



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 845**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00950576 .9**
86 Fecha de presentación : **21.07.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1196182**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

54 Título: **Método para mejorar la eficiencia de producción en un animal.**

30 Prioridad: **23.07.1999 US 145314 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

73 Titular/es: **Bioniche Life Sciences Inc.**
231 Dundas Street
Belleville, Ontario K8N 5J2, CA

72 Inventor/es: **Nosky, Bruce, J.;**
Pitts, Robert, E. y
Rogan, Dragan, R.

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 277 845 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

Método para mejorar la eficiencia de producción en un animal.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de un extracto de paredes de células micobacterianas par la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunológico en un animal y mejorar la eficiencia de producción del animal.

10 **Antecedentes de la invención**

Un aumento en la ganancia de peso media diaria de un animal es de gran importancia para las empresas en las cuales el peso corporal del animal es necesario para el éxito comercial de la empresa. La ganancia de peso es también importante para los animales, con inclusión de los humanos, que han perdido peso debido a una enfermedad, un trastorno mental o un tratamiento médico.

Los intentos para mejorar la eficiencia de producción en los animales de alimentación doméstica se han enfocado en gran parte en el uso de mejoradores de la eficiencia de los alimentos con inclusión, pero sin carácter limitante, de formulaciones que contienen nutrientes, vitaminas, minerales, hormonas, sulfonamidas, antiprotozoarios, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, antibióticos y vacunas.

Hormonas que incluyen, pero sin carácter limitante, estrógenos, estradiol, progesterona, progestinas sintéticas, testosterona, esteroides anabólicos y estimulantes de la producción de somatotrofina son costosas y no deben usarse en la cría de animales. Adicionalmente, su uso en la alimentación de los animales es inaceptable para grandes segmentos de la población y está restringido en algunos países. Los antiprotozoarios, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios y antibióticos con inclusión, pero sin carácter limitante, de terramicina, tetraciclina, virginiamicina, aureomicina y lincomicina son costosos, pueden ser tóxicos para los humanos y no pueden utilizarse en todas las especies animales. Existe una preocupación pública con relación al uso excesivo y el abuso de antibióticos en la reproducción animal, que conducen al desarrollo de organismos resistentes a los antibióticos. De nuevo, su utilización en la alimentación de los animales es inaceptable para grandes segmentos de la población y está restringida en algunos países. Las vacunas, utilizadas para combatir enfermedades infecciosas específicas en la alimentación doméstica son caras, no están disponibles para todas las enfermedades y pueden dar como resultado la selección de organismos patógenos en cuanto a virulencia y resistencia.

Se han utilizado diversos inmunomoduladores biológicos y químicos para estimular el sistema inmunitario a fin de minimizar el impacto de las enfermedades en los animales, con inclusión de los humanos. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, péptidos opioides, timosinas, glucocorticoides, citoquinas, interferones, levamisol, isoprinosina, polinucleótidos y productos microbianos. Productos microbianos que se han utilizado como inmunomoduladores incluyen, pero sin carácter limitante, suspensiones inactivadas por calor o tratadas con formaldehído de *Propionibacterium acnes*, polisacáridos microbianos, lipopolisacáridos, polisacáridos unidos a proteínas, muramil-dipéptido, lípido A y extracto de la pared celular de *Mycobacterium phlei* (Patente U.S. No. 4.744.984; Patente U.S. No. 5.759.554).

Los animales de alimentación doméstica son particularmente propensos a enfermedades infecciosas durante el primer año de su vida y más particularmente durante el periodo neonatal. Entre los terneros, más del 70% de las muertes que tienen lugar durante el primer año de vida ocurren durante el periodo neonatal cuando su sistema inmunitario es funcionalmente inmaduro (Radostits *et al.* 1985. Herd Health. W.B. Saunders, Philadelphia PA, pp. 116-1400). La inmadurez funcional del sistema inmunitario incluye, pero sin carácter limitante, la función sub-óptima de los neutrófilos (Hauser *et al.*, 1986. Am. J. Vet. Res. 47: 152-153), actividad disminuida del complemento (Renshaw *et al.* 1978. Immunology 34: 801-805), inducción deficiente de reacciones de hipersensibilidad retardada (Woodward *et al.* 1979. Am. J. Vet. Res. 40: 636-644), niveles bajos de producción de interleuquina (IL)-2 (Griebel *et al.* 1987. Can. J. Vet. Res. 51: 428-435) y respuestas proliferativas de linfocitos débiles (Rossi *et al.* 1979. Am. J. Vet. Res. 40: 576-579; Rossi *et al.* 1981. Am. J. Vet. Res. 27: 1369-1370).

D1, Van Kampen (Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (small Animal) 12: 186-192), describe productos dirigidos hacia la estimulación inespecífica del sistema inmunitario que se fabrican a partir de paredes de células de *Mycobacterium spp22* o fracciones de las mismas. Se considera que los estimuladores inespecíficos del sistema inmunitario afectan a la vez a las funciones humorales y celulares de la inmunidad.

Debido a la multitud de enfermedades para las cuales son vulnerables los animales y dado que, durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal, algunas de estas enfermedades son exacerbadas por un sistema inmunitario inmaduro, existe necesidad de un nuevo método para activar el sistema inmunitario a fin de mejorar la resistencia a las enfermedades, especialmente durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal, y, con ello, aumentar la eficiencia de producción en estos animales.

Este método debería ser de preparación relativamente económica, fácil de administrar y adecuado para uso en todos los animales. Además, su actividad debería mantenerse estable a lo largo del tiempo, ser reproducible entre

preparaciones, ser eficaz a los regímenes de dosis asociados con toxicidad mínima, ser segura para el consumidor y ser aceptable para todos los segmentos de la población.

Sumario de la invención

5

La presente invención satisface las necesidades anteriores al proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunitario de un animal a fin de mejorar la eficiencia de producción del animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de MCWE, activando con ello el sistema inmunitario del animal recién nacido a fin de mejorar la eficiencia de producción. De modo más particular, la presente invención proporciona el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunitario de un animal a fin de mejorar la eficiencia de producción del animal, que comprende administrar al animal dentro de las 24 horas del nacimiento una cantidad eficaz de MCWE, activando con ello el sistema inmunitario del animal a fin de mejorar la eficiencia de producción.

15

La presente invención proporciona el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunitario de un animal y mejorar la eficiencia de producción del animal que comprende administrar al animal neonato una cantidad efectiva del extracto de paredes de células de *Mycobacterium phlei* (MCWE), activando con ello el sistema inmunitario del animal y mejorando la eficiencia de producción del animal.

