

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 241**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 03793906 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1534330**

54 Título: **Células bacterianas completas como inmunomodulador**

30 Prioridad:

**06.09.2002 GB 0220809**  
**22.07.2003 GB 0317144**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.06.2014**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC (100.0%)**  
**The Network Building 97 Tottenham Court Road**  
**London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**MCINTYRE, GRAHAM;**  
**STANFORD, JOHN LAWSON;**  
**STANFORD, CYNTHIA ANN y**  
**BOTTASSO, OSCAR ADELMO**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 471 241 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

Células bacterianas completas como inmunomodulador

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a inmunomoduladores, en particular vacunas que modulan una respuesta inmunitaria celular, y a usos de los mismos.

### 10 **Antecedentes de la invención**

Las vacunas y otros inmunomoduladores tienen un impacto importante en la reducción de la morbimortalidad de enfermedades. La inmunidad primaria provocada por las vacunas más actuales parece estar mediada por la respuesta inmunitaria humoral. Para enfermedades que pueden requerir una respuesta inmunitaria celular, tal como tuberculosis y leishmaniasis, actualmente no se dispone de vacunas que sean eficaces de manera uniforme.

Normalmente, se añaden adyuvantes a las vacunas. El papel de los adyuvantes es potenciar la respuesta inmunitaria del organismo a antígenos específicos de la vacuna. Los adyuvantes usados comúnmente producen normalmente una respuesta inmunitaria humoral pero no una respuesta inmunitaria mediada por células. Además, los adyuvantes de aluminio, por ejemplo, pueden producir efectos secundarios negativos, tales como abscesos estériles, eritema, hinchazón, nódulos subcutáneos, inflamación granulomatosa e hipersensibilidad al contacto.

Se busca una vacuna u otro inmunomodulador que modifique una respuesta inmunitaria celular y en particular la respuesta de las células T cooperadoras, por ejemplo, la respuesta de las células T cooperadoras 1 (Th1) y las células T cooperadoras 2 (Th2).

### **Sumario de la invención**

Desde el nacimiento hasta la muerte, el sistema inmunitario se educa, se estimula constantemente y se regula a través del contacto con el entorno. La urbanización moderna y las medidas de salud pública para prevenir enfermedades infecciosas han eliminado prácticamente esta exposición conduciendo a un aumento sin precedentes de enfermedades, tales como alergias y enfermedades neoplásicas. El restablecimiento de los efectos beneficiosos del entorno a través del uso de suspensiones inactivadas de bacterias del entorno beneficiosas inofensivas puede corregir el equilibrio normal del sistema inmunitario actuando por tanto, de manera terapéutica y/o profiláctica, en el tratamiento de enfermedades y/o en la estimulación de un sistema inmunitario sano.

Por consiguiente, la presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que una célula completa de una bacteria de uno cualquiera de los géneros de actinomicetos *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* administrada a un sujeto de prueba puede provocar una modificación del sistema inmunitario, en particular el sistema inmunitario celular de ese sujeto de prueba.

La expresión "sistema inmunitario celular", tal como se usa en el presente documento, incluye una respuesta inmunitaria mediada por células que depende de la presencia de linfocitos T. El término "linfocitos T" incluye linfocitos T citotóxicos, células T cooperadoras, células T supresoras y células T reguladoras. La modificación de una respuesta inmunitaria mediada por células puede usarse, por ejemplo, para superar trastornos inmunitarios mediados por células incluyendo, por ejemplo un desequilibrio del sistema inmunitario e hipersensibilidad inmunitaria.

Los términos "modular", "modificar", "modificación" y otros derivados de los mismos, tal como se usan en el presente documento, significan regulación por disminución, inhibición, inducción, estimulación, regulación por incremento, alteración o alteración de otro modo de un componente o componentes del sistema inmunitario celular.

### **Aspectos detallados de la presente invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición inmunomoduladora o composición farmacéutica que comprende de  $10^4$  a  $10^{10}$  células completas muertas de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en el que dicha composición inmunomoduladora o composición farmacéutica en uso modifica una respuesta inmunitaria celular, en el que la composición farmacéutica opcionalmente comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección, una alergia, cáncer relacionado con virus o estrés posoperatorio.

El término "inmunomodulador", tal como se usa en el presente documento, significa una sustancia que modula un sistema inmunitario celular de un sujeto.

El término "célula completa", tal como se usa en el presente documento, significa una bacteria que está intacta o sustancialmente intacta. En particular, el término "intacta" tal como se usa en el presente documento significa una

- bacteria que está compuesta por todos los componentes presentes en una célula completa, particularmente una célula viable completa, y/o una bacteria que no se ha tratado específicamente para eliminar uno o más componentes de ella. Mediante el término "sustancialmente intacta" tal como se usa en el presente documento se quiere decir que aunque el procedimiento de aislamiento y/o purificación usado en la obtención de la bacteria puede dar como resultado, por ejemplo, una ligera modificación en la célula y/o en la eliminación de uno o más de los componentes de la célula, el grado en que se produce tal modificación y/o eliminación es insignificante. En particular, una célula sustancialmente intacta según la presente invención no se ha tratado específicamente para eliminar uno o más componentes de ella.
- 5
- 10 Aunque se ha sugerido que podrían usarse componentes individuales de células bacterianas para provocar un efecto de adyuvante, antes de la presente invención no se contempló el uso de células completas de bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para modular una respuesta inmunitaria celular. Sorprendentemente, se ha encontrado que mediante el uso de una célula completa de una bacteria de dichos géneros, puede efectuarse la modulación de un sistema inmunitario celular. La modulación de una respuesta
- 15 inmunitaria celular producida por la administración de dicha célula completa de dicha bacteria puede ser ventajosamente de larga duración en comparación con la respuesta provocada por la administración de un componente individual de la bacteria.
- 20 Preferiblemente, la composición según la presente invención comprende más de una célula completa, y más preferiblemente comprende una pluralidad de células completas.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o composición farmacéutica que comprende de  $10^4$  a  $10^{10}$  células completas muertas de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en la que dicha composición inmunomoduladora o composición farmacéutica en uso
- 25 modifica una respuesta inmunitaria celular, en la que la composición farmacéutica opcionalmente comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección, una alergia, cáncer relacionado con virus o estrés posoperatorio.
- 30 En el presente documento se enseña un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica de la presente invención, comprendiendo dicho procedimiento mezclar uno o más de los compuestos de la presente invención con un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora y/o una composición farmacéutica para su uso en la presente invención, en la que dicha composición comprende además un
- 35 antígeno o determinante antigénico.
- De manera adecuada, el antígeno o determinante antigénico puede ser un antígeno o determinante antigénico de uno o más de los siguientes: vacuna de BCG (bacilo de Calmette y Guerin), vacuna de toxoide diftérico, vacuna de la difteria/tétanos/tos ferina (DTP o Triple), vacuna de la tos ferina, vacuna de toxoide tetánico tétanos, vacuna del sarampión, vacuna de las paperas, vacuna de la rubeola, VOP (vacuna oral de la poliomeilitis), de *Mycobacterium vaccae*, o parte de las mismas (tal como se enseña en el documento GB0025694.1) y un antígeno genérico de *Plasmodium*, por ejemplo un antígeno del parásito de la malaria.
- 40
- De manera adecuada, la composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica para su uso en la presente invención puede comprender dos o más de tales antígenos o determinantes antigénicos.
- 45
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora para su uso en la presente invención que comprende un antígeno o un determinante antigénico y un adyuvante, en la que dicho antígeno o determinante antigénico comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*.
- 50
- Cuando se da el caso de que la célula completa de la bacteria funciona como un antígeno o determinante antigénico, la composición puede comprender de manera adecuada al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, antígenos o determinantes antigénicos adicionales.
- 55
- En el presente documento también se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de una infección (por ejemplo, una bacteriana, viral, por ejemplo una infección producida por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede al carcinoma del cuello uterino, o infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección, estrés, por ejemplo, estrés por traumatismo mayor, estrés psicosocial y estrés crónico, una alergia (por ejemplo, asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas,
- 60 picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos tales como mosquillas, por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos), arcadas, EPOC y cáncer (por ejemplo melanoma o
- 65

adenocarcinoma); un desequilibrio del sistema inmunitario (por ejemplo, un desequilibrio del sistema inmunitario en niños y ancianos) e infección y estrés posoperatorios, un desequilibrio del sistema inmunitario en ancianos puede denominarse inmunosescencia.

- 5 En el presente documento se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una o más infecciones virales, por ejemplo una infección producida por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino.
- 10 un aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora y/o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, y al menos un antígeno o determinante antigénico, en la que dicho antígeno o determinante antigénico es un antígeno viral de papilomavirus bovino.
- 15 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una o más de una infección parasitaria, tal como, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis.
- 20 En el presente documento también se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de estrés, tal como, por ejemplo, estrés por traumatismo mayor, estrés psicosocial y/o estrés crónico.
- 25 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de asma (incluyendo asma alérgica), fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos,
- 30 tales como mosquillas por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos). Preferiblemente, la composición inmunomoduladora o la composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, se usa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de asma incluyendo asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos). La presente invención proporciona
- 35 además el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de uno o más de arcadas y/o EPOC, particularmente en caballos.
- 40 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cáncer relacionado con virus.
- 45 En el presente documento también se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunitario en ancianos. Normalmente, una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica según este aspecto puede ser un potenciador inmunitario.
- 50 En el presente documento se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para potenciar el sistema inmunitario lo que puede dar como resultado por ejemplo, potenciación del crecimiento o un aumento en la eficacia de la utilización de alimentos. Normalmente, la composición inmunomoduladora o la composición farmacéutica
- 55 según este aspecto puede ser un potenciador inmunitario. Ventajosamente, la composición inmunomoduladora o la composición farmacéutica puede usarse para sustituir antibióticos que se usan actualmente para promover el crecimiento de ganado. De manera adecuada, la composición inmunomoduladora puede usarse o bien sola o bien en combinación con otros tratamientos. El término "ganado", tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, ganado es uno o más de aves de corral, cerdos (incluyendo lechones),
- 60 ovejas (incluyendo corderos), vacas o toros (incluyendo terneros). Más preferiblemente, ganado significa cerdos, incluyendo lechones.
- La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y
- 65 *Tsukamurella*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de estrés posoperatorio o infección posoperatoria.

5 En el presente documento se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunitario en niños.

10 En el presente documento se enseña el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides*, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una reacción adversa a vacunas infantiles, tales como vacunaciones contra la tos ferina y las vacunaciones MMR actuales, y/o consecuencias de las mismas. El término "reacción adversa", tal como se usa en el presente documento, significa una respuesta desventajosa local o generalizada producida por o sensibilizada por la vacuna o la administración de la misma, que normalmente se produce en un intervalo de tiempo corto pero que puede retrasarse (por ejemplo 6 meses). Una "reacción adversa" puede incluir la muerte del niño. La reacción adversa puede producirse como consecuencia de un acontecimiento separado, habiendo producido la vacuna o la administración de la misma la sensibilización de manera negativa de la respuesta al mismo.

20 La presente invención proporciona además el uso de una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* en la fabricación de un medicamento para modificar una respuesta inmunitaria celular.

25 En el presente documento se enseña una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso como medicamento.

30 En el presente documento se enseña una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en o como vacuna.

30 De manera adecuada, la vacuna puede ser una vacuna profiláctica o una vacuna terapéutica.

35 Una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides* para su uso como potenciador inmunitario.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de una infección (por ejemplo una bacteriana, viral, por ejemplo una infección producida por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino, o infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección, una alergia (por ejemplo asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas, por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos), arcadas, EPOC y cánceres relacionados con virus tales como cánceres de cuello uterino por ejemplo); y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.

50 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección parasitaria, tal como, por ejemplo, una o más de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección viral, por ejemplo una infección producida por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino.

60 En el presente documento se enseña una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides* para su uso en el tratamiento o la prevención de estrés, tales como, por ejemplo, uno o más de estrés por traumatismo mayor, estrés psicosocial y estrés crónico.

65 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de asma (incluyendo asma alérgica),

- 5 fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos). Preferiblemente, la composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* es para su uso en el tratamiento o la prevención de asma, incluyendo por ejemplo asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas, por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos).
- 10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de uno o más de arcadas y/o EPOC, particularmente en caballos.
- 15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres relacionados con virus tales como cáncer de cuello uterino, por ejemplo).
- 20 En el presente documento se enseña una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunitario, particularmente inmunosenescencia, en ancianos.
- 25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en el tratamiento o la prevención de infección y estrés posoperatorios.
- 30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* para su uso en potenciar el sistema inmunitario lo que puede dar como resultado por ejemplo, potenciación del crecimiento o un aumento en la eficacia de la utilización de alimentos en, por ejemplo, ganado.
- 35 En el presente documento se enseña una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides* para su uso en el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunitario en niños.
- 40 En el presente documento se enseña una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica que comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides* para su uso en el tratamiento o la prevención de una reacción adversa a vacunas infantiles, tales como vacunaciones contra la tos ferina y las vacunaciones MMR actuales, y/o consecuencias de las mismas.
- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* en una vacuna o un medicamento, en el que dicha célula completa de dicha bacteria modifica una respuesta inmunitaria celular.
- 50 En un aspecto, la célula completa de la bacteria según la presente invención puede regular por disminución una respuesta Th2.
- 55 En otro aspecto, la célula completa de la bacteria según la presente invención puede regular por incremento una respuesta Th1.
- De manera adecuada, la célula completa de la bacteria según la presente invención puede regular por disminución una respuesta Th2 y regular por incremento una respuesta Th1.
- Alternativamente, la célula completa de la bacteria según la presente invención puede regular por incremento una respuesta Th1 mientras que no afecta a una respuesta Th2.
- 60 Alternativamente, la célula completa de la bacteria según la presente invención puede regular por disminución una respuesta Th2, mientras que también regula por disminución una respuesta Th1. Alternativamente, la célula completa de la bacteria según la presente invención puede regular por incremento una respuesta Th2, mientras que también regula por incremento una respuesta Th1.
- 65 A modo de ejemplo únicamente, uno cualquiera o más de los siguientes organismos puede potenciar la respuesta Th1, sin cambiar la respuesta Th2: *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodocrous*, *Dietzia maris* y *Gordonia terrae*.

- 5 A modo de ejemplo únicamente, uno cualquiera o más de los siguientes organismos puede potenciar la respuesta Th1, o dejar la respuesta Th1 sin cambios, y regular por disminución la respuesta Th2: *Gordonia bronchialis*, *Tsakumurella inchonensis* y *Gordonia amarae*.
- 10 A modo de ejemplo únicamente, *Rhodococcus coprophilus* puede regular por disminución ambas respuestas Th1 y Th2, de manera adecuada *Rhodococcus coprophilus* puede regular por disminución fuertemente ambas respuestas Th1 y Th2.
- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un estado en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica y/o composición inmunomoduladora a un sujeto en el que dicha composición modula una respuesta inmunitaria celular.
- De manera adecuada la cantidad eficaz de la composición farmacéutica y/o composición inmunomoduladora puede administrarse como una dosis única. Alternativamente, la cantidad eficaz de la composición farmacéutica y/o composición inmunomoduladora puede administrarse en múltiples dosis (repetición), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis de repetición.
- 20 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para proteger, incluyendo inmunizar, a un sujeto que comprende administrar una composición farmacéutica y/o composición inmunomoduladora según la presente invención.
- 25 Preferiblemente, un sujeto se protege, por ejemplo se inmuniza, contra uno o más de una infección (por ejemplo una bacteriana, viral, por ejemplo una infección producida por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino, o infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección, una alergia (por ejemplo asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas, por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos), arcadas, EPOC, cánceres relacionados con virus, tales como cáncer de cuello uterino y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.
- 30 Preferiblemente, un sujeto se inmuniza contra uno o más de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis.
- 35 Preferiblemente, un sujeto se inmuniza contra infecciones virales, por ejemplo contra infecciones por papilomavirus, incluyendo contra sarcoidosis equina, verrugas genitales o displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino.
- 40 En el presente documento se enseña proteger a un sujeto contra estrés, tal como, por ejemplo, uno o más de estrés por traumatismo mayor, estrés psicosocial y estrés crónico.
- 45 Preferiblemente, un sujeto se protege (incluyendo se inmuniza) contra uno o más de asma (incluyendo asma alérgica), fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos). Más preferiblemente, un sujeto se inmuniza contra asma incluyendo por ejemplo asma alérgica, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas, por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos).
- 50 Preferiblemente, un sujeto se protege (incluyendo se inmuniza) contra uno o más de EPOC y/o arcadas, particularmente en el que el sujeto es un caballo.
- 55 Preferiblemente, un sujeto se protege (incluyendo se inmuniza) contra infección y estrés posoperatorios.
- 60 Preferiblemente, un sujeto se protege contra el desarrollo y/o la progresión de un cáncer relacionado con virus tales como cánceres de cuello uterino por ejemplo.
- En el presente documento se enseña proteger a un sujeto (incluyendo inmunizar) contra un desequilibrio del sistema inmunitario en ancianos. En particular, la composición puede usarse para regular el sistema inmunitario del sujeto.
- 65 En el presente documento también se enseña proteger a un sujeto (incluyendo inmunizar) contra un desequilibrio del sistema inmunitario en niños. En particular, la composición puede usarse para regular el sistema inmunitario del sujeto, particularmente el sistema inmunitario del niño.
- En el presente documento se enseña proteger a un sujeto (incluyendo inmunizar) contra una reacción adversa a vacunas infantiles y/o consecuencias de las mismas. En particular, el sistema inmunitario del sujeto se regula,

particularmente el sistema inmunitario de un niño, antes y/o durante y/o después de la administración de la vacuna infantil.

5 El término “protegido” tal como se usa en el presente documento significa que el sujeto es menos susceptible a la enfermedad/trastorno en comparación con un sujeto no tratado o al que no se han administrado las composiciones según la presente invención y/o que el sujeto tiene más capacidad para responder o superar la enfermedad/trastorno en comparación con un sujeto no tratado o al que no se han administrado las composiciones según la presente invención.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica y/o una composición inmunomoduladora según la presente invención a un sujeto, en la que dicha composición se coadministra con un antígeno o determinante antigénico.

15 Cuando la composición se coadministra con un antígeno o determinante antigénico según la presente invención, el antígeno o determinante antigénico puede ser de manera adecuada un antígeno o determinante antigénico de uno o más de los siguientes: vacuna de BCG (bacilo de Calmette y Guerin), vacuna de toxoide diftérico, vacuna de la difteria/tétanos/tos ferina (DTP o Triple), vacuna de la tos ferina, vacuna de toxoide tetánico, vacuna del sarampión, vacuna de las paperas, vacuna de la rubeola, VOP (vacuna oral de la poliomelitis), de *Mycobacterium vaccae*, o parte de las mismas (tal como se enseña en el documento GB0025694.1) y un antígeno genérico de *Plasmodium*, por ejemplo un antígeno del parásito contra la malaria. De manera adecuada dos o más, o tres o más, de tales antígenos o determinantes antigénicos pueden coadministrarse con una composición farmacéutica o una composición inmunomoduladora según la presente invención.

25 Preferiblemente, se usa un medicamento según la presente invención para el tratamiento o la prevención de uno o más de una infección (por ejemplo una bacteriana, viral, por ejemplo una infección producida por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino, o infección parasitaria, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis), una alergia (por ejemplo asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas, por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos), arcadas, EPOC y cáncer relacionado con virus (tal como cánceres de cuello uterino por ejemplo); y estrés posoperatorio e infección posoperatoria. Preferiblemente, se usa un medicamento según la presente invención para el tratamiento o la prevención de uno o más de malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis.

35 Preferiblemente, se usa un medicamento según la presente invención para el tratamiento o la prevención de infecciones virales, por ejemplo infecciones por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales o displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino por ejemplo.

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

Preferiblemente, se usa un medicamento según la presente invención para el tratamiento o la prevención de uno o más de EPOC y arcadas.

50 Preferiblemente, se usa un medicamento según la presente invención para el tratamiento o la prevención de cánceres relacionados con virus (tal como cánceres de cuello uterino por ejemplo). Preferiblemente, se usa un medicamento según la presente invención para el tratamiento o la prevención de estrés o infección posoperatorios.

55 En un aspecto adicional de la presente invención, una composición farmacéutica o una composición inmunomoduladora para su uso en la presente invención puede comprender bacterias de más de uno de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*. De manera adecuada, la composición puede comprender dos o más, o tres o más, bacterias de uno cualquiera de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*.

60 Preferiblemente, las bacterias para su uso según la presente invención son de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* incluyendo cualquier especie de cualquiera de estos géneros tales como *Gordonia bronchialis*, *G. amarae*, *G. sputti*, *G. terrae*, *Dietzia maris*, *Tsukamurella paurometabola*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodnii*, *R. copropholis* y *Tsukamurella inchonensis* por ejemplo. De manera adecuada, las especies usadas de cada género particular son unas que pueden hacerse crecer sobre un medio que es un medio poco, preferiblemente nada, antigénico. A modo de ejemplo únicamente, un medio no antigénico adecuado es medio de Sauton.

65



Más preferiblemente, las bacterias para su uso según la presente invención son del género *Rhodococcus*, incluyendo *Rhodococcus ruber* (anteriormente conocido como *Nocardia rubra*), *Rhodococcus rhodocrous*, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodococcus coprophilus*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus erythopolis*.

5 Más preferiblemente, la bacteria para su uso según la presente invención es *Rhodococcus ruber*.

A modo de ejemplo únicamente, uno o más de los organismos *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodocrous*, *Rhodococcus rhodnii*, *Dietzia maris* y *Gordonia terrae* pueden ser eficaces en el tratamiento y/o la prevención de infecciones parasitarias.

10 A modo de ejemplo únicamente, uno o más de los organismos *Tsukamurella inchonensis* y *Gordonia amarae* pueden ser particularmente eficaces en el tratamiento y/o la prevención de alergias, tales como alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas por ejemplo, y/o el tratamiento y/o la prevención de cánceres, incluyendo neoplasmas de piel tales como sarcoidosis equina.

15 A modo de ejemplo únicamente, *Rhodococcus coprophilus* puede ser particularmente eficaz en la modulación de infecciones, en particular infecciones parasitarias, y/o en potenciar el crecimiento en ganado.

20 Preferiblemente, se inactiva la bacteria según la presente invención antes de su uso. Preferiblemente, se inactiva la bacteria según la presente invención mediante tratamiento térmico de la misma, por ejemplo, tratamiento térmico en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Otros tratamientos adecuados para inactivar la bacteria pueden incluir radiación ultravioleta o ionizante o tratamiento con productos químicos tales como fenol, alcohol o formalina.

25 Preferiblemente, se purifica y/o se aísla la bacteria según la presente invención.

Preferiblemente, se suspende la bacteria según la presente invención en agua o solución salina tamponada, de manera adecuada borato tamponado a pH 8.

30 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, significa un animal. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, incluyendo por ejemplo ganado y seres humanos. En algunos aspectos de la presente invención, el sujeto puede ser de manera adecuada un ser humano.

El término "inmunomodulador" tal como se usa en el presente documento incluye una vacuna.

