



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 324 467**

(51) Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02715607 .4**
(96) Fecha de presentación : **17.01.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1368044**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.2003**

(54) Título: **Inmunomodulador para la gestión de enfermedad/infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.08.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.08.2009

(73) Titular/es: **Mafatlal Khamar Bakulesh**
201, Ashadha, Vasundhara Colony
Gulbai Tekra, Ellisbridge
Gujarat, Ahmedabad 380-006, IN
Ambalal Modi Indravadan

(72) Inventor/es: **Bakulesh, Mafatlal Khamar y**
Indravadan, Ambalal Modi

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Inmunomodulador para la gestión de enfermedad/infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

5 Esta invención se refiere a inmunomoduladores para la gestión de la enfermedad/infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Fundamento de la invención

10 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se aisló por primera vez en 1983. Se sabe que el agente causante del SIDA es un virus de la familia de los retrovirus llamado en español VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). Sin embargo, la infección con VIH, no da lugar inmediatamente a los síntomas manifiestos del SIDA. Tres a seis semanas después de la infección primaria por VIH más del 50% de los individuos desarrollan el síndrome agudo del VIH, que es auto-limitante. Los signos clínicos que se observan durante este periodo incluyen fiebre, faringitis, 15 linfadenopatía, dolor de cabeza, artralgia, mialgia, malestar, letargia, náuseas, vómitos, diarrea, sarpullidos en la piel, ulceración mucocutánea, meningitis, encefalitis, neuropatía etc. La única indicación de la exposición al virus puede ser la presencia de anticuerpos para el mismo en la sangre del sujeto infectado que a continuación se describe como “VIH positivo”. La infección puede permanecer latente; dando lugar a síntomas no obvios, y el periodo de incubación antes del desarrollo del SIDA puede variar de varios meses a décadas. El desarrollo del SIDA propiamente dicho 20 puede ir precedido por el complejo relacionado con el SIDA (abreviadamente CRS), que se caracteriza por fiebre sin explicación, pérdida de peso, tos o diarrea. El desarrollo del SIDA y/o CRS es dependiente del mal funcionamiento del sistema inmune. Son escasamente conocidas las razones del periodo variable entre la infección con el virus y el mal funcionamiento del sistema inmune en un individuo infectado. Factores actualmente desconocidos pueden desencadenar la proliferación del virus con la desactivación consiguiente del sistema inmune. Las víctimas de la 25 enfermedad son luego sometidas a diversas infecciones y enfermedades malignas, que, al no ser controladas por el sistema inmune desactivado, conducen a la muerte. Así el VIH se caracteriza por el síndrome “VIH agudo” seguido por una “etapa asintomática” con latencia clínica. La etapa sintomática se establece más tarde con la desactivación del sistema inmune, que finalmente conduce a la muerte del individuo infectado con el VIH.

30 Aunque la enfermedad es causada por el virus, la morbilidad y la mortalidad asociada con la enfermedad es debida a la desactivación del sistema inmune. La desactivación del sistema inmune se caracteriza por la disminución del recuento de los linfocitos CD4⁺ T. Debido a esta razón el sistema de clasificación revisado en 1993 para el VIH está basado en el recuento de los linfocitos CD4⁺ T. La enfermedad por VIH se divide empíricamente basándose en el recuento de los linfocitos CD4 que es una medida de la inmunodeficiencia.

- 35
- a) Etapa temprana: Recuento de células CD4⁺ T más de 500.
 - b) Etapa intermedia: Recuento de células CD4⁺ T de 200 a 500.
 - 40 c) Etapa avanzada: Recuento de células CD4⁺ T menos de 200.

Se ha encontrado que los individuos con enfermedad por VIH no progresiva tienen recuentos estacionarios de CD4. También se ha observado que tiene una fuerte respuesta inmune frente a los virus.

45 Existen pruebas de que en la infección por VIH, hay una pérdida espectacular de células CD4 T, que da como resultado un desarrollo muy rápido de los síntomas manifiestos del SIDA. La mayoría de los síntomas del SIDA que definen infecciones oportunistas y verdaderas enfermedades malignas ocurren en la fase avanzada de la enfermedad en donde el recuento de células CD4 es menos de 200 células/ μ L.