20

Más particularmente, la presente invención satisface las necesidades anteriores proporcionando el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento, en el cual una composición que comprende MCWE y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra a un animal dentro de las 24 horas del nacimiento en una cantidad eficaz para activar el sistema inmunitario del animal y mejorar la eficiencia de producción del animal. La preparación de MCWE es relativamente económica, fácil de administrar, adecuada para uso en todos los animales con inclusión, pero sin carácter limitante, de animales de alimentación doméstica, segura para el consumidor y aceptable para uso en todos los segmentos de la población y en todos los países. Su actividad es reproducible entre preparaciones y se mantiene terapéuticamente estable a lo largo del tiempo. Es eficaz para regímenes de dosis que están asociados con una toxicidad mínima incluso después de administración repetida, y tiene pocos efectos secundarios o ninguno. La capacidad inesperada de MCWE para estimular el sistema inmunitario de un animal durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal y mejorar la eficiencia de producción del animal proporcionar ventajas importantes para, entre otros sectores, la industria de la alimentación de los animales domésticos y el consumidor de productos de animales domésticos.

35

Aunque no se desea quedar ligados por la hipótesis siguiente, se cree que MCWE, cuando se administra dentro de las 24 horas del nacimiento como parte de una composición farmacéutica, activa la maduración del sistema inmunitario inmaduro de los animales y, al permitir que el animal resista mejor a los agentes infecciosos oportunistas y soporte mejor el estrés tanto durante como después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal, mejora la eficiencia de producción. Debe entenderse que la administración de MCWE como parte de una composición farmacéutica, no es un proceso de inmunización específico, sino que es un método para activar de modo inespecífico la maduración del sistema inmunitario del animal y, quizás también, para aumentar el metabolismo del animal a fin de mejorar la eficiencia de producción.

40

De acuerdo con ello, es un objeto de la presente invención proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar la maduración del sistema inmunitario inmaduro en un animal.

45

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para proteger un animal contra agentes infecciosos oportunistas durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

50

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para proteger un animal contra agentes infecciosos oportunistas después de los periodos de nacimiento reciente y neonatal.

55

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para permitir que un animal soporte mejor el estrés durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

60

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para permitir que un animal soporte mejor el estrés después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

65

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para proteger un animal contra las enfermedades exacerbadas por el estrés durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

ES 2 277 845 T3

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para proteger un animal contra las enfermedades exacerbadas por el estrés después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para permitir la supervivencia de un animal durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para hacer posible la supervivencia de un animal después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para aumentar el metabolismo de un animal durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para aumentar el metabolismo de un animal después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para aumentar la eficiencia del uso del pienso en un animal durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para aumentar la eficiencia del uso del pienso en un animal después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

30 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal durante los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal después de los periodos inmediato al nacimiento y neonatal.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que no es tóxico.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que no es cancerígeno.

45 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que no es teratógeno.

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que es seguro para uso en todas las especies animales.

55 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que es seguro para el consumidor.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que es aceptable para el consumidor.

60 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal utilizando una composición que puede prepararse en grandes cantidades.

65 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal utilizando una composición cuya preparación es relativamente económica.

ES 2 277 845 T3

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal utilizando una composición que se mantiene estable a lo largo del tiempo.

5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que puede utilizarse con agentes hormonales.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que puede utilizarse con otros agentes farmacéuticos.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción en un animal que puede utilizarse con vacunas.

Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes después de una revisión de la descripción detallada que sigue de la realización expuesta y las reivindicaciones del apéndice.

20 **Breve descripción de las figuras**

Fig. 1. Linfocitos T CD4⁺CD25⁺/ml (A) y linfocitos T CD4⁺MHC Clase II⁺/ml (B) en sangre obtenida el día 4 de terneros tratados dentro de las 24 horas del nacimiento (día 0) con MCWE-IV, MCWE-SC y solución salina-SC (control). Los valores corresponden a animales individuales y las barras representan valores medios para cada grupo (n = 4).

Fig. 2. Monocitos MHC Clase II⁺/ml en sangre obtenida el día 4 de terneros tratados dentro de las 24 horas del nacimiento (día 0) con MCWE-IV, MCWE-SC y solución salina-SC (control). Los valores corresponden a animales individuales y las barras representan valores medios para cada grupo (n = 4).

30 Fig. 3. Producción de INF γ por WBCs obtenidos el día 4 a partir de terneros tratados dentro de las 24 horas del nacimiento (día 0) con MCWE-IV, MCWE-SC y solución salina-SC (control). Los valores corresponden a animales individuales y las barras representan valores medios para cada grupo (n = 4).

35 Fig. 4. Ganancia de peso media diaria entre los terneros tratados, dentro de las 24 horas del nacimiento (día 0) con MCWE-IV, MCWE-IM, MCWE-SC y sin MCWE alguno (control).

40 Fig. 5. Número medio de días, durante un periodo de 71-78 días, que fue necesario el tratamiento para mantener la salud de los animales que, dentro de las 24 horas del nacimiento (día 0) recibieron MCWE-IV, MCWE-IM, MCWE-SC o no recibieron MCWE alguno (control).

45 Fig. 6. Costes, durante un periodo de 71-78 días, asociados con los tratamientos necesarios para mantener la salud de animales que, dentro de las 24 horas del nacimiento (día 0) recibieron MCWE-IV, MCWE-IM, MCWE-SC o no recibieron MCWE alguno (control).

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención proporciona el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunitario de un animal a fin de mejorar la eficiencia de producción del animal que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de MCWE, activando con ello el sistema inmunitario del animal para mejorar la eficiencia de producción. De modo más particular, la presente invención proporciona el uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunitario de un animal a fin de mejorar la eficiencia de producción del animal, que comprende administrar al animal dentro de las 24 horas del nacimiento una cantidad eficaz de MCWE, 55 activando con ello el sistema inmunitario del animal para mejorar la eficiencia de producción.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “periodo inmediato al nacimiento” incluye desde el nacimiento hasta 96 horas después del nacimiento.

60 Como se utiliza en esta memoria, el término “periodo neonatal” incluye desde el nacimiento hasta 28 días después del nacimiento.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “sistema inmunitario inmaduro” incluye deficiencias funcionales de los glóbulos blancos de la sangre del sistema inmunitario.

65 Como se utiliza en esta memoria, la expresión “eficiencia de producción” incluye la ganancia de peso media diaria de un animal, la mortalidad de un animal, el número de días de tratamiento necesarios para mantener la salud de un animal, el coste del tratamiento necesario para mantener la salud de un animal y cualquier combinación de los mismos.

