

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 684**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06744545 .2**

96 Fecha de presentación: **21.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1948782**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Adyuvantes de vacunas**

30 Prioridad:
25.04.2005 IN MU05052005

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2012

73 Titular/es:
**CADILA PHARMACEUTICALS LIMITED
CADILA CORPORATE CAMPUS SARKHEJ-
DHOLKA ROAD
BHAT, AHMEDABAD 382 210, IN**

72 Inventor/es:
**KHAMAR, Bakulesh, Mafatlal;
MODI, Indravadan, Ambalal;
MODI, Rajiv, Indravadan;
GHOSH, Prasanta, Kumar y
DESAI, Nirav**

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 388 684 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

Adyuvantes de vacunas.

Campo de la invención

5 La presente invención concierne a nuevos adyuvantes y a composiciones que los contienen, al menos con un antígeno, y a métodos para elaborar y utilizar los mismos.

Antecedentes de la invención

10 En caso de infección, una respuesta inmune específica tiene que ver con el reconocimiento y la eliminación final del antígeno/inmunógeno en una forma altamente discriminatoria. Las respuestas inmunes específicas están mediadas a través de dos tipos de mecanismos efectores. Una está mediada por anticuerpos producidos por linfocitos (respuesta humoral) y la otra está mediada por los mismos linfocitos sensibilizados especialmente (inmunidad mediada por células). Las respuestas humorales son las principales responsables de proporcionar profilaxis contra una enfermedad (vacuna profiláctica), mientras que la inmunidad mediada por células es la principal responsable de intervención en casos de enfermedad (vacuna terapéutica). Las vacunas profilácticas se administran anticipándose a una enfermedad. Las vacunas terapéuticas se administran en presencia de una enfermedad activa. La vacuna incluye antígeno(s) en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un antígeno es una sustancia que estimula una respuesta inmune.

20 En los libros de texto, monografías y artículos se describen una diversidad de antígenos. Estos incluyen alérgenos inmunógenos, una diversidad de materiales que incluyen o se obtienen a partir de agentes patógenos y no patógenos, tales como virus, bacterias, hongos, parásitos, material obtenido a partir de tumores o células. Las células, organismos tales como virus y bacterias, también se utilizan en forma intacta, p. ej., Polio, BCG, etc., una composición química de antígeno es muy variable e incluye péptidos de diversos tipos (tales como péptidos normales, polipéptidos, lipopéptidos, etc.), polisacáridos, conjugados de polisacáridos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos o el antígeno puede estar codificado por ácidos nucleicos.

Se clasifican en una variedad de formas. Algunas de las mismas se describen a continuación.

25 Inmunógeno - Cualquier sustancia que provoca la respuesta inmune cuando se introduce en el organismo. Un inmunógeno es siempre una macromolécula (proteína, polisacárido). Su capacidad para estimular la reacción inmune depende de su incidencia en el hospedador, el tamaño molecular, la composición química y la heterogeneidad (p. ej., similar a los aminoácidos en una proteína).

30 Alérgeno - Un alérgeno es una sustancia que causa una reacción alérgica. Se puede ingerir, inhalar, inyectar o entrar en contacto con la piel.

Los antígenos se pueden clasificar según su origen.

Antígenos endógenos. Los antígenos exógenos son antígenos que han entrado en el organismo desde el exterior, por ejemplo, por inhalación, ingestión o inyección.

35 Los antígenos endógenos son antígenos que se han generado dentro de la célula, como resultado del metabolismo celular normal o debido a una infección vírica o bacteriana intracelular. Los fragmentos se presentan a continuación, en la superficie celular en moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase I.

40 Antígenos tumorales. Los antígenos tumorales son aquellos antígenos que son presentados por las moléculas del MHC I en la superficie de células tumorales. Estos antígenos pueden estar presentados a veces únicamente por células tumorales y nunca por las células normales. En este caso, se denominan antígenos tumorales específicos y son típicamente el resultado de una mutación tumoral específica. Son más comunes los antígenos que son presentados por células tumorales y células normales, y se denominan antígenos asociados a tumores. Los linfocitos T citotóxicos que reconocen estos antígenos pueden ser capaces de destruir las células tumorales antes de que proliferen o sufran metástasis.

45 Los antígenos tumorales también pueden estar en la superficie del tumor en forma de, por ejemplo, un receptor mutado, en cuyo caso serán reconocidos por los linfocitos B.

Antígenos asociados a agentes patógenos:

50 Los antígenos se obtienen a partir de agentes patógenos tales como virus, bacterias, hongos, parásitos, por ejemplo, la rabia, la hepatitis B, las paperas, el sarampión, el tétanos, la difteria, etc. Los antígenos pueden ser producidos por tecnologías recombinantes, métodos de extracción, síntesis química, fermentación, etc. Pueden estar en forma de un compuesto o un organismo que es natural o que está modificado genéticamente, o como una fracción de un organismo, que tiene origen natural o está modificada genéticamente. Los ácidos nucleicos se han desarrollado cada vez más y se han identificado como antígenos en las vacunas de ADN. Los antígenos se pueden administrar en forma de antígenos aislados o en forma encapsulada, recubiertos, conjugados, mezclados, acoplados y/o formula-

dos con adyuvante.

La mayor parte de las vacunas, cuando se aplican solas, no producen un estímulo inmune adecuado, que se dirige mediante el uso de un adyuvante, por ejemplo, alumbre en la vacuna de la Hepatitis B para proporcionar el efecto deseado:

- 5 - incrementar directamente el número de células implicadas,
- asegurar el procesamiento eficaz del antígeno, prolongando la permanencia del antígeno en un hospedador inmunizado,
- o bien aumentando la síntesis de anticuerpos a través de las células que sintetizan anticuerpos.

10 Los adyuvantes son sustancias que potencian la respuesta inmune frente a los antígenos, pero no son necesariamente inmunógenos por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente cerca del sitio de administración, para producir un efecto de depósito para facilitar una liberación lenta y sostenida del antígeno a las células del sistema inmune. Los adyuvantes también pueden atraer las células del sistema inmune a un depósito de antígenos y estimular tales células para provocar respuestas inmunes.

15 Una amplia gama de adyuvantes provoca potentes respuestas inmunes frente a antígenos. Estos incluyen saponinas que forman complejos con antígenos de proteínas de membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias inactivas en aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos, tales como dipéptido de muramilo (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas. Para inducir eficazmente la respuesta inmune humoral (RIH) y la inmunidad mediada por células (IMC), los antígenos se emulsionan preferiblemente en adyuvantes.

20 En la actualidad el único adyuvante, ampliamente utilizado en seres humanos ha sido el alumbre. Contiene sales de aluminio (alumbre) y ha sido útil para algunas vacunas, tales como la hepatitis B, difteria, tétanos, toxoide, etc., pero no es útil para otras, como la rabia, triple vírica, fiebre tifoidea, etc. No es capaz de inducir inmunidad mediada por células. El hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio se denominan colectivamente de forma generalizada alumbre. Los informes indican que el alumbre no logró mejorar la eficacia de las vacunas contra la tos ferina y la fiebre tifoidea y sólo proporcionaba un ligero efecto con vacunas de adenovirus. Los problemas con el alumbre incluyen la inducción de granulomas en el sitio de la inyección y una variación de lote a lote de las preparaciones de alumbre (documento de patente de EE.UU. 6.861.410).

25 Otros adyuvantes, tales como saponina, Quil A, y el adyuvante de agua-en-aceite, de Freund con bacilos de tuberculosis inactivos (Freund completo) o sin bacilos (Freund incompleto), han tenido un uso limitado en los seres humanos debido a sus efectos tóxicos y se han expresado preocupaciones en cuanto a efectos adversos en animales. Se ha descrito la mayoría de las formulaciones de adyuvantes, pero la mayoría no son aceptadas para las vacunas de rutina, debido principalmente a su toxicidad y sólo unas pocas han sido evaluadas en humanos.

30 El adyuvante completo de Freund (CFA) es un agente inmunoestimulante muy potente que se ha utilizado con éxito con muchos antígenos, con carácter experimental. El CFA incluye tres componentes: un aceite mineral, un agente emulsionante y *Mycobacterium tuberculosis* inactivada. Las soluciones acuosas de antígeno se mezclan con estos componentes para crear una emulsión de agua-en-aceite. Aunque es eficaz como adyuvante, el CFA causa efectos secundarios graves, por ejemplo, dolor, formación de abscesos, fiebre, etc., por lo tanto, el CFA no se utiliza en la preparación de vacunas comerciales.

35 El adyuvante incompleto de Freund (IFA) es similar al CFA, pero no incluye el componente bacteriano. Es una emulsión de aceite-en-agua. Sin embargo, las pruebas indican que tanto el aceite como el emulsionante usados en el IFA, pueden causar tumores en ratones.