50 *Recuento de CD4 y VIH*

Aunque el VIH es una infección viral, la carga viral puede determinarse con una precisión razonable mediante el recuento de CD4 (una medida del estado del sistema inmune) que desempeña una función principal en la gestión del VIH debido a las siguientes razones.

- 55
1. La morbilidad y mortalidad en individuos infectados por VIH es debida a infecciones oportunistas. Estas infecciones oportunistas definen el comienzo del SIDA en individuos VIH positivos. El riesgo de enfermedades oportunistas aumenta marcadamente cuando el recuento de células CD4⁺ disminuye hasta menos de 200 células/mm³.
 - 60 2. El recuento de CD4 proporciona una estimación del grado de inmunodeficiencia existente. La inmunodeficiencia es responsable de que los individuos VIH positivos se conviertan enfermos de SIDA.
 3. La iniciación de la terapia anti-retroviral también es dependiente del recuento de CD4.
 - 65 4. El resultado de la terapia anti-retroviral también es dependiente del recuento de CD4. La mayor supervivencia está asociada con el recuento de CD4 inicial más elevado.

5. El riesgo de progreso hacia la enfermedad que define el SIDA está asociado con un recuento en disminución de CD4. El riesgo es más bajo cuanto más elevado el recuento de CD4.
6. La probabilidad de desarrollar SIDA en 3 años es significativamente mayor cuando el recuento de CD4 es bajo (menor que 200 células CD4 + T) comparado con un recuento elevado de células CD4⁺. Para una carga viral mayor que 55 k, obtenida por transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) el riesgo es 32,6% si el recuento de CD4⁺ T es más de 500 células/mm³ comparado con 85,5% para los individuos con un recuento de CD4 de menos de 200 células/mm³.
7. Similarmente para una carga viral de 20 k-55 k (RT-PCR) el riesgo de desarrollar SIDA es 9,5% cuando el recuento de CD4 es más de 750 células/mm³ comparado con 40,1% cuando el recuento de CD4 es menos de 350 células/mm³.

Objetivos de la terapia

- Supresión de la carga viral máxima y duradera.
- Restablecimiento y/o conservación de la función inmunológica.
- Mejora de la calidad de vida.
- Reducción de la morbilidad y mortalidad relacionada con el VIH.

El método para tratar el VIH incluye diversas opciones terapéuticas. Las opciones incluyen gestión de síntomas e infecciones que se manifiestan en los individuos infectados por el VIH en diversas etapas de la enfermedad. Los fármacos anti-retrovirales se usan para mantener bajo control la infección por VIH (carga viral). Dichos fármacos mantienen la carga viral bajo control. Los primeros fármacos anti-retrovirales como la azotimidina retrasaban el progreso de la enfermedad y no tenían ningún efecto significativo sobre el recuento de CD4. Los inhibidores de proteasas como el indinavir y ritonavir que se han introducido recientemente mejoran el recuento de CD4 al mismo tiempo que reducen la carga viral. Todos los fármacos (anti-retrovirales) tienen sus propios efectos secundarios. La resistencia de a los fármacos también ha de tenerse en cuenta. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar un mecanismo de terapia alternativa para tratar el VIH.

Puesto que el recuento de CD4 es importante en mantener la inmunidad de los individuos y los recuentos disminuidos de CD4 están asociados con la morbilidad y mortalidad en la infección por VIH se hacen intentos de mejorar la inmunidad para la gestión del VIH. Se han hecho diversos esfuerzos dirigidos a este fin. Esto ha dado como resultado la introducción de terapias de modificación del sistema inmune con o sin fármacos anti-retrovirales. Dichos fármacos comprenden antígenos, citoquinas, organismos etc.

Sorprendentemente se ha encontrado ahora durante el curso de la investigación realizada por los inventores de la presente solicitud que formulaciones "*Mycobacterium W*" (Mw) con o sin material antigénico y/o inmunomodulador derivado de (Mw) son eficaces la gestión de la enfermedad/infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Técnica anterior

M. vaccae es aparentemente único entre las especies de micobacterias conocidas porque las preparaciones matadas por calor retienen sus propiedades para uso como vacunas e inmunoterapéutico. Por ejemplo, las vacunas de *M. bovis-BCG*, usadas para la vacunación contra la tuberculosis, emplean cepas vivas. *M. bovis-BCG* y *M. tuberculosis* matadas por calor no tienen propiedades protectoras cuando se emplean en vacunas. Se ha aislado cierto número de compuestos de una gama de especies micobacterianas que tienen propiedades adyuvantes. El efecto de dichos adyuvantes es esencialmente estimular un mecanismo de respuesta inmune particular contra un antígeno de otras especies.