### 35 USOS TERAPÉUTICOS

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

40 Pueden usarse composiciones inmunomoduladoras/farmacéuticas que pueden modular, en particular bloquear, la proliferación y/o diferenciación y/o actividad de células T contra cualquier trastorno que sea sensible a la prevención o al tratamiento mediante la modulación de una respuesta inmunitaria adaptativa, es decir una respuesta inmunitaria celular.

45 De manera adecuada, las composiciones según la presente invención se usan para modular una respuesta inmunitaria celular para tratar o prevenir una o más de una enfermedad infecciosa (tal como una infección bacteriana por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina, tuberculosis, incluyendo tuberculosis resistente a múltiples fármacos y lepra; infecciones virales crónicas, por ejemplo hepatitis, VIH e infecciones provocadas por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino; infecciones virales latentes, tales como herpes (*Herpes zoster*) o herpes febril (*Herpes simplex*) por ejemplo; o infecciones parasitarias, por ejemplo malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis), una alergia, tal como dermatitis alérgica o asma alérgica, estrés (tal como estrés por traumatismo mayor, estrés psicosocial y estrés crónico) y cáncer (por ejemplo, puede administrarse la composición de manera regular a lo largo de toda la vida adulta para contrarrestar los efectos del tabaco).

50 Se facilita una lista más exhaustiva en el documento WO-A-98/09985. Por facilidad de referencia, ahora se proporciona parte de esa lista: inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, inflamación asociada con formación de úlceras aftosas, colitis ulcerosa, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, dermatitis, en particular dermatitis atópica por ejemplo eccema, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo leucemia, otros cánceres.

### 60 Enfermedades infecciosas

65 Pueden usarse generalmente composiciones que pueden modular, en particular estimular (es decir inducir o

potenciar) la proliferación y/o diferenciación de células T o prevenir la inducción de, o invertir, la anergia de células T, para reforzar o inducir respuestas inmunitarias de células T. Prácticamente todas las respuestas inmunitarias adaptativas requieren la activación de células T y su diferenciación para dar células productoras de citocina. Por tanto, estas composiciones pueden usarse generalmente para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas (tales como virales o bacterianas). De manera adecuada, estas composiciones pueden usarse para prevenir y tratar infecciones parasitarias, por ejemplo malaria, leishmaniasis, toxoplasmosis y tripanosomiasis. De manera adecuada, estas composiciones pueden usarse para prevenir o tratar infecciones virales, por ejemplo infecciones provocadas por papilomavirus, incluyendo sarcoidosis equina, verrugas genitales y displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino.

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

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

#### Sarcoidosis equina

Las composiciones de la presente invención también pueden usarse para prevenir y tratar la sarcoidosis equina.

La sarcoidosis equina es el neoplasma de piel más común de caballos y está asociada con la infección por papilomavirus bovino 1 y 2 (Chambers *et al* J. Gen. Virol. 2003: 84: 1055-1062). Actualmente este estado no tiene un tratamiento eficaz, aunque la cirugía, el tratamiento inmunitario no específico y los fármacos citotóxicos pueden tener todos ellos algún efecto.

Las composiciones de la presente invención se administran preferiblemente en la misma zona de drenaje de ganglio linfático que una lesión o neoplasma.

#### Alergia

Las composiciones de la presente invención también pueden usarse para prevenir y tratar alergias (por ejemplo, asma incluyendo asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos)).

La picazón dulce es una de las enfermedades más comunes observadas en caballos, particularmente en caballos salvajes y/o ponis. Aproximadamente el 3% de los caballos en el R.U. están afectados en cierta medida. La mayoría de los caballos muestran signos entre 1 y 4 años de edad y generalmente el estado empeora durante el verano. Determinadas razas son particularmente propensas a la enfermedad. Se ha sugerido que los ponis Shire, Hackney y galeses e islandeses son todas razas propensas. La picazón dulce está provocada por la hipersensibilidad a las picaduras de la mosca *Culicoides*. En el R.U., la mosca está presente desde abril hasta octubre, pero los números alcanzan máximos de mayo a septiembre. Las moscas se alimentan del caballo en sitios específicos habitualmente alrededor de la cabeza y de la cola y bajo la crin. Hay 20 especies de *Culicoides* presentes en el R.U. y algunas se alimentan bajo el abdomen de los caballos.

A modo de ejemplo únicamente, las composiciones de la presente invención también pueden usarse para prevenir y/o tratar choque anafiláctico administrando a un sujeto, sujeto que tiene una predisposición a padecer choque anafiláctico (por ejemplo un sujeto que se sabe que tiene una alergia, tal como una alergia a cacahuets por ejemplo) una composición según la presente invención, para reducir así la predisposición del sujeto a choque anafiláctico si entrara (accidentalmente) en contacto con el antígeno, por ejemplo cacahuets por ejemplo, hacia el cual puede reaccionar adversamente.

#### Arcadas/EPOC

Las composiciones de la presente invención también pueden utilizarse para prevenir y tratar arcadas y/o EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

Las arcadas son una enfermedad pulmonar equina con similitudes al asma humana y EPOC. Los signos clínicos en el caballo se inician por una respuesta alérgica a las partículas en el polvo de heno en pulmones ya dañados con un grado de fibrosis. Se observa con la mayor frecuencia en caballos más mayores (de más de seis años de edad) que permanecen en establos durante los meses de invierno. El heno contiene microorganismos (tales como bacterias y hongos) así como partículas diminutas de granos de alimentos, plantas, heces, caspa y polen. Estas partículas diminutas se convierten en aerosol en el polvo de heno y provocan una respuesta alérgica y fibrosis cuando las inhalan caballos con arcadas. Los microorganismos principales que se cree que están implicados en la etiología de las arcadas son *Aspergillus fumigatus*, *Thermoactinomyces vulgaris* y *Faenia rectivirgula*. La reducción tanto de los

broncoespasmos del asma como de la fibrosis de EPOC están dentro del alcance de la patente.

Estrés

5 Estrés se presenta con frecuencia como síntoma de la vida moderna, el estilo de vida ejecutivo con alta presión, cuyas consecuencias se perciben ampliamente como que conducen a estados patológicos principales tales como úlceras gástricas, hipertensión, cardiopatía y accidentes cerebrovasculares. Se considera que otros acontecimientos estresantes mayores en la vida tales como divorcio, luto y mudanza son factores de alto riesgo de cardiopatía.

10 Éstas no son ideas equivocadas, la industria de la ganadería es muy consciente de las pérdidas económicas que resultan de someter al ganado a estreses mayores tales como aglomeración, confinamiento y transporte que conducen a un aumento de la sensibilidad a la infección y a la precipitación de la patología subyacente. La investigación de médicos y científicos está produciendo un volumen creciente de trabajos publicados que muestran que estreses definibles tales como confinamiento pueden dar como resultado cambios significativos en la actividad endocrina (hormonal) que pueden afectar posteriormente a las funciones inmunitarias del organismo. Esto puede demostrarse notablemente en el estrés por traumatismo mayor (incluyendo estrés quirúrgico) en el que la respuesta inmunitaria mediada por células se paraliza drásticamente Faist (1996).

20 Elenkov IJ (1999) notifica pruebas recientes que indican que los glucocorticoides y las catecolaminas, los productos finales del sistema de estrés, y la histamina, un producto de mastocitos activados, podrían suprimir selectivamente la inmunidad celular y favorecer las respuestas inmunitarias humorales. Esto está mediado por un efecto diferencial de hormonas de estrés e histamina sobre patrones Th1/Th2 y la producción de citocinas tipo 1/tipo 2. Por tanto, sistémicamente, el estrés puede inducir un desplazamiento a Th2, mientras que, localmente, en determinadas condiciones, puede inducir actividades proinflamatorias mediante activación neural del eje factor liberador de corticotropina periférica – mastocitos – histamina.

30 Paik (2000) y Kay (2001), en estudios independientes sobre el estrés académico, examinaron los perfiles inmunológicos de estudiantes durante periodos sin exámenes y con exámenes. Notificaron una reducción significativa en la producción de IL-2 e interferón gamma y un aumento en IL-6. Esto indica que el sistema inmunitario del organismo responde a episodios estresantes mediante una regulación por disminución de las citocinas Th-1 y una regulación por incremento selectiva de las citocinas Th2.

35 Iwakabe (1998), usando un modelo de ratón de estrés por inmovilización, notifica la desviación de la respuesta inmunitaria hacia la inmunidad dominante Th2.

40 Este cambio inducido por hormona de estrés hacia un desequilibrio inmunitario Th2 también se notifica en situaciones de estrés crónico, no mayor, tales como estrés psicosocial entre trabajadores que pasaban el invierno en estaciones de la expedición de investigación antártica nacional australiana, (Mehta (2000)). También notifican un aumento asociado en las reactivaciones de virus latentes.

Se notifican cambios inmunológicos y de hormona de estrés similares a partir de estrés crónico en cuidadores de pacientes con demencia (Bauer (2000)) y en astronautas durante la misión de Euromir 95 (Norbiato (1998)). Resulta de interés particular que los astronautas aumentaron su sensibilidad a la infección.

45 El organismo está diseñado para recuperarse del estrés y en estrés agudo lo hace claramente ya que el riesgo de infección disminuye con la recuperación del paciente del traumatismo mayor.

50 Sin embargo, el estrés crónico parece mantener el desequilibrio inmunitario dominado por Th2. Esto es una consecuencia muy grave ya que todos los autores mencionados se refieren al estrés a través de los mecanismos anteriores, que influyen posiblemente en la aparición y/o el transcurso de enfermedades infecciosas, inflamatorias, alérgicas y neoplásicas.

Esta consecuencia se respalda además por Lawrence (2000).

55 Un inmunorregulador, preferiblemente un inmunorregulador administrado por vía oral, según la presente invención, que estimula la respuesta Th1 y regula por disminución Th2 puede restaurar el equilibrio sano del sistema inmunitario y por tanto reducir el riesgo aumentado de enfermedad grave asociado con el estrés crónico.

Preferiblemente, la composición según la presente invención se usa para tratar y/o prevenir el estrés posoperatorio.

60 Desequilibrio del sistema inmunitario

65 Un desequilibrio del sistema inmunitario (tal como una regulación por incremento, regulación por disminución o respuesta inmunitaria celular regulada de manera inapropiada) puede producirse en cualquier momento en la vida de un sujeto. De manera adecuada, las composiciones pueden usarse para modular un desequilibrio del sistema inmunitario. Es decir, las composiciones según la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir un

desequilibrio del sistema inmunitario.

(a) En niños

- 5 De manera adecuada, la composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica puede usarse para modular un desequilibrio del sistema inmunitario, en niños, incluyendo bebés, lactantes y niños pequeños. Un desequilibrio del sistema inmunitario (tal como una regulación por incremento, regulación por disminución o respuesta inmunitaria celular regulada de manera inapropiada) puede producirse en niños tras una vacunación, por ejemplo tras vacunaciones infantiles. Tal desequilibrio del sistema inmunitario puede dar como resultado estados  
10 tales como la aparición de alergias, es decir dermatitis alérgica y asma alérgica.

Con el objetivo de proteger a los niños frente a infecciones, se administran inyecciones repetidas contra la difteria, el tétanos, la tos ferina, la polio, el sarampión, las paperas y la rubeola. Se considera que todas éstas son necesarias y las autoridades sanitarias ejercen presión para garantizar que se presenten los niños para la vacunación en el  
15 momento apropiado. Sin embargo, la mayoría de las vacunaciones administradas al inicio de la vida contienen un adyuvante de alumbre que tiene importantes consecuencias inmunológicas. El alumbre es un potente estímulo para el patrón Th2 de respuesta y la desregulación inmunitaria consiguiente provoca que el niño se vuelva vulnerable al desarrollo de alergias y posiblemente cáncer por ejemplo.

- 20 Es posible reeducar al sistema inmunitario a reconocer, regular y responder apropiadamente tanto a sí mismo como al resto del mundo.

(b) Desequilibrio del sistema inmunitario en ancianos

- 25 Un desequilibrio del sistema inmunitario (tal como una regulación por incremento, regulación por disminución o respuesta inmunitaria celular regulada de manera inapropiada, en particular regulación por disminución, por ejemplo un deterioro de la función inmunitaria) puede producirse en personas ancianas, generalmente de más de 60 años de edad. En personas ancianas, una regulación por disminución en la respuesta inmunitaria celular se denomina generalmente inmunosenescencia. Normalmente, el deterioro de la función inmunitaria puede conducir a un  
30 aumento de la sensibilidad a enfermedades infecciosas y neoplasia por ejemplo. El número de personas ancianas como proporción de la población está aumentando drásticamente y la medicina geriátrica está convirtiéndose en un aspecto importante de la práctica clínica. Por tanto, no es sorprendente que la investigación se haya centrado en los mecanismos de la inmunosenescencia y los vínculos entre la salud del sistema inmunitario y la longevidad. Goronzy (2001) examinó la eficacia variable de la vacunación de la gripe en ancianos. En este estudio, sólo el 17% de los sujetos mostraron un aumento del título frente a las 3 hemaglutininas (vacunación satisfactoria) 1 mes tras la  
35 vacunación y el 46% no mostraron una respuesta demostrable en absoluto. Se propuso que la capacidad de respuesta a la vacunación de la gripe es un marcador biológico útil de la inmunosenescencia. Varios investigadores han estudiado diversos aspectos de la función inmunitaria en ancianos. Por ejemplo, Lio (2000) estudió respuestas de citocina, Solana (2000) estudió células NK y NKt, y Ginaldi (1999) sugirió que un cambio en la producción de  
40 citocinas Th1 a Th2 y un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias podían explicar muchos aspectos de los acontecimientos patológicos asociados con la edad, tales como aterosclerosis y osteoporosis. Por consiguiente, se requiere una estimulación no patológica del sistema inmunitario que aleje la respuesta de citocinas de la Th2 proinflamatoria hacia la Th1. Preferiblemente, tal inmunomodulador reduce la mortalidad debida a infección aguda, contrarresta la aparición y reduce la morbilidad de la enfermedad autoinmunitaria relacionada con la edad y posiblemente reduce la tasa de enfermedad neoplásica, todo lo cual está asociado con la  
45 inmunosenescencia.

Normalmente, una composición inmunomoduladora o una composición farmacéutica según este aspecto puede ser un potenciador inmunitario.

- 50 En esta área se ha investigado el posible papel de bacterias lácticas o comensales del intestino probióticas. Por ejemplo, se ha notificado que los productos lácteos complementados con  $5 \times 10^9$  ó  $5 \times 10^{10}$  *Bifidobacterium lactis* o *Lactobacillus rhamnosus* por dosis tomados diariamente durante 3 semanas aumentan los números de células NK, CD4 y CD25 en la sangre periférica y refuerzan de manera general la inmunidad celular sistémica en ancianos (Gill, (2001)). Actualmente están promocionándose activamente varios productos que contienen altos números de lactobacilos y otra flora comensal intestinal como "productos que mejoran el estilo de vida". Una revisión de Sanders (2001) sobre los afirmados efectos probióticos de *Lactobacillus acidophilus*, disponible como fármaco desde 1950, sugiere que sus efectos requieren una validación y aclaración adicional del mecanismo de acción. Aunque hay un efecto beneficioso en reponer la flora intestinal tras una enfermedad diarreica y en combatir la candidiasis tras la  
55 terapia con antibióticos, la estimulación inmunitaria parece poco fiable y de corta duración. Sin embargo, este trabajo identifica claramente un papel para un potente inmunomodulador administrado por vía oral, preferiblemente inactivado para evitar las dificultades de mantener productos vivos.

- 60 La vacunación oral es un mecanismo satisfactorio establecido desde hace mucho para inducir inmunidad protectora local contra patógenos orales/fecales (tales como la polio). Sin embargo, también se ha mostrado que las vacunas administradas por vía oral provocan respuestas inmunitarias protectoras sistémicas tanto mediadas por células como

humorales. Sharpe (2002) usó un constructo de adenovirus administrado por vía oral que contenía antígeno del virus del sarampión para inducir respuestas sistémicas de anticuerpos y linfocitos esplénicos al antígeno del sarampión. Manube (2002) ha desarrollado un modelo para mostrar que *Mycobacterium microti* atenuado administrado por vía oral proporciona un nivel superior de protección frente a una exposición en aerosol a tuberculosis que BCG administrado por vía subcutánea tradicional.

Kim (2001) mostró que la alimentación con polen de cedro japonés produjo tolerancia oral frente a alergia específica inducida mediante una inyección posterior de polen en aceite. Esto se asoció con niveles de inmunoglobulina específicos disminuidos y una reducción significativa en la producción de interleucina 4, es decir, se reguló por disminución la respuesta TH2.

Por tanto, una respuesta inmunitaria sistémica puede tanto estimularse como modularse mediante administración (tal como administración oral) de un inmunomodulador adecuado. De manera adecuada, en un aspecto se considera que puede incluirse una célula completa de la bacteria en preparados alimenticios y/o puede suministrarse como un tipo de "remedio", preferiblemente por vía oral.

#### Potenciación del sistema inmunitario

Las composiciones de la presente invención pueden usarse en la fabricación de un medicamento para potenciar el sistema inmunitario en un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente ganado, lo que puede dar como resultado, por ejemplo, la potenciación (por ejemplo promoción) del crecimiento y/o un aumento en la eficacia de la utilización de alimentos y/o un bienestar generalmente aumentado (es decir se mejora la salud general del sujeto) en el sujeto. La salud general de un sujeto puede determinarse mediante uno o más de los siguientes parámetros, por ejemplo: datos de peso (siendo el aumento de peso un factor determinante positivo), estado de alerta (siendo un estado de alerta completo un factor determinante positivo), movimiento (siendo el movimiento energético, opuesto a un movimiento letárgico, un factor determinante positivo) y malestar (siendo una cantidad reducida de malestar un factor determinante positivo). Normalmente, la composición inmunomoduladora o la composición farmacéutica según este aspecto de la presente invención puede ser un potenciador inmunitario.

Ventajosamente, la composición inmunomoduladora o la composición farmacéutica enseñada en el presente documento puede usarse para sustituir antibióticos que se usan actualmente para promover el crecimiento de ganado.

El término "ganado", tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, ganado es uno o más de aves de corral (incluyendo pollos), cerdos (incluyendo lechones), ovejas (incluyendo corderos), vacas o toros (incluyendo terneros). Más preferiblemente, ganado significa cerdos (incluyendo lechones).

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

Comercialmente en la actualidad se usan comúnmente antibióticos como aditivos de alimentación de potenciación dietéticos (o promotores del crecimiento) y se incorporan en piensos. Sin embargo, se espera que la UE introduzca una prohibición completa del uso no clínico de antibióticos en la cría de animales. Por tanto, el mercado requiere alternativas eficaces.

Una ventaja de la presente invención es que puede usarse (opcionalmente junto con prácticas correctas de cría de animales) como sustituto para aditivos de alimentación de potenciación dietéticos (o promotores del crecimiento).

Las composiciones inmunomoduladoras o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse como aditivo alimenticio cuando se usan para potenciar el sistema inmunitario.

#### Cáncer

De manera adecuada, las composiciones según la presente invención se usan para modular una respuesta inmunitaria celular para tratar y/o prevenir el cáncer relacionado con virus. En particular se considera que las composiciones según la presente invención pueden usarse para proteger a un sujeto contra el desarrollo y/o la progresión de un cáncer. En particular, el sujeto con una respuesta inmunitaria celular modulada puede ser menos propenso al desarrollo de cáncer.

En particular, durante el crecimiento del cáncer se observa un aumento no regulado de Th2.

El cáncer es una enfermedad que afecta a muchas personas, produciéndose el 65 por ciento de los casos en las personas de más de 65 años de edad. Dado que la esperanza de vida promedio en el R.U. casi se ha doblado desde mediados del siglo XIX, la población en riesgo de cáncer ha crecido. Las tasas de mortalidad por otras causas de fallecimiento, tales como cardiopatía, han disminuido en los últimos años mientras que los fallecimientos por

cáncer han permanecido relativamente estables. El resultado es que a 1 de cada 3 personas se les diagnosticará cáncer durante su vida y 1 de cada 4 personas morirá de cáncer. Los ejemplos de cáncer incluyen de vejiga, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon y rectal, adenocarcinoma, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, mieloma, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de tejido blando y de estómago.

Además, se ha asociado el fumar tabaco de manera persistente, y en menor medida, el tabaquismo pasivo, con carcinomas de las partes directamente en contacto con el humo, orofaringe, tráquea, pulmones, esófago y estómago. Al igual que éstos, los tumores distantes tales como los de riñón, vejiga, páncreas, hígado y leucemia mieloide pueden aumentar por fumar tabaco. En la presente invención, se considera que las composiciones según la presente invención pueden administrarse a fumadores de tabaco en un intento por reducir el riesgo del fumador de desarrollar carcinomas asociados con fumar tabaco.

De manera adecuada, el cáncer puede ser cánceres relacionados con virus tales como cáncer de cuello uterino por ejemplo. Sin desear limitarse a la teoría, en algunos casos se ha encontrado que una infección producida por papilomavirus, tal como displasia del cuello uterino, precede al carcinoma del cuello uterino. Por tanto, en el presente documento el cáncer de cuello uterino se considera un "cáncer relacionado con virus". Sin embargo, el término "cáncer relacionado con virus" tal como se usa en el presente documento significa cualquier cáncer que puede producirse por, o que está relacionado con, una infección viral.

#### Recuperación, estrés e infección posoperatorios

Tras cualquier operación mayor surgen posiblemente varias situaciones:

Los estreses asociados con la operación quirúrgica incluyen uno o más de los siguientes: aprehensión antes de la operación, estrés en los tejidos debido a los procedimientos de la operación, el dolor que acompaña habitualmente a una recuperación, preocupación por la importancia de los hallazgos de la operación.

Estas clases de estrés están asociadas con la desviación de la función de células T hacia Th2. Los efectos inmunosupresores de la medicación previa y los anestésicos pueden persistir durante días o semanas tras la propia operación.

Además, la exposición de la carne cortada a una infección directa en el momento de la operación y de la herida a una infección en unidades y salas de recuperación antes de salir del hospital también es un problema.

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

Dado que el paciente está hospitalizado, incluyen infecciones notorias asociadas con el hospital tales como por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Las operaciones en el intestino exponen al paciente a infecciones por bacterias gram-negativas debido a la exposición de tejidos cortados al contenido del intestino. Las operaciones en las extremidades inferiores también están sujetas a infecciones por miembros normales de la flora intestinal.

Infecciones menores de la herida retrasan la cicatrización y aumentan las posibilidades de contraer infecciones más graves.

Para contrarrestar estas influencias, la regulación inmunitaria hacia Th1 y una regulación por disminución de Th2, un resultado de la aplicación de la invención, producirán uno o más de los siguientes: aumento de la resistencia no específica a infecciones bacterianas posoperatorias; ayuda en la cicatrización de heridas y/o reducción del estrés.

#### CÉLULAS T COOPERADORAS

El término "Th1" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula T cooperadora tipo 1 (Th1). El término también puede usarse en el presente documento para referirse a la respuesta mediada por, o a través de, tal tipo de célula. Tal respuesta puede incluir uno o más de la secreción de interleucina 2 (IL-2), la secreción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), activación de macrófagos, activación de células T citotóxicas o cualquier otro acontecimiento asociado con Th1. Por tanto, el término "Th1" puede incluir célula(s) Th1 así como la(s) respuesta(s) inmunitaria(s) que produce(n) tal(es) célula(s).

