



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 293 898**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/39 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00926717 .0**

(86) Fecha de presentación : **12.05.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1183044**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

(54) Título: **Combinaciones de adyuvantes para inmunización y vacunas.**

(30) Prioridad: **12.05.1999 DK 1999 00655**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(73) Titular/es: **Statens Serum Institut
Artillerivej 5
2300 Copenhagen S, DK**

(72) Inventor/es: **Lindblad, Erik, B.;
Elhay, Martin, J.;
Andersen, Peter y
Brandt, Lise, Ostergaard**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Combinaciones de adyuvantes para inmunización y vacunas.

5 La presente invención se refiere a combinaciones de adyuvantes que comprenden dos o más adyuvantes diferentes. En particular, la invención se refiere a composiciones de adyuvantes que comprenden los adyuvantes en medios acuosos para inmunización y vacunas.

10 La invención también se refiere a vacunas y kits de combinación de inmunización que comprenden dos o más adyuvantes y una sustancia antigénica.

Antecedentes de la invención

15 Desde que el médico inglés Edward Jenner descubriera en 1796 que el agente infeccioso que causa la viruela vacuna en el ganado puede producir inmunidad frente a la viruela en los seres humanos sin causar una enfermedad grave, se han realizado muchos esfuerzos con el fin de hallar otras vacunas que puedan generar inmunidad frente a enfermedades más o menos graves en animales y seres humanos sin provocar los síntomas y reacciones desagradables, graves o mortales que acompañan normalmente a las enfermedades habituales en cuestión.

20 Así, por ejemplo, la tuberculosis en el hombre se ha combatido durante muchos años mediante vacunación con cepas atenuadas pero vivas de *Mycobacterium bovis* (vacuna BCG). Sin embargo, la eficacia de este procedimiento no proporciona siempre una resistencia satisfactoria a la tuberculosis humana en cada población.

25 Por tanto, se han hecho intentos en su lugar de aislar y usar fragmentos o subfragmentos de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* humano como un agente inmunogénico que, cuando se inyecta por vía intradérmica o por vía subcutánea a individuos, podría producir una inmunidad satisfactoria frente a infecciones con cepas que se producen de manera natural de *Mycobacterium tuberculosis* humano. Basándose en esto, sustancias indeterminadas procedentes de filtrados de cultivos así como unas cuantas moléculas aisladas, tales como Ag85 o ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* han mostrado que proporcionan cierto grado de inmunidad frente a la tuberculosis. En el futuro, sería deseable tener
30 vacunas basadas en sustancias bien definidas que producirían siempre una elevada inmunidad frente a la tuberculosis y otras enfermedades.

35 Desafortunadamente, muchas sustancias altamente purificadas, por ejemplo proteínas recombinantes purificadas, no son muy inmunogénicas y no generan una respuesta inmunitaria eficaz protectora frente a la enfermedad infecciosa real. Se ha reconocido este hecho desde el comienzo de este siglo y se ha mostrado que puede salvarse esta baja inmunogenicidad combinando la sustancia en cuestión con agentes de potenciación de la respuesta inmunogénica, los denominados adyuvantes. Se ha sugerido un gran número de adyuvantes y especie de adyuvantes de este tipo pero, en general, estos han experimentado numerosos problemas que excluyen su uso en seres humanos.

40 El documento "Immunopotential of cattle vaccinated with a soluble *Brucella abortus* antigen with low LPS content: an analysis of cellular and humoral immune responses" por G. T. Dzata *et al.* en *Veterinary Microbiology*, vol. 29, 1991, págs.15-26, da a conocer una combinación de adyuvantes que comprende DDA-Br y dimicolato de trehalosa (TDM) o muramil dipéptido (MDP) (componentes de segundo adyuvante hidrófobo). La combinación de DDA-Br y TDM con un extracto de proteína soluble de la cepa 19 de *Brucella abortus* irradiada con radiación gamma
45 (SPEDA) induce niveles superiores de anticuerpos en suero que SPEDA con DDA solo tras la vacunación de novillos. Además, la adición de TDM a DDA aumenta las respuestas inmunitarias mediadas por células, lo que es necesario para adquirir resistencia a la enfermedad de brucelosis. La conclusión es que una combinación de DDA y TDM potencia las respuestas IMC frente a una preparación de antígeno de *B. abortus* soluble y puede ser útil como adyuvantes para futuras vacunas.

50 Descripción de la invención

Los presentes inventores han descubierto ahora que dos clases particulares de adyuvantes tienen la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria intensa y persistente cuando se administran en combinación con una sustancia
55 antigénica, aun cuando esta sustancia puede tener sólo una escasa inmunogenicidad *per se*.

Por tanto, la presente invención se refiere a una combinación de adyuvantes que comprende un primer componente de adyuvante que es un halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario de fórmula $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4\text{-hal}$, en la que R^1 y R^2 es cada uno independientemente un grupo alquilo de cadena corta que contiene de 1 a 3 átomos de carbono, R^3 y R^4 es cada uno independientemente un grupo de hidrocarburo que contiene desde 12 hasta 20 átomos de carbono, preferiblemente desde 14 hasta 18 átomos de carbono y hal es un átomo de halógeno, y un segundo componente de adyuvante hidrófobo seleccionado del grupo constituido por: un monofosforil-lípido, dibehenato de trehalosa, un derivado de sorbitano y una saponina triterpenoide.

65 En la fórmula $\text{NR}^1\text{R}^2\text{R}^3\text{R}^4\text{-hal}$, los grupos R^1 y R^2 pueden ser, por ejemplo, metilo, etilo, propilo e isopropilo, mientras que R^3 y R^4 pueden ser grupos dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo y eicosilo. Sin embargo, también son posibles otros grupos de hidrocarburo $\text{C}_{12}\text{-C}_{20}$ porque a pesar de que los grupos R^3 y R^4 son normal y preferiblemente grupos de hidrocarburo de cadena lineal, pueden estar ramificados

en un grado menor teniendo, por ejemplo, cadenas laterales de metilo y etilo. R^3 y R^4 pueden tener también un grado de insaturación menor, por ejemplo conteniendo 1-3 dobles enlaces cada uno, pero preferiblemente son grupos alquilo saturados. R^3 y R^4 son preferiblemente grupos alquilo saturados que contienen desde 14 hasta 18 átomos de carbono.

