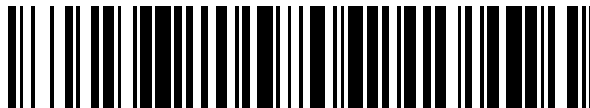


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 853**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2010 E 10787241 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2519252**

54 Título: **Inmunoterapia contra Pythium**

30 Prioridad:

28.12.2009 US 647971

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

19.10.2016

73 Titular/es:

BOARD OF TRUSTEES OF MICHIGAN STATE UNIVERSITY (100.0%)

**Michigan State University 238 Administrative Building
Lansing, MI 48824, US**

72 Inventor/es:

**MENDOZA, ALBERTO, L.;
GLASS, ROBERT, L. y
HANSEN, RICHARD, D.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 586 853 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

Inmunoterapia contra *Pythium*

Antecedentes de la invención

5 Esta invención se refiere a la exploración continua de *Pythium insidiosum*, su uso como un antígeno para vacunas profilácticas y terapéuticas y a métodos de aislamiento de la misma. En invenciones anteriores del Dr. Alberto L. Mendoza y otros coinventores junto con él, se usó la proteína de *P. insidiosum* para el tratamiento de infección por *P. insidiosum* en seres humanos y otros animales, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,948,413 del 9/7/1999; 6,287,573 del 9/11/2001; y 6,833,136 del 12/21/2004. En cada caso, la cepa fúngica utilizada allí se usó eventualmente sola o con otras células para el tratamiento de la Pitiosis tanto en seres humanos
10 como en otros animales. Las cepas fúngicas particulares utilizadas allí se depositaron en la colección de Cultivos Tipo de los Estados Unidos bajo el Tratado de Budapest como ATCC 74446 y/o ATCC 58643. Los animales que se trataron en esas patentes incluyeron seres humanos, caballos, perros y gatos. En todos los casos, en cada una de estas patentes un objetivo era el de preparar una vacuna de *Pythium insidiosum* para proporcionar una respuesta inmunológica beneficiosa en el tratamiento o prevención de la Pitosis. La divulgación de las patentes de los Estados
15 Unidos 5,948,413; 6,287,573; y 6,833,136 se incorpora por lo tanto aquí como referencia

El Dr. Mendoza y sus colegas han continuado trabajando con *P. insidiosum* en un esfuerzo por mejorar aquellas invenciones de sus patentes anteriores. Una mejora puede presentarse en una variedad de formas cuando se trata de vacunas. Una forma de mejora está en la eficacia del tratamiento o prevención específicos de la enfermedad. Otra forma de mejorar está en ampliar el cubrimiento de enfermedades que se pueden tratar o prevenir
20 efectivamente con una vacuna. Una manera aún adicional para mejorar una vacuna está en ampliar el número de especies que se pueden tratar con ella. La invención presente tiene como objetivo principal tanto ampliar el número de especies que se pueden tratar con proteína de *P. insidiosum* como ampliar el cubrimiento de enfermedades que se pueden tratar efectivamente al modular la respuesta inmunitaria en un animal.

No hace falta decir que hay una necesidad continua de vacunas que sean efectivas y que proporcionen una respuesta inmunitaria modulada eficiente para tratar efectivamente una variedad de enfermedades en una variedad de especies diferentes.
25

Resumen breve de la invención

Según la invención presente, se proporciona una vacuna inmunoterapéutica inyectable para uso en el tratamiento de algunas de las enfermedades en los grupos de:

30 cromoblastomicosis en seres humanos; sarcoidosis equina, granulomatosis exuberante, laminitis, alergia o anhidrosis en caballos;

mastocitoma, alergia y otitis externa, artritis o enfermedad inflamatoria del intestino en perros;

o asma o dermatitis miliar en gatos, dichas enfermedades no causadas por *P. insidiosum*,

y comprendiendo dicha vacuna:

35 proteínas expresadas a partir de la cepa *P. insidiosum* MTPI-04 en una solución vehículo acuosa, estéril e inyectable.