El término "Th2" tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula T cooperadora tipo 2 (Th2). El término también puede usarse en el presente documento para referirse a la respuesta mediada por, o a través de, tal tipo de célula. Tal respuesta puede incluir uno o más de la secreción de interleucina 4 (IL-4), la secreción de la interleucina variante de corte y empalme IL-4 $\delta$ 2, la secreción de interleucina 5 (IL-5), aumento de los niveles de determinante celular 30 (CD30) en linfocitos, aumento de los niveles de inmunoglobulina E (IgE) en la sangre o eosinófilos en la sangre o cualquier otro acontecimiento asociado con Th2. Por tanto, el término "Th2" puede incluir

la(s) célula(s) Th2 así como la(s) respuesta(s) inmunitaria(s) que produce(n) tal(es) célula(s).

Se sabe que diversas condiciones pueden dar como resultado, o resultar de, una respuesta inmunitaria celular no regulada o regulada de manera inapropiada, en particular la activación y/o proliferación de Th1 y/o Th2, que se ha encontrado que si se deja sin regular o se regula de manera inapropiada da como resultado uno o más efectos perjudiciales en el sujeto.

En particular, se ha encontrado que tal respuesta inmunitaria celular no regulada o regulada de manera inapropiada se produce tras la vacunación, por ejemplo, tras vacunaciones infantiles, y se piensa que da como resultado estados tales como la aparición de alergias, es decir dermatitis alérgica y asma alérgica. A modo de ejemplo, Lewis D Curr Opin Immunol 2002; 14: 644 notifica que las respuestas inmunitarias Th2 mediadas por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 son claves en la patogénesis de trastornos atópicos, incluyendo asma inducida por alérgenos, rinoconjuntivitis y anafilaxia. Aunque tales respuestas se regulan por disminución en cierto grado mediante inmunoterapia específica convencional, este enfoque sólo es parcialmente eficaz y tiene un riesgo sustancial de efectos adversos. Se han diseñado muchas estrategias para la profilaxis inmunoterápica y para el tratamiento de enfermedades atópicas basándose en modelos de alergia de ratón, incluyendo la regulación por disminución de respuestas Th2 mediante la inducción de la actividad de células T reguladoras, desviación inmunitaria de Th2 a Th1, regulación cruzada a Th1 de respuestas inmunitarias Th2, anergia y citocinas inmunosupresoras. Choi & Koh Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 88: 584-91 examinaron si la vacunación de BCG de pacientes adultos con asma, una enfermedad alérgica asociada con Th2, es clínicamente eficaz. Se mostró que la vacunación de BCG mejoró la función pulmonar y redujo el uso de medicación en adultos con asma de moderada a intensa. Esta mejora estuvo acompañada por una respuesta inmunitaria de tipo Th2 suprimida, lo que sugiere que la vacunación de BCG puede ser una modalidad terapéutica eficaz contra el asma. von Hertzen J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 923-8 destacó la posibilidad de que el estrés materno prolongado asociado con una secreción de cortisol excesiva sostenida podía afectar al sistema inmunitario en desarrollo (especialmente la diferenciación de células Th1/Th2) que puede aumentar adicionalmente la propensión al asma y atopía en individuos genéticamente predispuestos.

Además, se ha observado una respuesta inmunitaria celular no regulada o regulada de manera inapropiada durante la progresión de la enfermedad. En particular durante el crecimiento del cáncer se observa un aumento no regulado de Th2. A modo de ejemplo, Maraveyas *et al.* Ann Oncol 1999; 10: 817-24 han estudiado la eficacia de la vacuna de SRL 172 en pacientes con cáncer, es decir, melanoma maligno en estadio IV avanzado (AJCC). Se sometió a ensayo la inducción de citocinas intracelulares (IL-2 e INF-gamma) en linfocitos de sangre periférica (LSP) de estos pacientes y se correlacionó con el desenlace clínico. Se demostró que SRL 172 era eficaz en inducir respuestas de IL-2 intracelulares en un número significativo de pacientes con melanoma en estadio IV (AJCC). Stanford *et al.* International Journal of Pharmaceutical Medicine 1999; 13: 191-195 notifican que hay cada vez más pruebas de que es probable que respuestas inmunitarias antitumorales eficaces estén mediadas por citocinas de tipo 1. Recientes investigaciones indican que *Mycobacterium vaccae* inactivado por calor es un adyuvante de Th1 fiable y ensayos clínicos preliminares indican efectos beneficiosos en melanoma y en cáncer de próstata y de pulmón. Actualmente están realizándose estudios controlados más exhaustivos para confirmar estos hallazgos.

También se ha observado una respuesta inmunitaria celular no regulada o regulada de manera inapropiada durante la infección y particularmente infección crónica, por ejemplo durante tuberculosis progresiva, lepra lepromatosa, leishmaniasis visceral e infección por VIH y durante alergias. A modo de ejemplo, Clerici & Shearer GM Immunol Today 1993; 14: 107-11 proponen que un cambio de Th1 a Th2 es una etapa crítica en la etiología de la infección por VIH. Clerici & Shearer Immunol Lett 1996; 51: 69-73 muestran que la inmunidad mediada por células específicas para VIH puede ser el principal factor de correlación de la protección contra infección por VIH y contra la progresión de la infección por VIH al SIDA. Abbot NC *et al.* European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2002 24:202-8 evaluaron la inmunoterapia como medio para mejorar el flujo sanguíneo periférico en pacientes con lepra crónica mediante administración de *Mycobacterium vaccae* inactivado por calor. Se mostró que la inmunoterapia, administrada 18 meses antes, mejoraba significativamente el flujo sanguíneo y la sensación de temperatura en pacientes con lepra crónica, totalmente tratados.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es promover y establecer la regulación de una respuesta inmunitaria celular, incluyendo la regulación o modulación de Th1 y/o Th2, de tal manera que se superen los efectos negativos de la respuesta inmunitaria celular no regulada o regulada de manera inapropiada.

De manera adecuada, el uso de una composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención modula la respuesta Th1 o Th2, es decir un respuesta Th1 o Th2 que da como resultado, por ejemplo, daño tisular.

De manera adecuada, el uso de una composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención puede disminuir la respuesta Th1 y disminuir la respuesta Th2. A modo de ejemplo, tal composición inmunomoduladora y/o farmacéutica puede ser útil en el tratamiento de la diabetes por ejemplo.

De manera adecuada, el uso de una composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención puede aumentar la respuesta Th1 sin afectar a la respuesta Th2. A modo de ejemplo, tal

composición inmunomoduladora y/o farmacéutica puede ser útil como potenciador inmunitario.

5 De manera adecuada, el uso de una composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención puede aumentar la respuesta Th1 y disminuir la respuesta Th2. A modo de ejemplo, tal composición inmunomoduladora y/o farmacéutica puede ser útil en el tratamiento del asma.

De manera adecuada, un experto puede someter a prueba una especie específica de cada género según la presente invención para determinar su respuesta Th1/Th2 específica.

10 Una respuesta inmunitaria no regulada o regulada de manera inapropiada puede desempeñar un papel en el establecimiento de la enfermedad debido al hecho de que algunas enfermedades provocan respuestas Th1 y/o Th2 desplazadas. Junto con estas reacciones Th1 y Th2 atípicas hay una serie de respuestas inflamatorias anómalas, que pueden participar en los mecanismos subyacentes a la patología tisular.

15 A modo de ejemplo únicamente, la composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención pueden contrarrestar las desventajas del contacto reducido con influencias del entorno (por ejemplo, antígenos) acordes con la vida moderna, pueden contrarrestar la influencia del tratamiento de una infección (por ejemplo, una infección parasitaria, tal como, por ejemplo, malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y toxoplasmosis) y/o las anomalías inmunológicas que acompañan a una infección, estrés, tales como, por ejemplo, estrés por traumatismo mayor, estrés psicosocial y estrés crónico, una alergia (por ejemplo, asma incluyendo asma, asma alérgica, fiebre del heno, dermatitis alérgica (eccema), choque anafiláctico, alergias por contacto o ingestión de plantas, picaduras, tales como picaduras de insectos y ortigas, y alergias a picaduras de insectos, tales como mosquillas por ejemplo *Culicoides* (que produce picazón dulce en caballos), arcadas, EPOC y cáncer (por ejemplo melanoma o adenocarcinoma); un desequilibrio del sistema inmunitario (por ejemplo, un desequilibrio del sistema

20 inmunitario en niños por ejemplo, el efecto no deseado de vacunas infantiles y en ancianos); y estrés posoperatorio e infección posoperatoria.

25

#### VACUNAS

30 Un experto en la técnica conoce la preparación de vacunas que contienen una o más sustancias como principio(s) activo(s). Normalmente, tales vacunas se preparan como productos inyectables, o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución, o suspensión, en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse, o encapsularse el/los principio(s) activo(s) en liposomas. Con frecuencia se mezclan los principios activos con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Alternativamente, la vacuna puede prepararse, por ejemplo, para ingerirse por vía oral y/o que pueda inhalarse.

35

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

#### ADMINISTRACIÓN

45 Normalmente, un médico determinará la dosificación real de una vacuna, composición inmunomoduladora y composición farmacéutica que serán más adecuadas para un sujeto individual y variarán con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las siguientes dosificaciones son a modo de ejemplo del caso promedio. Evidentemente, puede haber casos individuales en los que se justifiquen intervalos de dosificación superiores o inferiores.

50 Preferiblemente, la dosificación real que se usa da como resultado una toxicidad mínima para el sujeto.

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

55

De manera adecuada, la composición según la presente invención puede administrarse a una dosis de  $10^3$  -  $10^{11}$  organismos, preferiblemente  $10^4$  -  $10^{10}$  organismos, más preferiblemente  $10^6$  -  $10^9$  organismos e incluso más preferiblemente  $10^6$  -  $10^9$  organismos. Normalmente, la composición según la presente invención puede administrarse a una dosis de  $10^8$  -  $10^9$  bacterias para su uso en seres humanos y animales.

60

Si las composiciones de la presente invención tienen que administrarse como potenciadores inmunitarios, entonces pueden administrarse a intervalos regulares  $10^3$  -  $10^{11}$  organismos por dosis, preferiblemente  $10^4$  -  $10^{10}$  organismos por dosis, más preferiblemente  $10^6$  -  $10^9$  organismos por dosis e incluso más preferiblemente  $10^6$  -  $10^9$  organismos por dosis e incluso más preferiblemente  $10^8$  -  $10^9$  bacterias por dosis para su uso en seres humanos y animales.

65



Tal como apreciará fácilmente un experto en la técnica la dosificación administrada dependerá del organismo al que esté administrándose la dosis.

5 El término “administrar” incluye suministrar mediante mecanismos de suministro incluyendo inyección, transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, Lipofectin, anfífilos faciales catiónicas (CFA) y combinaciones de los mismos, o incluso suministro viral. Las vías para tales mecanismos de suministro incluyen, pero no se limitan a, vías mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

10 El término “administrar” incluye, pero no se limita a, suministrar por una vía mucosa, por ejemplo, como pulverización nasal o aerosol para inhalación o como disolución que puede ingerirse; una vía parenteral en la que el suministro se realiza mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea.

15 El término “coadministrar” significa que el sitio y el momento de la administración de cada uno del/de los adyuvantes(s), antígeno(s) y/o determinante(s) antigénico(s) de la presente invención son tales que se logra la modulación necesaria del sistema inmunitario. Por tanto, aunque el/los antígeno(s) y adyuvante(s) puede(n) administrarse en el mismo momento en el tiempo y en el mismo sitio, puede ser ventajoso administrar el/los antígeno(s) y/o determinante(s) antigénico(s) en un momento diferente y en un sitio diferente del/de los adyuvante(s). El/los antígeno(s) y/o determinante(s) antigénico(s) y adyuvante(s) puede(n) incluso suministrarse en el mismo vehículo de suministro, y el/los antígeno(s) y/o determinante(s) antigénico(s) y adyuvante(s) puede(n) estar acoplado(s) y/o no acoplado(s) y/o genéticamente acoplado(s) y/o no acoplado(s). A modo de ejemplo únicamente, la composición inmunomoduladora según la presente invención puede administrarse antes, al mismo tiempo o después que la administración de uno o más antígenos o antígenos adicionales.

25 El antígeno, determinante antigénico, péptido u homólogo o agente mimético del mismo pueden administrarse por separado o administrarse conjuntamente al sujeto huésped como una única dosis o en múltiples dosis.

30 La composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica de la invención puede administrarse mediante varias vías diferentes tales como administración por inyección (que incluye inyección parenteral, subcutánea, intradérmica e intramuscular), intranasal, mucosa, oral, intravaginal, uretral u ocular.

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

35 Preferiblemente, en la presente invención, la administración es mediante una composición aceptable por vía oral.

40 Para la vacunación la composición puede proporcionarse en de 0,1 a 0,2 ml de disolución acuosa, preferiblemente solución salina fisiológica tamponada, y administrarse por vía parenteral, por ejemplo mediante inoculación intradérmica. La vacuna según la invención se inyecta preferiblemente por vía intradérmica. Puede encontrarse una ligera hinchazón y enrojecimiento, algunas veces también picor, en el sitio de la inyección. Los expertos en la técnica pueden optimizar el modo de administración, la dosis y el número de administraciones de una manera conocida.

### ANTÍGENOS

45 Tal como se usa en el presente documento, un “antígeno” significa una entidad que, cuando se introduce en un huésped inmunocompetente, modifica la producción de un anticuerpo o anticuerpos específicos que pueden combinarse con la entidad, y/o modifica la respuesta Th relevante, tal como Th2 y/o Th1. El antígeno puede ser una sustancia pura, una mezcla de sustancias o material soluble o particulado (incluyendo células o fragmentos celulares o material sonificado celular). En este sentido, el término incluye cualquier determinante antigénico adecuado, antígeno con acción cruzada, aloantígeno, xenoantígeno, tolerógeno, alérgeno, hapteno e inmunógeno, o partes de los mismos, así como cualquier combinación de los mismos, y estos términos se usan de manera intercambiable a lo largo de todo el texto.

55 El término “determinante antigénico o epítipo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un sitio en un antígeno que se reconoce por un anticuerpo o receptor de células T, o es responsable de provocar la respuesta de células T cooperadoras. Preferiblemente es un péptido corto derivado, o como parte, de un antígeno proteico. Sin embargo también se pretende que el término incluya epítopos de glicopéptidos e hidratos de carbono. El término también incluye hidratos de carbono o secuencias de aminoácidos modificadas que estimulan respuestas que reconocen al organismo completo.

60 Resulta ventajoso si el determinante antigénico es un determinante antigénico del agente infeccioso que provoca la enfermedad infecciosa.

65 Una vacuna “preventiva” o “profiláctica” es una vacuna que se administra a individuos no expuestos anteriormente para prevenir el desarrollo de un estado, tal como mediante estimulación de inmunidad protectora.

Una vacuna "terapéutica" es una vacuna que se administra a individuos con un estado existente para reducir o minimizar el estado o eliminar las consecuencias inmunopatológicas del estado.

#### ADYUVANTES

5 El término "adyuvante" tal como se usa en el presente documento significa una entidad que puede aumentar o participar en influir en una respuesta inmunitaria. Un adyuvante es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que ayuda, aumenta, regula por disminución, modifica o diversifica la respuesta inmunitaria a un antígeno.

10 La composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención puede comprender uno o más adyuvantes que potencian la eficacia de la composición inmunomoduladora y/o composiciones farmacéuticas. Los ejemplos de adyuvantes adicionales que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbono, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, muramil dipéptido, endotoxina bacteriana, 15 lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium vaccae*, polirribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, interleucina tal como interleucina 2 e interleucina 12, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros bloqueados u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes están disponibles comercialmente de diversas fuentes, por ejemplo, adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) o adyuvante completo y adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Sólo el hidróxido de aluminio está aprobado para su uso en seres humanos. 20 Algunos de los otros adyuvantes, tales como *M. vaccae* por ejemplo, se han aprobado para ensayos clínicos.

De manera adecuada, el adyuvante puede ser una célula completa de una bacteria de uno cualquiera de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*.

25 En la técnica, se sabe que las vacunas de ADN, que son esencialmente secuencias de ADN unidas a partículas de oro y que se disparan al interior de la piel mediante una pistola de helio, son sistemas de suministro de vacunas eficaces. Al contrario que las vacunas convencionales, estas vacunas de ADN no requieren un componente adyuvante tradicional. Según un aspecto adicional de la presente invención, la composición inmunomoduladora tal como se define en el presente documento puede usarse de manera adecuada junto con tales vacunas de ADN para 30 aumentar o participar en influir en la respuesta inmunitaria.

#### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

35 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* y opcionalmente un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables (incluyendo combinaciones de los mismos).

40 La composición farmacéutica puede comprender dos componentes, un primer componente que comprende un antígeno y un segundo componente que comprende un adyuvante del mismo. Los componentes primero y segundo pueden suministrarse de manera secuencial, de manera simultánea o juntos, e incluso por vías de administración diferentes. De manera adecuada, el antígeno puede incluso generarse dentro de los tejidos del huésped como parte de un proceso patológico. Por tanto, el antígeno puede originarse de una invasión bacteriana, de huésped o 45 parasitaria, o puede ser una sustancia liberada de los tejidos tales como una proteína de estrés o un antígeno tumoral.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para su uso en seres humanos o animales en medicina humana o veterinaria y normalmente comprenderán uno cualquiera o más de un diluyente, portador o excipiente 50 farmacéuticamente aceptables. En la técnica farmacéutica se conocen bien portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y a la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además del) portador, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente de solubilización adecuados. 55

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p- 60 hidroxibenzoico. También pueden usarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Pueden haber diferentes requisitos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para 65 administrarse usando una minibomba o por una vía mucosa, por ejemplo, como pulverización nasal o aerosol para inhalación o disolución que puede ingerirse, o por vía parenteral en la que la composición se formula mediante una forma inyectable, para su suministro, por ejemplo, por una vía intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para administrarse por ambas vías.

Preferiblemente en la presente invención la formulación está en forma inyectable. Más preferiblemente la formulación se inyecta por vía intradérmica.

5 Preferiblemente en la presente invención la formulación es una composición aceptable por vía oral.

Cuando el agente tiene que suministrarse por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debe poder permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

10 Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante inhalación, en forma de un supositorio u óvulo vaginal, por vía tópica en forma de una loción, disolución, crema, pomada o polvo para espolvorear, mediante el uso de un parche cutáneo, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos o bien solos o bien en mezcla con excipientes, o en forma de  
 15 elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos como para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual las composiciones pueden administrarse en forma de  
 20 comprimidos o pastillas para chupar que pueden formularse de una manera convencional.

#### COMBINACIONES FARMACÉUTICAS

25 El agente de la presente invención puede administrarse con una o más de otras sustancias farmacéuticamente activas. A modo de ejemplo, la presente invención cubre los tratamientos simultáneos o secuenciales con una composición inmunomoduladora y/o composición farmacéutica según la presente invención y uno o más esteroides, analgésicos, agentes antivirales, interleucinas tales como IL-2 u otra(s) sustancia(s) farmacéuticamente activa(s).

30 Se entenderá que estos regímenes incluyen la administración de las sustancias de manera secuencial, simultánea o juntas.

#### POTENCIADOR INMUNITARIO

35 El término "potenciador inmunitario" tal como se usa en el presente documento significa una o más bacterias o bien aisladas o bien en cultivo que cuando se administran a un sujeto proporcionan un beneficio para la salud de ese sujeto. Preferiblemente, este beneficio se logra mediante la modificación de la respuesta inmunitaria celular del sujeto.

40 Según la presente invención, pueden usarse potenciadores inmunitarios, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de un desequilibrio del sistema inmunitario en un sujeto, preferiblemente un niño o un sujeto anciano, o para potenciar el sistema inmunitario de un sujeto, por ejemplo de un mamífero, particularmente de ganado o de seres humanos.

45 Los potenciadores inmunitarios pueden administrarse mediante consumo en alimentos especialmente diseñados o en piensos, por ejemplo piensos para cerdos complementados con las bacterias de la presente invención.

Los potenciadores inmunitarios también pueden administrarse por otras vías (tales como inyección directa).

50 Preferiblemente, las bacterias se inactivan para evitar las dificultades de mantener productos vivos.

#### IDENTIFICAR UNA BACTERIA QUE MODULA UNA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR

55 En el presente documento se enseña un método para identificar una o más células completas de bacterias de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella* que modulan (por ejemplo modifican) una respuesta inmunitaria celular que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un primer animal de prueba con un inmunoestimulante; (b) poner en contacto un segundo animal de prueba con un inmunoestimulante mezclado con una bacteria; (c) medir la respuesta inmunitaria celular en cada uno de los animales de prueba; y (d) comparar la respuesta inmunitaria celular en cada uno de los animales de prueba, en la que, una respuesta inmunitaria celular inferior a partir del inmunoestimulante mezclado con una bacteria en comparación con el inmunoestimulante solo es  
 60 indicativo de una modificación de la respuesta inmunitaria celular por la bacteria.

65 En el presente documento se enseña un método de determinar la respuesta Th1/Th2 de una especie de bacterias seleccionadas de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, método que comprende el uso de la prueba cutánea a la tuberculina. En ratones, la prueba cutánea a la tuberculina se lleva a cabo preferiblemente en la almohadilla de la pata. En una reacción Th1 predominante la respuesta inmunitaria positiva en la almohadilla de la pata es máxima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas. Sin embargo, a medida que aumenta la reactividad Th2

entonces aumenta la respuesta inmunitaria positiva en la almohadilla de la pata a las 48 horas y puede incluso superar la respuesta inmunitaria en la almohadilla de la pata a las 24 horas.

5 El efecto de la vacunación de BCG está bien documentado usando esta prueba cutánea a la tuberculina. Por tanto, el ensayo de prueba puede usarse para evaluar si la introducción de una composición inmunomoduladora según la presente invención modula o no la respuesta inmunitaria celular a BCG.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “animal de prueba” se refiere a cualquier animal que obtiene una respuesta inmunitaria celular al inmunoestimulante. Preferiblemente, el/los animal(es) de prueba es/son un mamífero. Más preferiblemente, el/los animal(es) de prueba es/son una rata, hámster, conejo, cobaya o ratón. Más preferiblemente, el/los animal(es) de prueba es/son un ratón.

15 Preferiblemente, la bacteria modifica la respuesta de células T cooperadoras. De manera adecuada, la bacteria puede modificar la respuesta de células T cooperadoras disminuyendo la respuesta Th1 y Th2. De manera adecuada, la bacteria puede modificar la respuesta de células T cooperadoras aumentando la respuesta Th1 y disminuyendo la respuesta Th2. De manera adecuada, la bacteria puede modificar la respuesta de células T cooperadoras aumentando la respuesta Th1 sin afectar a la respuesta Th2.

20 Preferiblemente, el inmunoestimulante tendrá una respuesta Th1 y Th2 conocida. Por ejemplo, con el inmunoestimulante BCG la reacción es habitualmente mayor a las 24 h cuando es un indicador de la respuesta Th1; la reacción a las 48 h es habitualmente menor e incluye una contribución Th2. Se sabe que BCG estimula predominantemente una respuesta Th1. Usando tales inmunoestimulantes puede ser posible determinar la respuesta Th1/Th2 de una bacteria de prueba y, por tanto, puede ser posible identificar una o más bacterias que tienen una respuesta Th1/Th2 deseada para tratar y/o prevenir una enfermedad y/o un trastorno particular.