- 5 El átomo de halógeno "hal" es preferiblemente bromo o cloro porque los otros halógenos, flúor y yodo, pueden tener efectos bioquímicos, fisiológicos no deseados y efectos perjudiciales, pero para algunos fines experimentales, en los que pueden aceptarse tales efectos, también pueden seleccionarse.

Se prefieren especialmente como los segundos componentes de adyuvante hidrófobos, moléculas que se unen a miembros de la denominada familia del receptor de tipo Toll (TLR), tales como monofosforil-lípidos, lipoproteínas o polisacáridos bacterianos de cadena larga. Esto se basa en la hipótesis de que la señalización a través de receptores con variabilidad limitada presentes en las células del sistema inmunitario innato, desencadenada por moléculas presentadas apropiadamente como parte de un complejo de adyuvantes, puede provocar respuestas inmunitarias intensas desde la vertiente innata del sistema inmunitario que pueden servir para aumentar la posterior inmunidad relacionada. Se ha mostrado recientemente que ciertas moléculas de origen bacteriano son reconocidas por células del sistema inmunitario innato a través de una familia de receptores conocidos como receptores de tipo Toll (TLR). Se resumen este trabajo reciente y sus implicaciones en "Toll signaling pathways in the innate immune response" por K. V. Anderson en Current Opinion in Immunology, feb. de 2000; 12(1):13-9 y "The Toll-receptor family and control of innate immunity." por E. B. Kopp y R. Medzhitov en Current Opinion in Immunology, feb. de 1999; 11(1):13-8.

Los monofosforil-lípidos pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de lipopolisacárido microbiano (LPS) y se preparan normalmente a partir de polisacáridos bacterianos, a pesar de que otras fuentes microbianas como virus, mohos, hongos, levaduras y algas pueden ser la fuente de origen del fosforil-lípido de elección. Los polisacáridos bacterianos adecuados se describen, por ejemplo, en "The Theory and Practical Applications of adjuvants", capítulo trece, págs. 287-313, Ed. por D.E.S. Stewart-Tull, 1995, John Wiley Sons Ltd., en "Methods in Microbiology", Vol. 25, págs. 471-502, Ed. Stefan AE Kaufmann y Dieter Kabelitz, 1998, Academic Press, San Diego, California, EE.UU. y Londres, RU, y en "Vaccine", vol. 15, n° 3, págs. 248-256, 1997, Elsevier Science Ltd., GB.

También, se describen los monofosforil-lípidos que pueden derivarse de los polisacáridos microbianos y adecuados para su uso en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención con más detalle en las referencias anteriores. El monofosforil-lípido preferido es monofosforil-lípido A (MPL-A) que se describe en "The Theory and Practical Applications of adjuvants", capítulo trece, págs. 289-292, Ed. por D.E.S. Stewart-Tull, 1995, John Wiley Sons Ltd., en "Methods in Microbiology", Vol. 25, págs. 483-484, Ed. Stefan AE Kaufmann y Dieter Kabelitz, 1998, Academic Press, San Diego, California, EE.UU. y Londres, RU, y en "Vaccine", vol. 15, n° 3, pág. 252, columna 2, 1997, Elsevier Science Ltd., GB. El MPL-A más preferido se designa como monofosforil-lípido A 3-O-desacilado. Sin embargo, también pueden ser aplicables otros derivados de los MPL-A.

Se describen ejemplos de polisacáridos bacterianos de cadena larga, tales como derivados de trehalosa en "Methods in Microbiology", Vol. 25, pág. 480, Ed. Stefan AE Kaufmann y Dieter Kabelitz, 1998, Academic Press, San Diego, California, EE.UU. y Londres, RU. Un polisacárido bacteriano de cadena larga preferido es dibehenato de trehalosa. Se describen ejemplos de los derivados de muramil dipéptido en "Methods in Microbiology", Vol. 25, pág. 484, Ed. Stefan AE Kaufmann y Dieter Kabelitz, 1998, Academic Press, San Diego, California, EE.UU. y Londres, RU. Se prefiere especialmente N-acetilmuramilalanil-isoglutamina.

Se describen ejemplos de adyuvantes de copolímero en bloque, por ejemplo, por Todd C.V. *et al.*, Systematic development of a block copolymer adjuvant for trivalent influenza virus vaccine, Dev Biol Stand 1998; 92:341-51.

La combinación de adyuvantes de la presente invención puede estar preferiblemente en la forma de:

a) una composición acuosa que comprende el halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario de fórmula $NR^1R^2R^3R^4\text{-hal}$, en la que R^1 y R^2 es cada uno independientemente un grupo alquilo de cadena corta que contiene de 1 a 3 átomos de carbono, R^3 y R^4 es cada uno independientemente un grupo de hidrocarburo de longitud de cadena media que contiene de 12 a 20 átomos de carbono y hal es un átomo de halógeno, y

b) una composición acuosa que comprende el segundo componente de adyuvante hidrófobo.

Los medios acuosos en estas composiciones acuosas pueden ser cualquier disolvente acuoso adecuado. Sin embargo, la formación de posibles estructuras micelares útiles parece ser sensible a los aniones, como iones fosfato y sulfato. Por tanto, se prefiere que las composiciones de adyuvantes de la invención se formen en ausencia o con niveles bajos de tales iones.

Las composiciones acuosas de adyuvantes pueden prepararse mediante cualquier proceso o procedimiento adecuado, por ejemplo tal como se describe adicionalmente en la parte detallada de esta memoria descriptiva.

Un aspecto preferido de las composiciones acuosas de adyuvantes de la presente invención son composiciones en las que el halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario es bromuro o cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-Br o DDA-Cl) y el segundo componente de adyuvante hidrófobo es un monofosforil-lípido, lo más preferiblemente MPL-A.