40 Se ha encontrado que el dipéptido de muramilo (MDP) es la unidad mínima del complejo de la pared celular micobacteriana que genera la actividad adyuvante observada con CFA, por ejemplo, Ellouz y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. (1974) 59:1317. Se han generado varios análogos sintéticos de MDP que muestran una amplia gama de potencia adyuvante y efectos secundarios (Chedid y col., Prog. Allergy (1978) 25:63). Análogos representativos del MDP incluyen derivados de treonilo de MDP (Byars y col., Vaccine (1987) 5:223), derivados de n-butilo de MDP (Chedid y col., Infect. Immun. 35:417), y un derivado lipófilo de un tripéptido de muramilo (Gisler y col., in Immunomodulations of Microbial Products and Related Synthetic Compounds (1981) Y. Yamamura Kotani S., compiladores, Excerpta Medica, Ámsterdam, pág.167). Un derivado lipófilo de MDP es N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1',2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). El propio MTP-PE es capaz de actuar como un agente emulsionante para generar emulsiones estables de aceite-en-agua. El MTP-PE se ha utilizado en una emulsión de escualeno con Tween 80, denominada MTP-PE-LO (bajo nivel de aceite), para entregar el antígeno gD del virus del herpes simple, con resultados efectivos (Sánchez-Pescador y col., J. Immunol. (1988) 141:1720-1727), aunque con una estabilidad física deficiente.

55 Los polímeros sintéticos se evalúan como adyuvantes. Estos incluyen los homopolímeros y copolímeros de ácido láctico y glicólico, los cuales han sido utilizados para producir microesferas que encapsulan antígenos (véase Eldrid-

ge y col., Mol. Immunol. 28:287-294 (1993)).

Los copolímeros en bloque no iónicos son otros adyuvantes sintéticos que están siendo evaluados. Los efectos de los adyuvantes se investigan para copolímeros de bajo peso molecular en emulsiones a base de aceite y para copolímeros de peso molecular elevado en formulaciones acuosas (Todd y col., Vaccine 15:564-570 (1997)).

5 De hecho, el efecto adyuvante de la mayoría de los adyuvantes experimentales se ha asociado con los efectos adversos que provocan. Los adyuvantes que actúan como inmunoestimuladores, tales como dipéptido de muramilo, lipopolisacárido, lípido A, lípido A monofosforilo y citocinas tales como IL-2 e IL-12, también pueden causar efectos secundarios sistémicos (toxicidad general, pirogenicidad), limitando su uso.

10 Se conocen los adyuvantes que emplean células enteras, tales como células de insectos (*S. frugiperda*), documento de Patente de EE.UU. 6.224.882. En los insectos o en las células de insectos infectadas con algunos de los virus de insectos o agentes infecciosos o cualquier otro tipo de infección, tampoco se pueden identificar todavía qué insecto/célula de insecto está infectado y cual no, por lo que el uso de los mismos puede dar como resultado una baja producción y una posible amenaza de transmisión de enfermedades a humanos (informe de la OMS de enero de 2005).

15 En un artículo publicado en *Vaccine* (1999) 17:2446-2452, se utiliza el *Bacillus de Calmette-Guerin* (BCG) como adyuvante de la vacuna contra la rabia en ratones. Los resultados experimentales no muestran ninguna mejora en los títulos de anticuerpos séricos neutralizantes en grupos de ratones inmunizados con BCG como adyuvante, en comparación con la vacuna simple.

20 El documento de patente de EE.UU. 6.355.414 describe el polisacárido acemanano como adyuvante. El documento de Patente de EE.UU. 6.306.404 describe composiciones de adyuvante y vacuna de lípido A monofosforilo, azúcar, y opcionalmente un agente tensioactivo a base de amina. El documento de Patente de EE.UU. 6.231.859 describe una combinación de saponina como adyuvante. Los adyuvantes de saponina tienen toxicidades sistémicas elevadas, como la hemólisis. El documento de patente de EE.UU. 6.060.068 describe la interleucina-2 como adyuvante para vacunas. El documento de patente de EE.UU. 6.355.256 describe QS-21 y IL-12 como adyuvantes.

25 Los documentos de patentes de EE.UU. 6.103.697, 6.228.373 y 6.228.374 describen péptidos como adyuvantes. Los documentos JP 11106351, JP 9268130 y AU 780.054 describen adyuvantes de aceite. Pero todos estos adyuvantes no se han demostrado con una amplia variedad de antígenos y mamíferos. La seguridad de estos adyuvantes aún no se ha confirmado.

30 Los efectos secundarios de los adyuvantes utilizados actualmente incluyen: (1) la sensibilización a la tuberculina o a cualquier otro antígeno utilizado en las pruebas de detección de infecciones; (2) la presencia en animales destinados al consumo de materiales que no se pueden ingerir sin riesgo por los seres humanos, (3) reacciones inflamatorias, granulomatosas, necrotizantes u otras reacciones inaceptables en los sitios de inyección, sobre todo tal y como ocurre con el adyuvante completo de Freund; (4) la pirogenicidad; (5) efectos sobre el sistema nervioso central y efectos adversos sobre la conducta; (6) trastornos del crecimiento; (7) la artritis; (8) el aumento de la permeabilidad vascular y reacciones inflamatorias en el ojo; (9) la inducción de respuestas autoinmunes no deseadas; (10) la inmunosupresión de epítodos adyuvantes.

Gormus Bobby J y col., (Expert review of vaccines, future drugs, London GB, vol. 2, nº 6, 2003, páginas 791-804) describen vacunas contra la lepra, *Mw* o el bacilo de Calmette-Guerin.

40 Stills Harold F Jr, *Ilar Journal*, vol. 46, nº 3, 2005, páginas 280-293, describen adyuvantes tales como el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto.

Sur Prabir Kumar y col., *Journal of the Indian Medical Association* 2003, vol. 101, nº 2, páginas 118, 120, describen el uso de *Mw* en combinación con quimioterapia o radioterapia.

Sharma P y col., *Leprosy Review* 2000, vol. 71, nº 2, páginas 179-192, describen *Mw* para el tratamiento de la lepra.

45 Existe desde hace tiempo una necesidad de que la industria proporcione adyuvantes que estén exentos de los efectos secundarios mencionados anteriormente. Sorprendentemente, se observa que *Mycobacterium w* y/o sus componentes cumplen con los requisitos de adyuvante. A diferencia del adyuvante de Freund, proporciona una inmunostimulación en ausencia de emulsión. Tampoco se asocia a efectos sistémicos secundarios, tales como fiebre, dolor corporal, dolor muscular, etc.

50 *Mycobacterium w* es una micobacteria de crecimiento rápido. *Mycobacterium w* es una micobacteria atípica no patógena y cultivable, con propiedades bioquímicas y características de crecimiento rápido que se parecen a las que pertenecen a la clase IV del grupo Runyons de las micobacterias en sus propiedades metabólicas y de crecimiento, pero que no es idéntica a las cepas que se enumeran actualmente en este grupo. Por consiguiente, se cree que (*Mw*) es una cepa completamente nueva. La identidad de la especie de *Mw* ha sido definida mediante la determinación de la secuencia de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

Se ha observado que *Mycobacterium w* es útil para el tratamiento de la lepra, la tuberculosis (documento de patente con nº de publicación: WO03075825 – 18/09/2003), y también para el tratamiento del cáncer (documento de patente con nº de publicación: WO03049667 – 19/06/2003).

5 Existe actualmente una necesidad de tener adyuvantes mejorados. Los adyuvantes mejorados se necesitan en para mejorar la eficacia de las vacunas actuales contra la rabia, en las que adyuvantes del tipo alumbre no se pueden utilizar. Son necesarios para mejorar la eficacia de las vacunas actuales que contienen adyuvante, p. ej., la vacuna contra la hepatitis B, que contiene alumbre. Los adyuvantes mejorados son también necesarios para mejorar la eficacia de diferentes vacunas candidatas para que sean eficaces y se puedan utilizar con eficacia, por ejemplo, las vacunas que contienen CEA. Los nuevos adyuvantes también son necesarios para proporcionar nuevas vacunas para 10 para diversas indicaciones nuevas, tales como la vacuna para la enfermedad hepática vírica.