ES 2 277 845 T3

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “mejora de la eficiencia de producción” incluye un aumento en la ganancia media diaria de peso de un animal, una disminución en la mortalidad de un animal, una disminución en el número de días de tratamiento necesarios para mantener la salud de un animal, una disminución en el coste del tratamiento necesario para mantener la salud de un animal y cualquier combinación de los mismos.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “agente farmacéutico” incluye cualquier agente natural o sintético aprobado por una agencia reguladora de un país o un gobierno de estado o incluido en la lista de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en un animal, con inclusión de un humano.

Como se utiliza en esta memoria, la expresión “animal de alimentación doméstica” incluye cualquier animal que es producido comercialmente para uso como alimento o en alimentos.

MCWE y un vehículo farmacéuticamente aceptable se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el MCWE con vehículos líquidos, con vehículos sólidos, o con ambos. Los vehículos líquidos son vehículos acuosos y vehículos no acuosos. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, suspensiones acuosas, emulsiones aceitosas, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de agua-en-aceite-en-agua, emulsiones específicas del sitio, emulsiones de residencia larga, emulsiones adherentes, microemulsiones, nanoemulsiones y liposomas. Los vehículos sólidos son vehículos biológicos y vehículos químicos. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, micropartículas, microesferas, nanoesferas, nanopartículas, minibombas y polímeros naturales y sintéticos que permiten la liberación sostenida del MCWE. Adicionalmente, puede utilizarse MCWE con uno cualquiera, la totalidad, o cualquier combinación de excipientes con indiferencia del vehículo utilizado para presentar la composición a las células sensibles. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, antioxidantes, tampones, y bacteriostáticos, y pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Por ejemplo, MCWE se suspende en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como, pero sin carácter limitante, agua, solución salina o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se trata por ultrasonidos. Opcionalmente, la mezcla producida por ultrasonidos se emulsiona por microfluidización. En una realización, se mezcla MCWE liofilizado con solución salina estéril y se trata por ultrasonidos a una potencia de 20% durante 5 minutos (Modelo L2015 Sonicator, Heat Systems-Ultrasonics Inc) y, opcionalmente, la mezcla tratada por ultrasonidos se emulsiona por microfluidización a 15.000-30.000 psi (1055-2109 kg/cm²) para un paso directo (Modelo M-110Y; Microfluidics, Newton, MA). La mezcla se procesa asépticamente o se esteriliza finalmente.

Por ejemplo, se mezcla MCWE con un aceite mineral o con un aceite neutro que incluye, pero sin carácter limitante, un diglicérido, un triglicérido, un fosfolípido, un lípido, un aceite y mezclas de los mismos, en donde el aceite contiene una mezcla apropiada de ácidos grasos poliinsaturados y saturados. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante, escualano, escualeno, n-hexadecano y aceite de soja, aceite de canola, aceite de palma, aceite de oliva y migliol, en donde el número de carbonos de los ácidos grasos está comprendido entre 12 y 22 y en donde los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. Opcionalmente, el lípido o fosfolípido cargado puede suspenderse en el aceite neutro. En una realización, se disuelven fosfatidilcolina y aceite de triglicéridos de soja se disuelven por calentamiento moderado a 50°-60°C. Se añade MCWE liofilizado, se incuba la mezcla durante 60 min a 20°C y se añade PBS. La mezcla se trata por ultrasonidos a 20% de potencia durante 5 min y, opcionalmente, se emulsiona por microfluidización a 15.000-30.000 psi (1055-1109 kg/cm²) para un paso directo. La mezcla se procesa luego asépticamente o se esteriliza finalmente.

Los expertos en la técnica comprenderán que existen muchos métodos para suspender el MCWE en su vehículo farmacéuticamente aceptable. Numerosas variaciones de vehículo acuoso y de vehículo aceitoso y acuoso, de proporciones y de medios de emulsionamiento serán evidentes para los expertos en la técnica y pueden utilizarse con MCWE en la práctica del método presente. Opcionalmente, antibióticos que incluyen, pero sin carácter limitante, gentamicina y anfotericina B pueden añadirse como conservante a la emulsión de MCWE. La concentración preferida de gentamicina está comprendida entre aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 50 µg/ml, y la de anfotericina B está comprendida entre aproximadamente 0,5 µg/ml y aproximadamente 5 µg/ml.

Animales cuyo sistema inmunitario inmaduro puede ser activado por MCWE cuya eficiencia de producción puede mejorarse por MCWE incluyen, pero sin carácter limitante, mamíferos, aves, peces, anfibios y crustáceos recién nacidos. Preferiblemente, los animales son mamíferos, aves y peces, más preferiblemente mamíferos y aves. Los mamíferos incluyen, pero sin carácter limitante, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, cabras, renos, alces, gamos, bisontes, perros, gatos y humanos. Las aves incluyen, pero sin carácter limitante, pollos, patos, gansos, pavos y codornices.

Las rutas de administración incluyen, pero sin carácter limitante, oral, intravenosa (IV), subcutánea (SC), intramuscular (IM), intraperitoneal, intradérmica, intraocular, intrapulmonar, transdérmica, subdérmica, tópica, mucosal, nasal y de impresión en la piel. Preferiblemente, el MCWE se administra por vías oral, IV, SC o IM.

MCWE como parte de una composición farmacéutica se administra a un animal en un tiempo y en una cantidad eficaces para activar el sistema inmunitario inmaduro del animal y mejorar la eficiencia de producción del animal. El tiempo es preferiblemente desde 1 hora de edad hasta 28 días de edad, más preferiblemente desde 1 hora de edad a 4 días de edad, y muy preferiblemente desde 1 hora de edad a 24 horas de edad. La cantidad de MCWE adminis-

trada dependerá del animal de que se trate, el tiempo de administración, la ruta de administración y otros factores tales como la especie, el tamaño y el peso del animal. Preferiblemente, la dosis de MCWE administrada es de aproximadamente 0,001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis, de modo más preferible desde aproximadamente 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis, y de modo muy preferible desde aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis. Dependiendo de la ruta de administración, el volumen por dosis es de modo preferible aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 50 ml por dosis, de modo más preferible aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 25 ml y de modo muy preferible aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 10 ml. El MCWE puede administrarse en una sola dosis o en dosis múltiples a lo largo de un periodo de tiempo y con arreglo a un protocolo apropiado para el animal de que se trate y la ruta de administración. La cantidad de MCWE administrada está comprendida de modo preferible entre aproximadamente 1 mg y 1000 mg, de modo más preferible entre aproximadamente 25 mg y 500 mg y de modo muy preferible entre aproximadamente 50 mg y 300 mg.