Otro aspecto preferido de las composiciones acuosas de adyuvantes de la presente invención son composiciones en las que el halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario es bromuro o cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-Br o DDA-Cl) y el segundo componente de adyuvante hidrófobo es un polisacárido bacteriano de cadena larga, tal como un derivado de trehalosa, lo más preferiblemente dibehenato de trehalosa.

También se prefiere como composición acuosa de adyuvantes de la presente invención una composición en la que el halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario es bromuro o cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-Br o DDA-Cl) y el segundo componente de adyuvante hidrófobo es una saponina triterpenoide.

Además, se prefieren las composiciones acuosas de adyuvantes en las que el halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario es bromuro o cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-Br o DDA-Cl) y el segundo componente de adyuvante hidrófobo es un derivado de sorbitano, preferiblemente trioleato de sorbitano.

Si es oportuno, las diferentes composiciones de adyuvantes pueden combinarse en una única composición como una composición madre o bien inmediatamente antes de su uso.

La invención se refiere también un kit para inmunización, comprendiendo dicho kit un primer componente de adyuvante que es un halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario de fórmula $NR^1R^2R^3R^4-hal$, en la que R^1 y R^2 es cada uno independientemente un grupo alquilo de cadena corta que contiene de 1 a 3 átomos de carbono, R^3 y R^4 es cada uno independientemente un grupo de hidrocarburo que contiene desde 12 hasta 20 átomos de carbono, preferiblemente desde 14 hasta 18 átomos de carbono, y hal es un átomo de halógeno, y un segundo componente de adyuvante hidrófobo, y una sustancia antigénica seleccionado del grupo constituido por: un monofosforil-lípido, dibehenato de trehalosa, un derivado de sorbitano y una saponina triterpenoide.

Los kits preferidos son kits preparados a partir de las composiciones acuosas de adyuvantes preferidas descritas anteriormente y una sustancia antigénica.

Tal kit puede presentarse en la forma de recipientes o compartimentos individuales que contienen los diferentes adyuvantes y la sustancia antigénica y cualquier disolvente necesario para efectuar el procedimiento de inmunización así como cualquier dispositivo necesario para la realización del mismo. Si es apropiado, también pueden combinarse los adyuvantes y la sustancia antigénica y guardarse en un único recipiente. Si los adyuvantes y la sustancia antigénica están contenidos cada uno en un recipiente separado, pueden mezclarse en cualquier orden antes de su uso. Para algunas aplicaciones, puede ser ventajoso, sin embargo, mezclar los adyuvantes y las sustancias antigénicas en un orden particular para obtener resultados óptimos.

En principio, la sustancia antigénica puede ser cualquier especie química pura tal como una proteína o un fragmento de la misma o mezclas artificiales preparadas de tales especies. Pero puede ser también cualquier mezcla que se produzca de manera natural de especies químicas tales como, por ejemplo, un homogeneizado celular o fracciones del mismo, un filtrado de cultivo de microorganismos o tejidos celulares de organismos multicelulares, por ejemplo animales superiores.

Específicamente, la sustancia antigénica puede derivarse de un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* metabolizantes, *Mycobacterium bovis* y otras *Mycobacteria* ambientales tales como, por ejemplo, *Mycobacterium avium*. Una sustancia interesante particular del filtrado de tales *Mycobacteria* es la proteína ESAT-6 (diana antigénica secretora temprana) que es una diana dominante para la inmunidad mediada por células en la fase temprana de la tuberculosis en pacientes con TB y en diferentes modelos animales. Contiene 95 residuos de aminoácido y tiene una masa molecular deducida de aproximadamente 10 kDa. Su inmunogenicidad *per se* es baja, pero en combinación con las combinaciones de adyuvantes de la presente invención ha resultado ser un potente candidato para provocar una inmunidad elevada y persistente frente a la tuberculosis tal como se demuestra en la siguiente parte detallada de esta memoria descriptiva. Otra sustancia antigénica interesante es una molécula híbrida que comprende ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Hoy en día, ESAT-6, así como muchos otros antígenos aplicables en combinación con las combinaciones de adyuvantes de la presente invención, puede producirse artificialmente, por ejemplo sintéticamente o mediante técnicas recombinantes genéticas.

Además de proporcionar inmunidad frente a enfermedades, las combinaciones de adyuvantes de la presente invención también pueden usarse para producir anticuerpos contra compuestos que son malas sustancias inmunogénicas *per se* y pueden usarse tales anticuerpos para la detección y cuantificación de los compuestos en cuestión, por ejemplo en medicina y química analítica.

Sin quedar ligado a la teoría, se cree que un adyuvante tal como DDA, que induce fuertes respuestas IMC (inmunitarias mediadas por células), tiene la capacidad de formar micelas en disoluciones acuosas. Esta estructura proporciona una matriz para la retención de otros compuestos inmunomoduladores hidrófobos y la formación de micelas compuestas con un aumento de la actividad como adyuvante y una disminución de la capacidad de difusión.

Se exponen realizaciones preferidas de la combinación de adyuvantes y el kit de combinación de inmunización de la presente invención en las reivindicaciones dependientes en el conjunto acompañante de reivindicaciones adjuntas.

Ahora se describirá la invención y se ilustrará mediante referencia a ejemplos de realización de la invención y ejemplos experimentales que forman la base del descubrimiento de la presente invención.

Materiales y métodos

Animales

Se realizaron los estudios con ratones hembra de 8 a 12 semanas de edad C57BU6 (C57BL/6J, H-2^b), adquiridos a Bomholtegaard, Ry, Dinamarca.

Se alojaron los animales infectados en jaulas contenidas dentro un recinto de seguridad de flujo laminar.

Bacterias

Se hizo crecer *M. tuberculosis* H37Rv a 37°C en medio de Löwenstein Jensen o en suspensión en medio de Sauton modificado enriquecido con un 0,5% de piruvato de sodio y un 0,5% de glucosa.

Adyuvantes

Se mezcla DDA-Br (a continuación abreviado como DDA; Eastman Kodak, Inc., Rochester, N.Y.) en agua estéril hasta una concentración de 2,5 mg/ml y se calienta hasta 80 °C mientras se agita continuamente en una placa calefactora con agitación magnética durante 10 min. y luego se enfría hasta temperatura ambiente antes de su uso.