Referencias:

1. Essential Immunology, octava edición. Ivan Roitt, Blackwell Scientific publication.
2. Vaccines, tercera edición. S. Plotkein W. Orenstein, W.B. Saunder's company
3. Vaccines - Prospects & perspectives. Harminder sigh, rajesh Bhatia, forward publishing company, Delhi.
- 15 4. Immunotherapy of cancer. Mary L. Disis, Humana press, Totowa, New Jersey, EE.UU.
5. DNA vaccine. Douglas B. Lowrie, Robert G. Whalen, Humana press, Totowa New Jersey, EE.UU.
6. Handbook of cancer vaccines. Micheal A. Morse, Timothy M.Clay, H.Kiva Lyerly. Humana press Totowa New Jersey, EE.UU.
7. Cellular Microbiology. Bian Henderson, Micheal Wilson, John Wiley & Sons.

20 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona *Mycobacterium w* para uso como un adyuvante en el tratamiento profiláctico o terapéutico mediante vacunación, en donde dicho tratamiento comprende administrar una vacuna que comprende *Mycobacterium w* mezclada, formulada, conjugada, cebada, fusionada y/o ligada con un antígeno, a un mamífero, en donde dicha *Mycobacterium w* actúa como adyuvante que potencia la inmunogenicidad de dicho antígeno.

25 Otras realizaciones se describen en el conjunto de reivindicaciones.

Descripción detallada

Lista de figuras y sus descripciones:

- Fig. 1. Efecto de la inmunización con la vacuna antirrábica que contiene Mw en caballos con títulos iniciales elevados.
- 30 Fig. 2. Efecto de la inmunización con la vacuna antirrábica que contiene Mw en caballos con títulos iniciales bajos.
- Fig. 3. Efecto de la inmunización con la vacuna antirrábica que contiene Mw sobre los títulos de anticuerpos neutralizantes en caballos inmunizados previamente, antes y después del tratamiento.
- Fig. 4. Efecto de múltiples inmunizaciones con la vacuna antirrábica en comparación con dosis únicas de vacuna contra la rabia que contiene Mw sobre los títulos de anticuerpos anti-rabia en el caballo.
- 35 Fig. 5. Efecto de la vacuna contra la rabia recubierta con el antígeno Mw sobre la respuesta de los anticuerpos contra el virus de la rabia en el caballo.
- Fig. 6. Efecto de la vacuna recubierta con el antígeno Mw sobre la respuesta de los anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en el caballo.
- Fig. 7. Efecto de la inmunización con vacunas contra la rabia en comparación con una vacuna con adyuvante Mw en ratones.
- 40 Fig. 8. Títulos de anticuerpos contra la rabia mediante la prueba de neutralización en ratón de ratones inmunizados con la vacuna antirrábica y la vacuna contra la rabia formulada con Mw.
- Fig. 9. Respuesta de anticuerpos en voluntarios humanos sanos, contra antígenos de HB, inmunizados por vía intradérmica, con la vacuna contra la hepatitis B y la vacuna con adyuvante Mw.
- 45 Fig. 10. Efecto de la 2ª dosis de inmunización sobre la respuesta de los anticuerpos, después una vacuna contra la hepatitis B y una vacuna con adyuvante Mw.

Fig. 11. Efecto de refuerzo de la vacuna Mw-Ag de HB en voluntarios humanos.

Fig. 12. Respuestas de los anticuerpos en voluntarios humanos sanos, inmunizados por vía intramuscular con la vacuna contra la hepatitis B y adyuvante Mw.

I. El siguiente ejemplo describe el procedimiento para la obtención de componentes/fracciones de *Mycobacterium w*.

Método para el crecimiento de *Mycobacterium w*

1. Cultivo de *Mycobacterium w*
 - a) Preparación del medio de cultivo

Mycobacterium w se cultiva sobre medio sólido, más particularmente sobre medio LJ o más particularmente en un medio líquido, tal como medio Middlebrook o medio líquido de Sautn. El medio Middlebrook se enriquece para obtener un rendimiento mejor. Se puede enriquecer preferiblemente mediante la adición de glucosa, bactopectona y albúmina de suero bovino y aditivos de los mismos. Se utilizan en varias proporciones, preferiblemente se emplean en una proporción de 20:30:02. El medio de enriquecimiento se añade al medio Middlebrook en varias proporciones diferentes desde 15:1 hasta 25:1, más preferiblemente en la proporción de 20:1.

- b) Preparación del biorreactor

- a. Preparación del recipiente

Las partes internas de contacto del recipiente (juntas, sellados mecánicos, junta tórica/junta de estanqueidad, surcos, etc.) se limpian adecuadamente para evitar cualquier contaminación. El recipiente se llena con NaOH 0,1 N y se deja reposar durante 24 horas para eliminar los materiales pirógenos y otros contaminantes. El recipiente se limpia a continuación, primero con agua acidulada, luego tres veces con agua destilada antes de preparar el medio.

- b. Esterilización del biorreactor

El biorreactor que contiene nueve litros de agua destilada se esteriliza con vapor a presión (indirecto/directo). De forma similar, el biorreactor se esteriliza una vez más con medio Middlebrook. Las otras botellas de adición, los filtros de entrada/salida de aire, etc., se esterilizan dos veces en un autoclave a 121,6°C durante 15 minutos. Antes de utilizarlos se secan a 50°C en un horno.

- c. Parámetros ambientales

- i. Temperatura: $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$
- ii. pH: 6,7 hasta 6,8 inicialmente

2. Recolección y concentración

Se realiza típicamente al final del 6º día, después de haber cultivado bajo condiciones asépticas, pero se puede recolectar en cualquier momento entre 6 horas y 15 días. La concentración de las células (sedimentación) se hace por centrifugación.

3. Lavado de las células

El sedimento así obtenido se lava un mínimo de tres veces con solución salina normal. Se puede lavar con o sin líquido que contiene detergente, que es preferiblemente isotónico.

4. Adición de vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se añade una solución salina normal exenta de pirógenos al sedimento. Se puede utilizar cualquier otro líquido exento de pirógenos como vehículo farmacéutico. El vehículo se añade en una cantidad de forma que se obtenga la concentración deseada de material activo en la forma final.

5. Adición de conservante

Para conservar el producto exento de otras bacterias contaminantes, se añade un conservante para el tiempo de conservación. El conservante preferido es tiomersal en una concentración final de 0,005% p/v hasta 0,1% p/v más preferiblemente 0,01% p/v.

6. Esterilización terminal

La esterilización terminal se puede realizar mediante diversos métodos físicos, tal como la aplicación de calor o radiación ionizante o la filtración estéril. El calor puede ser en forma de calor seco o de calor húmedo. También puede

ser en forma de ebullición o pasteurización. La radiación ionizante puede ser ultravioleta o de rayos gamma o microondas o cualquier otra forma de radiación ionizante. Es preferible someter a autoclave el producto final. Esto se puede realizar antes o después del envasado final.

7. Control de Calidad

- 5 a) En el material se evalúa su pureza y su esterilidad.
- b) En los organismos se comprueba la ácido-resistencia y la tinción de Gram.
- c) Prueba de inactivación: Esta se realiza mediante el cultivo del producto en un medio LJ para descubrir cualquier organismo vivo.
- 10 d) Patogenicidad y/o contaminación con agentes patógenos. Con los organismos cultivados se infectan ratones Balb/c. Ninguno de los ratones debe morir y todos deben permanecer sanos y ganar peso. No debe haber ninguna lesión macroscópica o microscópica en el hígado, el pulmón, el bazo o cualquier otro órgano, cuando los animales se sacrifican hasta ocho semanas después del tratamiento.
- e) Prueba bioquímica.
- 15 f) El organismo se somete a las pruebas siguientes
- i. Ureasa
 - ii. Hidrólisis con Tween 80
 - iii. Prueba con niacina
 - iv. Prueba de reducción de nitrato.
- 20 El organismo da resultados negativos en ureasa, hidrólisis con Tween 80 y la prueba de niacina. Es positivo para la prueba de reducción de nitrato.

II. Los siguientes ejemplos ilustran los procedimientos utilizados para la obtención de los componentes de *Mycobacterium w*, el alcance de la invención no está limitada por los mismos:

1. Destrucción celular

25 La destrucción celular se puede realizar mediante ultrasonidos o el uso de un fraccionómetro de presión elevada o por aplicación de ingredientes para la presión osmótica. Las células rotas se lavaron con solución salina fisiológica y se volvieron a sedimentar mediante centrifugación.

1. Extracción del disolvente

30 Cualquier disolvente orgánico, tal como alcoholes, hidrocarburos halogenados, acetona, fenol, alcohol isopropílico, ácido acético, hexano y/o compuestos aromáticos de forma individual o en cualquier combinación de los mismos, puede realizar la extracción con disolventes.

2. Extracción enzimática.

La extracción enzimática se puede realizar con enzimas, que pueden digerir la pared/membranas celulares. Son típicamente proteolíticas y líticas esencialmente. Las enzimas lisozimas, lítica y pronasa son las enzimas preferidas.