25 Preferiblemente, la respuesta inmunitaria celular se mide usando la prueba cutánea a la tuberculina. La vacunación con un inmunoestimulante (tal como BCG) induce una respuesta a la prueba cutánea con tuberculina (una preparación soluble de *Tubercle bacilli*), cuando se somete a prueba posteriormente. Se mide la reacción local a diversos intervalos, por ejemplo, 24 horas, 48 horas y 72 horas tras la inyección de tuberculina. En resumen, se usa un inmunoestimulante (por ejemplo, BCG) que induce una respuesta inmunitaria positiva a tuberculina. En el animal de prueba, la prueba cutánea a la tuberculina se lleva a cabo preferiblemente en la almohadilla de la pata. En una reacción Th1 predominante la respuesta inmunitaria positiva en la almohadilla de la pata es habitualmente máxima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas. Sin embargo, a medida que aumenta la reactividad Th2 entonces aumenta la respuesta inmunitaria positiva en la almohadilla de la pata a las 48 horas y puede incluso superar la respuesta inmunitaria en la almohadilla de la pata a las 24 horas. Por tanto, el ensayo puede usarse para evaluar si la introducción de una composición inmunomoduladora según la presente invención modula o no la respuesta inmunitaria celular.

40 Preferiblemente, el inmunoestimulante es BCG.

### Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 es un gráfico que demuestra los resultados de medias de aumento de peso/controles y prueba de hembras de camada a lo largo de 12 semanas desde el destete.

La figura 2 es un gráfico que demuestra los resultados de media de aumento de peso/controles y prueba de machos de camada a lo largo de 12 semanas desde el destete.

50 La figura 3 es un gráfico que demuestra que *Gordonia bronchialis* potencia el efecto TH1 temprano.

La figura 4 es un gráfico que demuestra que *Tsukamurella inchonensis* potencia la respuesta TH1 temprana y suprime la respuesta TH2 tardía.

55 La figura 5 es un gráfico que demuestra que *Rhodococcus coprophilus* suprime ambas respuestas TH1 y TH2.

La figura 6 es un gráfico que demuestra la respuesta a la tuberculina para BCG tras 1 mes en comparación con controles no vacunados.

60 La figura 7 es un gráfico que demuestra la modulación inmunitaria del efecto de BCG por tres especies de bacterias. Se miden las respuestas a la tuberculina a las 24 y 48 horas. Las especies representativas son (Na) *Nocardia asteroides*; (Gb) *Gordonia bronchialis* y (Tp) *Tsukamurella inchonensis*.

65 La figura 8 es un gráfico que demuestra la modulación inmunitaria de BCG/BCG+ por dos especies de bacterias. Se miden las respuestas a la tuberculina a las 24, 48 y 72 horas. Las especies representativas son (Rrh) *Rhodococcus rhodocrous* y (Dm) *Dietzia maris*.

La figura 9 es un gráfico que demuestra la modulación inmunitaria del efecto de BCG por especies seleccionadas dentro del género *Rhodococcus*. Se miden las respuestas a la tuberculina a las 24, 48 y 72 horas. (Rrh) *Rhodococcus rhodocrous*; (Rru) *Rhodococcus ruber*; (Rrhod) *Rhodococcus rhodnii*; (Rcop) *Rhodococcus coprophilus*; (Ropa) *Rhodococcus opacus*; (Reryth) *Rhodococcus erythopolis*.

5 La figura 10 es un gráfico que demuestra la dosis óptima para *Rhodococcus ruber* usando BCG modificado con diluciones log de *Rhodococcus ruber* de desde  $10^8$  hasta  $10^4$  en comparación con BCG solo.

10 La figura 11 es un gráfico que muestra la potenciación del crecimiento de cerdos a los que se les administra *Rhodococcus coprophilus* (Ro) como reactivo de prueba.

La figura 12 muestra el desarrollo de la enfermedad de picazón dulce en un caballo al que se le administra *T. inchonensis*.

15 La figura 13 muestra una fotografía tomada en junio de 2003 que muestra una lesión de sarcoidosis en caballos a los que se les administra *T. inchonensis*.

20 La figura 14 muestra una fotografía tomada en junio de 2003 que muestra una lesión de sarcoidosis en caballos a los que se les administra *T. inchonensis*.

La figura 15 muestra una fotografía tomada en agosto de 2002 que muestra una lesión de sarcoidosis antes de administrar *T. inchonensis*.

25 La figura 16 muestra una fotografía tomada en junio de 2003 que muestra una lesión de sarcoidosis en caballos a los que se les administra *T. inchonensis*.

La figura 17 muestra una fotografía tomada en agosto de 2002 que muestra una lesión de sarcoidosis antes de administrar *T. inchonensis*.

30 La figura 18 muestra una fotografía tomada en agosto de 2003 que muestra una lesión de sarcoidosis tras la administración de *T. inchonensis*. La lesión se redujo mucho (aproximadamente un cuarto de su tamaño máximo [no hay fotografía]).

35 La figura 19 muestra una fotografía tomada en agosto de 2003 que muestra una lesión de sarcoidosis tras la administración de *T. inchonensis*. La lesión se redujo mucho (aproximadamente un cuarto de su tamaño máximo [no hay fotografía]).

40 La figura 20 muestra una fotografía tomada en agosto de 2003 que muestra una lesión de sarcoidosis tras la administración de *T. inchonensis*.

La figura 21 muestra una representación gráfica de la respuesta al estrés asociada con picazón dulce en caballos.

45 Ahora se describirá adicionalmente la invención a modo de ejemplos, que se pretende que sirvan para ayudar a un experto habitual en la técnica a llevar a cabo la invención y no se pretende que limiten de ninguna manera el alcance de la invención.

## Ejemplos

### MÉTODOS

#### 50 Prueba cutánea de la tuberculina

La prueba cutánea de la tuberculina es un ensayo modelo apropiado para evaluar el efecto de una composición inmunomoduladora, es decir composiciones/suspensiones bacterianas que comprenden células bacterianas inactivadas completas según la presente invención, sobre una respuesta inmunitaria celular.

60 La vacunación con BCG induce una respuesta inmunitaria positiva a tuberculina. En ratones, la prueba cutánea de la tuberculina se lleva a cabo preferiblemente en la almohadilla de la pata. En una reacción Th1 predominante, la respuesta inmunitaria positiva en la almohadilla de la pata es máxima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas. Sin embargo, a medida que aumenta la reactividad Th2 entonces aumenta la respuesta inmunitaria positiva en la almohadilla de la pata a las 48 horas y puede superar incluso la respuesta inmunitaria en la almohadilla de la pata a las 24 horas. El efecto de la vacunación con BCG está bien documentado usando esta prueba cutánea de la tuberculina. Por tanto, el ensayo de prueba puede usarse para evaluar si la introducción de una composición inmunomoduladora según la presente invención modula o no la respuesta inmunitaria celular a BCG.

#### 65 Preparación de una suspensión bacteriana

Las especies bacterianas de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides* pueden hacerse crecer en un medio libre de antígeno, tal como medio de Sauton, en un fermentador durante 2-28 días. Alternativamente, las especies bacterianas de interés pueden hacerse crecer sobre una pendiente sólida.

Los expertos en la técnica dispondrían fácilmente de métodos alternativos.

La masa bacteriana resultante puede recogerse y usarse o bien directamente o bien tras lavado para preparar una suspensión en tampón. Se prepara la suspensión celular bacteriana para que contenga entre 100.000 y 10.000.000.000 de bacilos por dosis. Se resuspenden las células bacterianas en agua o en una solución salina. Preferiblemente, la solución salina está tamponada a pH 8,0 con borato. Preferiblemente, se inactivan (se destruyen) los bacilos, de manera adecuada mediante calentamiento en un autoclave durante 15 minutos a 121°C. La suspensión bacteriana resultante comprende células completas.

EJEMPLO 1: Modulación de una respuesta inmunitaria celular por *Rhodococcus ruber* (R.r.).

Grupo 1: se dejaron sin vacunar ratones cruzados hembra adultos jóvenes como grupo control.

Grupo 2: se vacunaron ratones cruzados hembra adultos jóvenes en el día 0 en el pescuezo con BCG (10<sup>5</sup> bacilos) (Evans).

Grupo 3: se vacunaron ratones cruzados hembra adultos jóvenes en el día 0 en el pescuezo con BGC (10<sup>5</sup> bacilos) al que se había añadido *Mycobacterium vaccae* (M.v.) (10<sup>7</sup> bacilos) inactivado por calor.

Se sometieron a prueba en la almohadilla de la pata todos los ratones en los grupos 1-3 para determinar la respuesta inmunitaria a tuberculina en los días 10 y 30. Entonces, se le inyectó a cada ratón *Mycobacterium vaccae* (10<sup>7</sup> bacilos) inactivado por calor en el día 40. En el día 50, se repitió la prueba de la tuberculina en la almohadilla de la pata.

Grupo 4: se dejaron sin vacunar ratones cruzados hembra adultos jóvenes como grupo control adicional.

Grupo 5: se vacunaron ratones cruzados hembra adultos jóvenes en el día 0 en el pescuezo con BCG (Evans) (10<sup>5</sup> bacilos).

Grupo 6: se vacunaron ratones cruzados hembra adultos jóvenes en el día 0 en el pescuezo con BGC (10<sup>5</sup> bacilos) al que se había añadido *Mycobacterium vaccae* (10<sup>7</sup> bacilos) inactivado por calor.

Grupo 7: se vacunaron ratones cruzados hembra adultos jóvenes en el día 0 en el pescuezo con BGC (10<sup>5</sup> bacilos) al que se había añadido *Rhodococcus ruber* (10<sup>7</sup> bacilos) inactivado por calor.

Grupo 8: se vacunaron ratones cruzados hembra adultos jóvenes en el día 0 en el pescuezo con BCG (10<sup>5</sup> bacilos) al que se había añadido *Rhodococcus ruber* (10<sup>6</sup> bacilos) inactivado por calor.

Se sometieron a prueba en la almohadilla de la pata todos los ratones en los grupos 4-7 para determinar la respuesta inmunitaria a tuberculina en el día 30. Entonces, en el día 40 se dividió cada grupo de modo que la mitad de cada grupo no recibió tratamiento adicional y la segunda mitad de cada grupo recibió una inyección de *Rhodococcus ruber* (10<sup>7</sup> bacilos). En el día 50 se repitió la prueba de la tuberculina en la almohadilla de la pata.

En la tabla 1, se muestra el resultado del ejemplo 1.

TABLA 1: Modulación de una respuesta inmunitaria celular por *Rhodococcus ruber* (R.r.).

Día	Respuesta a la tuberculina en		Diferencia de 24-48
	24 horas	48 horas	
Grupo 1 - control			
10	6,9±4,5	5,3±3,7	1,6
30	5,9±4,7	5,2±4,5	0,7
50 M.v.	13,1±5,6 p<0,01	14,0±5,2 p<0,001	+0,9
Grupo 2 - BCG			
10	16,8±11,1	16,8±5,5	0
30	31,1±17,8	16,9±9,1	14,2 <0,05

ES 2 471 241 T3

50 M.v.	33,9±12,3	19,2±11,3	14,7 <0,02
Grupo 3 - BCG + M.v.			
10	14,6±8,3	9,9±2,7	4,7
30	23,8±16,1	21,7±11,5	2,1 n.s.
50 M.v.	27,4±10,3	15,1±5,8	12,3 <0,005
Grupo 4 - control			
30	2,8±3,7	2,5±2,3	0,3 n.s.
50	6,4±9,4	3,6±7,5	2,8 n.s.
50 R.r.	4,2±5,4	1,0±1,7	3,2 n.s.
Grupo 5 - BCG			
30	28,8±15,4	19,1±10,9	9,7 (<0,1)
50	33,8±21,6	12,0±7,9	21,8 (<0,1)
50 R.r.	40,0±22,4	12,2±9,2	27,8 <0,05
Grupo 6 - BCG + M.v,			
30	19,4±20,5	17,7±11,8	1,7 n.s.
50	56,8±53,8	29,4±31,1	27,4 n.s.
50 R.r.	50,0±38,4	9,0±10,4	41,0 <0,05
Grupo 7 - BCG + R.r.			
30	20,6±10,9	17,8±10,3	2,8 n.s.
50	24,8±22,5	14,6±13,2	10,2 n.s.
50 R.r.	28,0±13,2	11,0±4,7	17,0 <0,05
Grupo 8 - BCG + R.r. / grupo 10			
30	19,5±13,9	20,9±14,9	+1,4
50 R.r.	37,2±25,2	20,2±5,3	17,0 n.s.
50	26,8±14,8	12,8±8,0	14,0 (<0,1)

M.v. = *Mycobacterium vaccae*

- 5 En el grupo control 1, el tratamiento con *Mycobacterium vaccae* indujo un aumento estadísticamente significativo en la respuesta inmunitaria a tuberculina tanto tras 24 horas ( $p < 0,01$ ) como tras 48 horas ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, en el grupo control 4, el tratamiento con *Rhodococcus ruber* no indujo un cambio significativo en la respuesta inmunitaria a tuberculina tanto tras 24 horas como tras 48 horas. En ambos puntos de tiempo, los resultados de M.v. fueron significativamente mayores que los resultados de R.r. ( $p < 0,02$ ).
- 10 En los grupos con BCG (grupo 2 y grupo 5), la disminución en la respuesta a la tuberculina entre 24 horas y 48 horas fue mayor ( $p = 0,06$ ) en los ratones que recibieron tratamiento con *Rhodococcus ruber* (siendo la disminución media de 28,2±15,7) que en los ratones que recibieron tratamiento con *Mycobacterium vaccae* (siendo la disminución media de 14,9±9,6).
- 15 En el grupo con BCG+*Mycobacterium vaccae* (grupo 3 y grupo 6), la disminución en la respuesta a la tuberculina entre 24 horas y 48 horas fue de nuevo mayor ( $p < 0,05$ ) en el grupo que recibió tratamiento con *Rhodococcus ruber* (siendo la disminución media de 41,0±41,0) que en ratones que recibieron tratamiento con *Mycobacterium vaccae*

(siendo la disminución media de  $12,7 \pm 7,0$ ).

Estos datos sugieren que existe una regulación por disminución de la respuesta Th2 tras el tratamiento con *Rhodococcus ruber*, que no se observa tras el tratamiento con *Mycobacterium vaccae*.

5 En los grupos con BCG + *R.r.* (grupos 7 y 8) el efecto de añadir  $10^7$  *R.r.* (grupo 7) o  $10^6$  (grupo 8) a BCG fue muy similar y tras la segunda inyección con *R.r.* hubo una reducción sustancial en la respuesta entre 24 y 48 horas ( $15,5 \pm 10,0$ ).

10 EJEMPLO 2: Modulación de una respuesta inmunitaria celular usando *Nocardia asteroides* (N.a.), *Gordonia bronchialis* (G.b.) o *Tsakamurella inchonensis* (T.p.).

15 Se diseñó este experimento para comparar los efectos de las pruebas en la almohadilla de la pata con tuberculina 28 días tras la vacunación de grupos de 6 ratones con BCG solos o con la adición de  $10^7$  *M.v.*, *R.r.*, *Nocardia asteroides* (N.a.), *Gordonia bronchialis* (G.b.) o *Tsakamurella inchonensis* (T.p.). Para averiguar cuáles eran los efectos sobre la respuesta inmunitaria a cada uno de estos organismos añadidos, se sometieron a prueba los grupos de animales en la almohadilla de la otra pata 28 días tras haberse sometido a prueba con tuberculina con reactivos de prueba cutánea preparados a partir del organismo incluido en su vacunación (vacuna, rubina, asterina, bronquialina e inchonensina).

20 Se detallan los resultados en la tabla 2.

TABLA 2: Modulación de una respuesta inmunitaria celular

Día	Respuesta a la tuberculina en		Diferencia de 24-48
	24 horas	48 horas	
28	1) Grupo control		0,1
	3,8±4,8	3,7±3,6	
28	2) Grupo con BCG		9,8
	38,0±20,2	28,2±17,0	
56	Tuberculina		19,2
	65,0±31,2	45,8±23,6	
28	3) Grupo con BCG+ <i>M.v.</i>		6,1
	20,3±10,0	14,2±5,7	
56	Vacuna		10,7
	18,7±12,1	8,0±6,5	
28	4) Grupo con BCG+ <i>R.r.</i>		7,1
	31,3±16,0	24,2±10,3	
56	Rubina		7,2
	19,5±7,1	12,3±10,4	
28	5) Grupo con BCG+ <i>N.a.</i>		4,0
	24,2±20,8	20,2±17,6	
56	Asterina		2,0
	7,3±8,3	5,3±5,0	
28	6) Grupo con BCG+ <i>G.b.</i>		0,1
	15,8±14,4	15,7±13,2	



## ES 2 471 241 T3

Bronquialina				
56	11,3±3,4	6,2±4,3	5,1	
	7) Grupo con BCG+ <i>T.p</i>			
28	19,5±7,4	15,8±5,7	3,7	
Paurometabolina				
56	9,8±5,0	2,3±2,7	7,5	

Todas las suspensiones bacterianas redujeron la respuesta a la tuberculina en el 28 día medida tanto a las 24 como a las 48 horas, en comparación con la que hubo tras BCG solo ( $p=0,05$ ;  $p=0,2$ ).

- 5 Con la excepción de tuberculina y vacuna, fue la primera vez que se usó alguno de estos reactivos de prueba cutánea. Las diferencias en la capacidad de respuesta a los nuevos reactivos a las 24 horas se debieron probablemente a que no se habían equilibrado excepto mediante la estimación de proteínas. Sin embargo, todos mostraron una disminución en la respuesta entre las 24 y 48 horas en el día 50, lo que sugiere actividad inmunorreguladora.

10 EJEMPLO 3: Modulación de una respuesta inmunitaria celular mediante tratamiento con *Rhodococcus ruber*

15 Se diseñó este experimento para investigar el efecto de la vacuna de la difteria/tétanos/tos ferina (DTP) y/o la vacuna del sarampión/paperas/rubeola (MMR) con la vacunación posterior con BCG y cómo puede modificarse el efecto mediante tratamiento con células completas inactivadas por calor de *Rhodococcus ruber* administrado 7 días o 28 días por adelantado, o con la primera dosis de DTP.

20 Se detalla el diseño experimental en la tabla 4. Grupos de seis ratones cruzados hembra en destete recibieron los tratamientos detallados en la tabla 4. Se sometieron a la prueba de tuberculina todos los ratones 28 días tras la vacunación con BCG.

Se presentan los resultados en la tabla 3.

TABLA 3:

	24 horas	48 horas	Diferencia de 24-48 h
Grupo 5 en la tabla 4			
BCG sólo:	35,0±24,7	22,0±14,8	13,0
Grupo 3 en la tabla 4			
DTP/MMR entonces BCG:	42,7±28,5	24,2±13,2	18,5
Grupo 4 en la tabla 4			
DTP/MMR entonces BCG:	42,0±21,1	23,7±8,0	18,3
Grupo 6 en la tabla 4			
<i>R.r.</i> administrado 49 días antes de BCG:	50,3±47,0	31,8±32,0	18,5
Grupo 1 en la tabla 4			
<i>R.r.</i> administrado 7 días antes de DTP/MMR entonces BGG:	32,0±18,4	24,3±15,4	7,7
Grupo 2 en la tabla 4			
<i>R.r.</i> administrado 28 días antes de DTP/MMR entonces BCG:	44,7±25,8	20,0±11,0	24,7
Grupo 7 en la tabla 4			
<i>R.r.</i> DTP/MMR entonces BGG:	40,3±26,0	27,3±16,5	13,0

25 Tendencias mostradas en este experimento:

30 El efecto de administrar DTP/MMR antes de BCG (grupos 3 y 4 en la tabla 4): la administración de DTP y MMR antes de la vacunación con BCG da como resultado un aumento en la respuesta a las 24 horas y mejor separación entre la respuesta a las 24 y 48 horas.

El efecto de administrar *R.r.* antes de BCG (grupo 6 en la tabla 4): *R.r.* administrado 49 días antes de BCG aumenta la respuesta a la tuberculina a las 24 y 48 horas, y aumenta la diferencia entre ellos.

5 El efecto de administrar *R.r.* antes de DTP/MMR antes de BCG (grupos 1 y 2 en la tabla 4): administrar *R.r.* 28 días antes de DTP/MMR aumenta la separación entre las respuestas a tuberculina a las 24 y 48 horas, mientras que administrar *R.r.* 7 días antes de DTP/MMR suprime el efecto sobre BCG posterior.

10 El efecto de administrar *R.r.* con la primera dosis de DTP/MMR antes de BCG (grupo 7 en la tabla 4): administrar *R.r.* con la primera inyección de DTP pareció no presentar ninguna diferencia en cuanto al efecto de DTP/MMR sobre la vacunación posterior con BCG.

15 Los hallazgos preliminares sugieren que la inmunización con DTP seguido por MMR, antes de la vacunación con BCG, tiene un efecto sobre la reactividad a tuberculina 28 días después. El estudio también sugiere que la vacunación con *R.r.* antes de la vacunación con BCG, tiene un efecto sobre la reactividad a tuberculina 28 días después. El momento de la vacunación con *R.r.* en relación con DTP/MMR antes de la vacunación con BCG puede ser importante.

EJEMPLO 4: Reacciones cutáneas locales a inyecciones intradérmicas en cobayas adultas

20 Se afeitó el costado izquierdo de 3 animales para administrarles inyecciones intradérmicas de 0,1 ml que contenían  $10^8$  *M. vaccae* en el extremo de la cabeza y 0,1 ml que contenían  $10^9$  *M. vaccae* 5 cm hacia el extremo de la cola del animal.

25 Se afeitaron otros 3 animales en el costado derecho y se les administraron inyecciones intradérmicas de 0,1 ml que contenían  $10^8$  *R. rhodochrous* en el extremo de la cabeza y 0,1 ml que contenían  $10^9$  *R. rhodochrous* 5 cm hacia el extremo de la cola del animal.

Grupos	Diámetros de induración en mm					
	48 h $10^8$	7 d $10^8$	14 d $10^8$	48 h $10^9$	7 d $10^9$	14 d $10^9$
<i>M. vaccae</i>	2x2	-	-	4x4	2x3	-
<i>M. vaccae</i>	-	-	-	2x2	2x2	1x1
<i>M. vaccae</i>	-	-	-	5x5	1x2	-
<i>R. rhodochrous</i>	-	-	-	1x1	2x2	-
<i>R. rhodochrous</i>	-	-	-	1x1	2x2	-
<i>R. rhodochrous</i>	-	-	-	2x1	4x3	1x2

30 En 3 cobayas, las reacciones locales a las inyecciones intradérmicas (la vía de inyección que se usa normalmente en la práctica veterinaria y médica) de  $10^9$  *R. ruber* (una dosis típica para uso en seres humanos y animales) fueron similares a las reacciones a la misma dosis de *M. vaccae* en otras 3 cobayas. A las 48 horas tras la inyección, las reacciones a *R. ruber* fueron menores ( $p < 0,05$ ) que aquéllas a *M. vaccae*. Por tanto, *R. ruber* puede ser incluso farmacéuticamente más aceptable que *M. vaccae*. No existen reacciones locales a ninguna preparación a la dosis de  $10^8$ .