Se mezcla MPL-A (a continuación abreviado como MPL) (MPL, Ribí Immunochem, Hamilton, MT, EE.UU.) en agua estéril que contiene 2 µl de trietilamina hasta una concentración de 1 mg/ml. Se calienta la mezcla en un baño de agua a 65-70°C durante 30 segundos y luego se sonica durante 30 segundos. Se repite dos veces el procedimiento de calentamiento y sonicación. Se almacena la disolución a 4°C hasta su uso.

Se mezcla 6,6'-dibehenato de D-(+)-trehalosa (a continuación abreviado como TDB, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.) en agua estéril que contiene un 2% de dimetilsulfóxido hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Luego se sonica la mezcla durante 30 segundos. Se repite dos veces el procedimiento de sonicación. Se almacena la disolución a -20°C hasta su uso.

Se mezcla N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (a continuación abreviado como AMI, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.) en agua estéril hasta una concentración de 1 mg/ml. Luego se sonica la muestra durante 30 segundos. Se repite dos veces el procedimiento de sonicación. Se almacena la disolución a 4°C hasta su uso.

Se mezcla saponina (Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.) en agua estéril hasta una concentración de 1 mg/ml. Se mezcla luego la mezcla mediante agitación en vórtex durante 30 segundos. Se repite dos veces el procedimiento de agitación en vórtex. Se almacena la disolución a 4°C hasta su uso.

Se mezcla trioleato de sorbitano (a continuación abreviado como sorbitol, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.) en agua estéril hasta una concentración del 10% en peso por volumen. Se mezcla luego la mezcla mediante agitación en vórtex durante 30 segundos. Se repite dos veces el procedimiento de agitación en vórtex. Se almacena la disolución a 4°C hasta su uso.

La mañana de la inmunización, se mezcla el antígeno con solución salina y se añade el segundo componente de adyuvante. Luego, se añade DDA y se mezcla la suspensión en una mezcladora de vórtex.

Inmunización

Se inmunizaron los ratones por vía subcutánea (s.c.) dos o tres veces a intervalos de dos semanas, en el lomo con las vacunas experimentales que contenían 50 µg de ST-CF/dosis, 10-50 µg de ESAT-6/dosis o bien 1 µg/dosis de una vacuna de subunidad que contiene ESAT-6, emulsionada en DDA (250 µg/dosis, Eastman Kodak, Inc., Rochester, N.Y.) con o sin 25 µg de monofosforil-lípido A (MPL, Ribí Immunochem, Hamilton, MT, EE.UU.), 50 microgramos de 6,6'-dibehenato de D-(+)-trehalosa (T2268, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.), 25 microgramos de N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (A9519, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.), 2,5 microgramos de saponina (S7900, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.) o el 1% en peso por volumen de trioleato de sorbitano (S7135, Sigma Biochemicals, St. Louis, MO, EE.UU.), en un volumen de 0,2 ml.

Se inyectó una dosis única de BCG Copenhagen 1331 (5 x 10⁴ ufc (unidades formadoras de colonias)) por vía subcutánea en la base de la cola en animales control.

Infecciones experimentales

Se administraron infecciones intravenosas (i.v.) a través de la vena lateral de la cola con un inóculo de 5 x 10⁴ de *M. tuberculosis* (H37Rv) suspendido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en un volumen de 0,1 ml. Se sacrificaron los ratones dos semanas después.

Se administraron infecciones respiratorias (i.r.) de los animales con *M. tuberculosis* (Erdman) mediante la vía aérea con un inóculo de 5×10^6 /ml. Seis semanas después, se sacrificaron los ratones. Se determinó el número de bacterias en el hígado, bazo o pulmón mediante diluciones de 3 veces en serie dobles de homogeneizados individuales de órganos completos en medio de Middlebrook 7H11. Se hicieron crecer los órganos de los animales vacunados con BCG en medio complementado con $2 \mu\text{g}$ de hidrazida del ácido 2-tiofeno-carboxílico (TCH). Se contaron las colonias tras 3 semanas de incubación a 37°C . Se expresan las eficacias protectoras como medias de los recuentos bacterianos en ratones inmunizados tras la resta del control de adyuvante obtenidas de 5 animales/grupo.

Antígenos micobacterianos

Se produjo el filtrado de cultivo a corto plazo (ST-CF) tal como se describió anteriormente {Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Bennedsen J., y Heron I., Proteins released from Mycobacterium tuberculosis during growth. Infect. Immun. 59: 1905-1910, 1991}. En resumen, se hizo crecer *M. tuberculosis* (8×10^6 UFC/ml) en medio de Sauton modificado sin Tween 80 en un agitador orbital durante 7 días. Se filtraron de manera estéril los sobrenadantes de cultivo y se concentraron sobre una membrana YM3 de Amicon (Amicon, Danvers, MA.).

Se preparó ESAT-6 recombinante por Brandt *et al.* {Brandt L., Oettinger T., y Andersen P., Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. J. Immunol. 157:3527-3533, 1996}.

Se preparó una molécula de subunidad recombinante que contenía ESAT-6 y Ag85B (a la que se hace referencia a continuación en el presente documento como híbrida) tal como se describe {Olsen, A., van Pinxteren. L., Arend, S., Okkels, L., Rasmussen, P., Ottenhoff, T. y Andersen, P. An efficient tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of Ag85B and ESAT-6. J. Immunol., presentado}.

Se midió que el contenido en LPS en las preparaciones mediante la prueba de LAL era inferior a $0,3 \text{ ng}/\mu\text{g}$ de proteína y esta concentración no tuvo influencia sobre la actividad celular. Se guardó la proteína a -80°C hasta su uso.