35 Los componentes/fracciones celulares de *Mycobacterium w* se utilizaron de forma aislada en lugar de organismos de *Mycobacterium w* y/o se añadieron al producto que contenía *Mycobacterium w*. La adición de los componentes celulares daba como resultado una eficacia mejorada del producto.

III. Métodos para ilustrar la preparación de una composición que contiene *Mycobacterium w* y/o sus componentes, como adyuvante.

40 Las *Mw* en forma de células enteras o una fracción se formularon mezclando *Mw* en una solución isotónica, una fracción de *Mw* se formuló en un tampón apropiado y/o se conjugó con agentes de acoplamiento químico de antígenos o inmunógenos, tales como aldehídos, carbodiamidas, anhídridos y cualquiera de tales compuestos.

Los siguientes ejemplos demuestran la invención y no limitan el objeto de la invención.

Ejemplo 1

45 Las células de *Mycobacterium w* se dejaron crecer tal y como se ha mencionado anteriormente, en medio Middle-

brook y se destruyeron en un autoclave a 121,6°C, bajo presión de vapor de 1,03 bar. Las células se suspendieron en solución salina normal estéril, exenta de pirógeno. En las células se comprobó la esterilidad y la pureza. Las células se diluyeron hasta tener una concentración final de 10^9 células por ml. Las células se mezclaron con el antígeno, en uno de los ejemplos, el antígeno es un Ag de HB. Estas mezclas se utilizan como vacuna en donde *Mw* actúa como adyuvante.

Ejemplo 2

El calor inactivó las células de *Mw* y/o sus componentes y se activaron con hidrócloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma) y se recubrieron con antígeno, mezclando las células activadas con antígeno. La relación molar utilizada de antígeno frente a célula estaba en el intervalo de 1:2 a 1:100, preferiblemente en una relación de 1:50. Esta composición se utilizó para la inmunización en donde *Mw* y/o sus componentes actuaban como adyuvante.

IV. Los siguientes ejemplos ilustran el efecto adyuvante:

El siguiente ejemplo describe el método para utilizar *Mycobacterium w* y sus componentes o fracciones como adyuvante. Los siguientes experimentos muestran el efecto adyuvante de la presente invención y no limitan el alcance de la invención.

A: Efecto adyuvante según la presente invención en los animales que recibieron la vacuna contra la rabia.

El efecto adyuvante de acuerdo con la presente invención, se estudió en caballos inmunizados previamente que recibieron la vacuna contra la rabia, con el fin de evaluar el efecto de las composiciones que contenían *Mycobacterium w* y/o sus componentes y se formularon y se evaluaron para estudiar su efecto sobre el título de anticuerpos. Todas las inyecciones individuales de vacuna testigo (Rabipur), así como la vacuna del ensayo, contenían virus de la rabia inactivados en una cantidad superior o igual a 2,5 UI/ml. Se aplicaron con una dosificación diferente (n° de inyecciones) o en el intervalo mencionado. Los títulos de anticuerpos se midieron por el método ELISA y se evaluaron adicionalmente con la prueba de anticuerpos neutralizantes en ratones.

Ejemplo 1

Inmunización de caballos contra la rabia empleando adyuvante *Mw*.

Caballos inmunizados con la vacuna contra la rabia (Rabipur) fueron inmunizados de nuevo mediante la administración de la vacuna contra la rabia (Rabipur) reconstituida con agua o con solución salina que contenía *Mycobacterium w*. Cada caballo recibió 1,0 ml de Rabipur reconstituida por vía intramuscular en dos dosis de 0,5 ml cada una, en cada hombro. Se recogió sangre al comienzo (día cero) y en intervalos de siete y catorce días después de la reinmunización. La sangre se analizó para determinar el título de anticuerpos contra la rabia mediante ELISA frente a un patrón de referencia. Las muestras de sangre también se analizaron para determinar los anticuerpos neutralizantes contra la rabia mediante la prueba de anticuerpos neutralizantes de ratón.

La Figura 1 muestra el efecto de ambas vacunas sobre los niveles de anticuerpos en el suero de los caballos, tres en cada grupo, que tenían un título de anticuerpos inicial muy bajo. La vacuna sola no produce el título protector de anticuerpos, mientras que la vacuna con *Mw* es capaz de elevar el título a un nivel significativamente superior el día 7. Este se incrementa aún más el día 14.

La Figura - 2 muestra el efecto de ambas vacunas sobre los niveles de anticuerpos en el suero de los caballos, dos en cada grupo, con títulos de anticuerpos iniciales elevados. La vacuna sola no produce el título protector de anticuerpos, mientras que la vacuna con *Mw* es capaz de elevar el título a un nivel significativamente superior el día 7. Este aumenta aún más el día 14.

Cuando los anticuerpos neutralizantes se evaluaron usando la prueba neutralizante de ratón, se observó que no había ningún efecto sobre los niveles de anticuerpos neutralizantes en el grupo testigo (que recibía la vacuna contra la rabia sola), pero hubo una mejora significativa en un grupo que recibía la vacuna con *Mycobacterium w* (grupo experimental). Hubo un incremento de más del doble en el título de anticuerpos neutralizantes el día 14, en comparación con el nivel de referencia en el grupo experimental (Fig. 3).

Ejemplo 2

Los grupos experimentales recibieron la vacuna contra la rabia reconstituida con *Mw*, mientras que el grupo testigo recibió sólo la vacuna contra la rabia. El grupo experimental fue inmunizado el día 0 con una sola inyección de la vacuna. El grupo testigo recibió cuatro inyecciones de la vacuna contra la rabia los días 0, 7 y 14 (en total 12).

En los resultados, tal y como se muestran en la Figura 4, el grupo experimental muestra una respuesta inmune mejor en comparación con el testigo. La respuesta de anticuerpos en el grupo experimental se consigue con menor cantidad de antígeno en comparación con el grupo testigo.

Ejemplo 3

La vacuna del ensayo, de acuerdo con la invención, fue evaluada en los mismos caballos que recibieron cuatro inyecciones de la vacuna contra la rabia convencional, en un intervalo de 4 semanas (16 inyecciones en total) antes de la misma. Todos recibieron una sola inyección de la vacuna del ensayo, que contenía la misma carga de antígeno que la que contenía una sola inyección de la vacuna contra la rabia. El título de anticuerpos generado en los caballos con la vacuna del ensayo, es mayor o igual que cualquiera que se produzca en el mismo caballo con cuatro inyecciones de vacuna testigo, inyectadas cada semana hasta un total de 16 inyecciones. El título de anticuerpos también se alcanza al cabo de 2 y 3 semanas en el grupo experimental, en comparación con cinco semanas en el grupo testigo.

Ejemplo 4

Un grupo de cinco caballos (grupo experimental) fueron inmunizados con vacuna antirrábica y el otro grupo (grupo testigo) fue inmunizado con el antígeno de la rabia recubierto con *Mw*. Cada caballo recibió 1 ml de vacuna por vía intramuscular. A los caballos se les extrajo sangre en un intervalo de 7 días durante el periodo de un mes. Los títulos de anticuerpos específicos se determinaron por ELISA y MNT. Los títulos de anticuerpos en el grupo experimental fueron significativamente más elevados que en el grupo testigo de caballos a partir del día 7 en adelante, tal y como se muestra en las Figuras 5 y 6.

Ejemplo 5

Inmunización de ratones contra la rabia

A los ratones se les administró 0,2 ml de vacuna contra la rabia (Rabipur) reconstituida en agua (testigo) o reconstituida con *Mycobacterium w* (*Mw*) que contenía solución salina normal. En cada grupo se inmunizaron treinta ratones. En cada grupo los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30, se extrajo sangre de cinco ratones de cada grupo para obtener suero. Se administraron 0,2 ml de la vacuna por vía intradérmica, divididos en dos inyecciones de 0,1 ml cada una, a cada lado del lomo. El título de anticuerpos se evaluó después de la administración de la vacuna en un intervalo de 5 días. El título de anticuerpos se midió con ELISA (Figura 7). Los resultados sugieren que con la adición de *Mycobacterium w* se alcanza un mayor título de anticuerpos en comparación con el testigo. Dicho título tan elevado se alcanza muy pronto. El valor máximo se consigue el día 10 en el grupo de *Mw*, en comparación con el día 15 en el grupo testigo. El día 10, el valor alcanzado por el grupo de *Mw* es más del doble que el del grupo testigo. En un grupo testigo, después de alcanzar el valor máximo el día 15, este valor disminuye rápidamente y el valor alcanzado el día 20 es menos de la mitad del alcanzado el día 15 y no es detectable el día 25 y 30. En el grupo de *Mw*, el valor el día 20 es más del doble en comparación con el grupo testigo, que se mantiene el día 25 y el día 30. Las muestras se verificaron para estudiar la presencia de isotipos específicos de IgG. Estos anticuerpos estaban teniendo un componente importante de anticuerpos de isotipo IgG2a, tal y como se determinó mediante un equipo de reactivos para determinar isotipos de IgG (SIGMA).