Los ejemplos siguientes servirán para ilustrar adicionalmente la presente invención sin constituir, al mismo tiempo, no obstante, limitación alguna de la misma.

Ejemplo 1

Emulsión de MCWE

Se preparó MCWE de acuerdo con la Patente U.S. No. 4.744.984. Resumidamente, se desarrollaron organismos *Mycobacterium phlei* en medio líquido y se recogieron, se disgregaron las bacterias, se recogieron las paredes celulares, se desproteinizaron, se deslipidaron, se lavaron, y se liofilizaron. MCWE puede obtenerse comercialmente de Bioniche Life Sciences, Inc. (London, Ontario, Canadá). Para uso, se emulsionó MCWE liofilizado en:

TABLA 1

Emulsión de MCWE

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL
MCWE liofilizado	0,1 g
Escualano	2%
Polisorbato (Tween)-80 [®]	0,2 g
Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2	QS para 100 ml
Gentamicina	3,0 mg

Se añadió MCWE a un vaso de precipitados seco y estéril. Se añadió escualano y la mezcla se cubrió y se dejó en reposo durante una noche. La mezcla se llevó a 100 ml con solución salina estéril tamponada con fosfato que contenía 80% de monooleato de polioxietilensorbitán, Tween 80[®]. La concentración óptima de aceite en la mezcla de aceite y agua está comprendida entre aproximadamente 1% y 7%. La mezcla se emulsionó utilizando un microfluidizador de sobremesa Microfluidics modelo M-110Y a 10.700-23.000 psi (752-1617 kg/cm²) para un flujo directo. Se llenaron viales de vidrio estériles con 5 y 10 ml de la emulsión de MCWE en condiciones de flujo de aire laminar estéril utilizando un dispositivo Filamatic Vial Filler (National Instrument Co., Baltimore, MD). Los viales de vidrio se taparon, sellaron y guardaron a 4°C.

Ejemplo 2

Activación del sistema inmunitario inmaduro por MCWE

Se obtuvieron terneros clínicamente sanos y privados de calostro de vacas domésticas dentro de 8 horas de su nacimiento. Los terneros se pusieron en corrales individuales dentro de un refugio abierto, se alimentaron dos veces al día con leche fresca que no contenía antibiótico alguno y se sometieron a las mismas prácticas rutinarias del rancho. No se administró medicación o vacunación, alguna distinta de MCWE, durante el periodo de estudio.

Se dividieron aleatoriamente 15 terneros recién nacidos en 3 grupos. Dentro de las 24 horas del nacimiento, los terneros del Grupo 1 recibieron 250 μg de MCWE en 1 ml de emulsión IV, los terneros del Grupo 2 recibieron 250 μg de MCWE en 1 ml de emulsión SC y los terneros del Grupo 3 recibieron 1 ml de solución salina SC.

ES 2 277 845 T3

Se evaluaron dos veces al día la temperatura corporal, el comportamiento, el consumo de leche y la consistencia de las heces y se registraron en una escala de 0 (normal) a 3 (síntomas graves). La hidratación se evaluó dos veces al día y se registró en una escala de 0 (normal) a 2 (deshidratación grave). Los animales que tenían un registro superior a 1 se consideraron como clínicamente anormales y se excluyeron de los análisis del estudio.

La sangre, obtenida de cada animal antes de la administración de MCWE, se analizó en cuanto a glóbulos blancos de la sangre (WBCs) y respecto a interferón gamma (IFN γ). Adicionalmente, se realizaron dos ensayos de turbidez con sulfato de cinc para confirmar que no se había producido transferencia de anticuerpos maternos. La sangre, obtenida de cada animal los días 1-4 después de la administración de MCWE, se analizó en cuanto a WBCs y en cuanto a IFN γ .

Los recuentos de WBC se realizaron utilizando un instrumento CELL-DYN 3500 R ANALYZER[®] (Abbott Laboratories, Irving, TX) y Sheath Reagent (WIC/HGB Lyse Diluent). Se determinaron los recuentos diferenciales de WBC en frotis de sangre teñidos con Wright. La sangre entera se sometió a lisis en solución de cloruro de amonio para generar una población de leucocitos de sangre periférica (EDLs) que incluían monocitos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Se utilizó citometría de flujo para analizar las subpoblaciones de linfocitos y monocitos utilizando los anticuerpos enumerados en la Tabla 2. Se utilizaron compuertas electrónicas basadas en dispersión de la luz en ángulo de avance y ángulo recto para excluir los PMNs del análisis citométrico de flujo.

TABLA 2

Anticuerpos Monoclonales

Numero de Clon	Especificidad de Antígeno	Tipo de Célula Identificado
MM1A	CD3	Linfocito T
Pig45a	IgM de Superficie	Linfocito B
DH59B	Células mononucleares	Monocito
IL-A11	CD4	Linfocito T CD4+
CACT116A	CD25	Linfocito T CD4 ⁺ CD25 ⁺
TH14B	MHC Clase II	Linfocito T CD4 ⁺ MHC Clase 2 ⁺

La marcación simple se detectó utilizando IgG anti-ratón de cabra conjugada con FITC. La marcación dual se detectó utilizando IgG anti-ratón de cabra conjugada con FITC e Ig anti-ratón de cabra específica de isotipo, conjugada a PE. Los análisis citométricos de flujo se realizaron utilizando un citómetro de flujo FACSSCAN[®] y el programa CELL QUEST[®].

El IFN γ se determinó utilizando la población de PBL aislada por análisis citométrico de flujo. 2×10^5 células PBL en 200 μ l de medio exento de suero (AIM-V[®]; Gibco/BRL, Life Technologies, Rockville, MD) complementadas con 2% de suero bovino fetal y 2×10^{-5} MESH se extendieron por triplicado en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 48 h con o sin 10 μ g/ml del mitógeno Concanavalina A (Con A) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO). Los sobrenadantes de cultivo exentos de células se recogieron y se ensayaron en cuanto a IFN γ utilizando un ELISA de captura (Mutwiri *et al.* 2000. Vaccine, en prensa).

Entre los animales de los Grupos 1, 2 y 3, la administración de MCWE no tuvo efecto significativo alguno sobre los recuentos totales de WBC, linfocitos T totales/ml, los linfocitos B totales/ml y los monocitos totales/ml.