Cultivos de linfocitos

Se obtuvieron linfocitos de los bazos tal como se describió previamente {Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Bentzon M.W., y Heron I., T-cell proliferative response to antigens secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 59: 1558-1563, 1991}. Se purificaron los linfocitos sanguíneos en medio de densidad. Se cultivaron las células reunidas de 3-5 ratones en cada experimento en pocillos de microtitulación (96 pocillos, Nunc, Roskilde, Dinamarca) que contenían 2×10^5 células en un volumen de $200 \mu\text{l}$ de RPMI 1640 complementado con 2-mercaptoetanol, penicilina-estreptomycin, glutamina y un 5% (vol/vol) de FCS (suero de ternero fetal). Se usaron ST-CF y las preparaciones de ESAT-6 en diversas concentraciones ($0,5$ - 20 microgramos/ml) en los cultivos. Se usaron fracciones de los filtrados de cultivo a 5 microgramos/ml. Basándose en investigaciones previas de dosis-respuesta, los antígenos y los péptidos micobacterianos purificados se usaron todos a $0,5$ - 10 microgramos/ml. Se usó Con A a una concentración de 1 microgramo/ml en todos los experimentos como control positivo para determinar la viabilidad celular. Se sometieron a prueba todas las preparaciones en los cultivos celulares y se encontró que no eran tóxicas a las concentraciones usadas en el presente estudio. Se recogieron los sobrenadantes de cultivos paralelos para la investigación de citocinas tras 72 h de incubación.

EUSA de IFN- γ

Se revistieron placas de microtitulación (96 pocillos, maxisorb, Nunc) con IFN- γ monoclonal de hámster anti-murino (Genzyme, Cambridge, Ma) en PBS a 4°C . Se bloquearon los sitios de unión libres con un 1% (p/vol) de BSA/0,05% de Tween 20. Se sometieron a prueba los sobrenadantes de cultivo por triplicado y se detectó IFN- γ mediante anticuerpo monoclonal de rata anti-murino marcado con biotina (clon XMG1.2, Pharmingen, San Diego, Ca.). Se usó IFN- γ recombinante (Pharmingen) como patrón.

Técnica EUSPOT

En este ensayo, se revistieron placas de microtitulación (96 pocillos, maxisorb) con $2,5$ microgramos/ml de IFN- γ monoclonal de hámster anti-murino (Genzyme). Se bloquearon los sitios de unión libres con albúmina de suero bovino seguido por lavado con PBS/0,05% de Tween 20. Se realizaron siempre los análisis en células reunidas a partir de tres ratones. Se estimularon las células con concentraciones óptimas de antígeno en RPMI 1640 modificado durante 18 - 22 h y posteriormente se cultivaron sin antígeno durante 7 h directamente en las placas de ELISPOT. Se retiraron las células mediante lavado y se detectó el sitio de secreción de citocinas mediante el anticuerpo monoclonal IFN- γ de rata anti-murino marcado con biotina (clon XMG1.2, Pharmingen) y estreptavidina conjugada con fosfatasa (Jackson ImmunoResearch Lab., Inc., PA.). Se desarrolló la reacción enzimática con BCIP (Sigma). Se contaron las manchas azules microscópicamente. La relación entre el número de células por pocillo y el número de manchas fue lineal en las concentraciones, 2×10^5 - $6,2 \times 10^3$ células/pocillos. No se usaron los pocillos con menos de 10 manchas para los cálculos.

ELISA de IgG específico de ESAT-6

Se revistieron placas de ELISA (NUNC Maxisorp, tipo 96F) con ESAT-6 (0,1 microgramos/pocillo) durante la noche a 4°C. Se bloquearon los sitios de unión libres con un 1% de albúmina de suero bovino-PBS. Se analizaron los sueros de ratones individuales de 5 ratones/grupo en diluciones de tres veces. Se detectó el anticuerpo IgG (P260, diluido 1/1000, DAKO) mediante reactivo de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa. Se expresan los títulos de anticuerpos como la inversa del título del punto final.

Procedimientos estadísticos

Se comparó la respuesta media a antígenos individuales mediante la prueba de la t de Student para datos emparejados. Se han comparado las eficacias de diferentes protocolos de vacunación mediante análisis de la varianza de una vía de log 10 ufc (unidades formadoras de colonias).

Ejemplo 1

ESAT-6 se reconoce enormemente durante la infección pero no tras la vacunación de subunidad, es decir, ESAT-6 es una molécula con baja inmunogenicidad

Para estudiar la respuesta inmunitaria tras la vacunación con ESAT-6, se vacunaron ratones C57BL/6 con una vacuna de subunidad de ESAT-6 emulsionada en DDA; un adyuvante que ha mostrado que induce una respuesta inmunitaria del tipo Th1 {Grun. J.L. y Maurer, P. H. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles, Cell Immunol., 121: 134-145, 1989; Lindblad, E.B., Elhay, M. J. Silva, R., Appelberg, R y Andersen, P., Adjuvant modulation of immune response to tuberculosis sub-unit vaccines. infect. immun., 65(2): 623-629, 1997}. Paralelamente, se inmunizaron grupos de ratones con vacunas experimentales constituidas por filtrado de cultivo a corto plazo (ST-CF). Se administraron todas las vacunas tres veces con un intervalo de dos semanas. También se incluyeron un grupo de ratones vacunados con BCG y un grupo de ratones a los que se les administró una infección primaria con *M. tuberculosis*. En la tabla 1, columna 2, se muestra el contenido en IFN- γ en sobrenadantes de 72 h tras la estimulación de esplenocitos de ratones infectados con TB, con ST-CF o ESAT-6 *in vitro*. La estimulación con ST-CF mostró una potente respuesta de IFN- γ de 34.000 pg/ml seguido por una respuesta intensa a ESAT-6 (~19700 pg/ml).