Ejemplo 6

Anticuerpos neutralizantes de ratón contra la rabia.

Suero obtenido el día 5, el día 10 y el día 25 a partir del ejemplo cinco anterior, se utilizó para detectar los anticuerpos neutralizantes de ratón, inoculando el cerebro de los ratones con virus de la rabia vivos (prueba de neutralización en ratón). El día 5, el título de anticuerpos neutralizantes no era detectable en ambos grupos. El día 10, el grupo *Mw* contenía 1,35 UI/ml, mientras que el grupo testigo contenía 0,2975 UI/ml de anticuerpos neutralizantes. Incluso después del día 25, los títulos de anticuerpos neutralizantes específicos eran significativamente más elevados en el grupo *Mw* como adyuvante que en el grupo testigo. El título del grupo de *Mw* era de 32 UI/mL, mientras que el grupo testigo solo logró el título protector de 1,09 UI/mL.

Esto muestra claramente la inducción más rápida y específica de la respuesta de anticuerpos neutralizantes hasta títulos protectores en 10 días en el grupo *Mw*, tal y como se indica en la tabla 2 y la Figura 8.

Tabla 2: Efecto de la inmunización con *Mw* de Immuvac en ratones

	Vacuna testigo contra la rabia	Vacuna contra la rabia con <i>Mw</i>
Día 5	no detectable	no detectable
Día 10	0,2975	1,35
Día 25	1,09	32,00

B: Efecto adyuvante de acuerdo con la presente invención en voluntarios humanos sanos que recibieron una vacuna contra la hepatitis B.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención, se prepararon de forma que tuvieran antígeno de la hepa-

titis B (vacuna del ensayo) y se compararon con la vacuna contra la hepatitis B (Engerix-B). Ambas (la vacuna del ensayo, así como la vacuna testigo) contenían 20 microgramos/ml de antígeno de la hepatitis B. Los títulos de anticuerpos se midieron utilizando el equipo de reactivos para ELISA, disponible comercialmente.

Ejemplo 1: Efecto de una dosis intradérmica única

5 Después de dar su consentimiento, dos grupos de 15 personas adultas de sexo masculino fueron seleccionadas al azar y se inmunizaron por vía intradérmica. Con una sola inyección de vacuna contra la hepatitis B (Engerix B), sola o con la incorporación de *Mw*, el antígeno de la hepatitis B utilizado eran 2 mcG. Las muestras de suero se analizaron para determinar el título de anticuerpos en la semana 1, 2, 3 y 4 después de la inmunización. Los resultados indican que ningún voluntario en el grupo testigo produjo anticuerpos contra la hepatitis B. El nivel protector es 10 UI/ml. Por otro lado, el grupo que contenía la vacuna que incorporaba *Mw*, consiguió un título significativamente elevado (Figura 9), más de los niveles requeridos para un título protector de anticuerpos.

Ejemplo 2: Efecto de la segunda dosis intradérmica

15 El día 35 después de la primera inmunización, las personas con falta de respuesta recibieron una segunda dosis de inmunización con la vacuna del ensayo o testigo, por vía intradérmica. Las respuestas de los anticuerpos después de la segunda dosis se determinaron cada siete días. Los anticuerpos anti-HB en el grupo experimental se incrementaron significativamente en comparación con los títulos en el grupo testigo, tal y como se muestra en la Figura 10. En el grupo testigo sólo uno de los seis individuos que recibían la segunda dosis de la vacuna testigo, alcanzó el título de anticuerpos.

Ejemplo 3: Efecto de refuerzo de una dosis única de vacuna contra la Hepatitis B intradérmica

20 Dos individuos con títulos protectores el día 0, recibieron una vacuna del ensayo o una vacuna testigo. Después de la inmunización con las vacunas respectivas, sus títulos de anticuerpos mejoraron en los dos casos.

Ejemplo 4: Efecto de la administración intramuscular:

25 En otro ejemplo, 46 personas adultas de sexo masculino, fueron seleccionadas cada una al azar y se inmunizaron intramuscularmente, con una sola inyección de cualquier vacuna contra la hepatitis B (vacuna testigo (Engerix B)) sola o formulada con *Mw* (la vacuna del ensayo). Quince voluntarios recibieron la vacuna testigo, mientras que 31 voluntarios fueron inmunizados con la vacuna del ensayo. La cantidad de antígeno de la hepatitis B utilizado era 20 mcG. Las muestras de suero se analizaron para determinar el título de anticuerpos en la semana 1, 2, 3, 4, 6 y 7 después de la inmunización. Los resultados indican que ninguno de los voluntarios del grupo testigo produjo anticuerpos contra la hepatitis B. El nivel protector es de 10 UI/ml. Por otro lado, el grupo que contenía la vacuna que incorporaba *Mw*, logró un título significativamente alto (Fig. 12). Todos lograron niveles superiores a los requeridos para un título de anticuerpos protector con una sola inyección. Todos recibieron una segunda inyección de la vacuna testigo o una vacuna del ensayo el día 28. Hubo un aumento significativo del título de anticuerpos en el grupo experimental (Fig.12). El aumento también se observó en el grupo testigo, pero no fue tan notable.

Ejemplo 5: Efecto adyuvante de *Mw* para la respuesta inmune mediada por células contra el Ag de HB en ratones.

35 Un grupo de cinco ratones (grupo experimental) fueron inmunizados con la vacuna contra la hepatitis B (Engerix B) mezclada con *Mw* y otro grupo de cinco ratones (grupo testigo) recibió la vacuna contra la hepatitis B adecuadamente diluida. La inmunización se realizó por vía subcutánea. Cada ratón recibió 2 microgramos de antígeno de HB. El grupo experimental recibió la misma dosis de 2 microgramos de antígeno, formulada en células de *Mw*. Después de 40 15 días, se extrajo sangre de los ratones y se aislaron los PBMC. Las células aisladas se cultivaron en medio RPMI completo con FBS al 10% y 1 µg/mL de concavalina A como mutágeno, a 37°C y 7% de CO₂ durante 72 horas y se estimularon con antígeno de HB. Después de 72 horas, las células se recogieron y se sometieron a ELISPOT para IFN-γ, IL-2. Los resultados se obtuvieron con un lector de ELISPOT.

45 Los resultados mostraron que las células productoras de IFN-γ e IL-2 eran significativamente superiores en el grupo experimental en comparación con el grupo testigo.

C: Efecto adyuvante de acuerdo con la presente invención para mostrar el efecto sobre la inmunidad mediada por células cuando se incorporan antígenos de la enfermedad en la composición.

Ejemplo 1: Efecto adyuvante de *Mw* sobre la respuesta inmune mediada por células contra el antígeno de cáncer CA - 19.9 en ratones.

50 Un grupo de cinco ratones se inmunizaron con CA - 19.9 (Sigma) solo (grupo testigo) o con una composición de acuerdo con la presente invención. Todos los ratones fueron inmunizados con inyecciones subcutáneas de 0,2 ml en la zona lumbar. Cada ratón recibió 10 UI de antígeno CA - 19.9. El grupo experimental recibió la misma dosis de 10 UI de antígeno formulada en células de *Mw*. Después de 15 días, se tomó sangre de los ratones y se aislaron las PBMC. Las células aisladas se cultivaron en medio RPMI completo con FBS al 10% y 1 µg/mL de concavalina A

como mutágeno, a 37°C y 7% de CO₂ durante 72 horas y se estimularon con antígeno CA - 19,9. Después de 72 horas, las células se recogieron y se sometieron a ELISPOT para IFN-γ e IL-2.

Los resultados mostraron que el número de células secretoras de IFN-γ e IL-2 era significativamente superior en el grupo experimental en comparación con el grupo testigo.

5 **Ejemplo 2: Efecto adyuvante de *Mw* para la respuesta inmune mediada por células contra el antígeno de neumococos en ratones.**

Un grupo de cinco ratones fueron inmunizados con el antígeno de neumococos aislado (grupo testigo) o con una composición de acuerdo con la presente invención. Todos los ratones fueron inmunizados con inyecciones subcutáneas de 0,2 ml en la parte lumbar, que contenían 0,1 ml de antígeno de neumococo. Después de 15 días, se recogió
10 sangre de los ratones y se aislaron las PBMC. Las células aisladas se cultivaron en medio RPMI completo con FBS al 10% y 1 µg/ml de concavalina A como mutágeno, a 37°C y 7% de CO₂ durante 72 horas y se estimularon con antígeno de neumococo. Después de 72 horas, las células se recogieron y se sometieron a ELISPOT para IFN-γ, IL-2 e IL-12.

