i>     |                          |                          |  |  |  | 533,4 | 2 | 400,1 |

## REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar bacterias o combinaciones de bacterias apropiado para preparar inmunocomposiciones que contengan fracciones de lisados divididas en partículas obtenidas por lisis mecánica de dichas bacterias para el tratamiento personalizado de pacientes, que consta de los pasos siguientes:
- 5 seleccionar las bacterias o combinaciones de bacterias de los géneros siguientes: *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Diplococcus*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria*,  
determinar el nivel de expresión de los cuatro marcadores de membrana: DC80, DC83, DC86 y HLA-II inducidos por  
10 cada bacteria o combinación de bacterias en células dendríticas inmaduras;  
calcular para cada bacteria o combinación de bacterias la puntuación acumulada, que es la suma de las cantidades de los cuatro marcadores expresados,  
confeccionar el listado de todas bacterias o combinación de bacterias aumentando las puntuaciones acumuladas, con lo cual: cuanto mayor sea la puntuación acumulada, tanto mayor será el efecto de inmunoestimulación.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que las bacterias o combinaciones de bacterias se eligen entre las especies: *Klebsiella* spp, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus* spp.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que por lo menos una bacteria se elige entre las especies: *Klebsiella* spp, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria catarrhalis* y la inmunocomposición es una composición inmunoestimulante.
4. Un método para preparar una inmunocomposición que contiene bacterias o combinación de bacterias elegidas con arreglo al método de una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, dichas células o combinaciones bacterianas se lisan mecánicamente y después se recogen las fracciones de los lisados divididos en partículas.
- 25 5. El método según la reivindicación 4, en el que se recogen las fracciones de partículas de los lisados y se liofilizan.
6. El método según la reivindicación 4, en el que se liofilizan las fracciones de partículas recogidas de cada bacteria antes de mezclarlas.
- 30 7. El método según la reivindicación 4, en el que las células bacterianas se inactivan con formaldehído o con calor.
8. El método según la reivindicación 4, en el que las fracciones divididas en partículas se formulan en forma de composición farmacéutica que además contiene uno o más vehículos, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 35 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones de 4 a 8, en el que las bacterias o composición de bacterias son:
- 40 - *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp;  
- *Staphylococcus aureus*;  
- *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp;  
- *Diplococcus pneumoniae*;
- 45 - *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae*;  
- *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp;  
- *Streptococcus* spp;  
- *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*;
- 50 - *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp;  
- *Klebsiella* spp, *Haemophilus influenzae*;  
- *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp;  
- *Klebsiella* spp, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp;
- 55 - *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Streptococcus* spp;  
- *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp;  
- *Klebsiella* spp, *Streptococcus* spp, *Neisseria catarrhalis*;  
- *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Neisseria catarrhalis*;
- 60 - *Klebsiella* spp, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus* spp, *Neisseria catarrhalis*;  
- *Haemophilus influenzae*;
- 65 - *Klebsiella* spp, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria catarrhalis*;  
- *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp, *Diplococcus pneumoniae*;  
- *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria catarrhalis*;  
- *Klebsiella* spp, *Streptococcus* spp;  
- *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* spp, *Neisseria catarrhalis*;  
- *Klebsiella* spp, *Diplococcus pneumoniae*;

- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- *Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- 5 - *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- 10 - *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- *Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae;*
- 15 - *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- 20 - *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- 25 - *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- 30 - *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp;*
- *Diplococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- *Klebsiella spp;*
- 35 - *Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- *Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis y*
- *Staphylococcus aureus, Neisseria catarrhalis.*
- 40
- 10. Una inmunocomposición de bacterias divididas en partículas para el uso en el inmunotratamiento médico, dichas bacterias divididas en partículas son una fracción de lisado obtenido por lisis mecánica de bacterias o combinaciones de bacterias elegidas entre el grupo formado por:
- 45 - *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- 50 - *Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- 55 - *Staphylococcus aureus, Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Streptococcus spp;*
- *Diplococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Klebsiella spp, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- 60 - *Klebsiella spp;*
- *Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- *Staphylococcus aureus, Diplococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae;*
- *Streptococcus spp, Neisseria catarrhalis;*
- *Diplococcus pneumoniae, Neisseria catarrhalis y*
- 65 - *Staphylococcus aureus, Neisseria catarrhalis.*