Los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ se identificaron por citometría de flujo como células que se co-marcaban con CACT116A e IL-A11. Los linfocitos T CD4⁺MHC Clase II⁺ se identificaron por citometría de flujo como células que se co-marcaban con TH14B e IL-A11. La expresión superficial de moléculas CD25 y moléculas MHC Clase II está unida estrechamente a la activación de los linfocitos T CD4⁺. Es decir, el número de linfocitos T CD4⁺ que expresan CD25 y MHC Clase II es un indicador de la activación del sistema inmunitario. Como se muestra en Fig. 1A, el día 4 después del tratamiento con MCWE, los animales clínicamente normales del Grupo 2 (MCWE-SC) tenían más linfocitos T CD4⁺ CD25⁺/ml de sangre que los animales del Grupo 3 clínicamente normales (solución salina-SC). Como se muestra en Fig. 1B, el día 4 después del tratamiento, los animales del Grupo 2 clínicamente normales (MCWE-SC) tenían más linfocitos T CD4⁺MHC Clase II⁺ que los animales clínicamente normales del Grupo 3 (solución salina-SC).

ES 2 277 845 T3

Los monocitos de la sangre se identificaron por citometría de flujo como células que se marcaban con DH59B⁺. Los monocitos MHC de Clase II⁺ en la sangre se identificaron por citometría de flujo como células que se co-marcaban con TH14B y DH59B⁺. La expresión en superficie de las moléculas MHC Clase II es esencial también para que los monocitos se comporten como células presentadoras de antígeno y el número de monocitos que expresan MHC Clase II es un indicador de la capacidad funcional del sistema inmunitario. Como se muestra en Fig. 2, el día 4 después del tratamiento, los animales clínicamente normales del Grupo 2 (MCWE-SC) tenían más monocitos MHC Clase II⁺/ml de sangre que los animales clínicamente normales del Grupo 3 (solución salina-SC).

La producción de INF γ por los WBCs se midió utilizando el mitógeno Con A en un ensayo de estimulación *in vitro*. La citoquina INF γ juega un papel fundamental en la regulación del sistema inmunitario y activación de las células efectoras que proporcionan defensa contra patógenos intracelulares. La producción de INF γ por los WBCs es un indicador de la capacidad del sistema inmunitario para responder a los agentes infecciosos. Como se muestra en Fig. 3, el día 4 después del tratamiento, los WBCs de los animales clínicamente normales del Grupo 2 (MCWE-SC) exhibían un aumento acusado en la producción de INF γ .

Ejemplo 3

Mejora de la eficiencia de producción en los terneros por MCWE

El día 0, 400 centenares de terneros de vacas domésticas, de menos de 24 horas de edad, se dividieron aleatoriamente en cuatro Grupos iguales (Grupos 4-7). Se pesaron los terneros, se pusieron en jaulas individuales, se analizaron dos veces al día con un sustitutivo de leche constituido por cereales y agua que no contenía antibiótico alguno y se sometieron a las mismas prácticas de rutina del rancho.

Dentro de las 24 horas del nacimiento, los terneros del Grupo 4 recibieron 250 μ g de MCWE en 1 ml de emulsión IV, los terneros del Grupo 5 recibieron 250 μ g de MCWE en 1 ml de emulsión IM, los terneros del Grupo 6 recibieron 250 μ g de MCWE en 1 ml de emulsión SC y los terneros del Grupo 7 no recibieron MCWE alguno (control).

Cada animal se observó dos veces al día en cuanto a cambios de apetito, hidratación y síntomas de enfermedad. Se anotaron la mortalidad, los días de enfermedad y los costes del tratamiento para cada animal. Después de 71-78 días, se pesó cada animal y se calculó la ganancia de peso media diaria (ADG) como sigue:

$$\frac{\text{kg el día 71-78} - \text{kg el día 0}}{\text{kg el día 71-78}}$$

Los resultados del tratamiento expresados en ADG para los Grupos 4-7 se muestran en la Tabla 3 y Fig. 4. Únicamente se incluyeron en los cálculos aquellos animales para los cuales existían datos completos el día final del estudio. Cada grupo se inició con 100 animales. Al final del estudio, los datos eran completos para 91 animales en el grupo 4 (MCWE-IV), 89 animales en el grupo 5 (MCWE-IM), 93 animales en el grupo 6 (MCWE-SC) y 96 animales en el grupo 7 (control).

TABLA 3

Eficiencia de producción de los terneros recién nacidos

GRUPO	NÚMERO DE ANIMALES	PESO MEDIO, LBS (KG) EL DIA 0	PESO MEDIO, LBS (KG) EL DIA 71-78	GANANCIA MEDIA, LBS (KG)	ADG, LBS (KG)
4 (IV)	91	89,38 (40,54)	158,27 (71,79)	76,76 (34,82)	1,01 (0,46)
5 (IM)	89	91,98 (41,72)	162,54 (73,73)	80,58 (36,55)	1,07 (0,49)
6 (SC)	93	86,91 (39,42)	162,34 (73,64)	81,08 (36,78)	1,07 (0,49)
7	96	87,39 (39,64)	153,28 (69,52)	69,54 (31,54)	0,92 (0,42)

ADG aumentaba significativamente ($p < 0,02$) en los animales tratados con MCWE (Grupos 4-6) en comparación con los animales de control (grupo 7). Los animales tratados con MCWE ganaban aproximadamente 0,1 libra/día (0,0454 kg/día) más que los animales de control.

El número medio de días de tratamiento y los costes de tratamiento necesarios para mantener la salud de los animales se compararon a lo largo de un periodo de 71-78 días. Fig. 5 muestra que el número medio de días de tratamiento era mayor para los animales del Grupo 7 (control) que para los animales de los Grupos 4-6 (tratados con MCWE). Fig. 6 muestra que los costes de tratamiento a lo largo del periodo de 71 a 78 días eran mayores para los animales del Grupo 7 (control) que para los Grupos 4-6 (tratados con MCWE).

ES 2 277 845 T3

Ejemplo 4

Mejora de la eficiencia de producción en los cerdos por MCWE

5 El día 0, lechones de cerdas domésticas, de menos de 24 horas de edad, se dividen aleatoriamente en dos Grupos iguales (Grupos 8 y 9). Se pesan los lechones, se alimentan dos veces al día y se someten a las mismas prácticas rutinarias del rancho. Dentro de las 24 horas del nacimiento, cada lechón del Grupo 8 recibe emulsión SC de MCWE. Los lechones del Grupo 9 no reciben cantidad alguna de MCWE (control). Cada lechón se observa respecto a cambios de apetito, hidratación y síntomas de enfermedad. El día 30, se pesan los animales y se calcula el valor ADG para cada animal. Se determinan también la mortalidad, los días de enfermedad y los costes de tratamiento para cada animal durante el periodo de 30 días. Al final del periodo de estudio, los animales del Grupo 8 (tratados con MCWE) tienen mejor ADG, menor mortalidad, menos días de enfermedad y menos costes de tratamiento que los animales del Grupo 9 (control).