Los resultados mostraron que el número de células productoras de IFN-γ era menor en el grupo testigo que en el grupo experimental. La respuesta de IL-2 se observó sólo en el grupo experimental. Las células secretoras de IL-12 eran significativamente superiores en el grupo experimental.

15 **Ejemplo 3: Efecto adyuvante de *Mw* para la respuesta inmune mediada por células contra el antígeno del virus de la gripe en ratones.**

Un grupo de cinco ratones fueron inmunizados con la vacuna contra la gripe (Vaxigrip) mezclada con *Mw* y otro grupo de cinco ratones recibieron la vacuna de la gripe convenientemente diluida. Todos los ratones fueron inmunizados con inyecciones subcutáneas de 0,2 ml en la zona lumbar. Cada ratón recibió 0,10 ml de vacuna contra la gripe. El grupo experimental recibió la misma dosis de antígeno formulada en células de *Mw*. Después de 15 días, se extrajo
20 sangre de los ratones y se aislaron las PBMC. Las células aisladas se estimularon en medio RPMI completo con FBS al 10% y 1 µg/ml de concavalina A como mutágeno, a 37°C y 7% de CO₂ durante 72 horas y se estimularon con la vacuna contra la gripe. Después de 72 horas, se recogieron las células y se sometieron a ELISPOT para IFN-γ, IL-2 e IL-12.

Los resultados mostraron que el número de células productoras de IFN-γ, IL-2 e IL-12 en el grupo experimental era superior al número en el grupo testigo. El efecto fue máximo para IL-12 seguido por IL-2 y IFN-γ.

25 **Ejemplo 4: Efecto adyuvante de *Mw* para la respuesta inmune mediada por células contra el antígeno de la *Salmonella typhi* vi en ratones.**

Un grupo de cinco ratones (grupo experimental) fue inmunizado con antígeno de *Salmonella typhi* vi mezclado con *Mw* y el otro grupo de cinco ratones (grupo testigo) recibió el antígeno *Salmonella typhi* vi convenientemente diluido. Todos los ratones fueron inmunizados con inyecciones subcutáneas de 0,2 ml en la zona lumbar. Cada ratón recibió
30 0,1 ml de antígeno *Salmonella typhi* vi. El grupo experimental recibió la misma dosis de antígeno formulado en células *Mw*. Después de 15 días, se recogió sangre de los ratones y se aislaron las PBMC. Las células aisladas se cultivaron en medio RPMI completo con FBS al 10% y 1 µg/ml de concavalina A como mutágeno, a 37°C y 7% de CO₂ durante 72 horas y se estimularon con antígeno *Salmonella typhi* iv. Después de 72 horas, las células se recogieron y se sometieron a ELISPOT para estudiar IFN-γ, IL-2 e IL-12.

Los resultados mostraron que el grupo experimental tenía un mayor número de células productoras de IFN-γ, IL-2 e IL-12 que el grupo testigo. El efecto fue máximo con IL-12 seguido por IL-2 e IFN-γ.

35 **Ejemplo 5: Efecto adyuvante de *Mw* para la respuesta inmune mediada por células contra el antígeno de la hepatitis A en ratones.**

Un grupo de cinco ratones (grupo experimental) fue inmunizado con el antígeno de la hepatitis A (Havrix) mezclado con *Mw* y el otro grupo de cinco ratones (grupo testigo) recibió antígeno de la hepatitis A adecuadamente diluido.
40 Todos los ratones fueron inmunizados con inyecciones subcutáneas de 0,2 ml en la zona lumbar. Cada ratón recibió 140 U de antígeno de la hepatitis A. El grupo experimental recibió la misma dosis de 140 U de antígeno formulada en células *Mw*. Después de 15 días, se recogió sangre de los ratones y se aislaron las PBMC. Las células aisladas se cultivaron en medio RPMI completo con FBS al 10% y 1 µg/ml de concavalina A como mutágeno, a 37°C y 7% de CO₂ durante 72 horas y se estimularon con antígeno de la hepatitis A. Después de 72 horas, las células se reco-
45 gieron y se sometieron a ELISPOT para estudiar IFN-γ e IL-2.

Los resultados mostraron que en el grupo experimental el número de células productoras de IL-2 e IFN-γ era significativamente más elevado que en el grupo testigo.

Los ejemplos anteriores muestran el funcionamiento de la presente invención cuando se incorpora una variedad de diferentes tipos de antígenos. Para algunos de ellos, tales como el antígeno de la rabia, tifoideo, de neumococo, ac-

tualmente no hay adyuvantes incorporados en una preparación comercialmente disponible, debido al hecho de que los adyuvantes actuales no proporcionan el efecto deseado. También se muestra el efecto de la adición de adyuvante en combinación con un adyuvante conocido, tal como el alumbre. Por lo tanto, el adyuvante de la presente invención parece ser universal con una eficacia mejorada.

5 Estos ejemplos muestran claramente que *Mw*, cuando se utiliza como adyuvante, puede estimular la respuesta inmune específica mediada por células. Los resultados en caballos inmunizados previamente muestran que las inyecciones individuales de las vacunas del ensayo producen un aumento del título de anticuerpos, en comparación con caballos inmunizados con múltiples inyecciones de vacuna contra la rabia.

10 Los ejemplos con personas voluntarias y caballos también indican que los títulos protectores se pueden conseguir a través de una dosis de inmunización única con la vacuna del ensayo, en 7 a 10 días, mientras que títulos similares se pueden conseguir con la vacuna convencional después de un mes o más con múltiples inyecciones.

15 Los ejemplos anteriores muestran que el objeto de la estimulación inmunológica de acuerdo con la presente invención, puede ser cualquier mamífero, incluyendo pequeños ratones, mamíferos grandes, tales como caballos y seres humanos. La respuesta neta es idéntica en todos los animales. Las composiciones de prueba estimulan la inmunidad mediada por células de forma evidente a partir de los ejemplos anteriores.

Mw, cuando se utiliza junto con la vacuna antirrábica, logra un nivel máximo de anticuerpos más elevado y más pronto, reduciendo el tiempo hasta la primera aparición de anticuerpos, en comparación con el grupo testigo y se mantiene durante un período prolongado.

20 El ejemplo anterior también muestra la inducción más rápida y específica de la respuesta de los anticuerpos neutralizantes con títulos protectores en 10 días, en el grupo *Mw*, tal y como se indica en la tabla 2 y la Figura 7.

Ninguno de los animales ni de los voluntarios humanos ha mostrado ningún signo de toxicidad local o generalizada y la vacuna fue bien tolerada. También se obtienen resultados idénticos cuando se utilizan fracciones o componentes de *Mycobacterium w* o *Mw* completa.

25 *Mw* y/o sus componentes pueden estimular la respuesta inmune en humanos frente a un antígeno específico, sin ningún efecto adverso. También la ruta de inmunización es independiente de la respuesta inmune, cuando se administra con *Mw* como adyuvante.

30 Esto es indicativo del potencial de *Mw* para producir una respuesta inmune humoral más potente y sostenida para todos los antígenos. Como se ha mostrado en todos los ejemplos anteriores, dicho adyuvante *Mw* se utilizará completo o se emplearán sus componentes para potenciar la estimulación de la respuesta inmune contra prácticamente cualquier antígeno/inmunógeno.

REIVINDICACIONES

1. *Mycobacterium w* inactivo para uso como adyuvante en el tratamiento profiláctico o terapéutico mediante vacunación, en donde dicho tratamiento comprende la administración a un mamífero de una vacuna que comprende *Mycobacterium w* mezclado, formulado, conjugado, cebado, fusionado y/o ligado con un antígeno, en donde dicho *Mycobacterium w* actúa como un adyuvante que potencia la inmunogenicidad de dicho antígeno.
2. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se disminuye la morbilidad y la mortalidad asociadas a una enfermedad.
3. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho tratamiento mediante vacunación evita una enfermedad en un mamífero.
4. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde se induce una respuesta inmune más rápida, más fuerte y/o más duradera.
5. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el *Mycobacterium w* se formula en una composición que también contiene otros adyuvantes.
6. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho *Mycobacterium w* se inactiva mediante calor o radiación, preferentemente utilizando un autoclave.
7. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el antígeno se selecciona a partir de péptidos, polipéptidos, células, extractos celulares, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, lípidos, glicolípidos, carbohidratos, proteínas, virus, extractos víricos y antígeno codificado por ácidos nucleicos.
8. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el antígeno se obtiene a partir de un agente infeccioso seleccionado entre un virus, una bacteria, un hongo y un parásito.
9. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el antígeno es un antígeno asociado a un tumor.
10. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el antígeno es un antígeno específico de un tumor.
11. *Mycobacterium w* inactivo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el antígeno es un alérgeno.