11. La inmunocomposición de la reivindicación 10 para el uso de agente inmunomodulador específico o inespecífico.

5 12. Composición de la reivindicación 10 para el uso en la estimulación inespecífica del sistema inmune, la inmunopotenciación inespecífica por vacunación, la inmunoprofilaxis específica de infecciones causadas por las cepas bacterianas contenidas en la composición, la inmunopotenciación del efecto de la vacuna en pacientes “que no responden”, la inmunoterapia inespecífica de tumores; la inmunoterapia inespecífica de melanoma, de tumores superficiales de vejiga, NSCLC, la inmunoterapia específica de tumores con antígenos asociados a tumor de peso molecular diferente o efectores linfoides asociados a tumores o de células dendríticas cargadas; la activación del sistema de  
10 macrófago como limpiador de enfermedades crónicas, decúbito o úlceras fagedénicas y tumores de la zona craneoencefálica.

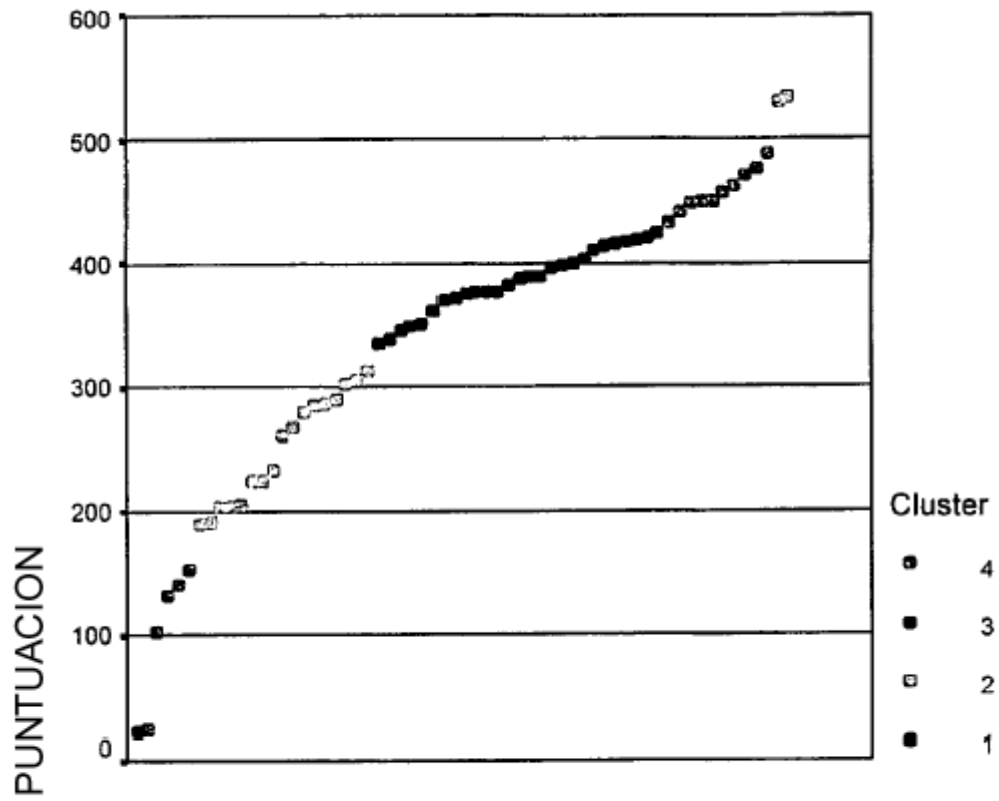


Fig. 1

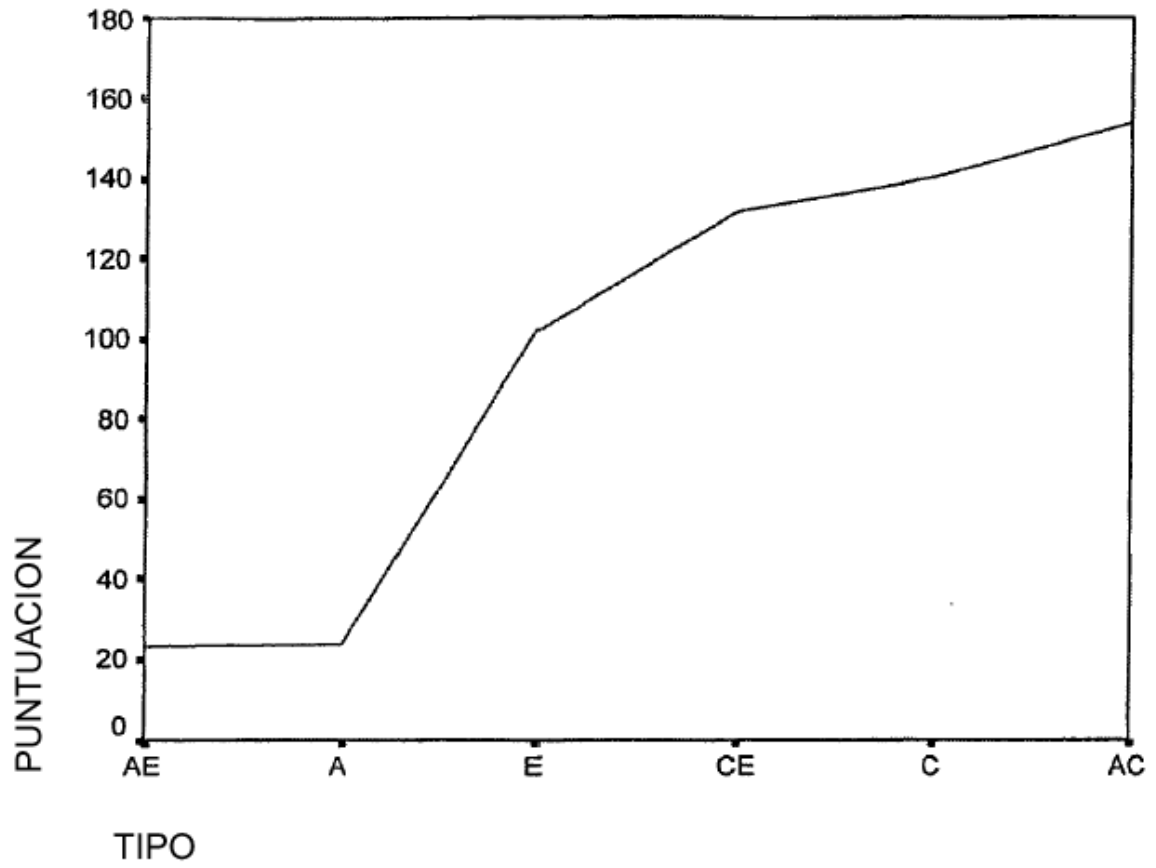


Fig. 2

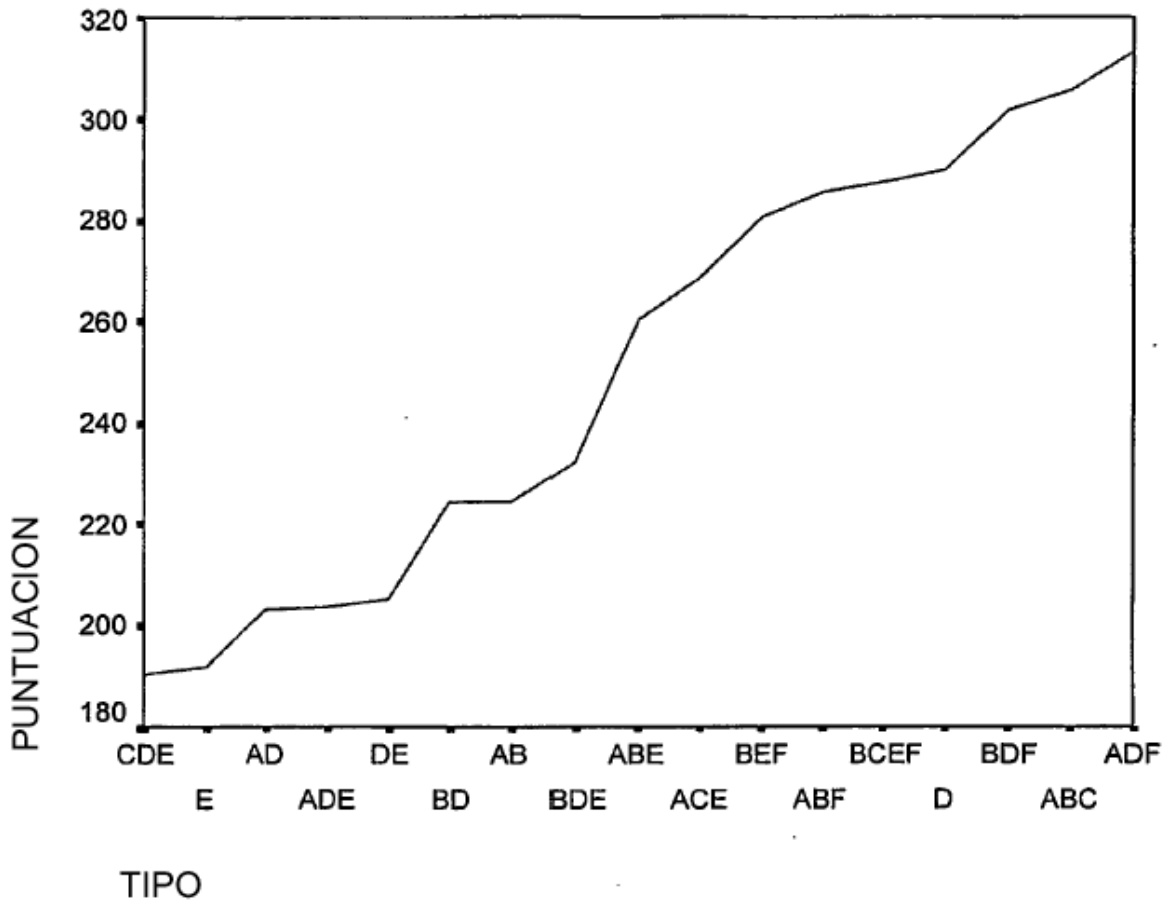