15 Ejemplo 5

Mejora de la eficiencia de producción en los pollos por MCWE

20 El día 0, polluelos de gallina doméstica común, de menos de 24 horas de edad, se dividen aleatoriamente en dos Grupos iguales (Grupos 10 y 11). Se pesan los pollos, se alimentan y se someten a las mismas prácticas rutinarias del rancho. Dentro de las 24 horas del nacimiento, cada pollo del Grupo 10 recibe emulsión de MCWE por vía oral. Los pollos del Grupo 11 no reciben MCWE alguno (control). Se observa cada pollo respecto a cambios de apetito, hidratación y síntomas de enfermedad. El día 15, se pesan los pollos y se calcula el valor ADG para cada ave. Se determinan también la mortalidad, los días de enfermedad y los costes de tratamiento para cada ave. Al final del periodo de estudio, los pollos del Grupo 10 (tratados con MCWE) tienen mejor ADG, menor mortalidad, menos días de enfermedad y menos costes de tratamiento que los pollos del Grupo 11 (control).

Ejemplo 6

Mejora de la eficiencia de producción en las ovejas por MCWE

30 El día 0, corderos de ovejas domésticas, de menos de 24 horas de edad, se dividen aleatoriamente en dos Grupos iguales (Grupos 12 y 13). Se pesan los corderos, se alimentan y se someten a las mismas prácticas rutinarias del rancho. Dentro de las 24 horas del nacimiento, cada cordero del Grupo 12 recibe emulsión SC de MCWE. Los corderos del Grupo 13 no reciben MCWE alguno. Se observa cada cordero en cuanto a cambios de apetito, hidratación y síntomas de enfermedad. Se pesan los corderos el día 40, y se calcula el valor ADG para cada cordero. Se determinan también la mortalidad, los días de enfermedad y los costes de tratamiento para cada cordero. Al final del periodo de estudio, los corderos del Grupo 12 (tratados con MCWE) tienen mejor ADG, menor mortalidad, menos días de enfermedad y menos costes de tratamiento que los corderos del Grupo 13 (control).

40

45

50

55

60

65

ES 2 277 845 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para activar el sistema inmunitario de un animal, en el cual el medicamento es para administración al animal entre 1 hora y 28 días de edad.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el medicamento es para administración al animal entre 1 hora y 4 días de edad.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el medicamento es para administración al animal dentro de las primeras 24 horas de edad.
- 15 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el extracto de paredes de células micobacterianas se prepara a partir de la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*, o especie *Mycobacterium phlei*.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la activación del sistema inmunitario comprende activación de los glóbulos blancos de la sangre.
- 20 6. El uso de la reivindicación 5, en el cual los glóbulos blancos se seleccionan del Grupo constituido por linfocitos T y monocitos.
7. El uso de la reivindicación 6, en el cual los linfocitos T son linfocitos T CD4⁺.
- 25 8. El uso de la reivindicación 7, en el cual los linfocitos T CD4⁺ son linfocitos T CD4⁺CD25⁺ o linfocitos T CD4⁺MHC Clase II⁺.
9. El uso de la reivindicación 6, en el cual los monocitos son monocitos MHC Clase II⁺.
- 30 10. El uso de la reivindicación 5, en el cual los glóbulos blancos activados exhiben una producción incrementada de IFN- γ en respuesta a un estímulo.
- 35 11. El uso de un extracto de paredes de células micobacterianas para la fabricación de un medicamento útil como tratamiento para mejorar la eficiencia de producción de un animal, en el cual el medicamento es para administración al animal entre 1 hora y 28 días de edad.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el medicamento es para administración al animal entre 1 hora y 4 días de edad.
- 40 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual el medicamento es para administración al animal dentro de las primeras 24 horas de edad.
- 45 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el cual el extracto de paredes de células micobacterianas se prepara a partir de la familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*, o especie *Mycobacterium phlei*.
15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el cual la mejora de la eficiencia de producción es un incremento en la ganancia de peso media diaria del animal o un aumento en la eficiencia de uso de la alimentación.
- 50 16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el cual el aumento de la eficiencia de producción es una disminución en la mortalidad del animal, una disminución en el número de días de tratamiento necesarios para mantener la salud del animal, una disminución en el coste del tratamiento necesario para mantener la salud del animal, o cualquier combinación de los mismos.
- 55 17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el animal es un mamífero, ave, pez, anfibio o crustáceo.
18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el animal es un animal de alimentación doméstica.
- 60 19. El uso de la reivindicación 18, en el cual el animal de alimentación doméstica es un ternero, un pollo, un lechón, un cabrito, un cervato o un cordero.
20. El uso de la reivindicación 18, en el cual el animal de alimentación doméstica es un ternero de una vaca doméstica.
- 65 21. El uso de la reivindicación 18, en el cual el animal de alimentación doméstica es un polluelo de una gallina doméstica.

ES 2 277 845 T3

22. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el extracto de paredes de células micobacterianas está combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 23. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la administración es subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal u oral.

10 24. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la cantidad del extracto de paredes de células micobacterianas administrada al animal es de aproximadamente 0,001 μg por kg a aproximadamente 600 μg por kg, aproximadamente 0,01 μg por kg a aproximadamente 400 μg por kg, o aproximadamente 0,1 μg por kg a aproximadamente 200 μg por kg por dosis.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