La invención presente proporciona una inmunoterapia contra *Pythium* producida a partir de la cepa *P. insidiosum* MTPI-04 (cepa Texas) mediante aislamiento y concentración de proteínas solubles. Esta inmunoterapia de cepa específica para *Pythium* se compone de todas las proteínas que se encuentran en el extracto alergénico de *Pythium* (PAE) descrito en patentes anteriores del Dr. Mendoza, pero contiene adicionalmente otras diversas proteínas, que incluyen una cantidad significativamente mayor de proteínas de 28kDa expresadas mediante el MTPI-04. En resumen, el perfil de la proteína expresada es muy diferente en este caso.
40

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

45 Esta invención se relaciona con un producto para inmunoterapia contra *Pythium*, el cual puede administrarse, por ejemplo, mediante inyección.

Como se usa aquí, la cepa MPTI-04 (cepa Texas) de *Pythium insidiosum* se refiere a la cepa MPTI-04 la cual produce una respuesta efectiva inmunitaria modulada, la cual es una respuesta que se puede usar para proporcionar

5 un beneficio demostrado de inmunoterapia contra *Pythium* en el tratamiento o manejo de enfermedades diferentes a las causadas por *Pythium insidiosum*, como por ejemplo: Sarcoidosis (Equino), Mastocitoma (Canino); Enfermedad Alérgica (Canino, Equino); Enfermedad inflamatoria del intestino (Canino); Dermatitis miliar (Felino); Granulomatosis exuberante (Equino); Cromoblastomycosis (Seres humanos); Asma (Felino); Otitis externa (Canino); Artritis (Canino); Anhidrosis (Equino); y Laminitis (Equino).

10 No se sabe lo que es peculiar y único acerca del *P. insidiosum* cepa MTPI-04 (cepa Texas) que le permite modular efectivamente el sistema inmunológico y proporcionar inmunoterapia contra enfermedades más allá de las causadas por *Pythium insidiosum*. Aunque el solicitante no desea limitarse a ninguna teoría, es posible que las otras proteínas expresadas diferentes a las expresadas por las cepas utilizadas en nuestras patentes anteriores, y/o que las diferentes proporciones de proteína puedan ser factores. Por ejemplo se ha observado que hay una cantidad significativamente más grande de proteínas de 28k Da y que la expresión de una proteína en aproximadamente 124 kDa parece ser única a la cepa MTPI-04 (cepa Texas). Véase Chindamporn et al, Clinical Vaccine Immunology, Antibodies in the Sera of Host Species with Pythiosis Recognize a Variety of Unique Immunogens in Geographically Divergent *Pythium insidiosum* Strains, Vol. 16, No. 3, pp. 330-36, Tabla 3 MTPI-04 en la página 334.

15 Con respecto al *P. insidiosum* cepa MTPI-04, los Solicitantes afirman que tras la admisión de las reivindicaciones, los Solicitantes podrán depositar *P. insidiosum*, cepa MTPI-04, tal como se describe en esta memoria descriptiva presentada originalmente, y modificarán las reivindicaciones como un inserto necesario del número ATCC en las reivindicaciones. Los Solicitantes aseguran adicionalmente que:

- a) durante la tramitación de esta solicitud se otorgará acceso a la invención al Comisionado a pedido;
- 20 b) todas las restricciones a la disponibilidad a la voluntad pública se eliminarán irrevocablemente tras la concesión de la patente;
- c) el depósito se mantendrá en un depósito público por un período de treinta años, o cinco años después de la última petición durante la vida ejecutable de la patente, lo que en cualquier caso sea mayor;
- 25 d) se llevará a cabo un ensayo de la viabilidad del material biológico en el momento del depósito (véase 37 C.F.R. § 1/807); y
- e) el depósito será reemplazado si es que alguna vez se convierta en no viable

Los solicitantes indican que esta oferta de depósito completa los requisitos del U.S.C. 35 § 112 con respecto al *Pythium insidiosum*, cepa MTPI-04, se cumplen y todos los requerimientos del C.F.R. 37 §§ 1,801-1,809.

30 Si bien la descripción de aquí en adelante se da principalmente en conjunción con las vacunas inyectables en solución acuosa estéril, la vacuna se puede administrar de otras maneras tales como inyección sin aguja, un implante de dosis sólida, por vía tópica o incluso por vía oral, ocular, inhalación o administración de supositorio.