Fig. 3

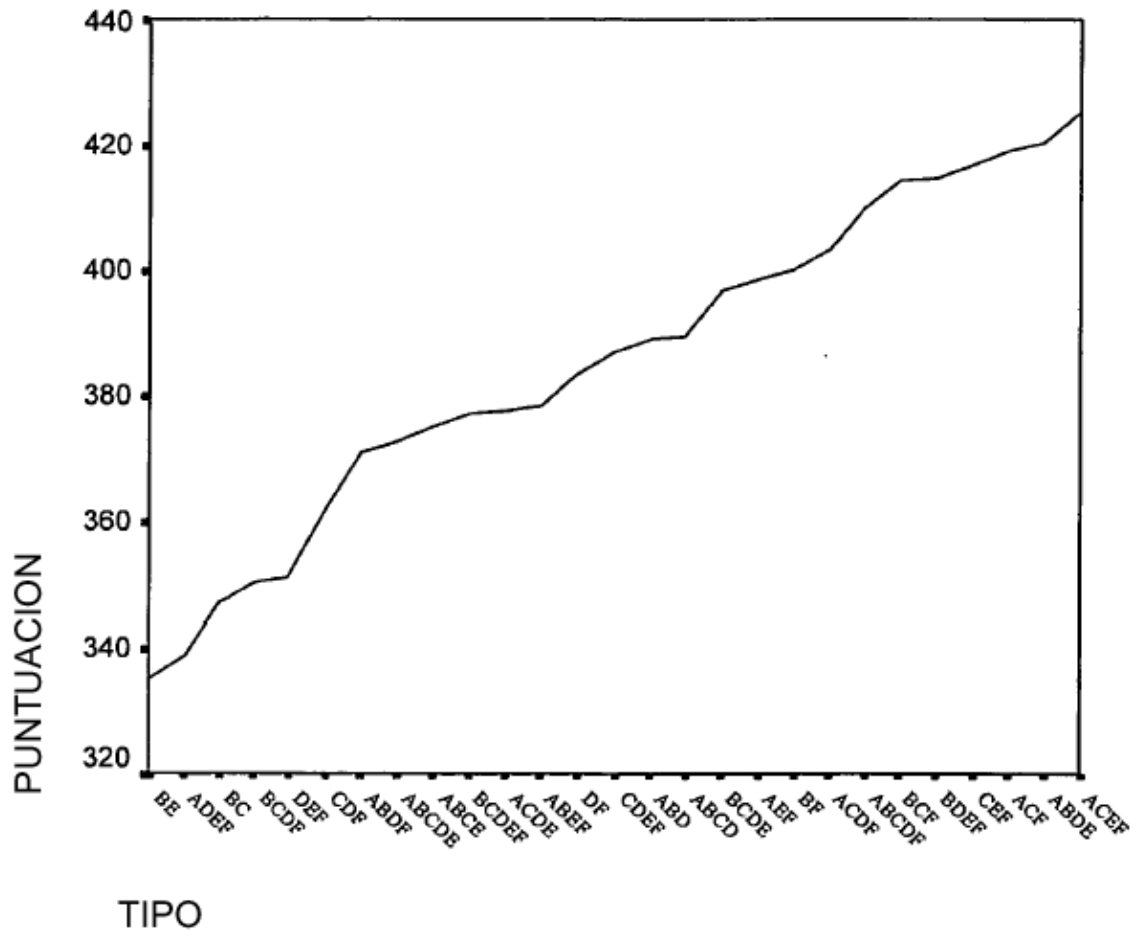


Fig. 4

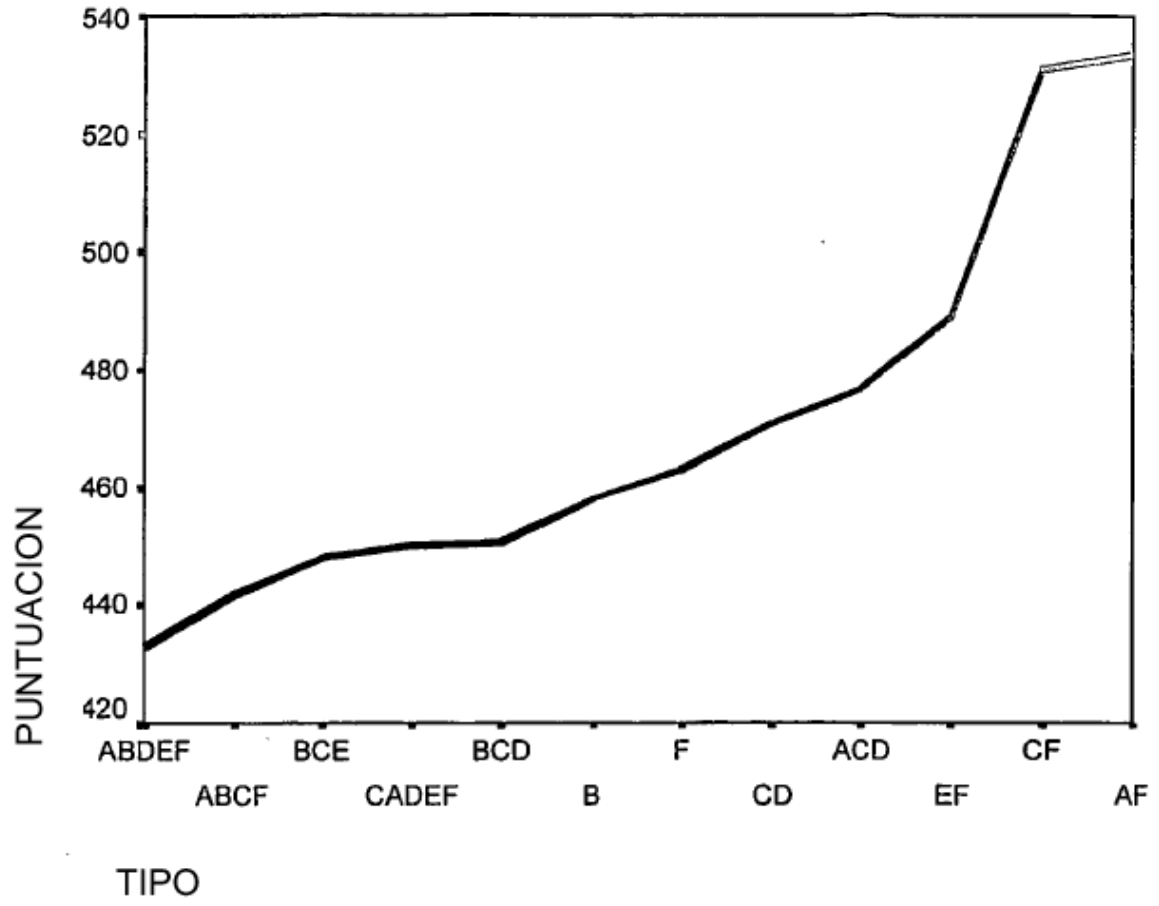


Fig. 5

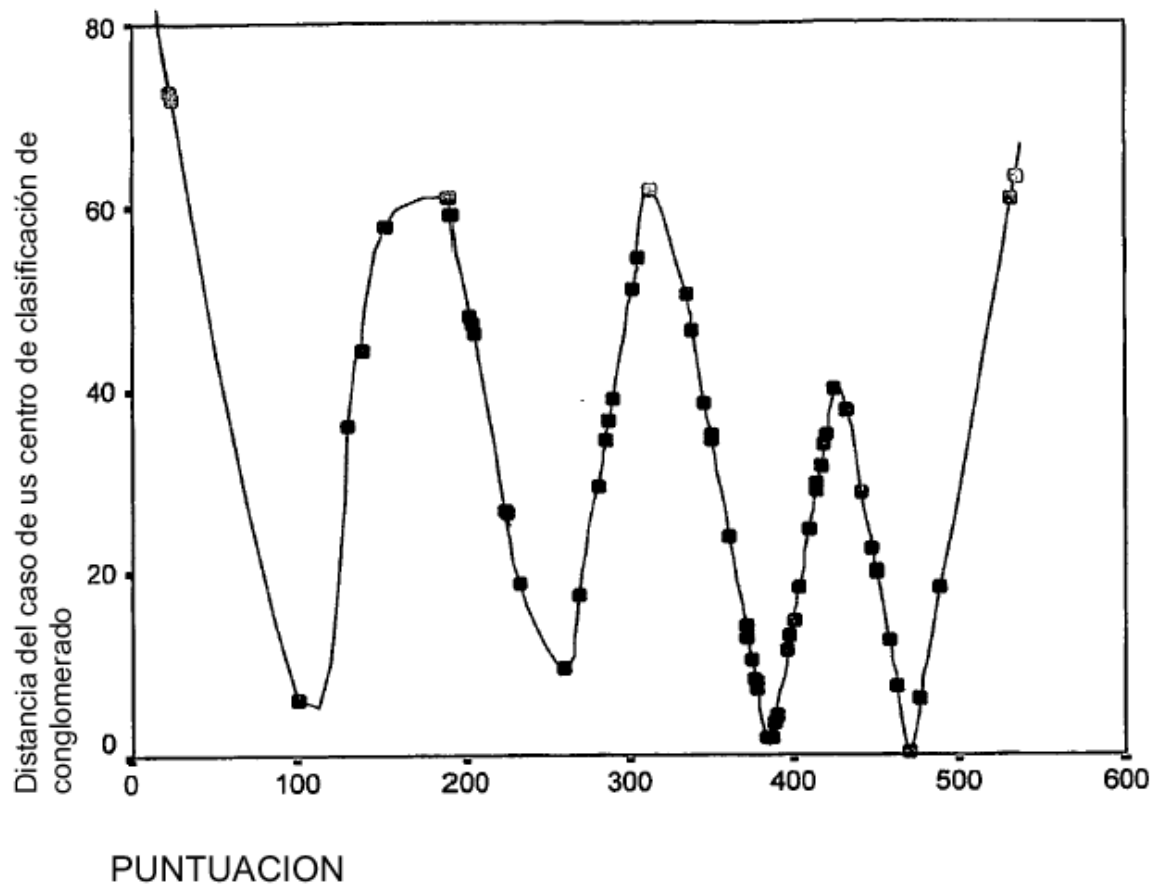


Fig. 6

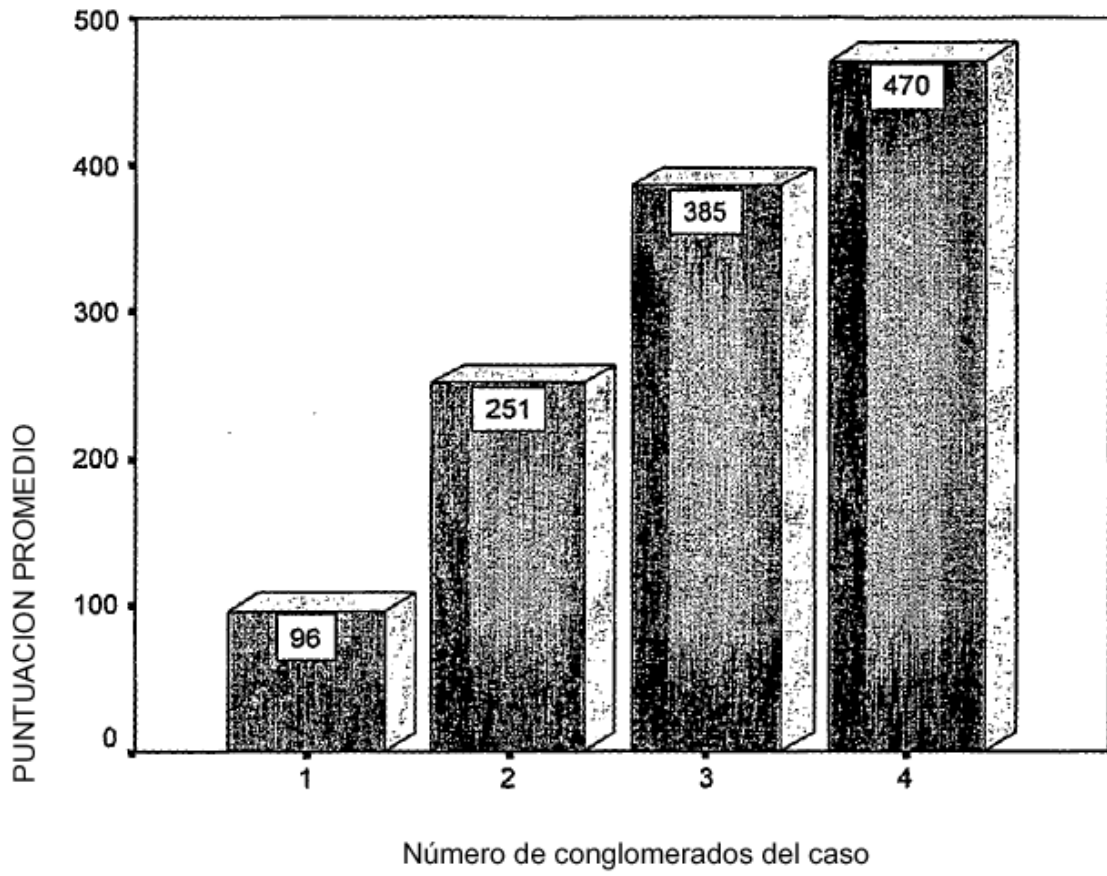


Fig. 7