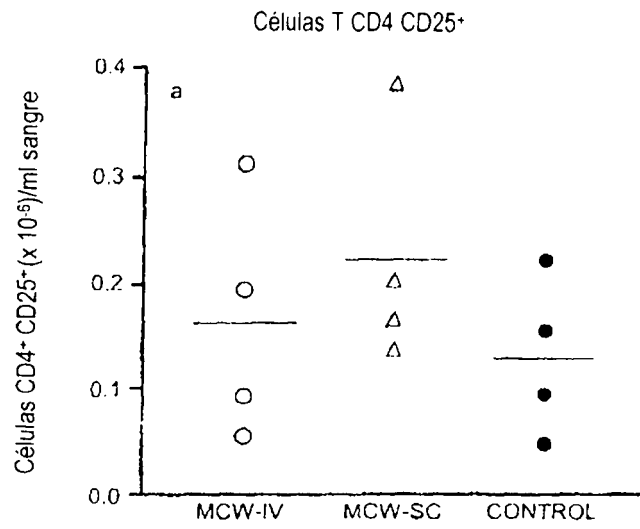


Fig. 1A

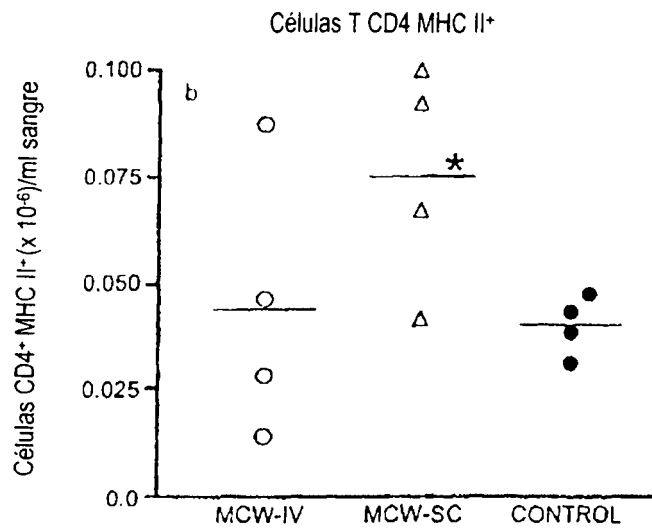


Fig.1B

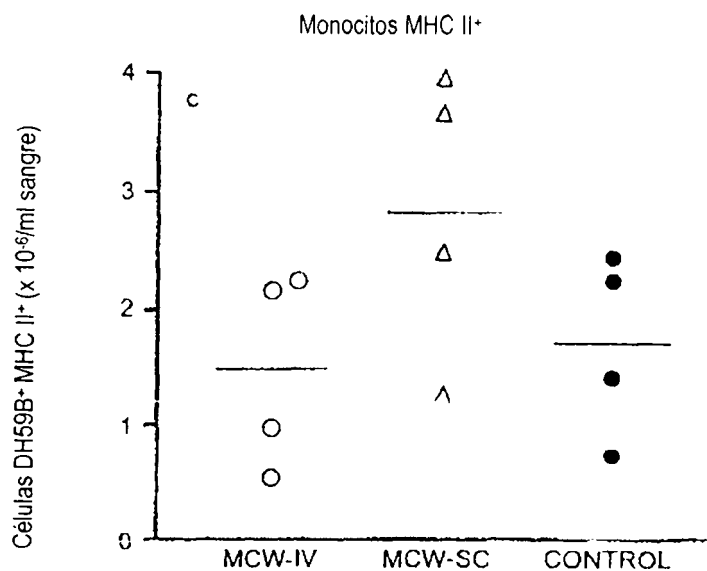


Fig. 2

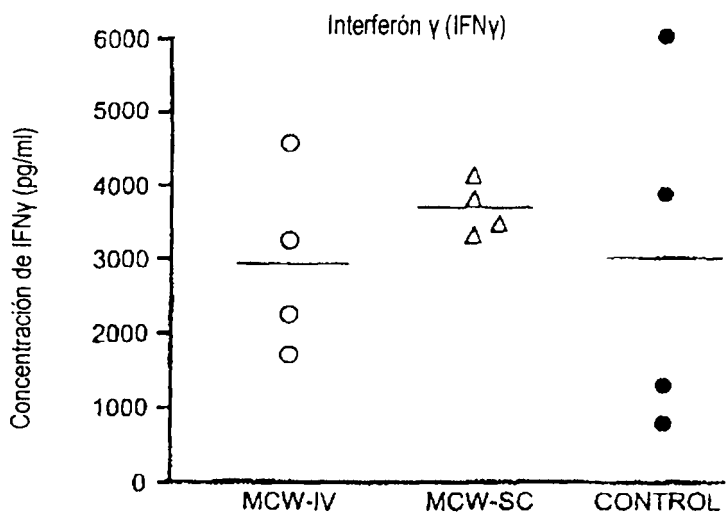