En la Patente de EE.UU. n° 6.001.361 la invención se refiere a compuestos y métodos para el tratamiento de infecciones por micobacterias que incluyen *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*. La invención se refiere además a compuestos que funcionan como amplificadores no específicos de la respuesta inmune, y al uso de dichos amplificadores no específicos de la respuesta inmune como adyuvantes en vacunación o inmunoterapia contra enfermedades infecciosas, y en cientos tratamientos para trastornos del sistema inmune y cáncer.

La Patente de EE.UU. n° 4.716.038 describe el diagnóstico de, la vacunación contra y el tratamiento de, enfermedades autoinmunes de diversos tipos, incluyendo enfermedades artríticas, por administración de micobacterias, incluyendo *M. vaccae*.

La Patente de EE.UU. n° 6.210.684 describe un método para retrasar el comienzo del SIDA usando *M. Vaccae* muerta. El comienzo del SIDA que está relacionado con la disminución del recuento de CD4 no se describe en esta patente. Los estudios publicados muestran que *M. Vaccae* muerta carece de efectos sobre el recuento de CD4 en individuos VIH positivos.

ES 2 324 467 T3

La Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 91/01751 describe el uso de material antigénico y/o inmuno-regulador procedente de *M. vaccae* como un agente inmuno-profiláctico para retrasar y/o prevenir el comienzo del SIDA.

5 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 94/06466 describe el uso de material antigénico y/o inmuno-regulador procedente de *M. vaccae* para la terapia de infección por VIH, con o sin SIDA y con o sin tuberculosis asociada.

10 La Patente de EE.UU. nº 6.001.361 describe una invención que se refiere generalmente al tratamiento por vacunación o inmunoterapia de trastornos de la piel, tales como psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, alopecia areata, y los cánceres de piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma. En particular, la invención se refiere al uso de compuestos, que están presentes en *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*) o han sido derivados del mismo o proceden del filtrado de cultivo de *M. vaccae*.

15 La Patente de EE.UU. nº 5.599.545 describe el uso de micobacterias, especialmente *M. vaccae* entera inactivada, como un adyuvante para la administración con antígenos, que no son endógenos para *M. vaccae*. Esta publicación teoriza que el efecto beneficioso como adyuvante a la proteína de choque térmico 65 (abreviadamente HSP 65, por la expresión inglesa *Heat Shock Protein*).

20 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 92/08484 describe el uso de material antigénico y/o inmuno-regulador derivado *M. vaccae* para el tratamiento de la uveitis.

25 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 93/16727 describe el uso de material antigénico y/o inmuno-regulador derivado de *M. vaccae* para el tratamiento de enfermedades mentales asociadas con una reacción autoinmune iniciada por una infección.

La Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 95/26742 describe el uso de material antigénico y/o inmuno-regulador derivado de *M. vaccae* para retrasar o prevenir el crecimiento o diseminación extensión de tumores.

30 *M. Vaccae* no está asociado con cambios en el recuento de CD4 o la carga viral en individuos VIH positivos. No proporciona ningún alivio relevante en individuos VIH positivos.

35 Sin embargo, a pesar de las diversas patentes expedidas en relación con *Mycobacterium vaccae*, dicho microorganismo fracasa en proporcionar un cambio significativo en el recuento de CD4, así como en la carga viral en individuos que son VIH positivos.

Se han realizado intentos similares en mejorar el recuento de CD4 usando inmunomoduladores de diversas fuentes.

40 Remune es un inmunógeno específico de VIH-1 en adyuvante incompleto de Freund. Incluye VIH-1 inactivado, el cual está empobrecido en gp 120. Se encuentra que es seguro como inmunógeno potencial en personas infectadas con el VIH. En estudios iniciales se encontró que mejoraba el recuento de células CD4 en estudio de cohortes de VIH asintomáticos VIH que no toman agentes anti-retrovirales. Se administra intramuscularmente como una inyección en los músculos tríceps. El estudio reciente por Sukeepaisarncharoen W. *et al.*, sugiere que la terapia con Remune está asociada con la estabilización de los recuentos de células CD 4. También sugiere que puede ser valioso en participantes con elevados recuentos de células CD4⁺ T.