EJEMPLO 5: Toxicidad tras inyección subcutánea.

40 No se observó evidencia de toxicidad a dosis subcutáneas en 17 ratas que recibieron 3 inyecciones de *R. ruber* cuando tenían la edad de 1 día, 14 días y 28 días (a estas últimas se les administraron 7 días tras la exposición a *Trypanosoma cruzi* en el expt. 6).

45 Las respuestas a  $10^9$  *R. ruber* a las 48 horas fueron menores que aquéllas a la misma dosis de *M. vaccae* ( $p < 0,05$ ). No hubo diferencias a los 7 días ni a los 14 días. Muchos ratones recibieron inyecciones de diversas especies de las bacterias de la presente invención, sin ninguna evidencia de toxicidad.

EJEMPLO 6: Modulación de tripanosomiasis en ratas

Preparación de los animales

50 i) A ratas macho de un día de edad "1" se les inyectó en el pescuezo  $10^7$  *Rhodococcus ruber* o *Rhodococcus coprophilus* en un volumen de 0,1 ml mediante inyección por vía subcutánea.

55 ii) Tras tener 14 días de edad, a las ratas macho "1" se les administró una segunda inyección subcutánea con  $10^7$  *R. ruber* en 0,1 ml en el lado izquierdo.

iii) Se expusieron los animales a *Trypanosoma cruzi* vivo en el día 21 a través de la vía subcutánea a  $10^6$  tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Se mantuvieron tripomastigotes sanguíneos infecciosos mediante pase en serie en ratones CBI.

5 iv) Se evaluaron las formas en el torrente sanguíneo de *T. cruzi* en condiciones normalizadas, mediante observación directa al microscopio de 5  $\mu$ ml de sangre venosa de cola heparinizada, a los 7 y 14 días tras la infección (pi, *post-infection*). Se expresan los datos como el número de parásitos/50 campos.

10 v) 7 días después se administró una inyección subcutánea adicional de  $10^7$  *R. ruber* en un volumen de 0,1 ml en el lado derecho.

Los animales control sólo recibieron la exposición a *T. cruzi*.

15 Se dejó sin exposición otro grupo de animales para fines de comparación.

Se presentan los resultados en la tabla 5.

**TABLA 5: Parasitemias (Se expresan los datos como el número de parásitos/50 campos)**

1<sup>er</sup> experimento

GRUPO	n	Día 7		Día 14	
		Media $\pm$ D.E.	Mediana (rango)	Media $\pm$ D.E.	Mediana (R)
Controles	7	2,57 $\pm$ 1,8	2(1-5)	1,14 $\pm$ 1,07	1(0-3)
Rr	10	0,30 $\pm$ 0,67	0(0-2)	0 $\pm$ 0	0(0-0)
		P<0,005		P<0,005	
		Prueba de la t de Student			

2<sup>o</sup> experimento

GRUPO	n	Día 7		Día 14	
		Media $\pm$ D.E.	Mediana (rango)	Media $\pm$ D.E.	Mediana (R)
Controles	7	2,14 $\pm$ 1,07	2(1-4)	1 $\pm$ 1,15	1(0-3)
Rr	7	1,1 $\pm$ 0,69	0(1-2)	1,5 $\pm$ 0,97	2(0-3)
		P<0,005			
		Prueba de la t de Student			

Datos reunidos de ambos experimentos

GRUPO	n	Día 7		Día 14	
		Media $\pm$ D.E.	Mediana (rango)	Media $\pm$ D.E.	Mediana (R)
Controles	14	2,35 $\pm$ 1,44	2(1-5)	1,07 $\pm$ 1,07	1(0-3)
Control 2	6	3,83 $\pm$ 4,36		3,50 $\pm$ 2,89	
Rr	17	0,65 $\pm$ 0,78	0(1-2)	0,69 $\pm$ 1,01	0(0-3)
Rc	6	1,67 $\pm$ 0,81		0,75 $\pm$ 1,5	
		P=0,001			
		Prueba de la t de Student			
		Rc = <i>Rhodococcus coprophilus</i>			

20 Estos datos demuestran una reducción significativa de los parásitos que circulan en la sangre en el momento en el que se encuentra los mayores números en los animales control. Esto sugiere que tanto *R. ruber* como *R. coprophilus* potencian las respuestas Th1 (7 días es demasiado pronto para la producción de anticuerpos a través de la ruta de Th2).

25

EJEMPLO 7: Investigación de los efectos de *Rhodococcus coprophilus* NCIMB 11211, *Gordonia bronchialis* NC10667 y *Tsukamurella inchonensis* NC13040 sobre la toxicidad, en particular la velocidad de crecimiento y la vacunación posterior con BCG en ratones recién nacidos.

5 Una prueba alternativa de toxicidad es aquella en la que se administran inyecciones subcutáneas de *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus coprophilus* o *Tsukamurella inchonensis* el día de nacimiento, y de nuevo en un sitio separado, en el día 21. Se pesaron estos animales, y controles a los que se les inyectó solución salina a intervalos regulares a lo largo de 3 meses.

10 Métodos

Se usan 9 ratonas Balb C preñadas en periodo avanzado.

15 Preparación de suspensión bacteriana inactivada: suspensión preparada a partir de caldo de cultivo antiespumante de Sauton del día 10, centrifugado y resuspendido como 10 mg/ml en solución salina tamponada con borato, tratada en autoclave y almacenada a 4°C. Diluir 10 mg/ml, 10<sup>10</sup>/ml 1/2 en borato proporcionando 5x10<sup>9</sup> y entonces diluir 1/10 en tampón borato proporcionando una concentración final de 10<sup>7</sup> en 20 µ para su uso.

20 DÍA 1

En el día del nacimiento retirar los ratones recién nacidos individualmente e inyectar a la camada 10<sup>7</sup> de suspensión inactivada en el pescuezo y devolvérselos a la madre. Inyectar a camadas control 20 µlitros de solución salina tamponada con borato M15 en el pescuezo.

25 Camada 1 = 2 hembras + 3 machos (*Rhodococcus coprophilus* NCIMB 11211)

Camada 2 = 2 hembras + 3 machos (*Rhodococcus coprophilus* NCIMB 11211)

30 Camada 3 = 5 hembras + 3 machos (*Gordonia bronchialis* NC 10667)

Camada 4 = 3 hembras + 4 machos (*Gordonia bronchialis* NC 10667)

Camada 5 = 1 hembras + 1 machos (solución salina tamponada con borato)

35 Camada 6 = 3 hembras + 1 machos (solución salina tamponada con borato)

Camada 7 = 5 hembras + 3 machos (*Tsukamurella inchonensis* NC13040)

40 Camada 8 = 5 hembras + 4 machos (*Tsukamurella inchonensis* NC13040)

Camada 9 = 4 hembras + 5 machos (solución salina tamponada con borato)

DÍA 21

45 Destetar los ratones, sexarlos y separar las camadas en 2 grupos de machos y hembras

Pesar y revacunar. Marcar los individuos mediante marcas en la cola con un bolígrafo indeleble.

Pesar y volver a marcar la cola semanalmente durante 3 meses.

50 La figura 1 demuestra los resultados de medias de aumento de peso/controles y prueba de hembras de camada a lo largo de 12 semanas desde el destete.

55 La figura 2 demuestra los resultados de media de aumento de peso/controles y prueba de machos de camada a lo largo de 12 semanas desde el destete.

60 El aumento de peso es el mismo en todos los grupos, y sólo 2/57 animales murieron a lo largo de 3 meses. Ambos eran machos, que murieron justo después de ponerse junto con otros machos tras el destete. Por tanto, puede concluirse que el aumento de peso y el progreso de los animales no se vieron afectados por las tres especies sometidas a prueba.

EJEMPLO 8: El efecto sobre la inmunización con BCG medido a través de la respuesta a la prueba cutánea de la tuberculina

65 Se concibe un modelo de prueba de inmunomodulador, basándose en el principio de que la vacunación con BCG induce una respuesta a pruebas cutáneas con tuberculina (una preparación soluble de *Tubercle bacilli*), cuando se

- 5 somete a prueba 4 semanas después. Se mide la reacción local 24 horas, 48 horas y 72 horas tras la inyección de tuberculina. En el ratón, la mayor reacción es habitualmente a las 24 horas cuando es un indicador de la respuesta Th1 a los antígenos en la tuberculina. La reacción a las 48 horas es habitualmente menor e incluye una contribución Th2. La reacción a las 72 horas es a menudo un poco menor que a las 48 horas y es una respuesta Th2. Esta reacción a la tuberculina tras BCG puede modularse mediante sensibilización anterior, de modo que las componentes Th1 y Th2 de la reacción reflejarán la naturaleza del reactivo de sensibilización.

Métodos

- 10 Se inyectó a los ratones sensibilizados según el ejemplo 8 cuando tenían 3 meses de edad  $10^6$  BCG en 100  $\mu$ l en el pescuezo a la mitad de cada grupo de prueba y control.

- 15 A los 4 meses, la prueba de la tuberculina con el reactivo T1475 1 mg/ml. Diluir 100  $\mu$ litros en 1,9 ml para proporcionar una concentración final de 50  $\mu$ g/ml. Almacenar a 4°C. La dosis es de 2,5  $\mu$ g en 50  $\mu$ litros administrados en la almohadilla de la pata trasera. Se midió la hinchazón de respuesta a la tuberculina usando un micrómetro a las 24, 48 y 72 horas.

Resultados

- 20 La figura 3 muestra que *Gordonia bronchialis* potencia el efecto TH1 a las 24 horas.  
La figura 4 muestra que *Tsukamurella inchonensis* potencia la respuesta TH1 a las 24 horas y suprime la respuesta TH2 a las 72 horas.  
25 La figura 5 muestra que *Rhodococcus coprophilus* suprime ambas respuestas TH1 y TH2

Hinchazón (micrómetros, media $\pm$ D.E.)		24 h	48 h	72 h
BCG solo	6	9 $\pm$ 4,19	7,67 $\pm$ 3,39	3,7 $\pm$ 3,5
<i>Dietzia maris</i>	4	13,25 $\pm$ 5,79	8,75 $\pm$ 3,95	5 $\pm$ 4,7
<i>G. terrae</i>	11	11,4 $\pm$ 5,09	9,9 $\pm$ 4,95	4,7 $\pm$ 4,08
<i>R. rhodococcus</i>	3	11,7 $\pm$ 6,4	6,3 $\pm$ 4	5 $\pm$ 2,6
<i>G. bronchialis</i>	4	10,5 $\pm$ 2,6	3,5 $\pm$ 1	1,25 $\pm$ 1,25
<i>G. amarae</i>	9	6,9 $\pm$ 3,7	4 $\pm$ 3,16	2 $\pm$ 1,9
<i>N. asteroides</i>	6	6,7 $\pm$ 3,98	2 $\pm$ 2,6	1 $\pm$ 2,6
<i>T. inchonensis</i>	4	6 $\pm$ 2,8	4 $\pm$ 2,83	2 $\pm$ 2,7
<i>R. rhodnii</i>	10	7 $\pm$ 4,87	7,9 $\pm$ 6,38	2,5 $\pm$ 2,8
<i>G. sputi</i>	8	4 $\pm$ 3,6	7,25 $\pm$ 65,6	2,12 $\pm$ 2,59
<i>R. coprophilus</i>	4	3 $\pm$ 1,4	0,75 $\pm$ 1,5	0,25 $\pm$ 0,5
		P<0,0025	P<0,005	P=0,062

Conclusión

- 30 Las especies sometidas a prueba indujeron cada una diferentes efectos sobre la prueba de la tuberculina tras la exposición a BCG:

- 35 *Rhodococcus rhodocrous* indujo una respuesta Th1 potenciada, sin cambiar la respuesta Th2. También se ha mostrado que *Rhodococcus rhodnii*, *Dietzia maris* y *Gordonia terrae* también tienen esta función. *Rhodococcus ruber* también tiene esta función.

- 40 *Tsukamurella inchonensis* potenció o dejó inalterada la respuesta Th1 y reguló por disminución la respuesta Th2. También se ha mostrado que *Gordonia bronchialis*, *Gordonia amarae* y *Nocardia asteroides* también tienen esta función. *Rhodococcus coprophilus* reguló por disminución fuertemente ambas respuestas Th1 y Th2.

- Estos resultados también muestran claramente que la influencia de 2 inmunizaciones de sensibilización con cualquiera de las especies representativas de la invención persiste durante al menos 9 semanas tras la segunda inmunización.

- 45 EJEMPLO 9: Modelo de prueba de inmunomodulador

Se concibe un modelo de prueba de inmunomodulador, basándose en el principio de que la vacunación con BCG induce una respuesta a las pruebas cutáneas con tuberculina (una preparación soluble de *Tubercle bacilli*), cuando se somete a prueba 4 semanas después. Se mide la reacción local 24 horas, 48 horas y 72 horas tras la inyección de tuberculina. En el ratón, la mayor reacción es habitualmente a las 24 horas cuando es un indicador de la respuesta Th1 a los antígenos en la tuberculina. La reacción a las 48 horas es habitualmente menor e incluye una contribución Th2. La reacción a las 72 horas es a menudo un poco menor que a las 48 horas y es una respuesta Th2. Esta reacción a la tuberculina tras BCG puede modularse mediante sensibilización anterior, de modo que las componentes Th1 y Th2 de la reacción reflejarán la naturaleza del reactivo de sensibilización.

Se inyecta el inmunoestimulante conocido, BCG en el pescuezo de ratones jóvenes de 3 semanas de edad y se mide la respuesta a la tuberculina 1 mes después mediante inyección subcutánea de tuberculina en la almohadilla de la pata del ratón. Entonces se mide la hinchazón resultante, es decir, la "respuesta a la tuberculina" a las 24, 48 y 72 horas. La hinchazón a las 24 horas se considera una respuesta temprana o mediada por Th1 y la hinchazón a las 48 y 72 horas una respuesta tardía o mediada por Th2. BCG en el ratón sano estimula predominantemente una respuesta Th1.

#### Método

(a) Vial de 10 dosis de vacuna intradérmica de BCG (Evans Medical).

Reconstituir con 1 ml de agua estéril suministrada usando una jeringa y aguja dejando 5 minutos para que se disuelva. Debe ser  $1 \times 10^7$ /ml.

Usando una jeringa y aguja retirar toda la vacuna y transferirla a un frasco Bijou de plástico.

Diluir 1/10 0,15 ml en 1,35 ml de solución salina tamponada con borato M15 proporciona  $10^5$  en 100  $\mu$ litros

La dosis es de  $10^5$  en 100  $\mu$ l administrados en el pescuezo.

(b) Tuberculina

T1475 1 mg/ml.

Diluir 100  $\mu$ l en 1,9 ml para proporcionar una concentración final de 50  $\mu$ gm/ml.

Almacenar a 4°C.

La dosis es de 2,5  $\mu$ g en 50  $\mu$ l administrados por vía intradérmica en la almohadilla de la pata trasera.

Se mide la respuesta a la tuberculina a las 24, 48 y 72 horas usando un micrómetro

La figura 6 muestra la respuesta a la tuberculina para BCG tras 1 mes en comparación con controles no vacunados.

(c) Preparación de suspensiones de prueba

Se hacen crecer cultivos en caldo Sauton, se recogen mediante centrifugación y se resuspenden a una concentración de 10 mg/ml en solución salina tamponada con borato M15 y se almacenan a 4°C.

10 mg/ml =  $10^9$  en 100  $\mu$ l.

Diluir 1/10 =  $10^8$  en 100  $\mu$ l.

Añadir 150  $\mu$ l de  $10^8$  a 1,2 ml de borato M15 y añadir 150  $\mu$ l de BCG.

La dosis es ahora de  $10^5$  BCG +  $10^7$  organismos de prueba en 100  $\mu$ l inyectados en el pescuezo.

#### Resultados

La figura 7 es un gráfico que demuestra la modulación inmunitaria del efecto de BCG por tres especies de bacterias. Se miden las respuestas a la tuberculina a las 24 y 48 horas.

Especies representativas son (Na) *Nocardia asteroidis*; (Gb) *Gordonia bronchialis*; y (Tp) *Tsukamurella inchonensis*.

La figura 8 es un gráfico que demuestra la modulación inmunitaria de BCG/BCG+ por dos especies de bacterias. Se

miden las respuestas a la tuberculina a las 24, 48 y 72 horas. Especies representativas son (Rrh) *Rhodococcus rhodocrous* y (Dm) *Dietzia maris*.

5 La figura 9 es un gráfico que demuestra la modulación inmunitaria del efecto de BCG por especies seleccionadas dentro del género *Rhodococcus*. Se miden las respuestas a la tuberculina a las 24, 48 y 72 horas. (Rrh) *Rhodococcus rhodocrous*; (Rru) *Rhodococcus ruber*; (Rrhod) *Rhodococcus rhodnii*; (Rcop) *Rhodococcus coprophilus*; (Ropa) *Rhodococcus opacus*; (Reryth) *Rhodococcus erythopolis*.

10 La figura 10 es un gráfico que demuestra la dosis óptima para *Rhodococcus ruber* usando BCG modificado con diluciones log de *Rhodococcus ruber* de desde  $10^8$  hasta  $10^4$  en comparación con BCG solo.

Conclusión

15 Esta prueba de detección demuestra que mezclando suspensiones de prueba con BCG y comparando con BCG solo, 28 días después de la prueba de la tuberculina, como medida de la respuesta a BCG, se ha regulado o modificado. En este modelo sencillo, se muestra la inmunorregulación como una reducción en la magnitud de la respuesta tanto a las 24 como a las 48 horas. Esto puede investigarse adicionalmente en experimentos a más largo plazo en los que se lleva a cabo la sensibilización con la suspensión de prueba algunas semanas antes de la exposición a BCG y las pruebas de la tuberculina posteriores.

20 EJEMPLO 10: Potenciación del crecimiento en cerdos.

25 Esto se basa en el principio de que un sistema inmunitario sensibilizado para la potenciación de Th1, con o sin regulación de Th2 da como resultado menos restricción del crecimiento por infecciones subclínicas. Por tanto, en una situación en la que son frecuentes infecciones menores, una reducción de su influencia debe dar como resultado que los animales engorden más. Esto podría lograrse mediante la reducción del nivel de TNF (factor de necrosis tumoral) circulante, que en presencia de citocinas Th2 actúa como “factor caquéxico”, reduciendo el apetito y aumentando la tasa metabólica.

30 El estudio se llevó a cabo en 10 lechones recién nacidos. Se mantuvieron estos animales con todos los demás nacidos esa semana.

35 El día del nacimiento: todos los lechones recibieron inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en el lado izquierdo del cuello. Entonces se pesaron y se devolvieron a la cerda. El grupo control (5 lechones) recibió inyecciones de solución salina tamponada con borato (pH 8) como placebo. El grupo de prueba (5 lechones) recibió 500 microgramos de *Rhodococcus coprophilus* en 0,1 ml de solución salina tamponada con borato (pH 8).

40 En el día 7: todos los lechones recibieron inyecciones intradérmicas de 0,1ml en el lado derecho del cuello. Entonces se pesaron y se devolvieron a la cerda. El grupo control recibió inyecciones de solución salina tamponada con borato (pH 8) como placebo. El grupo de prueba recibió 500 microgramos de *Rhodococcus coprophilus* en 0,1 ml de solución salina tamponada con borato (pH 8)

45 En el día 14: todos los lechones recibieron inyecciones intradérmicas de 0,1 ml en el lado derecho del cuello. Entonces se pesaron y se devolvieron a la cerda. El grupo control recibió inyecciones de solución salina tamponada con borato (pH 8) como placebo. El grupo de prueba recibió 2 mg de *Rhodococcus coprophilus* en 0,2 ml de solución salina tamponada con borato (pH 8).

Se presentan los datos a continuación en el presente documento:

Grupos	Semanas						
	0	1	2	5	8	9	11
Placebo (P1)	1,46	3	4,68	9	16,62	19,76	28,06
<i>Rhodo</i> (Ro)	1,76	3,26	5,2	10	20,24	22,36	33,1

50 En la figura 11 se muestra un gráfico que demuestra la potenciación del crecimiento de cerdos a los que se les administra *Rhodococcus coprophilus* (Ro) como reactivo de prueba.

55 Las investigaciones preliminares muestran que lechones que recibieron *Rhodococcus coprophilus* engordaron significativamente más que controles con placebo a los que se les administraron inyecciones similares, pero de solución salina tamponada. Las ventajas de esto pueden ser que los cerdos alcancen pesos regulares en el momento del sacrificio (entre 90-100kg) de 2 a 3 semanas antes de lo habitual.

60 Sin desear limitarse por la teoría, se supone que el aumento de la ganancia de peso observado en animales que recibieron el reactivo de prueba puede deberse a uno o más de los siguientes: mejor conversión de alimentos, una

reducción en la infección y estrés reducido.

EJEMPLO 11: Modulación de estrés asociado con picazón dulce en caballos

5 La picazón dulce es el estado cutáneo que comúnmente padecen los caballos y ponis que producen una respuesta alérgica a las picaduras por las mosquillas *Culicoides*. Esto se produce de la manera más común en zonas en las que el pelo es largo, tales como la crin y la cola. Existe una caída de pelo y engrosamiento e inflamación de la piel con intenso picor. Los caballos se muestran excitados y angustiados por este estado y pierden peso como resultado del mismo. Es un estado anual que afecta a caballos y ponis aquejados a finales de primavera y verano habitualmente.

15 Grupos de 4 ponis y caballos que se sabía que desarrollaban picazón dulce cada año, recibieron 1 mg de *T. inchoensis* mediante inyección intradérmica en 2 ocasiones separadas 2 semanas, 4 animales recibieron inyecciones de solución salina tamponada como control, y 2 animales recibieron inyecciones de 1 mg de *M. vaccae* como control positivo. Puesto que esto se realizó durante la temporada de picazón dulce, los animales llevaban una manta, capucha o mascarilla para protegerlos frente a las picaduras de las mosquillas, que se retirarán 3 semanas después de la segunda inyección. Tras la retirada de las cubiertas, se espera que se produzca picazón dulce en el plazo de 1-2 semanas en el grupo control cuando se realizará la primera evaluación completa de la eficacia. Puede administrarse una tercera inyección de los reactivos en ese momento.

20 Se presentan los resultados a continuación:

1	3	15	16	12	17	2	5	6	7		Caballo		
P	P	P	P	V	V	T	T	T	T		Reactivo		
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B		Manta		
H	H		H		H	H	H	H			Capucha		
									M		Máscara		
5	4	5	5	5	5	4	4	3	5		Sacudida de cola	1-5	constante
0	2	53	1	5	0	1	0	5	11		Agitación de cabeza		x 15 min
0	7	4	10	0	11	1	19	3	2		Coces en el vientre		
0	3	0	6	0	0	0	0	0	0		Pisoteo		
0	4	8	7	0	3	0	1	1	1		Frotado		
0	3	0	2	0	3	0	1	1	2		Mordida		
0	0	2	3	0	0	0	0	2	1		Caminar mecánico		
0	0	1	1	0	1	0	0	0	0		Revolcarse		
1	2	4	6	1	5	1	5	2	6		Impresión del observador	1-10	alta
6	25	77	41	11	28	7	30	17	28		Puntuación total		
	P	37		V	19		T	21			Media/grupo		

25 Los resultados muestran que tanto *M. vaccae* como *T. inchoensis* redujeron los síntomas de estrés provocados por la picazón dulce ( $p < 0,01$ ).