Fig. 3

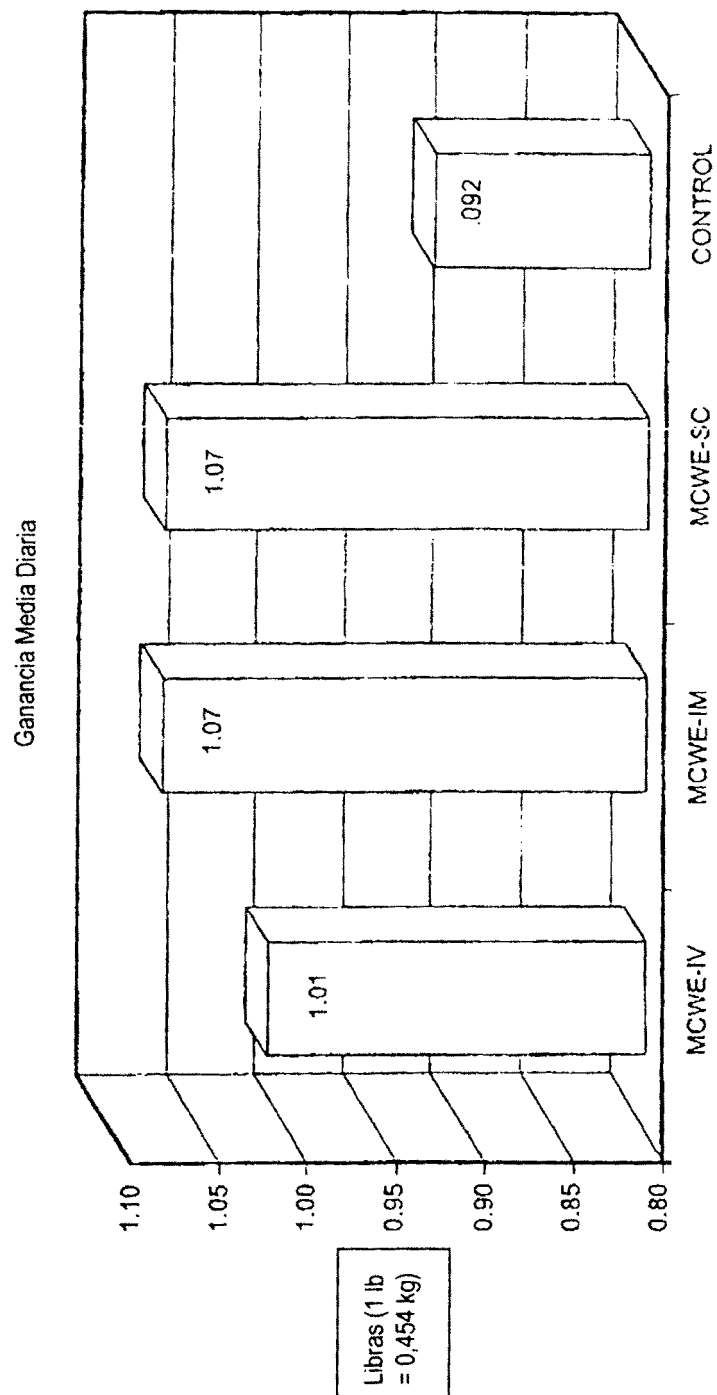


Fig. 4

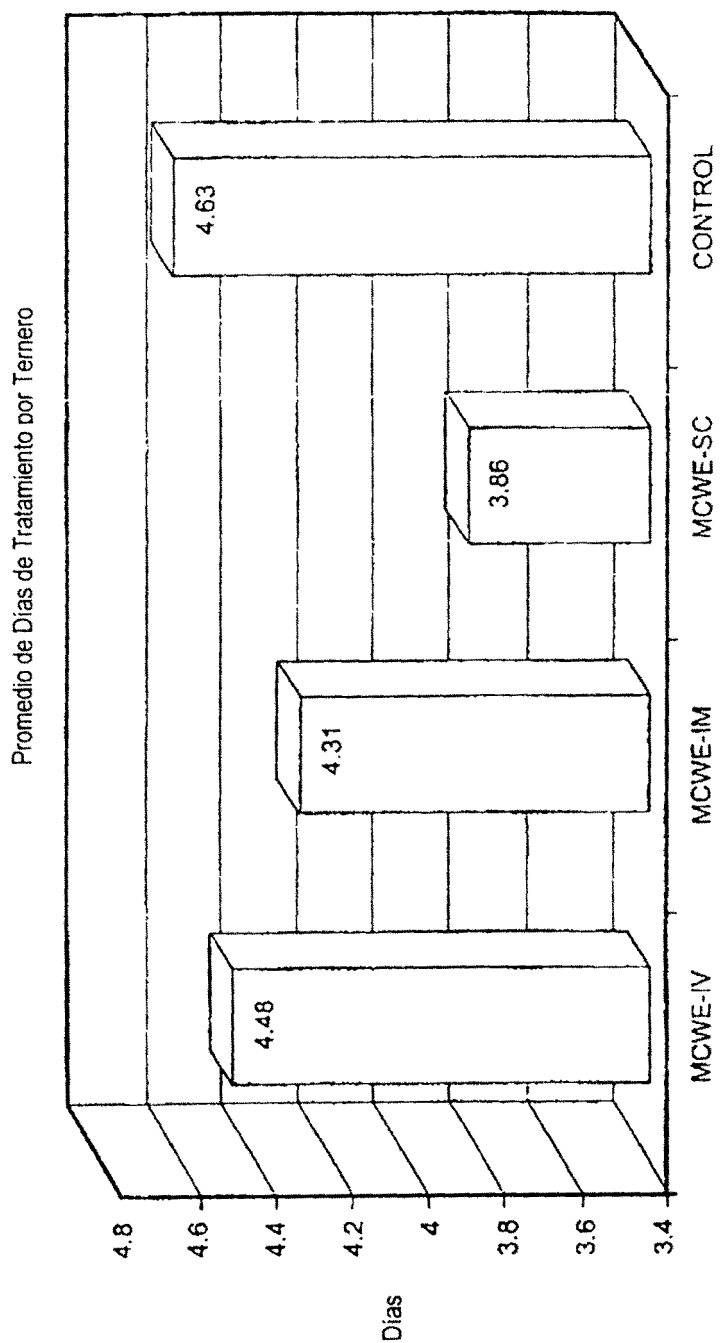


Fig. 5

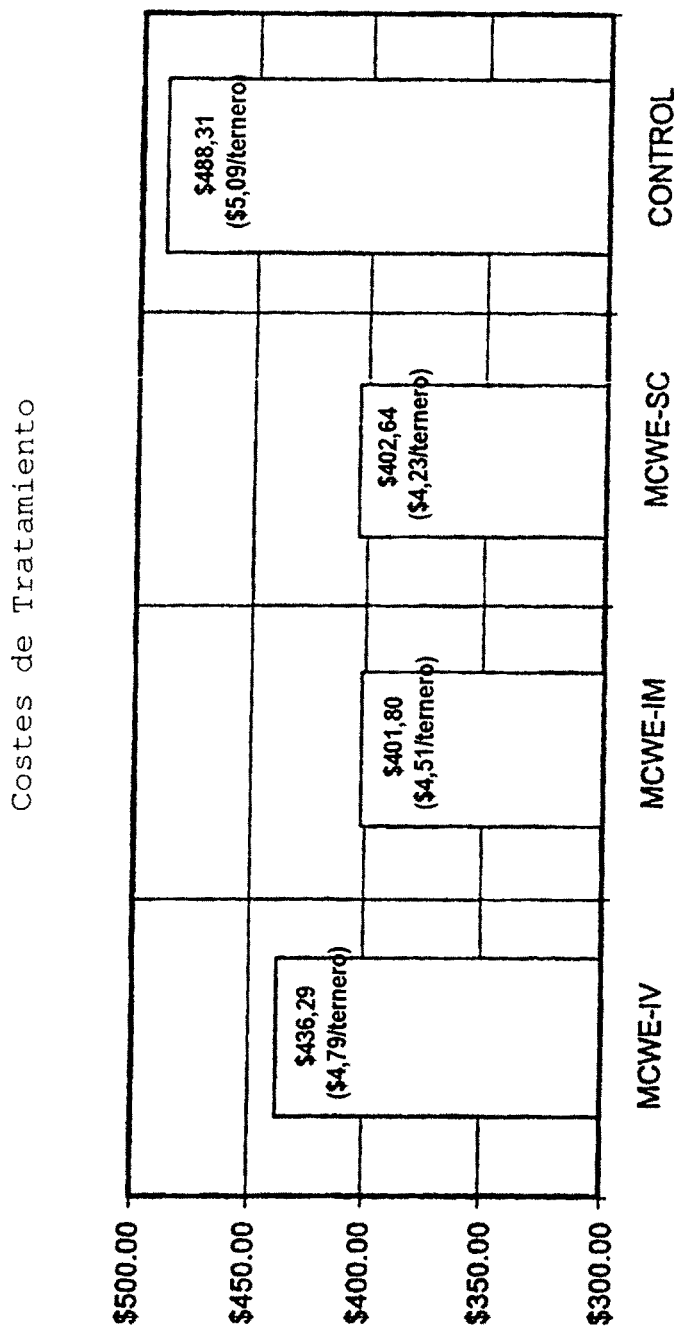


Fig. 6