45 Uno de dichos inmunomoduladores consiste en una mezcla de antígenos de bacterias inactivadas con antígenos del virus de la gripe (inmunomodulador poliantigénico). Usando este inmunomodulador no ha sido posible conseguir una mejora en el recuento de CD4.

50 SB-73 es otro inmunomodulador hecho de la sustancia producida por *Penicillium P* (cepa PB-73). En un pequeño estudio se encontró que mejoraba el recuento de CD4 en la mayoría (10/14) de individuos infectados con el VIH cuando se administró intramuscularmente en dosis de 5 mg.

55 Reticulosa, un péptido-ácido nucleico es otro inmunomodulador encontrado como útil en mejorar el recuento de CD4 en individuos infectados con VIH cuando se administra subcutáneamente. Se administró como dos inyecciones subcutáneas (SC) de 1 ml al día durante dos semanas seguido por un inyección SC de 1 ml al día una semana si y otra no durante un total 60 días (tratamiento total de 30 días). Dio como resultado una mejora significativa en el recuento de CD4 en ausencia de una terapia anti-retroviral.

60 Timosin α_1 es un péptido de 28 aminoácidos. Junto con interleuquin-2 se evaluó su eficacia en mejorar el recuento de CD4. Se encontró que no tenía un efecto significativo. El factor estimulante de colonias de granulocitos (Filgrastim) también ha sido evaluado en la mejora de la respuesta inmune en VIH sin mucho éxito.

65 OKT3, un anticuerpo monoclonal de CD3 se ha usado satisfactoriamente en la gestión del VIH junto con agentes anti-retrovirales e interleuquina-2 en tres pacientes.

De las diversas citoquinas usadas en la gestión de VIH, la interleuquina-2 (IL-2) está exhaustivamente estudiada y usada. Se usa en forma de inyección que ha de ser administrada intravenosamente o subcutáneamente. Se encuentra que

mejora significativamente el recuento de CD4 cuando se usa sola o junto con fármacos anti-retrovirales. Se administra en forma de terapia intermitente observándose a veces efectos secundarios intolerables. Dichos efectos se observan solamente durante el periodo de administración activa. La mejora observada en el recuento de CD4 se encontró que era estable.

Otras citoquinas usadas en la gestión del VIH incluyen IL-12 e IL-15.

La Patente de EE.UU. n° 5.759.992 proporciona un glicopéptido de bajo peso molecular con un peso molecular de 919,2 daltons se deriva del líquido sobrenadante de células rotas manteniendo la temperatura de 4°C a través de todo el proceso. Dicho glicopéptido se obtiene a partir de bacterias que incluyen *E. coli* y *Mycobacterium*. Se encontró que mejoraba el recuento de CD4 en ratones normales. No se evaluó en animales VIH positivos.

La Patente de EE.UU. n° 5.871.732 describe método para impedir o tratar SIDA, complejo relacionado con el SIDA e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana por anticuerpos anti-CD4 homólogos a las secuencias de DNA que codifican dichos homólogos.

La *Mycobacterium w* es una micobacteria atípica, cultivable y no patógena, con propiedades bioquímicas y características de crecimiento rápido que se asemejan a la clase IV del grupo de Runyons de micobacterias en sus propiedades metabólicas y de crecimiento, pero no es idéntica a las cepas usualmente listadas en este grupo. Por tanto, se piensa que (Mw) es una cepa enteramente nueva. La identidad de especie de Mw ha sido definida por la determinación de la secuencia de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa.

Se ha encontrado que comparte antígenos con *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha encontrado que proporciona profilaxis contra la lepra en seres humanos convirtiendo a individuos negativos a la lepromina en positivos a la lepromina. También se ha encontrado que proporciona profilaxis contra la tuberculosis en animales. En la lepra también se encuentra que reduce la duración de la terapia para matar bacterias, la eliminación, así como el curado clínico cuando se usa con terapia de multi-fármacos.

Referencias

1. *Immunological parameters modified in HIV disease by the macrophage activity immunomodulator WF 10 (a phase II pathogenesis study)* Herndier B; Lull R. Ah Ching O; Broz M; Kuehne F W; Kahn J; *Int. Conf. AIDS*. 1998; 12: 347-8.