FIG :1

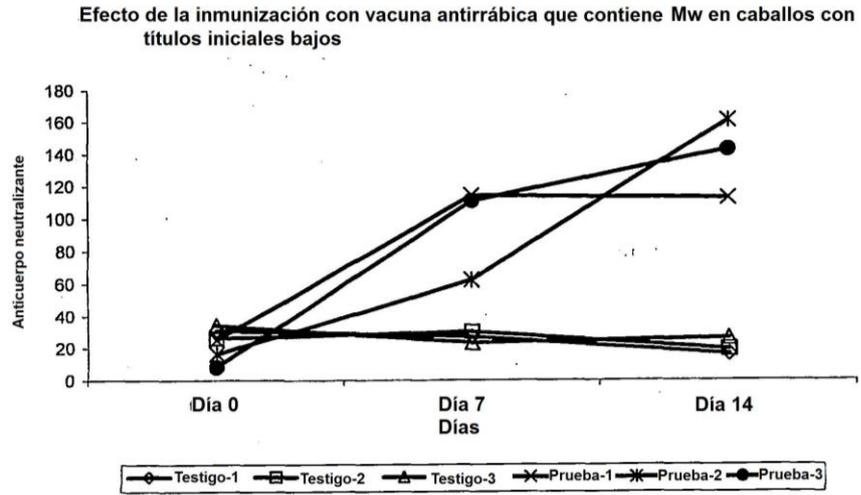


FIG:2

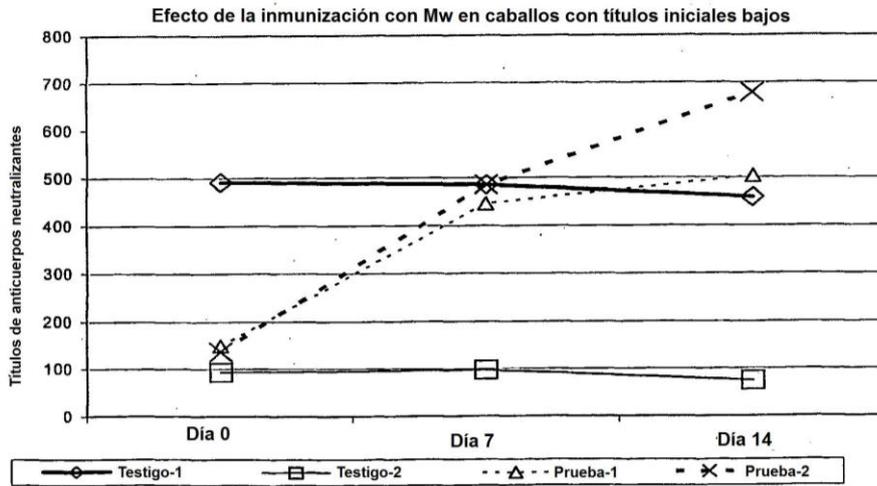


Fig 3

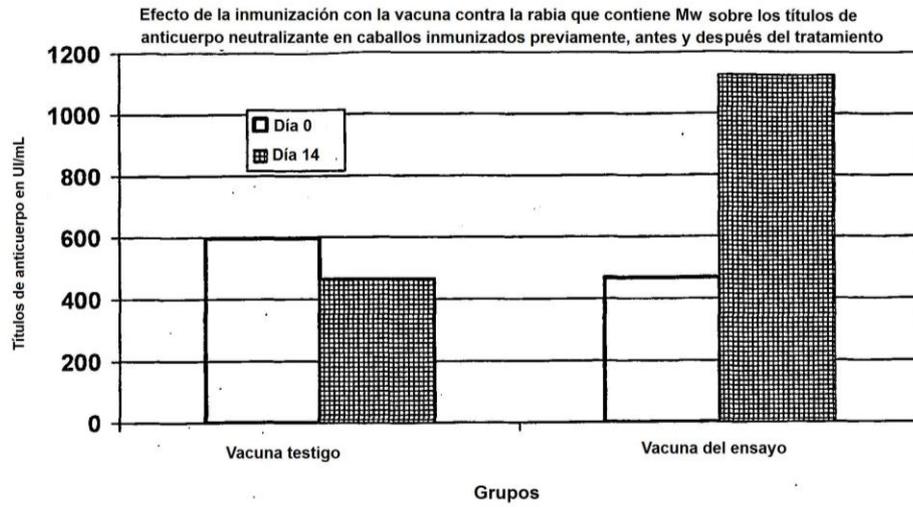


FIG: 4

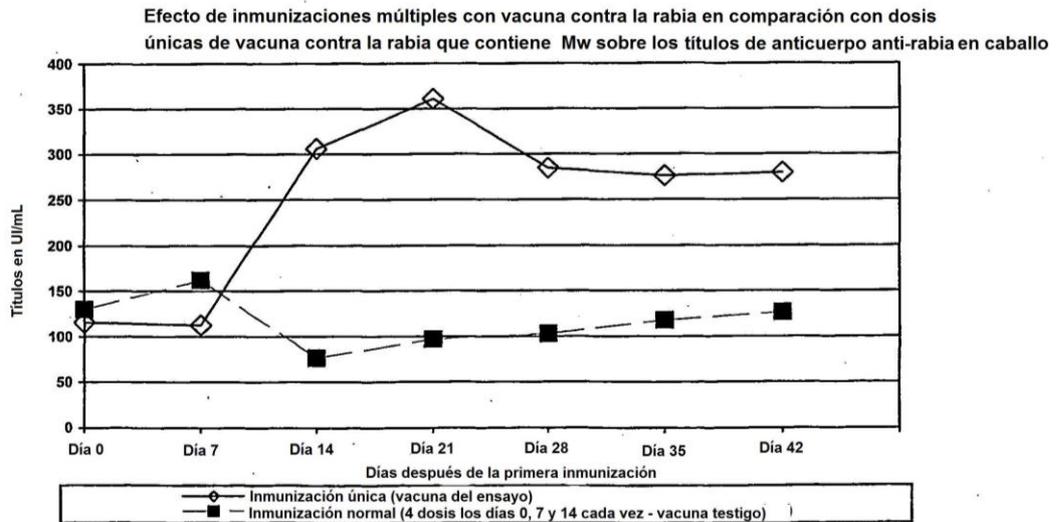


FIG:5

Efecto de la vacuna contra la rabia que contiene antígeno recubierto con Mw sobre la respuesta de los anticuerpos contra el virus de la rabia

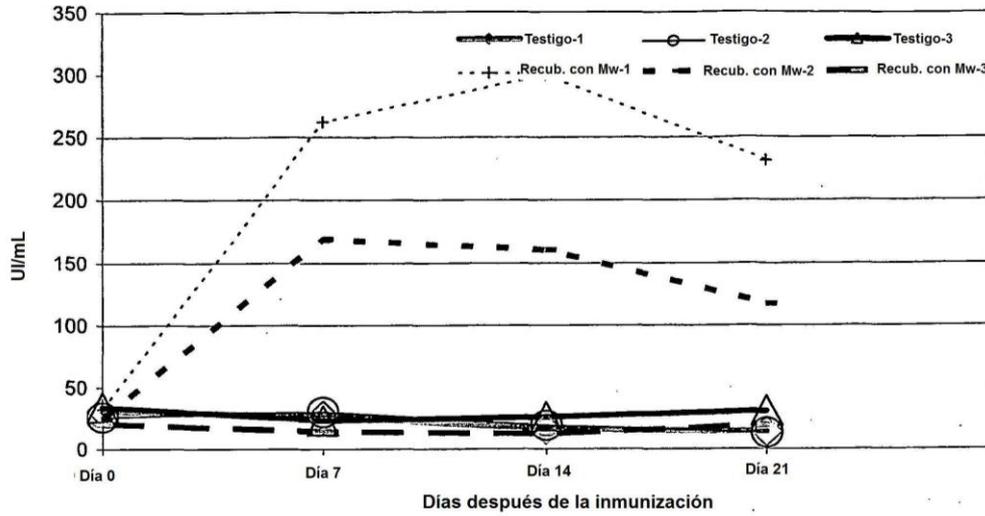


FIG:6

Efecto de la vacuna antirrábica de antígeno recubierto con Mw sobre la respuesta neutralizante contra el virus de la rabia