Se investigó la capacidad de las vacunaciones de subunidad para generar una respuesta inmunitaria específica de antígeno frente a la preparación homóloga tres semanas después de la última inyección de refuerzo estimulando células de los ganglios linfáticos drenantes *in vitro*, tabla 1, columna 3. De los ratones inmunizados, el grupo vacunado con ST-CF indujo la liberación más intensa de IFN- γ tras estimulación con la preparación homóloga (~19.150 pg/ml). Por el contrario, no fue detectable una respuesta de IFN- γ específica de ESAT-6 (< 50 pg/ml).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

^b Antígeno	^a Respuestas de recuerdo de IFN- γ	
	^c Infección con TB	^d Vacunación
No estimulado	1,405 $\pm$ 25	125 $\pm$ 25
ST-CF	34.317 $\pm$ 972	19.156 $\pm$ 987
ESAT-6	19.668 $\pm$ 3281	< 50

^aLas respuestas de recuerdo se expresan como el contenido medio de IFN- γ que representa la media de valores por triplicado en pg/ml $\pm$ EEM en el sobrenadante controlado tras 72 h de estimulación *in vitro*.

^bSe vacunaron los ratones con BCG, ST-CF (50 μ g/dosis) o ESAT-6 (20 μ g/dosis) usando DDA como adyuvante.

^cSe aislaron células de bazo de ratones infectados por vía i.v. con 5×10^4 ufc de *M. tuberculosis* dos semanas tras la infección y se estimuló una reserva de células de 5 ratones *in vitro* durante 72 h, tras lo cual se determinó el contenido de IFN- γ (pg/ml) en los sobrenadantes.

^dSe aislaron células de ganglio linfático tres semanas tras la última inyección de refuerzo y se estimuló una reserva de células de 5 ratones *in vitro* con la proteína homóloga. No fueron detectables las respuestas de IFN- γ < 50 en este ensayo.

No se obtuvo protección tras la inmunización con ESAT-6 en DDA

Para estudiar la eficacia protectora de estas vacunas experimentales, se dejaron los ratones durante tres meses tras lo cual los ratones recibieron infección por vía i.v. o bien aérea con *M. tuberculosis* vivo. Se determinó la carga bacteriana en hígado o pulmón y se expresa la eficacia protectora de estas vacunas como la reducción en log₁₀ comparado con los ratones control, mostrado para dos experimentos individuales en la tabla 2 (Expt. I y Expt. II). Las vacunaciones con BCG o bien ST-CF/DDA provocaron una protección significativa de 0,73 log₁₀ y 1,10 log₁₀, respectivamente, comparado con los ratones control, mientras que no se detectó una reducción significativa de la carga bacteriana tras la vacunación con ESAT-6, mostrado en la tabla 2, Expt. I. En el experimento II, se confirmó la eficacia protectora de la vacunación con BCG y ST-CF. La vacuna con ESAT-6/DDA sólo indujo niveles mínimos de protección.

TABLA 2

^b Vacunación	^a Protección	
	^c Expt. I	^d Expt. II
BCG	0,73 ± 0,06 (<i>p</i> = 0,008)	0,98 ± 0,22 (<i>p</i> = 0,008)
ST-CF	1,10 ± 0,09 (<i>p</i> = 0,008)	0,81 ± 0,17 (<i>p</i> = 0,006)
ESAT-6	0,11 ± 0,10	0,25 ± 0,09 (<i>p</i> = 0,009)

^aLas eficacias protectoras de las vacunas se expresan como la reducción en log₁₀ de la carga bacteriana. Los datos expresados son medias basados en análisis por duplicado para cada grupo (n = 5). Se han facilitado los valores de *p* para la carga bacteriana que son significativamente diferentes de los números hallados para los ratones control no inmunizados determinados mediante la prueba de la *t* de Student.

^bSe vacunaron los ratones con BCG o se inmunizaron por vía s.c. con las vacunas experimentales emulsionadas en DDA.

^cProtección obtenida en el hígado de ratones C57BU6 tras infección con TB administrada por vía i.v.

^dProtección obtenida en el pulmón tras la infección con TB por vía aérea.

Ejemplo 2

DDA combinado con MPL promueve una respuesta eficaz frente a ESAT-6

Es un hecho aceptado de forma general que los adyuvantes tienen cierta selectividad por la inducción de una determinada clase de respuesta inmunitaria. Puesto que la importancia de la liberación de citocinas de tipo Th1 basada en la producción de IFN- γ ha demostrado ser esencial en la resistencia a TB {Flynn J.L., Chan J., Triebold K.J., Dalton D.K., Stewart T.A., y Bloom B.R., An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection, J. Exp. Med., 178:2249-2254, 1993; y Cooper A.M., Dalton D.K., Stewart T.A., Griffen J.P., Russel D.G., y Orme I., M. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice, J.Exp.Med., 178:2243-2247, 1993}, se añadió MPL a la preparación de ESAT-6/DDA. En el intento para investigar el potencial de esta vacuna, se inmunizaron los ratones tres veces y una semana tras la 3ª vacunación se investigaron las respuestas inmunitarias específicas de ESAT-6 de las células sanguíneas. Sólo pudo detectarse un mínimo reconocimiento por células T de ESAT-6 de ratones que recibieron ESAT-6 mezclado con DDA. Por el contrario, la inmunización con ESAT-6 emulsionado en DDA+MPL (es decir, DDA-Br+MPL-A) generó una respuesta de IFN- γ muy potente y una frecuencia muy elevada de células que secretan IFN- γ (1:470), medido mediante la sensible técnica ELISPOT, tabla 3.

Se investigó el desarrollo de la respuesta de anticuerpos específica de ESAT-6 en ratones 7 semanas tras la primera vacunación, mostrado en la tabla 3. Están presentes altos títulos de IgG específica de ESAT-6 en los sueros de ratones vacunados con ESAT-6/DDA+MPL comparado con las cantidades halladas en los sueros tras la vacunación con ESAT-6/DDA.

TABLA 3

Respuesta de recuerdo específica de ESAT-6					
^a Vacuna	^b IFN- γ	Expt. 1		Expt. II	
		^c Frecuencia	^d IgG específica de ESAT-6	^c Frecuencia	^d IgG específica de ESAT-6
DDA	< 50	< 1:20.000	< 3	< 1:20.000	< 3
DDA+MPL	< 50	< 1:20.000	< 3	< 1:20.000	< 3
ESAT-6 + DDA	< 50	1:14.800	32.768	1:8.700	65.530
ESAT-6 + MPL	< 0,05	1:14.800	32768	1:10.000	ND
ESAT-6 + DDA/MPL	12.235 $\pm$ 553	1:470	262.144	1:440	524.288

^a Se vacunaron los ratones con vacunas de subunidad de ESAT-6 o adyuvante (10 μ g/dosis) tres veces con un intervalo de 2 semanas.