EJEMPLO 12: Prevención de picazón dulce en caballos

30 A un caballo de 7 años de edad que se sabía que desarrollaba regularmente picazón dulce bastante grave cada año en la temporada de mosquillas, se le administraron dos inyecciones intradérmicas de *T. inchoensis* en la parte delantera del tórax en enero y febrero, respectivamente, con dos semanas entre las inyecciones. Hasta los últimos días de mayo y muy dentro de la temporada de *Culicoides*, sorprendentemente el caballo no mostró signos de picazón dulce, tal como caída de pelo o inflamación de la piel. A finales de mayo, sí que apareció picazón dulce en el animal y se administró una tercera inyección de *T. inchoensis* al animal. En el plazo de 24-48 horas desde la administración, los síntomas de picazón dulce (en particular la inflamación de la piel y/o caída de pelo) habían desaparecido por completo. Entonces el animal estuvo de nuevo libre de picazón dulce hasta principios de agosto.



De nuevo se administró una inyección adicional (4ª) de *T. inchonensis* y de nuevo desaparecieron los síntomas de picazón dulce en el plazo de 24-48 h tras la administración.

Se presentan estos datos en forma gráfica en la figura 21.

5 Los resultados muestran que *T. inchonensis* administrado dos veces antes de la temporada de picazón dulce y luego de nuevo según se va necesitando durante la temporada de picazón dulce a medida que se producen los síntomas de picazón dulce proporcionará una prevención y/o un tratamiento eficaces contra la picazón dulce.

10 EJEMPLO 13: Modelo de cáncer

15 Este estudio evalúa el efecto de inyecciones de  $10^6$  y  $10^7$  *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus coprophilus* y *Tsukamurella inchonensis* en la prevención y el tratamiento de ratones expuestos a una línea celular de adenocarcinoma de pulmón. Grupos de ratones recibirán inyecciones subcutáneas de las especies de prueba o placebo de solución salina en el pescuezo 5 semanas y dos semanas antes de la exposición subcutánea a células tumorales en el costado. La tercera inyección de los organismos de prueba y placebo de solución salina se administrará en el pescuezo 1 semana tras la exposición tumoral. Se decidirá el número de células tumorales inyectadas por expertos totalmente competentes con el sistema. Los criterios de valoración serán la presencia y el tamaño de los tumores en el sitio de exposición 7, 14 y 21 días tras la exposición.

20 Las investigaciones preliminares sugieren que al menos una de las bacterias de prueba retrasará el desarrollo tumoral y reducirá la progresión tumoral.

25 EJEMPLO 14: Para mostrar que las suspensiones de células completas de las bacterias son más eficaces en la modulación de la inmunidad que los extractos celulares, se producen preparaciones comparativas y se someten a prueba en un sistema de exposición a BCG/prueba cutánea de la tuberculina.

30 Se suspenden 100 mg de *Tsukamurella inchonensis* en solución salina tamponada (pH 8,0) en un tubo de centrifuga pesado previamente a una concentración de 10 mg de peso húmedo de organismos/ml. Se trata la totalidad de los 10 ml en un ultrasonificador para romper y abrir la mayoría de los organismos (70-80%).

35 Se centrifuga el material sonificado a 15000 rpm durante una hora en un tubo y se retira cuidadosamente el sobrenadante y se hace pasar a través de un filtro de membrana de tamaño de poro de 0,2 µm como el extracto de prueba. Se pesa de nuevo el tubo, con el depósito, para determinar la proporción de organismos completos que no se rompen y abren más desechos de pared, etc. Esto es de 64 mg. Entonces se estima el volumen de extracto equivalente a 0,01 mg de *T. inchonensis* y esto se compara con el equivalente a 0,01 mg de (que se aproxima a  $10^7$ ) bacilos completos.

40 Grupos de 10 animales reciben inyecciones del extracto o suspensiones de células completas de bacilos (equivalente a 0,01 mg/dosis) o placebo de solución salina tamponada en el pescuezo en el destete y 7 días después. Dos semanas después, se exponen animales a BCG. 28 días después se realizan pruebas de la tuberculina tomándose lecturas a las 24, 48 y 72 horas. (Estos datos estarán listos en septiembre.)

45 Resultados:

Respuestas a la tuberculina en ratones tras la vacunación con BCG administrado tras sensibilización con nada, tampón borato, células completas de *T. inchonensis* o antígenos solubles (material sonificado filtrado).

50 Respuesta a la tuberculina tras BCG administrado a animales no sensibilizados:

N.º	24 horas	48 horas	72 horas
6	9±4,2	7,7±3,39	3,67±3,5

Respuesta a la tuberculina tras BCG administrado a animales sensibilizados con tampón borato solo:

6	9±5,7	6,3±7,1	3,17±2,93
---	-------	---------	-----------

55 La sensibilización con tampón borato no tiene ningún efecto sobre la prueba de la tuberculina tras BCG.

Respuesta a la tuberculina tras BCG administrado a animales sensibilizados con *T. inchonensis* completo inactivado por calor:

6 7,3±1,03 6,17±3,87 1,5±2,07

La sensibilización con *T. inchoensis* completo disminuye las respuestas a la tuberculina, especialmente a las 72 horas (capacidad de respuesta Th2).

- 5 Respuesta a la tuberculina tras BCG administrado a animales sensibilizados con preparación soluble de *T. inchoensis* (material sonicado filtrado):

6 6,8±6,8 11,0±8,0 4,6±6,8

- 10 La sensibilización con material sonicado filtrado de *T. inchoensis* aumenta las respuestas a las 48 horas y 72 horas (capacidad de respuesta Th2). Esto se debe probablemente a un aumento en la producción de anticuerpos inflamatorios frente a antígenos compartidos entre BCG y *T. inchoensis*. Los resultados muestran que la sensibilización con el material sonicado da como resultado una respuesta que es diferente de la respuesta tras la sensibilización con organismos inactivados completos.

- 15 Las investigaciones preliminares sugieren que células completas de las bacterias son más eficaces en la modulación de la inmunidad que extractos celulares.

EJEMPLO 15: Estrés en cerdos

- 20 Para evaluar el efecto de células completas de bacterias de uno o más de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Tsukamurella* y *Nocardioides* sobre el estrés en cerdos (lechones), se sometieron a prueba una o más especies de uno o más de estos géneros en cerdos.

- 25 La medición del cortisol en saliva es un método no invasivo de cuantificación del estrés agudo en animales de laboratorio, granja, salvajes en cautividad y con vida libre. Se detalla a continuación un método de recogida de saliva de cerdos u ovejas y el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para cortisol disponible comercialmente diseñado para medir cortisol en saliva humana. Este kit de ELISA se ha usado satisfactoriamente para medir el cortisol en saliva en cerdos y ovejas.

30 Método

Recogida de muestras de saliva.

- 35 1. Los cerdos tienen un fuerte ritmo circadiano (diario) de cortisol, lo que significa que tienen de manera natural mayores niveles de hormonas de estrés por la mañana que más tarde a lo largo del día. En cerdos, los mayores niveles de cortisol se encuentran a las 07:00 h y disminuyen hacia el mediodía. Por este motivo, es vital que se tomen siempre las muestras de saliva a la misma hora del día.

- 40 2. Comer y beber pueden afectar a la concentración de hormonas en saliva. Para obtener los resultados más realistas, tomar muestras de saliva cuando los cerdos no estén comiendo ni bebiendo. Es mejor tomar las muestras antes de que coman o beban.

- 45 3. Para cerdos pequeños, hacer que el cerdo muerda bastoncillos de algodón hidrófilo convencionales (los coloreados son más fáciles de encontrar en el heno) mientras que sujeta el otro extremo. Aproximadamente cuatro bastoncillos de algodón (ambos extremos) deben recoger saliva suficiente para cada cerdo. Para cerdos más grandes, usar los bastoncillos de algodón hidrófilo grandes para recoger saliva de la parte interior de la mejilla. Aproximadamente dos bastoncillos de algodón grandes deben recoger saliva suficiente. Es necesario un mínimo de 0,2 ml de saliva por cerdo.

- 50 4. Inmediatamente tras la recogida, cortar el bastoncillo de algodón para que quepa en el interior de un tubo para microcentrifuga Eppendorf. Colocar el bastoncillo de algodón en el tubo Eppendorf con el trozo de algodón en la parte superior. Centrifugar a la velocidad superior durante aproximadamente dos minutos o hasta que la saliva haya sedimentado en la parte inferior del tubo Eppendorf. Sacudir la parte superior del bastoncillo para obtener la saliva restante de la parte hueca.

- 55 5. Debe recogerse un mínimo de 0,1 ml (primera marca en el tubo Eppendorf) de saliva en cada tubo Eppendorf mediante centrifugación de más de un bastoncillo de algodón por tubo Eppendorf, pero uno cada vez. Recoger dos tubos Eppendorf por cerdo.

- 60 6. Marcar claramente el tubo Eppendorf con números de identidad y la fecha.

7. Tan pronto como sea posible, almacenar las muestras de saliva en bolsas resellables herméticas en el

congelador, preferiblemente a -20°C.

Ensayo de cortisol

- 5 1. Diseñar un plan de placas.  
2. Retirar las muestras de saliva del congelador y permitir que se descongelen.  
3. Encender el horno a 25°C  
10 4. Llevar los reactivos de ELISA hasta temperatura ambiente antes de su uso.  
5. Diluir la disolución de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.  
15 6. Dispensar 100 µl de patrones de cortisol y muestras de saliva por duplicado en los pocillos apropiados.  
7. Dispensar 200 µl de conjugado enzimático a cada pocillo.  
8. Agitar la placa durante 10 s.  
20 9. Incubar a 25°C (en horno) durante 1 h.  
10. Lavar todos los pocillos tres veces desechando el contenido por el sumidero, dispensar 400 µl de disolución de lavado en cada pocillo usando la pipeta multicanal, desechar el contenido de nuevo y repetir dos veces más.  
25 11. Secar firmemente con pequeños golpes la placa invertida sobre toallitas absorbentes para eliminar cualquier cantidad de disolución de lavado en exceso. La fase de lavado del ensayo es muy importante, y la placa debe lavarse apropiadamente.  
30 12. Dispensar 200 µl de disolución de sustrato a cada pocillo.  
13. Incubar a 25°C (en horno) durante 30 min.  
14. Sin vaciar los pocillos, dispensar 100 µl de disolución de detención a cada pocillo.  
35 15. Leer la placa a 450 nm en el plazo de 10 min desde la adición de la disolución de detención.

Kit de ELISA de cortisol en saliva

40 Kit de 96 pocillos para saliva humana, disponible de:

Immunodiagnostic Systems Ltd,

45 10 Didcot Way,

Boldon Business Park,

Boldon,

50 Tyne and Wear,

NE35 9PD.

55 Se tomarán uno o más hisopos con saliva de cada animal a las 3 semanas, a los 64 días y en la comercialización con 4-5 meses de edad. Se analizará la saliva para determinar hormonas relacionadas con estrés, en particular cortisol.

Se espera que una o más de las bacterias de prueba reducirá el estrés mediante mecanismos inmunológicos neuroendocrinos.

60

EJEMPLO 16: Tratamiento de sarcoidosis equina

La sarcoidosis equina, la neoplasia de piel más común de caballos, se asocia con infección con papilomavirus bovino 1 y 2.

65

Un caballo castrado de seis años de edad (3/4 purasangre; 1/4 Warmblood belga) había desarrollado varias lesiones sarcoides a lo largo del año anterior o más. En la primavera de 2002, se encontraron varios crecimientos de tipo verruga en la parte alta de la zona interior del muslo/ingle.

5 En agosto de 2002, un tumor estaba cerca de la vaina y cuando se tomó una fotografía, esta lesión era una agrupación similar a un racimo de crecimientos de aproximadamente 3 cm de diámetro, que había comenzado a ulcerarse. Parte de esta agrupación estaba pedunculada, pero no era adecuada para ligamiento. Otro grupo de crecimientos de tipo verruga, no ulcerados se había desarrollado en la parte superior de la pata delantera derecha cubriendo una zona de aproximadamente 3,5 x 2,5 cm. Se inició el tratamiento dos veces al día con la pomada  
10 Camrosa (remedio a base de hierbas).

En las figuras 15 y 17, se muestran las fotografías tomadas en agosto de 2002.

15 En otoño de 2002, los pequeños sarcoides permanecían inalterados pero el grupo en la parte superior de la pata delantera continuó agrandándose para cubrir una zona de aproximadamente 4,3 x 3 cm y el crecimiento ulceroso cerca de la vaina triplicó su tamaño.

En enero de 2003, se administró la primera inyección de *Tsukamurella inchonensis* y se continuó con la pomada Camrosa dos veces al día como anteriormente. Se observó una reducción muy gradual en el tamaño de todos los  
20 crecimientos durante los siguientes pocos meses.

Inicialmente, se administraron dos inyecciones intradérmicas de 1 mg de *Tsukamurella inchonensis* separadas dos semanas a unos 8-10 cm desde la lesión torácica (es decir, la lesión en la parte superior de la pata delantera derecha) y en la misma zona de drenaje de ganglios linfáticos. Cuatro semanas después de la segunda inyección, la  
25 lesión torácica era más plana y estaba resolviéndose. La gran lesión en el pene (es decir, la lesión cerca de la vaina) estaba pedunculada de manera más obvia y parecía haberse vuelto necrótica.

Un mes después de la segunda inyección, se administró una tercera inyección de *T. inchonensis*, esta vez en la parte delantera izquierda del tórax en una zona de drenaje de ganglios linfáticos en la que no había lesiones sarcoides. Un mes después no se observó una resolución adicional de los sarcoides.  
30

Un mes después de la tercera inyección, se administró una cuarta, esta vez de nuevo a unos pocos cm desde la lesión en la parte derecha del tórax. Un mes después que la lesión del tórax se hubiera resuelto casi por completo, la necrosis de la lesión del pene estaba progresando y las otras lesiones de la ingle eran apreciablemente más pequeñas.  
35

En mayo de 2003, se detuvo la aplicación de la pomada Camrosa para todos los crecimientos excepto para el ulcerado en el que se continuó una vez al día como repelente de moscas.

40 Se presentan las fotografías tomadas en junio de 2003 como las figuras 13, 14 y 16.

En agosto de 2003, todos menos uno de los pequeños crecimientos habían desaparecido como lo había hecho el grupo en la parte superior de la pata delantera. El crecimiento cerca de la vaina estaba todavía ulcerado pero ahora era de aproximadamente 1/4 de su tamaño máximo y se desprenden pequeños trozos de tejido cuando se limpia el  
45 crecimiento.

Se presentan las fotografías tomadas en agosto de 2003 como las figuras 18, 19 y 20. Se observa que los sarcoides mostrados en la figura 17 se habían curado por completo en agosto de 2003 tras la administración de *T. inchonensis*.  
50

En total, se administraron 7 dosis de *T. inchonensis* entre mediados de enero y mediados de agosto.

Conclusión: La preparación de *T. inchonensis* fue eficaz para reducir las lesiones sarcoides. Sobre todo, se redujeron los sarcoides en aproximadamente el 75%. La preparación fue particularmente eficaz cuando se administró en la misma zona de drenaje de ganglios linfáticos que una lesión.  
55

Este tratamiento puede ser particularmente importante con este estado cuando existen evidencias de que el virus se restringe a las lesiones y existen pocas evidencias de que esté en la circulación (*Nasir et al Res. Vet. Sci. 1997, 63: 289-290*).  
60

Estos resultados indican que puede usarse, entre otros, *T. inchonensis* para tratar neoplasias de piel comunes asociadas con la presencia de papilomavirus, indicando que la presente invención será útil en el tratamiento de verrugas genitales y/o displasia del cuello uterino que precede a carcinoma del cuello uterino, por ejemplo, que están provocados ambos por infección por papilomavirus.  
65

Tabla 4: Diseño experimental. Grupos de 6 ratones cruzados hembra en destete recibieron los siguientes

	tratamientos:											
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56	Día 77	Día 84	Día 105
Grupo 1	R/r	DTP	DTP	DTP	MMR				BCG		TT	
Grupo 2	R/r				DTP	DTP	DTP	MMR		BCG		TT
Grupo 3		DTP	DTP	DTP	MMR				BCG		TT	
Grupo 4					DTP	DTP	DTP	MMR		BCG		TT
Grupo 5									BCG		TT	
Grupo 6					R/r					BCG		TT
Grupo 7		R/r/DTP	DTP	DTP	MMR				BCG		TT	

Leyenda

R/r *Rhodococcus ruber*  
 DTP Difteria/tétanos/tos ferina  
 MMR Sarampión/paperas/rubeola  
 BCG vacuna de BCG  
 TT Prueba de la tuberculina

Referencias

5

10 Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol*, diciembre de 2001;75(24):12182-7

15 Lio D, Balistreri CR, Candore G, D'Anna C, Di Lorenzo G, Gervasi F, Listi F, Scola L, Caruso C. In vitro treatment with interleukin-2 normalizes type-1 cytokine production by lymphocytes from elderly. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, mayo de 2000;22(2):195-203

Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*, 25 de febrero de 2000;18(16):1613-20

20 Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly: III. Innate immunity. *Immunol Res* 1999;20(2):117-26

25 Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activation in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol*, julio de 2001;21(4):264-71

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.*, diciembre de 2001;74(6):833-9.

30 de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis; a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.*, febrero de 2000;71(2):405-11.

Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review; the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionally as a probiotic. *J Dairy Sci*, febrero de 2001;84(2):19-31

35 Sharpe S, Fooks A, Lee J, Clegg C, Cranage M. Single oral immunisation with replication deficient recombinant adenovirus elicits long-lived transgene-specific cellular and humoral

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

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

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

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

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

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

57

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

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

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

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

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

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

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición inmunomoduladora o composición farmacéutica que comprende de  $10^4$  a  $10^{10}$  células completas muertas de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en el que dicha composición inmunomoduladora o composición farmacéutica modifica una respuesta inmunitaria celular, en el que la composición farmacéutica opcionalmente comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección, una alergia, cáncer relacionado con virus o estrés posoperatorio.
- 10 2. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica que comprende de  $10^4$  a  $10^{10}$  células completas muertas de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*, en la que dicha composición inmunomoduladora o composición farmacéutica modifica una respuesta inmunitaria celular, en la que la composición farmacéutica opcionalmente comprende un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección, una alergia, cáncer relacionado con virus o estrés posoperatorio.
- 15 3. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 o uso según la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende un antígeno y un adyuvante, en donde dicho adyuvante comprende una célula completa de una bacteria de los géneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* y *Tsukamurella*.
- 20 4. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3 o uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde dicha composición comprende además un antígeno o determinante antigénico.
- 25 5. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4 o uso según la reivindicación 4, en donde dicho antígeno o determinante antigénico es un antígeno o determinante antigénico seleccionado de uno o más de una vacuna de BCG (bacilo de Calmette y Guérin), una vacuna de toxoide diftérico, una vacuna de la difteria/tétanos/tos ferina, una vacuna de la tos ferina, la vacuna de toxoide tetánico, la vacuna del sarampión, la vacuna de las paperas, la vacuna de la rubeola, la VOP (vacuna oral de la poliomelitis) y de
- 30 *Mycobacterium vaccae*, o parte de las mismas.
- 35 6. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5 o uso según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde dicha composición comprende dos o más de tales antígenos o determinantes antigénicos.
- 40 7. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o uso según la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicha bacteria se selecciona del género *Rhodococcus*.
- 45 8. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7 o uso según la reivindicación 7, en donde dicha bacteria es una o más de las siguientes *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus rhodococcus*, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodococcus coprophilus*, *Rhodococcus opacus* y *Rhodococcus erythopolis*.
- 50 9. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o uso según la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en donde dicha bacteria se selecciona del género *Tsukamurella*.
- 55 10. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9 o uso según la reivindicación 9, en donde dicha bacteria es *Tsukamurella inchonensis*.
11. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o uso según la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde dicha bacteria se selecciona del género *Gordonia*.
12. Composición inmunomoduladora o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 o uso según la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde dicha bacteria se selecciona del género *Dietzia*.