2. *Changes in viral expression and cytokine profile induced by a polyantigenic immunomodulator in HIV-infected peripheral blood mononuclear cells.* Ríos Z; Ríos E O; García M I; De León C; Guzmán L M; Rodríguez W; Romero D; Hunter R. *Cell. Mol. Biol.* (Noisy-le-grand). 1995; 41 Suppl. I: s93-101.

3. *Controlled clinical trial of reticulose, a peptide-nucleic acid with Immunomodulator activity, in patients with HIV infection.* Levett P N; Roach T C; Hirschman S Z; Broome H; Fraser H S; *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1998 May 17-21; 98: 53.

4. *Survival and quality of life in HIV-positive patients treated with poly antigenic immunomodulator.* Colón J I; Encarnación G; Ortiz Santini M R; Rodríguez Malave M T; Santiago Delpin E A; Marchand A M. *P. R. Health Sci. J.* 1997 Mar; 16 (1): 9-14.

5. *SB-73 Immunomodulator: phase II clinical trial on HIV infection.* Bellucci S; Abreu W; Bertazzoli R; Tomita F; Lourenco C; Machodo L; Silva O. *Int. Conf. AIDS*. 1992 Jul 19-24; 8 (3): 54.

3. *Interleukin-15 Triggers Activation and Growth of the CD8 T-Cell Pool in Extravascular Tissues of Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome.* Agostini C, Trentin L, Sancetta R, Facco M, Tassinari C, Cerutti A, Bortolin M, Milani A, Siviero M, Zambello R, Semenzato G. *Blood*, Vol. 90, No 3 (August 1), 1997: pp 1115-1123.

4. *Ethylene Glycol-Modified Interleukin-2 and Thymosin α_1 in Human immunodeficiency Virus Type 1 Infection.* *Journal of Infectious Disease*, 1996; 173; 1005-8.

5. *OKT3 and IL-2 treatment for purging of the latent HIV-1 reservoir in vivo results in selective long-lasting CD4+ T cell depletion.* Van Praag R M, Prins J M, Roos M T, Schellekens P T, Ten Berge I J, Yong S L, Schuitemaker H, Eerenberg A J, Jurriaans S, de Wolf F, Fox CH, Goudsmit. J. Miedema F, Lange J M. *J. Clin. Immunol.* 2001 May; 21 (3): 218-26.

6. *How effective are complementary therapies for HIV and AIDs ?-A systemic review.* Ozsoy M, Ernst E. *Int. J. STD. AIDS* 1999 Oct; 10 (10): 629-35.

7. *Mechanism of HIV persistence: implications for vaccines and therapy.* Brememlann H J, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 1995 Aug 15; 9(5):459-83.

8. *Both serum HIV type 1 RNA levels and CD4 lymphocyte counts predict clinical outcome in HIV type 1-infected subjects with 200 to 500 CD4 + cells per cubic millimeter.* AIDs clinical trials group study 175 virology study team.

Kim S, Hughes M D, Hammer S M, Jackson J B, DeGruttola V, Katzenstein D A. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2000 May 1; 16 (7): 645-53.

9. *Do HIV type 1 RNA levels provide additional prognostic value to CD4 (+) T lymphocyte counts in patients with advanced HIV type 1 infection?* *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2001 Aug 10; 17 (12): 1099-105.

10. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents.* August 13, 2001 (Estas directrices fueron desarrolladas por el Panel on *Clinical Practices for Treatment of HIV Infection convened by the Department of Health and Human Services (DHHS)* y la *Henry J. Kaiser Family Foundation*. La dirección del Panel la ejerce Anthony S. Fauci, del National Institutes of Health, Bethesda, MD (co-presidente); Eric P. Goosby, DHHS, Washington, DC, (co-convocante); and Jennifer Kates, Henry J. Kaiser Foundation, San Francisco, CA, (co-convocante).

11. *A controlled Trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less.* **Arduino J M, Fischl M A, Stanley K, Collier A C, Spiegelman D.** *The New Eng. Journal of Med.* 1997 Sep. 337 (11): 725-733.

12. *Treatment with Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy.* **Scott M., Hammer, M. D., Kathleen E. Squires, M. D., Michael D. Hughes, Ph. D., Janet M. Grimes, M. S. Lisa M. Emeter, M. D., Judith S. Currier, M. D., Joseph J. Eron, Jr., M. D., Judith E. Feinberg, M. D., Henry H. Balfour, Jr., M. D., Lawrence R. Eyton, M. D., Jeffrey A. Chodakewitz, M. D., et al.** *The New Eng. Journal of Med.* 1997 September 337 (11): 734-739.