^b Medias de las respuestas de IFN- γ en pg/ml medidas en sobrenadante de 72 h de cultivos de células sanguíneas una semana tras la última inyección de refuerzo

^c Se estimaron las frecuencias de linfocitos que producen IFN- γ mediante análisis ELISPOT de células sanguíneas establecidas a partir de ratones inmunizados 1 semana tras la última inyección de refuerzo. Se estimaron las frecuencias de una reserva de 5 ratones. Los resultados se expresan como la media de valores por duplicado y las diferencias entre los cultivos por duplicado son < 12 % de la media. No fueron detectables frecuencias inferiores a 1:20.000 en este ensayo.

^d 5 semanas después de la vacunación primaria, se determinaron los sueros mediante ELISA tal como se describe en Materiales y métodos. Los datos enumerados son los títulos de punto final de una reserva de sueros de 5. Los resultados enumerados son la media de valores por duplicado y las diferencias entre los pocillos por duplicado son < 11 %.

Ejemplo 3

Eficacia protectora de la vacuna de ESAT-6.

Con el fin de medir las eficacias de la vacuna de ESAT-6/DDA+MPL, se expusieron los ratones a una administración con aerosol de *M. tuberculosis* (Erdman) 6-8 semanas tras la última inmunización con ESAT-6 y 6 semanas tras la infección, se recogieron el bazo y el pulmón para la determinación de la carga bacteriana. Tal como se muestra en la tabla 4, la protección obtenida a partir de la vacunación con ESAT-6 /DDA+MPL fue similar a la inducida por la vacunación con BCG sin diferencias significativas en ninguno de los dos experimentos descritos. Por el contrario, la vacuna de ESAT-6/DDA no protegió significativamente en comparación con el control no vacunado, en el bazo o bien en el pulmón.

TABLA 4

Experimento	^a Vacuna	^b Resistencia en log ₁₀	
		Bazo	Pulmón
I	DDA	< 0,05	< 0,05
	MPL	< 0,05	< 0,05
	DDA + MPL	< 0,05	< 0,05
	ESAT-6/DDA	^c 0,28 (± 0,14)	0,18 (± 0,12)
	ESAT-6/DDA + MPL	^c 0,58 (± 0,10)	^c 0,41 (± 0,05)
	BCG	^c 0,53 (± 0,19)	^c 0,77 (± 0,06)
	II	DDA + MPL	< 0,05
ESAT-6/DDA + MPL		^c 0,89 (± 0,32)	^c 0,50 (± 0,09)
BCG		^c 0,94 (± 0,24)	^c 0,46 (± 0,09)

^a Se vacunaron los ratones por vía s.c. con vacunas de subunidad de ESAT-6 (10 µg/dosis) tres veces con intervalos de 2 semanas o se vacunaron con BCG (4 x 10⁵ ufc).

^b Se expresa la carga bacteriana como reducción en log₁₀ medido en el bazo o el pulmón 6 semanas tras la exposición al aerosol.

^c Eficacias protectoras, que son significativamente diferentes de los ratones control, determinadas mediante la prueba de la t de Student.

Ejemplo 4

Aumento de la eficacia protectora de añadir MPL a vacunas a base de moléculas sumamente inmunogénicas

La vacunación de ratones C57BL con ST-CF emulsionado en DDA ha mostrado que induce una protección a niveles comparables a BCG {Andersen P., Effective vaccination of mice of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins., infect immun. 62: 2536-2544, 1994}.

Para analizar la capacidad protectora de vacunas constituidas por ST-CF en DDA+MPL, se inmunizaron ratones C57BL con ST-CF mezclado en esta vacuna. Ninguno de los adyuvantes solos produjo una respuesta inmunitaria protectora (datos no mostrados), ni lo hizo ST-CF emulsionado en MPL solo, tabla 5. Tras añadir MPL a la vacuna de ST-CF/DDA, aumentó la respuesta de IFN-γ de esta preparación de antígeno sumamente inmunogénico unas 10 veces, y también aumentó significativamente la eficacia protectora comparado con una vacuna similar mezclada con DDA solo. Esto demostró una falta de eficacia usando MPL por sí mismo pero, al mismo tiempo, mostró que puede ser un coadyuvante eficaz para DDA, promoviendo una respuesta inmunitaria protectora eficaz.

TABLA 5

^a Vacuna	^b IFN- γ (pg/ml)	^c Resistencia en log ₁₀
MPL + ST-CF	1003	0,10 $\pm$ 0,08
DDA + ST-CF	458	0,69 $\pm$ 0,10
MPL + DDA + ST-CF	4936	0,93 $\pm$ 0,11
BCG	588	1,29 $\pm$ 0,09

^aSe vacunaron los ratones por vía s.c. con las vacunas de subunidad experimentales (100 μ g/dosis) dos veces con intervalos de 2 semanas o se vacunaron con BCG (4 x 10⁵ ufc).

^b Se estimularon los esplenocitos *in vitro* con ST-CF (4 μ g/ml) y se midió el contenido en IFN- γ en sobrenadantes de 72 h. Los resultados se expresan como la media de valores por duplicado y las diferencias entre los cultivos por duplicado son < 6 % de la media. No fueron detectables las respuestas de IFN- γ < 50 en este ensayo.

^cLa carga bacteriana tras exposición i.v. expresada como la reducción en log₁₀ medida en el bazo comparado con el control no vacunado.

Ejemplo 5

Demostración del principio de aumento de la inmunogenicidad de composiciones de adyuvantes combinados usando una selección de otros adyuvantes secundarios

Para demostrar que el principio de aumento de la capacidad como adyuvante no se limita simplemente a la combinación de DDA más MPL, se sometieron a prueba otras varias moléculas que cumplen los criterios expuestos anteriormente sobre capacidad como coadyuvante eficaz de segundos adyuvantes. Las moléculas elegidas fueron:

6,6'-Dibehenato de D-(+)-trehalosa, Sigma Biochemicals, T2268 (TDB) N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina, Sigma Biochemicals, A9519 (AMI) saponina, Sigma Biochemicals, S7900 (saponina) trioleato de sorbitano, Sigma Biochemicals, S7135 (sorbitol).