El proceso de producción de la vacuna comienza con el cultivo de las células de *Pythium insidiosum* cepa MTPI-04 en un medio de cultivo. La preparación del cultivo madre, del inóculo de semilla y del producto terminado pueden suceder de la manera siguiente. Los pasos se categorizan y se enumeran, por conveniencia.

35 Crecimiento de los cultivos

1. Los cultivos de la cepa MTPI-04 se almacenan/mantienen en alguna de las tres (3) siguientes formas:
 - a) Liofilizados
 - b) Congelados
 - c) Mediante cultivo de hifas mantenidas en agar harina de maíz (CMA) o agar dextrosa Sabouraud (SDA)
- 40 2. Una placa con SDA se inocula con uno de los cultivos mencionados y se incuba a 37°C durante aproximadamente 24 horas. Esto representa el Cultivo de Producción #1.
3. Se transfiere una porción de la colonia de hifas a otra placa con SDA y se incuba durante otras 24 horas a 37°C. Esto representa el Cultivo de Producción #2.

ES 2 586 853 T3

4. Se transfiere una porción de la colonia de hifas a otra placa con SDA y se incuba durante otras 24 horas a 37°C. Esto representa el Cultivo de Producción #3. Mediante este tercer cultivo las hifas deberían estar sanas y listas para inocularse en un medio líquido.
5. Se prepara(n) el(los) matraz(ces) de agitación con caldo Sabouraud dextrosa estéril (SDB), se llenan a la mitad de su volumen completo.
6. Se inocula(n) el(los) matraz(ces) que contenga(n) SDB tibio (37°C) con una porción del Cultivo de Producción #3. Se incuba(n) el(los) matraz(ces) a 37°C en una centrífuga a aproximadamente 150 rpm durante 5 a 7 días hasta que el cultivo tenga una maraña de hifas confluentes.

Extracción de la proteína

- 10 1. Se transfieren de manera aséptica los fluidos de cultivo a la cubierta del filtro de un filtrador estéril al vacío/en botella equipado con un filtro de clarificación. Tras la aplicación de vacío al brazo receptor de la tapa de la botella, las hifas permanecen por encima del filtro y el fluido que contiene proteínas extracelulares solubles (filtrado) se recoge en la botella receptora. Registre el volumen de filtrado y almacene a 2-7 °C.
- 15 2. Las hifas se transfieren de manera aséptica a un mortero estéril previamente enfriado que contiene nitrógeno líquido. Este congelamiento rápido inactiva efectivamente el cultivo de *Pythium insidiosum*. Un mazo de mortero estéril se usa para romper las células y volver la masa en un polvo. El polvo se suspende en agua estéril desionizada, se mezcla bien y se incuba a 2-a 7 °C durante 1 hora. La suspensión de hifas pulverizadas en agua contiene proteínas intracelulares solubles y fragmentos de hifas insolubles.
- 20 3. La suspensión se centrifuga a aproximadamente 750 x g durante 1 hora, luego el sobrenadante que contiene proteínas intracelulares solubles se recoge y se almacena a 2 a -7 °C.
4. El filtrado del Paso 1 anterior y el sobrenadante del paso 3 anterior se combinan y se vierten en un matraz Erlenmeyer y se adiciona acetona hasta que la suspensión se vuelve de una apariencia blanco lechosa. Esta suspensión se pone a 2º a 7 °C hasta que suceda la clarificación y la proteína extracelular se recoge del fondo del matraz.
- 25 5. Se decanta cuidadosamente el sobrenadante de acetona y se deja que el precipitado se seque al aire libre a temperatura ambiente bajo una campana extractora durante 20 minutos para que toda la acetona remanente se evapore.
6. Se recoge la proteína precipitada con un volumen de agua desionizada estéril suficiente para disolver el precipitado y se mantiene a 2-7 °C durante 24 horas para disolver las proteínas solubles.
- 30 7. Se centrifuga la mezcla de las proteínas solubles intracelulares y extracelulares a 750 x g durante 30 minutos. Se recoge el sobrenadante que contiene únicamente las proteínas solubles y se descarta el precipitado que contiene cualquier remanente de proteínas insolubles.
- 35 8. Se somete a diafiltración el sobrenadante en refrigeración usando una cubierta de filtro estéril equipado con un filtro de unión no proteico de 10.000 MWCO. El filtrado se descarta y el retenido se almacena refrigerado a 2-7 °C o se mantiene congelado hasta que el producto terminado pueda prepararse.
9. Antes de almacenar el concentrado, se toma una muestra, se mide y registra la proteína extracelular/intracelular total combinadas.