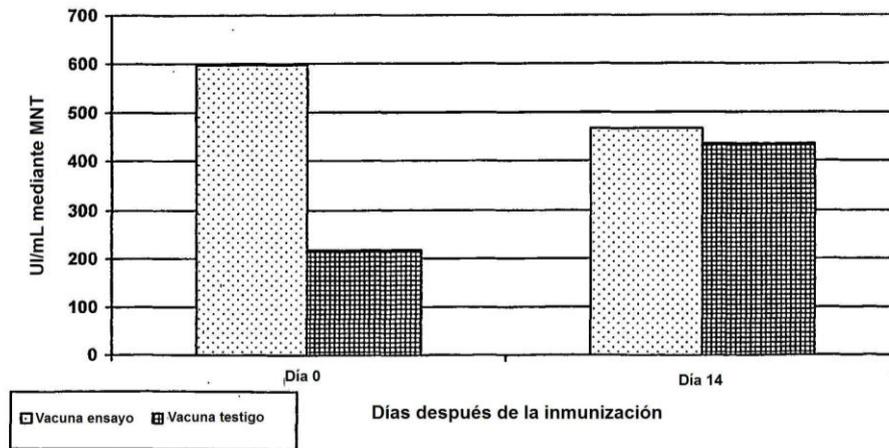


FIG: 7

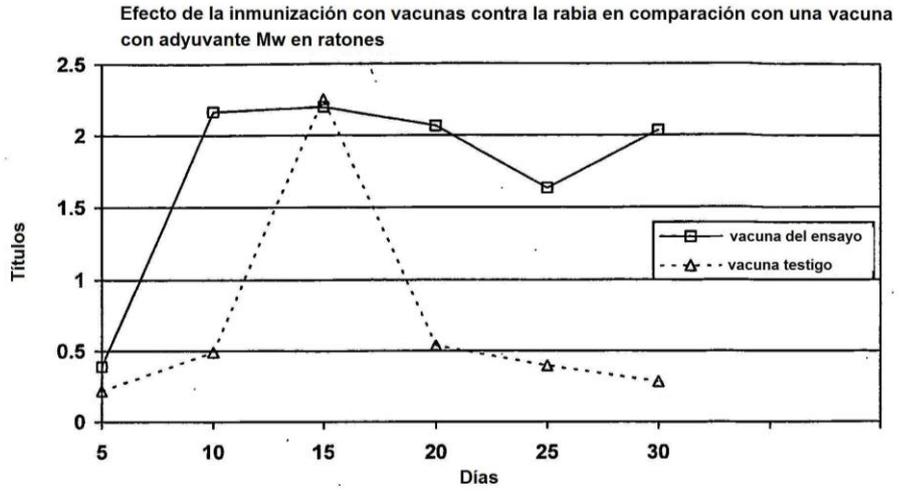


FIG: 8

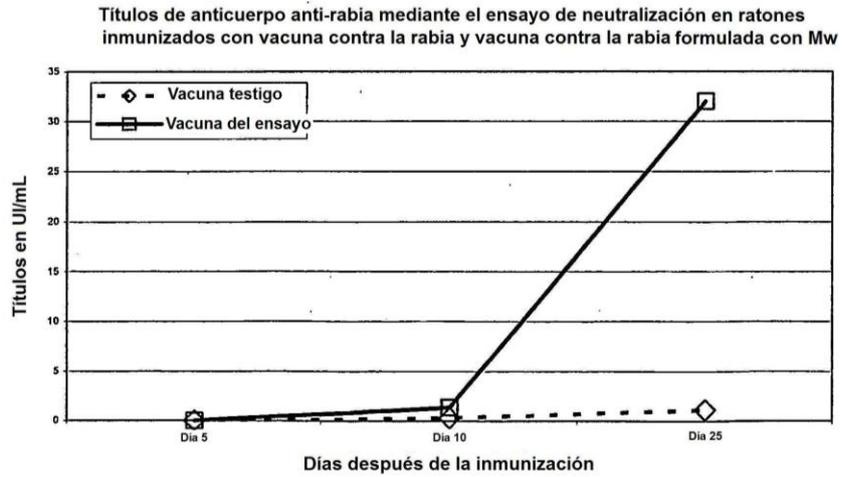


FIG :9

Respuesta de los anticuerpos en voluntarios humanos sanos frente al Ag de HB, inmunizados intradérmicamente con vacuna contra la Hepatitis B y vacuna con adyuvante Mw

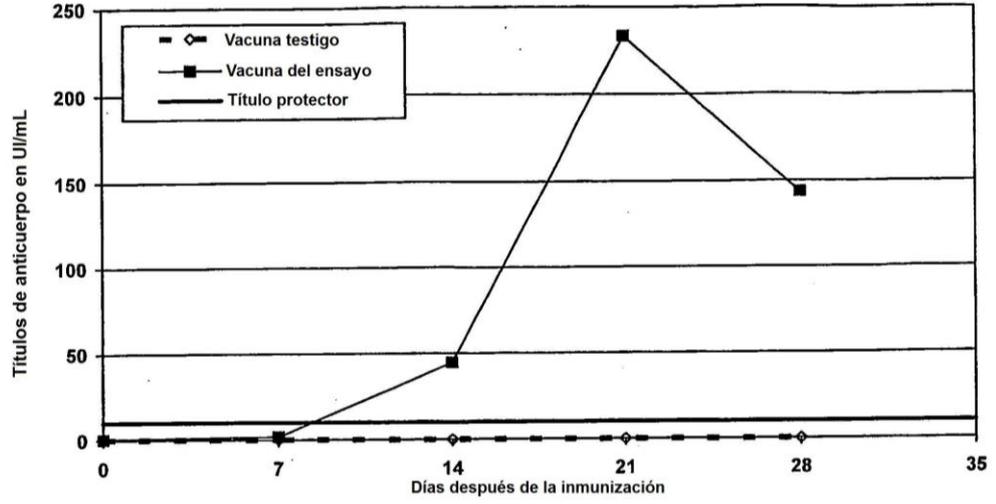


FIG : 10

Efecto de la 2ª dosis de inmunización sobre la respuesta de los anticuerpos después de una vacuna contra la Hepatitis B y una vacuna con adyuvante Mw

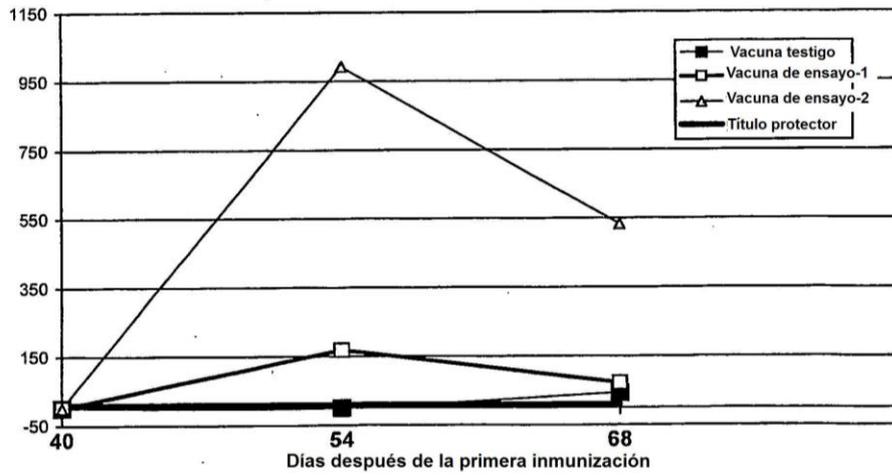


FIG: 11

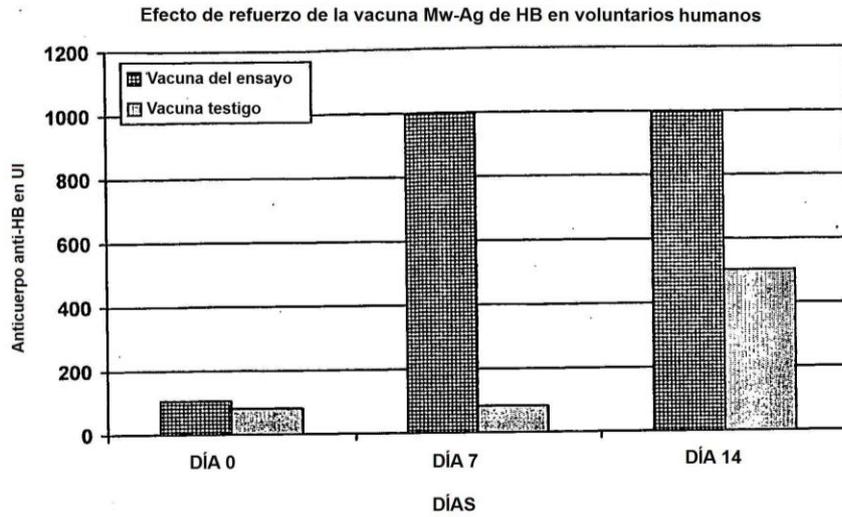


FIG:12