Puesto que se mostró que la magnitud de la respuesta inmunitaria a ESAT-6 dependía enormemente de la composición del adyuvante (véase anteriormente), se vacunaron ratones C57BU6 con una vacuna de subunidad que contenía ESAT-6 emulsionada en DDA más las moléculas de coadyuvante descritas inmediatamente antes. Paralelamente, se inmunizaron los ratones con el mismo antígeno en una combinación de DDA/MPL preparada tal como se describió anteriormente. Todos los grupos recibieron dos vacunaciones, separadas dos semanas. Se infectaron los animales control con una dosis única de BCG Copenhagen 1331 (5 x 10⁴ ufc (unidades formadoras de colonias)) inyectado por vía subcutánea en la base de la cola.

En la tabla 6, se muestran los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de 72 h tras la estimulación de esplenocitos de ratones vacunados *in vitro*. La estimulación con un antígeno específico indujo una fuerte respuesta de IFN- γ en los grupos vacunados de prueba, comparable a la obtenida con DDA/MPL. Esto demuestra que los principios expuestos en la solicitud de patente pueden usarse para producir un aumento de las respuestas inmunitarias usando una variedad de segundos componentes de adyuvante, y son eficaces en la estimulación de respuestas frente a una gama de antígenos definidos o complejos.

TABLA 6

^a Vacuna	^b IFN- γ (pg/ml)
Experimento 1	
Control	189
DDA + ^c híbrida	1.440
DDA + MPL + híbrida	11.324
Experimento 2	
Control	660
DDA + MPL + híbrida	14.006
DDA + TDB + híbrida	15.768
DDA + AMI + híbrida	14.514
DDA + saponina + híbrida	14.314
DDA + sorbitol + híbrida	6.635
BCG	720
^a Se vacunaron los ratones por vía s.c. con la vacuna de subunidad experimental (1 μ g/dosis) dos veces con intervalos de 2 semanas o se vacunaron con BCG (4 x 10 ⁵ ufc).	
^b Se estimularon los esplenocitos <i>in vitro</i> con la vacuna de subunidad experimental (1,25-10 μ g/ml) y se midió el contenido en IFN- γ en sobrenadantes de 72 h. Los resultados se expresan como la media de valores por duplicado y las diferencias entre los cultivos por duplicado son < 10 % de la media. No fueron detectables las respuestas de IFN- γ < 50 en este ensayo.	
^c La vacuna de subunidad experimental usada contenía tanto ESAT-6 como Aq85B y se denomina híbrida.	

Observaciones finales

La selección de adyuvantes que no tienen o tienen niveles bajos de efectos secundarios no deseados es bastante limitada. Al(OH)₃, que se sabe que prepara principalmente una respuesta inmunitaria de tipo Th2, es el único adyuvante que está autorizado para uso con seres humanos en la actualidad. Todos los componentes de adyuvante sometidos a prueba son adyuvantes suaves y, por tanto, pueden ser posibles candidatos para uso con seres humanos. Tal como se muestra en los estudios anteriores, el antígeno mezclado con una combinación de DDA más un inmunomodulador apropiado demuestra claramente que esta combinación amplifica algunos de los acontecimientos cruciales en la cascada inmunológica protectora tras la vacunación. Estos hallazgos implican que una vacuna basada incluso en moléculas de baja inmunogenicidad (tales como ESAT-6) usadas en combinación con DDA + y un segundo adyuvante apropiado puede ser una manera sumamente eficaz de desencadenar el tipo correcto de respuesta inmunitaria.

Se ha demostrado el uso de esta nueva combinación de adyuvantes usando antígenos de TB, pero el uso de esta combinación puede ser de gran valor para otros antígenos que se encuentran fuera del campo de la TB.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de adyuvantes que comprende:

- un primer componente de adyuvante que es un halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario de fórmula $NR^1R^2R^3R^4-hal$, en la que R^1 y R^2 es cada uno independientemente un grupo alquilo de cadena corta que contiene de 1 a 3 átomos de carbono, R^3 y R^4 es cada uno independientemente un grupo de hidrocarburo que contiene desde 12 hasta 20 átomos de carbono, preferible desde 14 hasta 18 átomos de carbono, y hal es un átomo de halógeno, y
- un segundo componente de adyuvante hidrófobo seleccionado del grupo constituido por: un monofosforil-lípido, dibehenato de trehalosa, un derivado de sorbitano y una saponina triterpenoide.

2. Una combinación de adyuvantes según la reivindicación 1, que comprende:

- un primer componente de adyuvante que es el halogenuro de amonio de hidrocarburo cuaternario bromuro o cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-Br o DDA-CI), y
- un segundo componente de adyuvante hidrófobo seleccionado del grupo constituido por: monofosforil-lípido A (MPL-A), dibehenato de trehalosa (TDB) y un derivado de sorbitano.

3. La combinación de adyuvantes según la reivindicación 1 ó 2, en la que el derivado de sorbitano es trioleato de sorbitano.

4. Un kit de combinación de inmunización que comprende una combinación de adyuvantes según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y una sustancia antigénica.

5. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la sustancia antigénica se deriva de un homogeneizado celular o fracciones del mismo.

6. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la sustancia antigénica es un filtrado de cultivo (CF), tal como un filtrado de cultivo que procede del cultivo de un microorganismo.

7. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la sustancia antigénica se deriva de *Mycobacterium tuberculosis*.

8. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la sustancia antigénica es un fragmento antigénico, por ejemplo una especie molecular sustancialmente pura.

9. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la especie molecular antigénica es de origen sintético o recombinante.

10. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la especie molecular antigénica es ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.

11. El kit de inmunización según la reivindicación 4, en el que la especie molecular antigénica es una molécula híbrida recombinante que comprende ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*.