Preparación del producto terminado

- 40 1. Se diluye el concentrado con solución salina estéril al nivel de proteína deseado, luego se mide una vez más para confirmar.
2. Se llenan viales estériles de dosis unitaria múltiples o individuales con el producto terminado. Un filtro de 0,2 micras se incorpora en línea para ayudar a asegurar la esterilidad del producto.
3. Se aplican los tapones de los viales estériles, luego se fijan con sellos de aluminio.

45 Existe una diferencia principal en el método de producción y el aislamiento de la cepa de la invención presente de aquellas usadas en patentes previas de Mendoza et al., a saber, el método de producción en el nuevo producto es diferente al de las patentes anteriores en las formas siguientes:

1. La cepa MTPI-04 se utiliza en lugar de la cepa MTPI-19 (ATCC 74446 y/o ATCC 58643); y
2. La destrucción criogénica de las hifas se utiliza para inactivar el cultivo de *Pythium*, en lugar de usar un agente químico.

5 Preferiblemente, el concentrado inmunoterapéutico contiene entre aproximadamente 20 mcg a 5,0 mg de proteína por dosis. La dosis inmunoterapéutica preferida para algunos animales es entre aproximadamente 20 mcg/ml y 40 mcg/mL.

El agente inmunoterapéutico de la invención presente se inyecta preferiblemente por vía intramuscular. La vacuna también se puede administrar por vía subcutánea o por vía intradérmica a través de métodos con aguja o sin aguja.

10 Un vehículo estéril se utiliza en el inmunoterapéutico. El vehículo preferido es agua o una solución salina acuosa, particularmente en seres humanos.

El agente inmunoterapéutico puede combinarse con componentes inmunizantes contra otras enfermedades para producir una vacuna multivalente.

En los ejemplos siguientes, el agente inmunoterapéutico mejorado se preparó a partir *P. insidiosum* cepa MTPI-04 que se cultiva, aísla, extrae y almacena como se describió anteriormente. Se almacenó a 2-7 ° C hasta su uso.

15 Para todos los ejemplos a continuación el vehículo fue solución salina solución y para los Ejemplos 3-4, y 6-12 de cada dosis era de 40 mcg.

EJEMPLO 1

Humano

A. Cromoblastomycosis

20 Un hombre brasileño de 74 años de edad, presentaba una historia de 54 años con una infección fúngica de cromoblastomycosis en su brazo derecho. El paciente se trató varias veces en el tiempo con medicamentos antifúngicos como itraconazol, ketoconazol y la anfotericina B sin éxito. Entró en el Instituto de Dermatología (ISMD) en Belo Horizonte, Brasil debido a que las lesiones en su brazo aumentaban de tamaño. Con base en la larga historia de tratamientos sin éxito con fármacos antifúngicos convencionales, el tratamiento se inició con el uso de inyecciones del producto inmunoterapéutico de *Pythium* derivado de la cepa MTPI-04 a 20 mcg/dosis, por vía subcutánea, una semana por un mes. Hubo una reducción significativa del tamaño de la lesión durante el período de tratamiento inicial de 7 meses. Puesto que el ISMD encontró aún "cuerpos escleróticos" en algunas lesiones pequeñas residuales durante la última visita del paciente el 11 de diciembre de 2009, se sugiere que la infección aún está presente en un nivel menor, pero el tratamiento parece haber hecho disminuir y controlado la progresión de la enfermedad. La inmunoterapia comenzó de nuevo con el paciente programado para visitar el ISMD durante febrero de 2010.

EJEMPLO 2

Equino

A. Sarcoidosis

35 La sarcoidosis equina es el tumor de piel más común en caballos alrededor del mundo. Se acepta ampliamente que estos tumores benignos localmente agresivos se asocian con el virus del papiloma bovino. Cuatro (4) veterinarios que tratan un total de 6 casos de la enfermedad de sarcoidosis equina con inyecciones subcutáneas del inmunoterapéutico de *Pythium* (20 mcg/dosis) informaron de una resolución completa de las lesiones de sarcoidosis en 4 casos y 50 % de reducción de las lesiones en los 2 casos restantes.