Figura 1

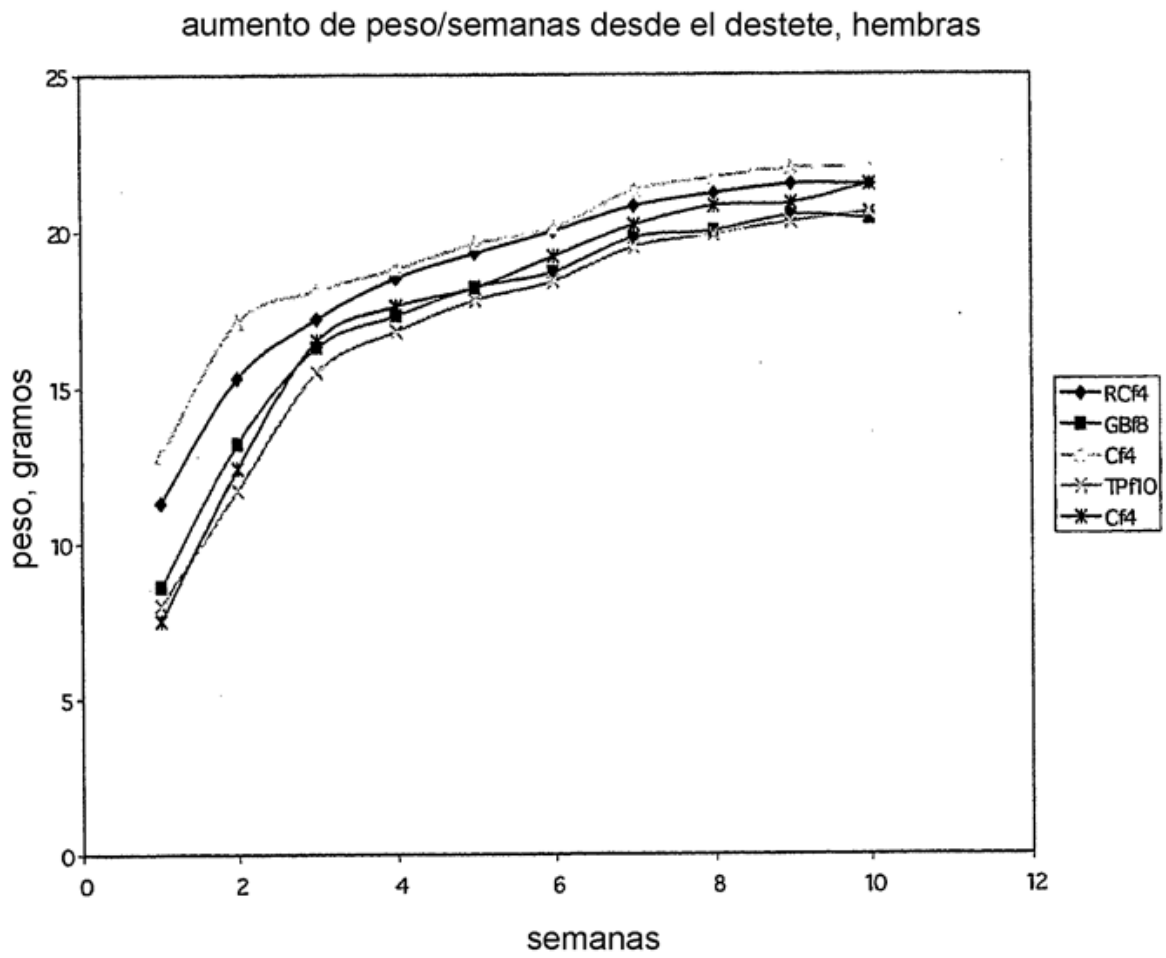




Figura 2

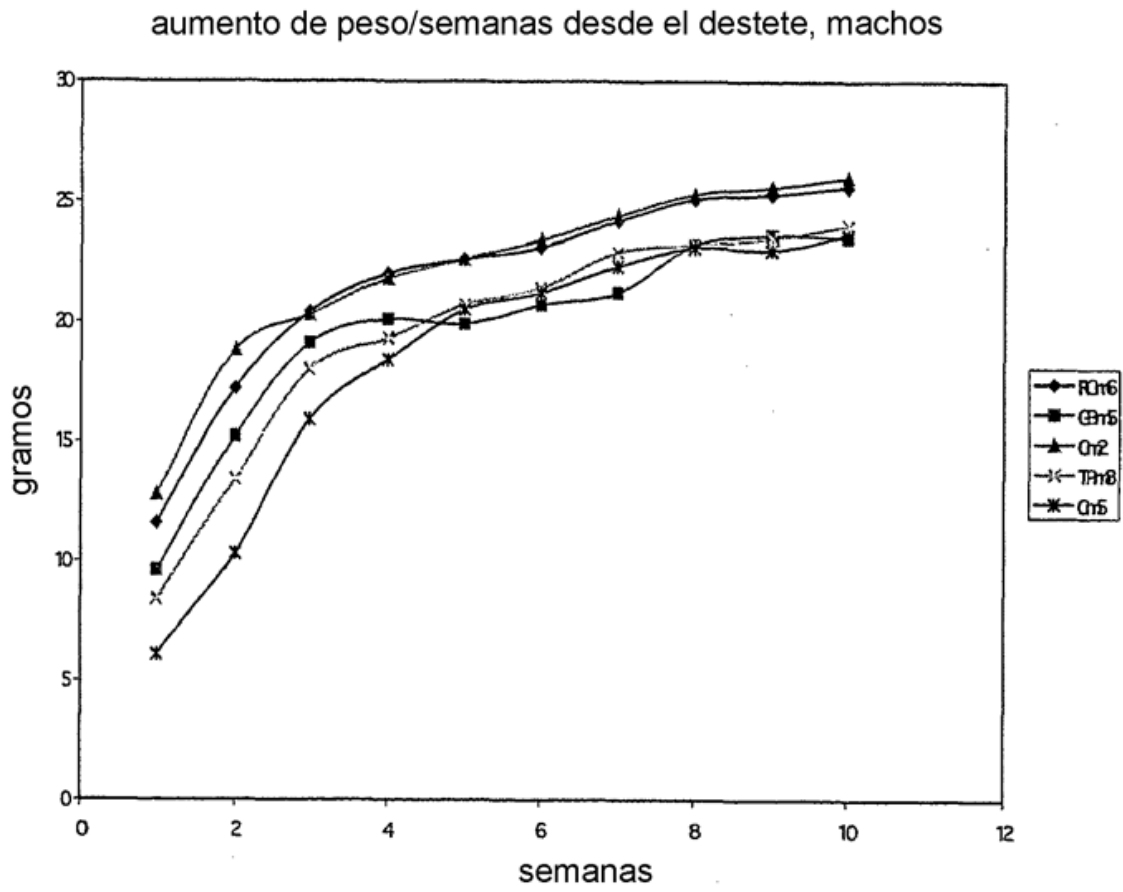


Figura 3

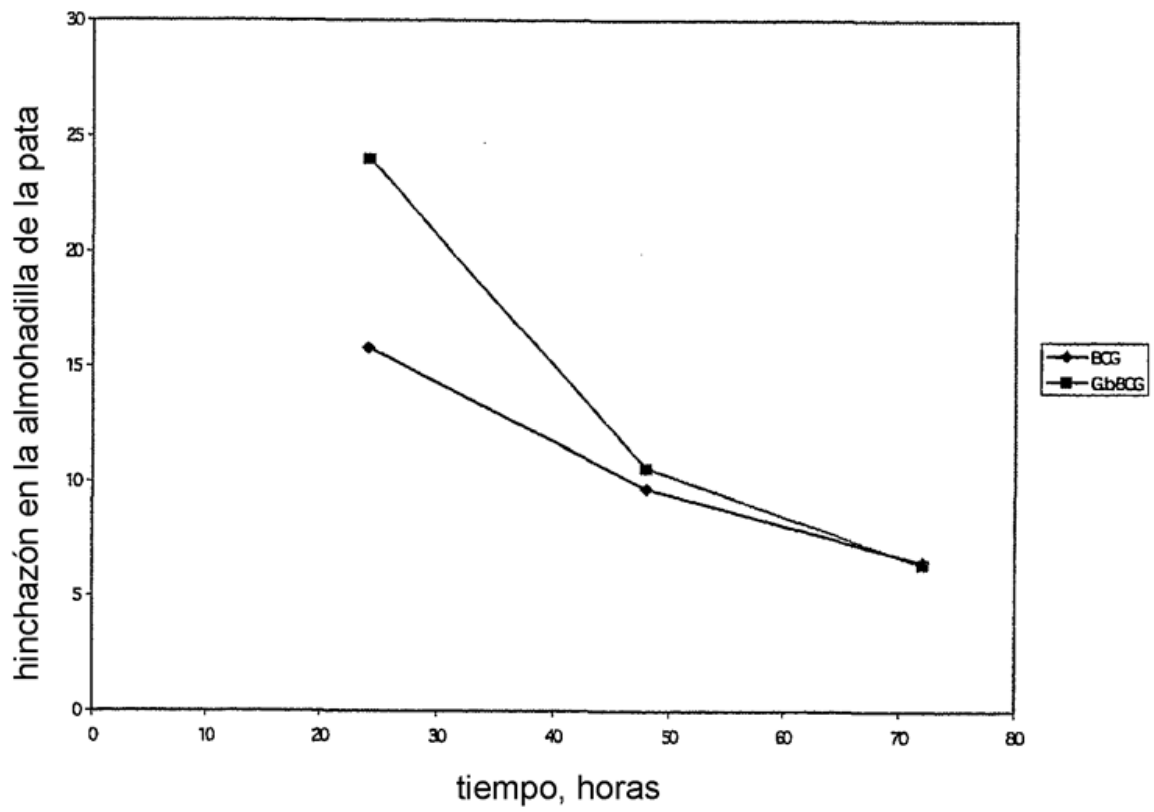


Figura 4

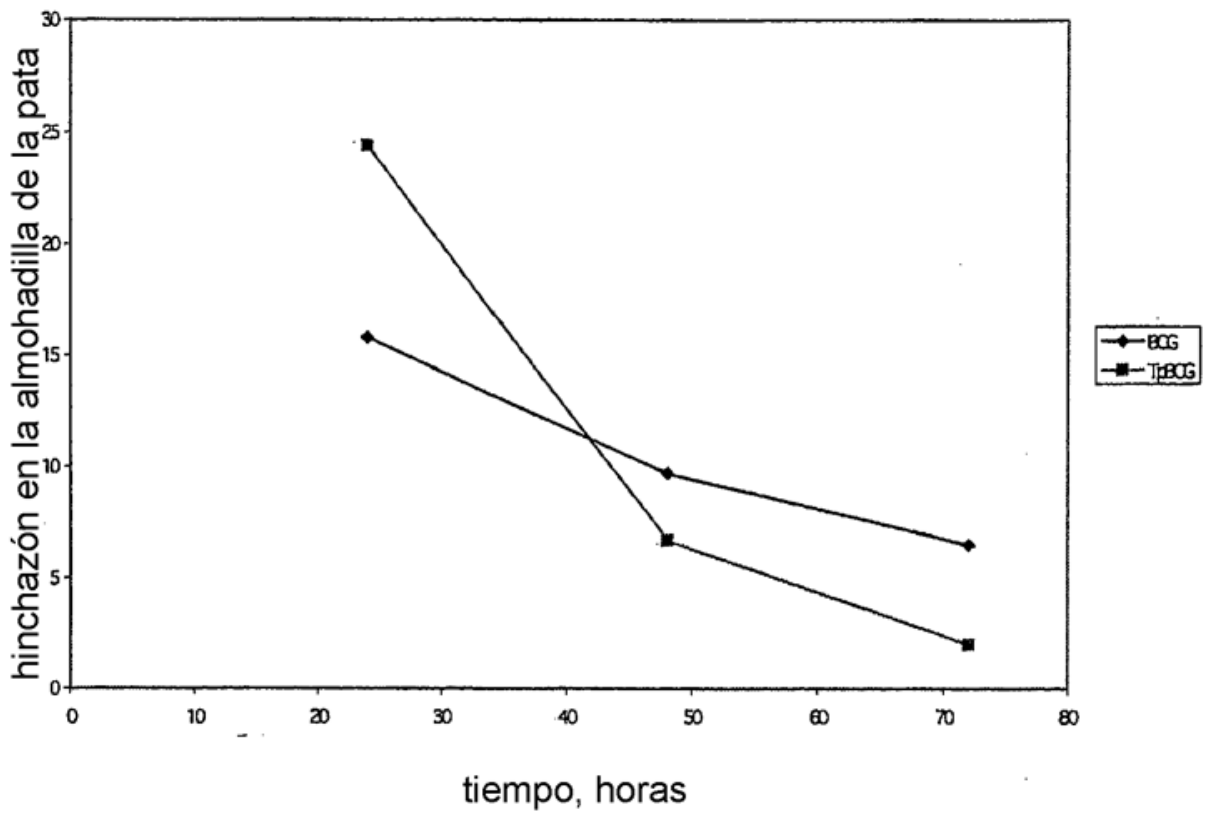


Figura 5

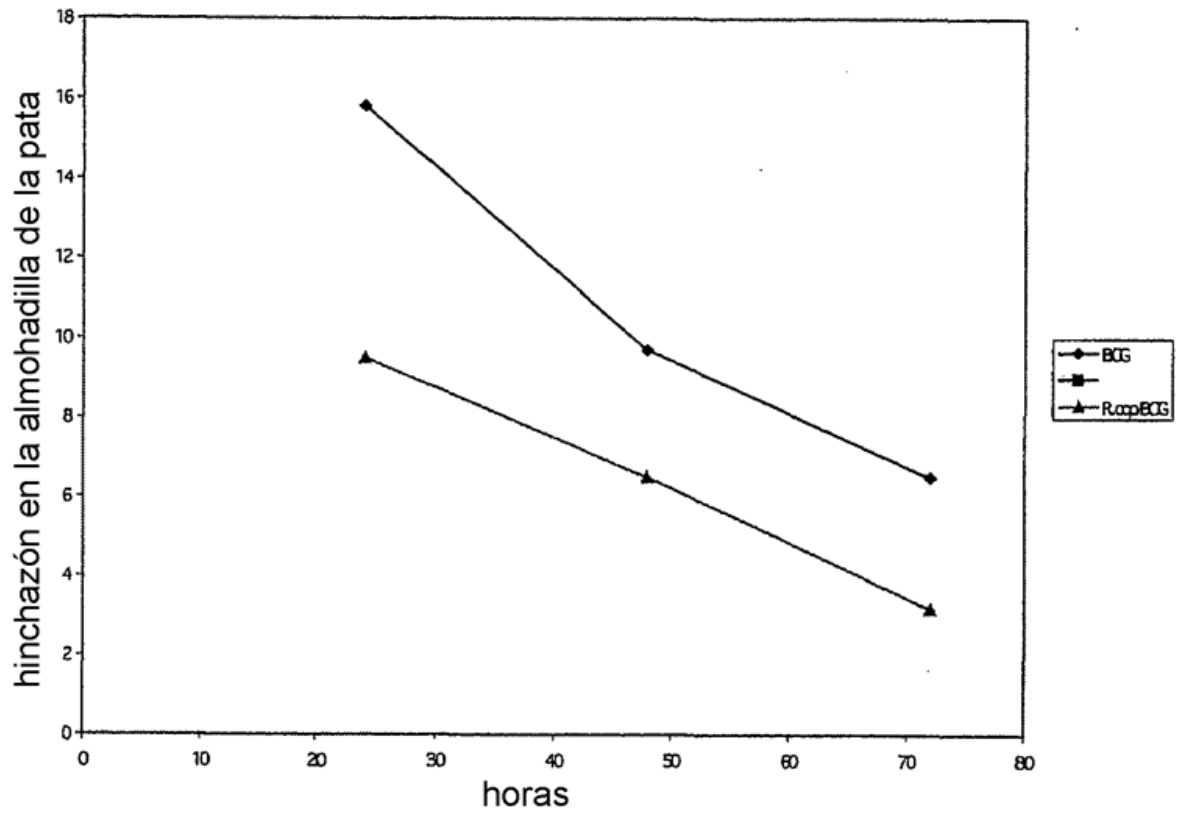


Figura 6

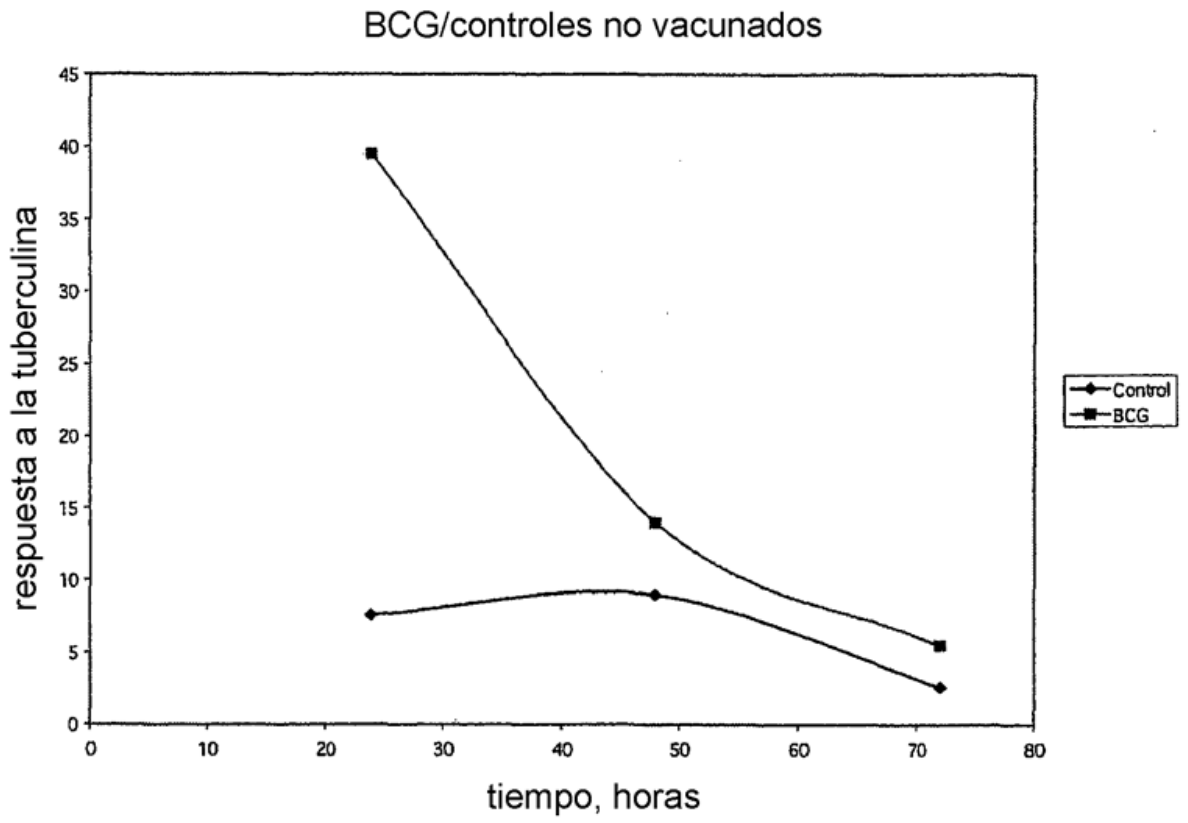


Figura 7

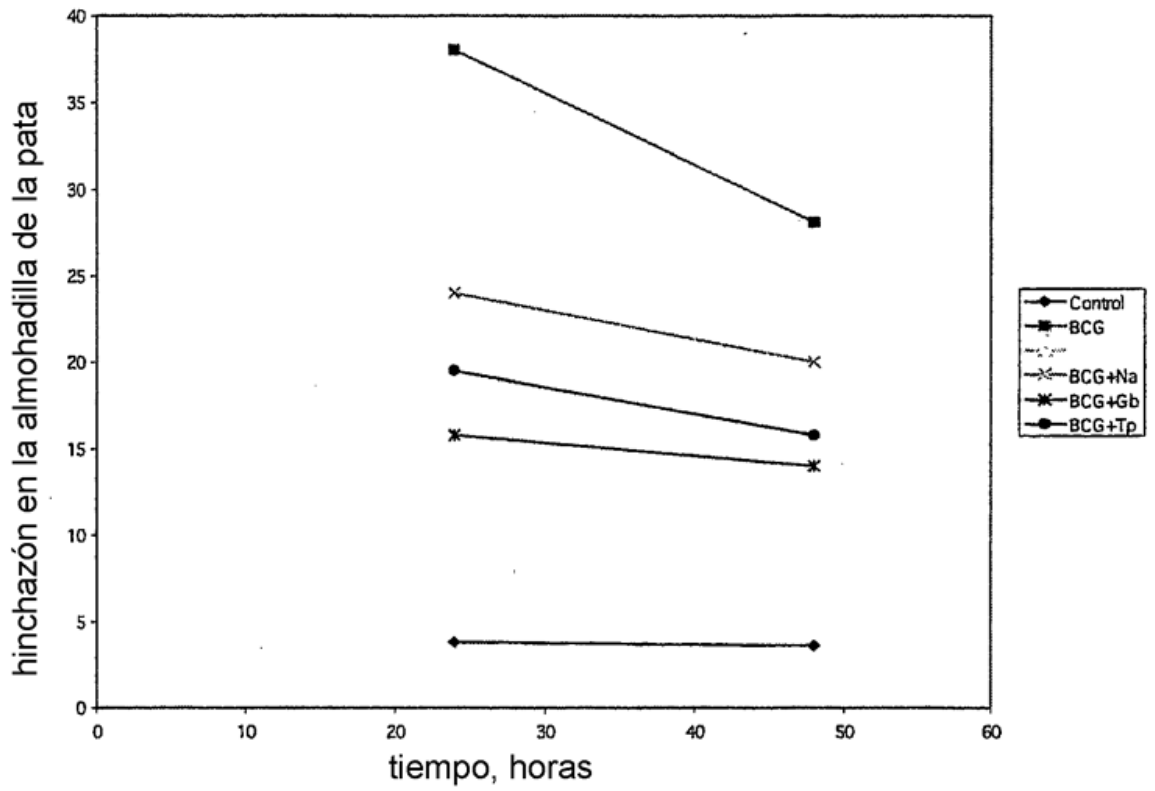


Figura 8

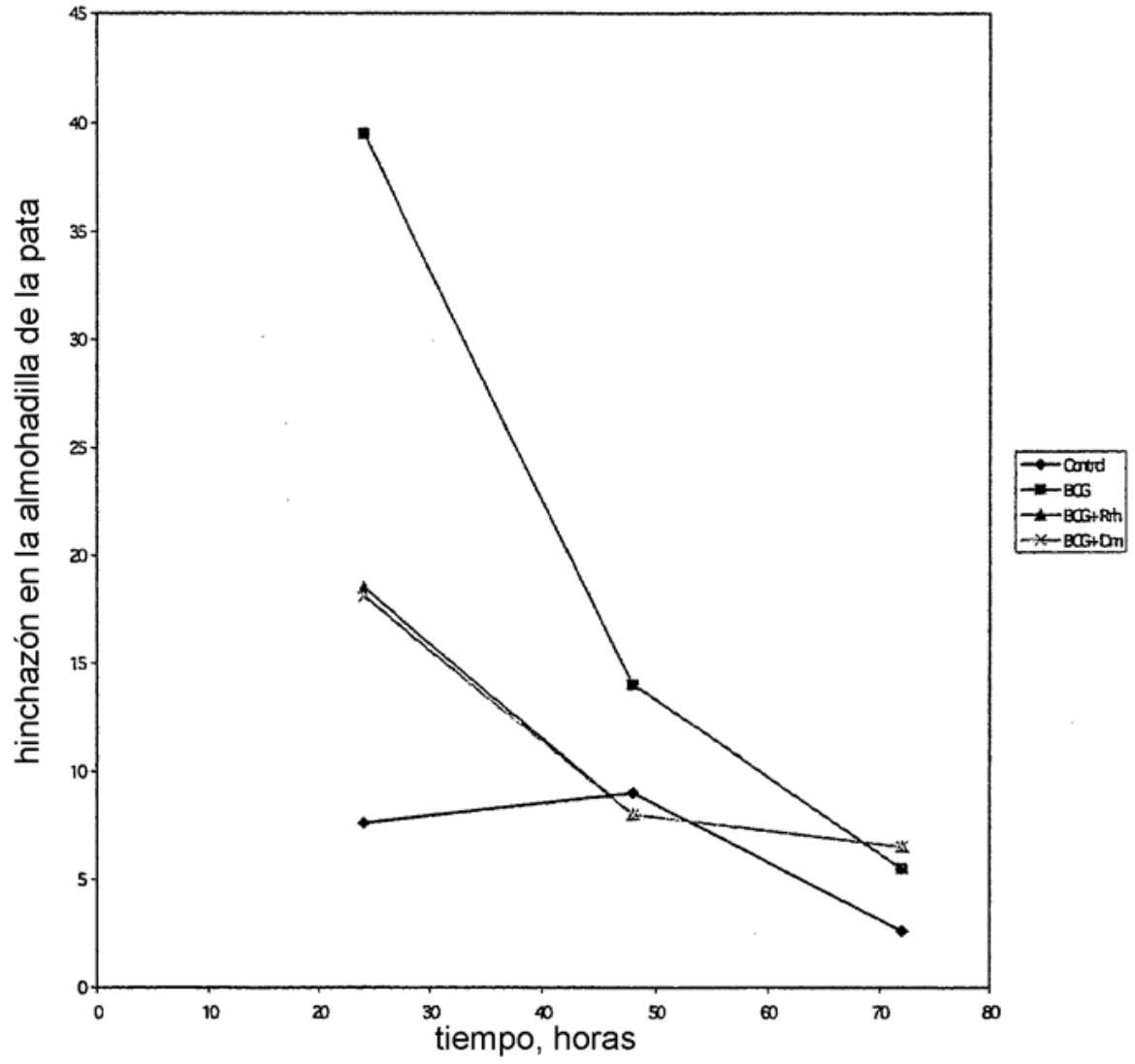


Figura 9

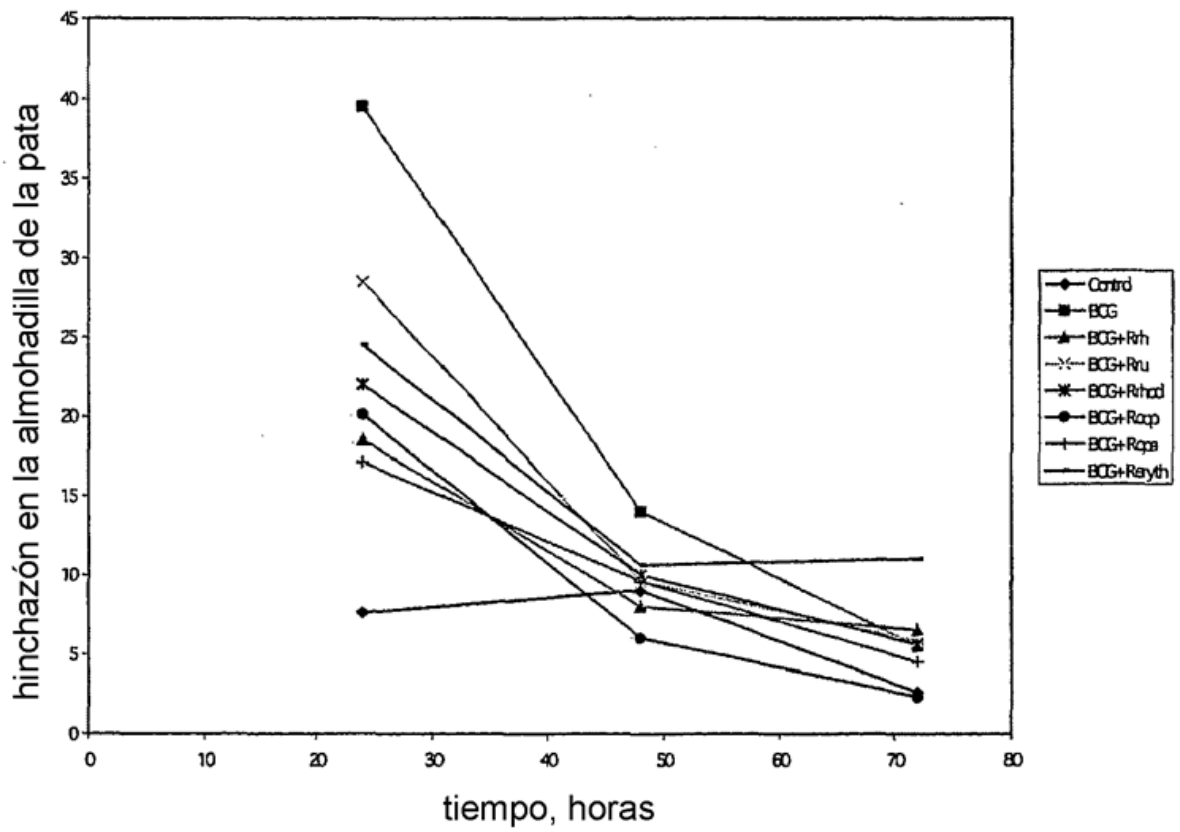




Figura 10