40 EJEMPLO 3

B. Granulación exuberante ("Tejido granular")

Una yegua de 30 años de edad experimentó una herida en su miembro posterior derecho a la altura del hueso metatarsiano proximal que posteriormente curó con tejido de granulación, confirmado por histopatología. Tras la resección definida del tumor de 10 cm, se administró una serie de 4 inyecciones intramusculares semanales del

Inmunoterapéutico de Pythium. Sin tratamiento auxiliar, la lesión sanó completamente durante un período de 5 meses. El caballo desarrolló posteriormente una capa de invierno extremadamente gruesa, algo que no había hecho durante muchos años.

EJEMPLO 4

5 C. Laminitis

Un caballo con historia de claudicación menor debida a enfermedad del hueso navicular tuvo también el diagnóstico de laminitis. Al paciente se le administraron 3 inyecciones semanales del agente inmunoterapéutico de Pythium. Se observó resolución de la claudicación dentro de las 24 horas después de cada tratamiento, sin embargo, la claudicación volvió al día 6 después de cada tratamiento. Se administró un ciclo adicional de 3 inyecciones semanales, esta vez no se montó el caballo durante el período de tratamiento. Se observó aproximadamente 90% de recuperación clínica y el paciente continuó mejorando.

EJEMPLO 5

D. Alergia

15 Un caballo con una historia de signos atópicos y niveles altos de anticuerpos de IgE en el suero en simultáneo contra alérgenos múltiples alérgenos se trató con una combinación de agente inmunoterapéutico de Pythium por vía subcutánea en una dosis de 20 mcg y con varias inyecciones del extracto del alérgeno en los días 1, 14 y 30. La IgE sérica específica para los alérgenos usados en el conjunto de tratamiento demostró sustancialmente una reducción de los niveles en el día 30. Para el día 60, la IgE sérica se encontraba dentro de los límites normales y se resolvieron los signos clínicos atópicos.

20 EJEMPLO 6

E. Anhidrosis

25 A un caballo con una historia de 2 años de anhidrosis clínica (incapacidad para transpirar) se le dieron 3 inyecciones subcutáneas (días 1, 7 y 21) del agente inmunoterapéutico de Pythium, 40 meg/dosis. Siete (7) días después del tercer tratamiento, el caballo transpiró normalmente durante el ejercicio. El veterinario tratante reporta que el paciente continúa transpirando normalmente durante el ejercicio a los 90 días después de la tercera inyección.

EJEMPLO 7

Canino

A. Mastocitoma

30 A una perra de 12 años de edad, castrada, de raza mezclada se le extrajeron quirúrgicamente seis (6) mastocitomas (MCT) en un período de 2 años. Un MCT nuevo y suave que medía 4–5 cm de diámetro apareció a la altura de la cruz dorsal y el propietario rechazó cirugía adicional. Se comenzó con una inmunoterapia subcutánea de Pythium y una semana después cuando se presenta para un segundo tratamiento, el tumor medía 2 x 3 cm y estaba duro. Al tercer tratamiento, una semana después, el tumor era circular, medía 1,5 cm de diámetro y 0,5 cm de espesor y estaba muy duro. Al cuarto tratamiento una semana después, el tumor tenía 1.25 cm de diámetro y 0.5 cm de espesor, estaba muy duro e indoloro. Se administró por inyección subcutánea. Una semana después del cuarto tratamiento, el tumor continuó encogiéndose a 1.0 cm de diámetro y después desapareció. Ningún MCT volvió a aparecer.

EJEMPLO 8

B. Alergia y Otitis externa

40 Una hembra Cocker Spaniel entera de 8 años de edad sufrió de alergia severa en la piel la mayor parte de su vida. Sus oídos estaban especialmente sucios y llenos de secreción purulenta y tenía una gran lesión de piel en su pecho que se negaba a sanar. Se le administraron semanalmente inyecciones subcutáneas del agente inmunoterapéutico de Pythium durante 4 semanas, pero se apreciaron mejorías a la semana 1 tras el tratamiento inicial. La lesión del pecho sanó y las orejas se encontraban clínicamente normales, es decir, sin inflamación, sin secreción y sin olor. Hacia la cuarta inyección los oídos parecían aún normales.