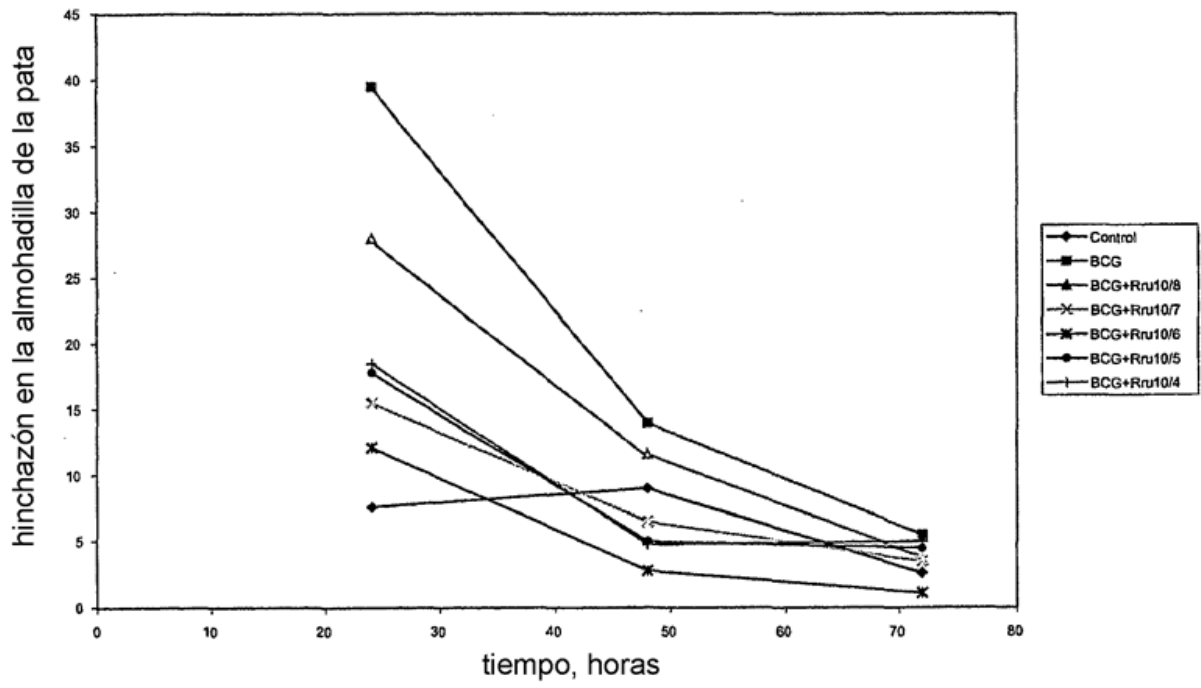


Figura 11

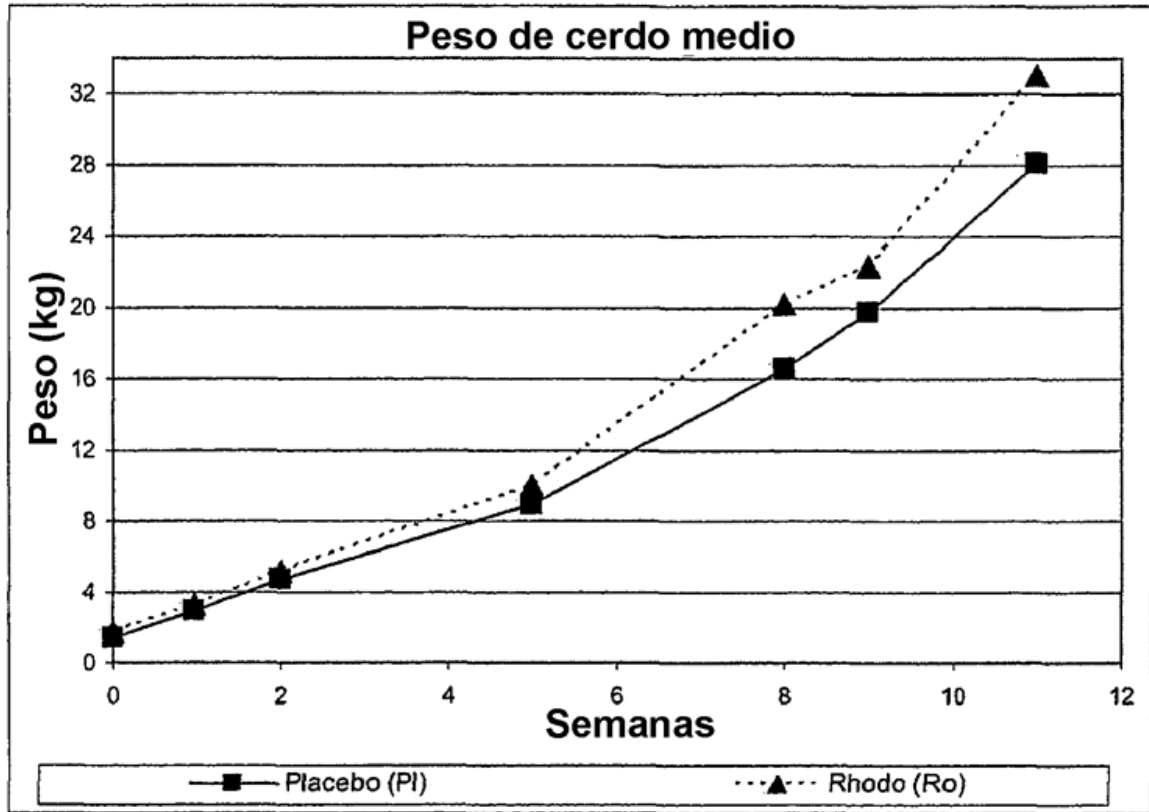


Figura 12

Caballo con picazón dulce. Enfermedad relacionada con inyecciones de *T. inchonensis*

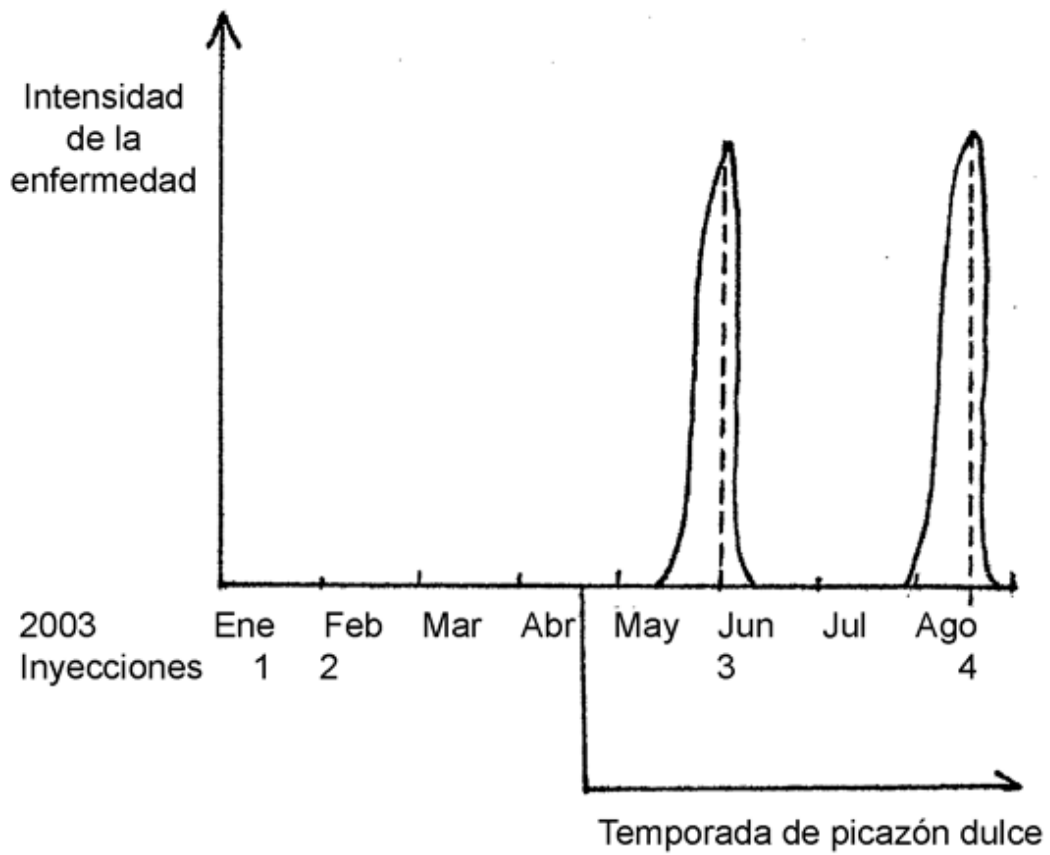


Figura 13

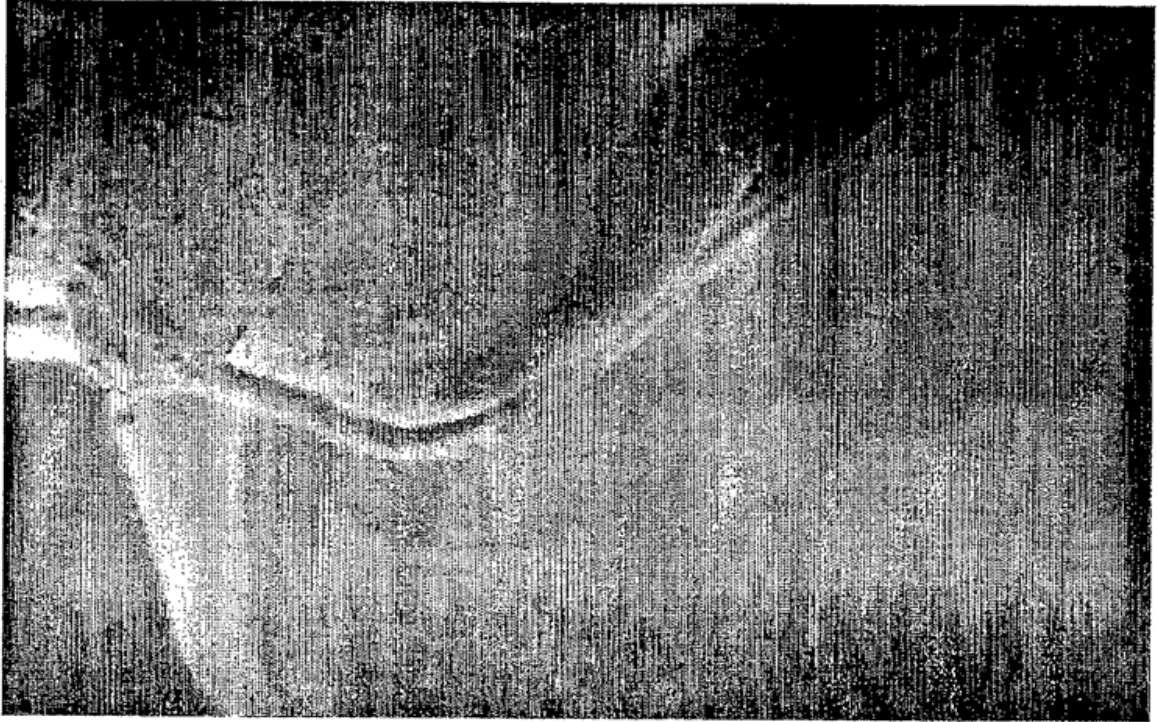


Figura 14



Figura 15



Figura 16

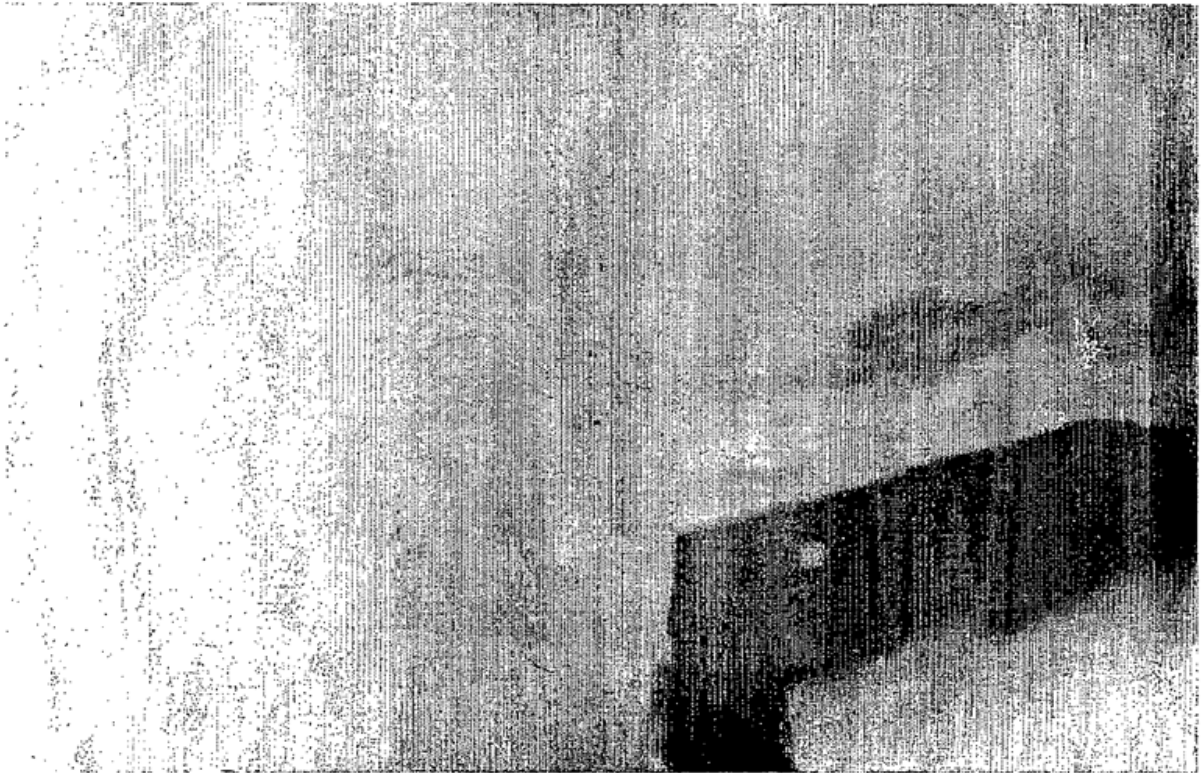


Figura 17





Figura 18

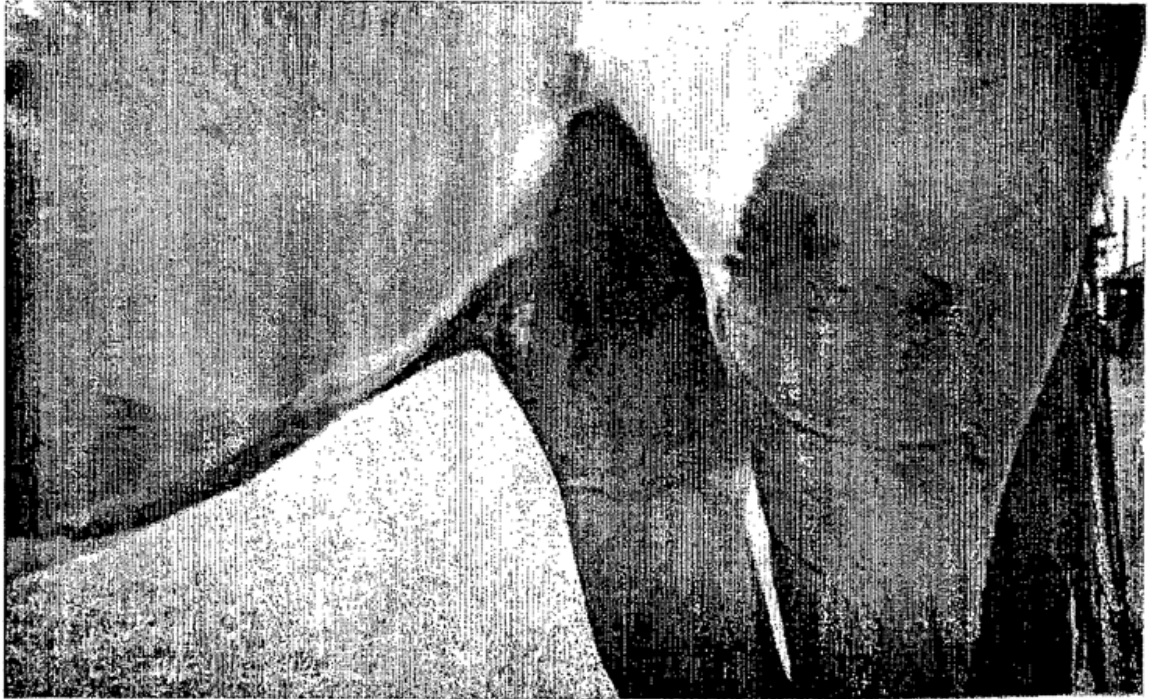


Figura 19



Figura 20

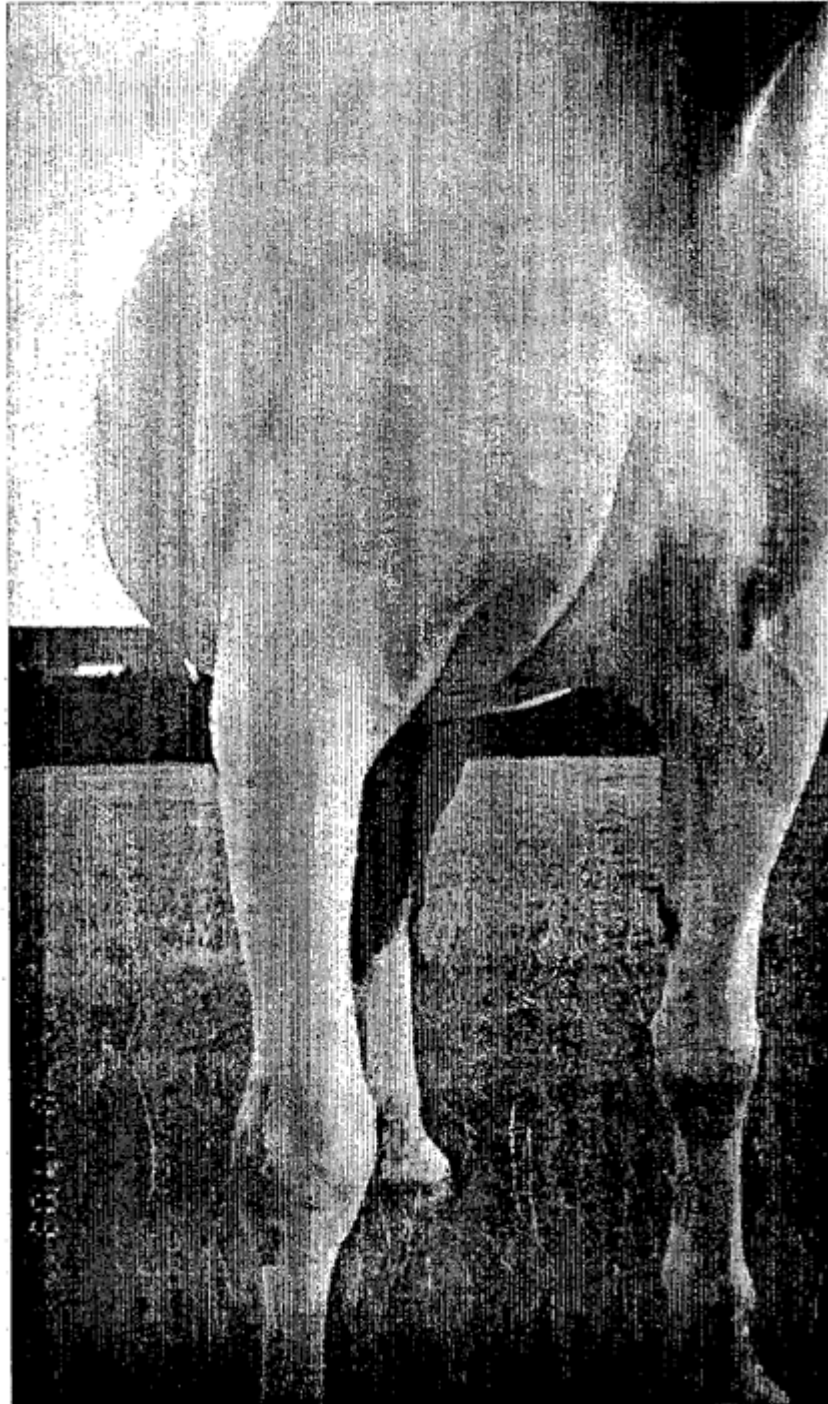


Figura 21