EJEMPLO 9

C. Artritis

- 5 Un pastor de las Islas Shetland castrado de 5 años de edad presentaba displasia de cadera congénita y alergias extremas y recurrentes de piel. Se trató con cuatro inyecciones subcutáneas semanales. Cinco (5) días tras la primera inyección subcutánea con el agente inmunoterapéutico de Pythium, el perro no presentaba prurito y actuaba como si su cadera no lo estuviera molestando. Al momento de la última inyección, el perro seguía muy activo a pesar de que todavía se encontraba algo lento para levantarse después de descansar. No había problemas alérgicos en piel aparentes. Un año después el dueño informó que se encontraba mucho mejor, solamente con problemas alérgicos leves que requerían antihistamínicos y su artritis seguía mucho mejor.

EJEMPLO 10

10 D. Enfermedad Inflamatoria Intestinal

- 15 Un terrier macho mezclado castrado de 10 años de edad con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD) presentaba episodios continuos de vómito y diarrea. Se le trató con cuatro inyecciones subcutáneas semanales. Los signos clínicos mejoraron notoriamente tras la inyección subcutánea inicial del agente inmunoterapéutico del Pythium y el perro no presentó más episodios gastrointestinales, se encontraba mucho más calmado y ganó 0,77 kilos (1,7 libras) al momento que se presentaba para el tercer tratamiento.

EJEMPLO 11

Felino

A. Asma

- 20 Una gata siamesa esterilizada de 10 años de edad presentaba problemas respiratorios consistentes con asma felino por alrededor de 2 años. Se le trató con cuatro inyecciones subcutáneas semanales. Al momento de la inyección inicial del agente inmunoterapéutico de Pythium, la gata presentó disnea espiratoria severa. En la segunda inyección, la gata aún presentaba disnea ligera pero no tan severa. La gata se encontraba clínicamente normal, sin disnea, cuando se presentó para su tercera inyección.

EJEMPLO 12

25 B. Dermatitis miliar

- 30 Un gato de raza Manx castrado de 10 años de edad mostraba lesiones extremas por dermatitis miliar. Presentaba alopecia y una piel con mucho prurito, seca y escamosa en más de aproximadamente el 70% de su cuerpo. Se inició una inmunoterapia subcutánea de Pythium. Al segundo tratamiento la alopecia comenzó a resolverse y la piel ya no estaba tan caliente ni inflamada. Después de un tratamiento de 8 semanas en total, el pelo creció nuevamente, la piel se encontraba normal y el gato no se rascaba más. Quedó un área pequeña de alopecia sobre el abdomen caudal ventral.

Reivindicaciones

1. Una vacuna inmunoterapéutica inyectable para uso en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades en los grupos de:
cromoblastomicosis en seres humanos;
- 5 sarcoidosis equina, granulomatosis exuberante, laminitis, alergia o anhidrosis en caballos;
mastocitoma, alergia y otitis externa, artritis o enfermedad inflamatoria del intestino en perros;
o asma o dermatitis miliar en gatos, dichas enfermedades no causadas por *P. insidiosum*, y dicha vacuna que comprende:
- 10 proteínas expresadas a partir de la cepa *P. insidiosum* MTPI-04 en una solución vehículo acuosa, estéril e inyectable.
2. La vacuna para uso según la reivindicación 1 en la que la proteína de *P. insidiosum* MTPI-04 está a un nivel de 20 mcg a 5.0 mg por dosis.
3. La vacuna para uso según la reivindicación 1 en la que la vacuna es una combinación de proteínas intracelulares y extracelulares de *P. insidiosum* MTPI-04.
- 15 4. La vacuna para uso según la reivindicación 1 en la que la solución vehículo es una solución salina acuosa.
5. La vacuna para uso según la reivindicación 1, la cual incluye un adyuvante.
6. La vacuna para uso según la reivindicación 5, la cual es parte de una vacuna polivalente.