13. *Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease.* **Yazdanpanah Y, Chene G, Losina E, Goldie S J, Merchadou L D, Alfandari S, Seage G R 3rd, Sullivan L, Marimoutou C, Paltiel A D, Salamon R, Mouton Y, Freedberg K A.** *Int. J. Epidemiol.* 2001 Aug; 30 (4): 864-71.

22. *Randomise trial of intradermal *Mycobacterium vaccae* or intradermal hepatitis B immunisation in children with HIV infection.* **Johnson D, Waddell R D, Pelton S I, Jaeger A S, Modlin J F, Yorgev, R, Morin P, Arbeit R D, von Reyn C F.** *Vaccine.* 1999 Jun 4; 17 (20-21): 2583-7.

23. *Immunization of HIV-infected adults with a three-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae*.* **Marsh B J, Fordham von Reyn C, Arbeit RD, Morin P.** *Am. J. Med. Sci.* 1997 Jun; 313 (6): 377-83.

24. *Safety and immunogenicity of a five-dose series of inactivated *Mycobacterium vaccae* vaccination for the prevention of HIV-associated tuberculosis.* **Waddell R D, Chintu C, Lein A D, Zumla A, Karagas M R, Baboo K S, Habbema J D, Tosteson A N, Morin P, Tvaroha S, Arbeit R D, Mwinga A, von Reyn C F.** *Clin. Infect. Dis.* 2000 Jun; 30 Suppl. 3: S309-15.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que el inmunomodulador preparado a partir de *Mycobacterium w* (Mw) es útil en la gestión de la infección por VIH. Los inventores hemos encontrado ahora que el mismo agente terapéutico no sólo retrasa el desarrollo del SIDA en pacientes infectados con el VIH, sino que también es capaz de causar la regresión, o incluso la eliminación, de síntomas manifiestos de SIDA incluso en pacientes en los que la enfermedad está bastante avanzada. Estos efectos se han encontrado en pacientes que también padecen tuberculosis. Estos efectos también se observan en pacientes que padecen infección por VIH con o sin SIDA y sin tuberculosis asociada. El inmunomodulador de la presente invención también se ha encontrado útil en aliviar los síntomas del VIH.

El agente terapéutico que puede ser usado en la presente invención se parece al Mw una micobacteria atípica, cultivable y no patógena, en sus propiedades bioquímicas y características de crecimiento rápido que la asemeja a las que pertenecen a la clase IV del grupo Runyons de micobacterias en sus propiedades metabólicas y de crecimiento, pero no es idéntica a las cepas corrientemente listadas en este grupo. Por tanto se cree que (Mw) es una cepa enteramente nueva.

La identidad de especie de Mw ha sido definida por la determinación de la secuencia de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa y se diferencia de otras treinta especies de micobacterias. Sin embargo, difiere de las actualmente listadas en este grupo en un aspecto u otro. Mediante un análisis de la secuencia de bases de una región polimórfica del análisis del patrón se ha establecido que Mw es una especie única distinta de muchas otras especies de micobacterias conocidas examinadas que son: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. shimoidei*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. triviale*, *M. marinum*, *M. flavescens*, *M. simian*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. asiaticum*, *M. aurum*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *Peregrinum*, *M. chelonae* subsp. *Chelonae*, *M. chelonae* subsp. *Abscessus*, *M. genavense*, *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis H₃₇R_v*, *M. paratuberculosis*.

El objeto de la presente invención es proporcionar un inmunomodulador *Mycobacterium w* que contiene “*Mycobacterium w*” (Mw) obtenido a partir de Mw, con o sin otros agentes anti-retrovirales, para la profilaxis o terapia de SIDA o complejo relacionado con el SIDA, a un sujeto expuesto a infección por VIH o que es VIH positivo con o sin síntomas manifiestos de SIDA.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un inmunomodulador derivado de *Mycobacterium w* que es útil para la gestión de la infección por VIH.

5 Todavía otro objeto de la invención es proporcionar un inmunomodulador derivado *Mycobacterium w* para mejorar la función inmune de sujetos VIH positivos.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un inmunomodulador para mejorar el recuento de CD4 en individuos infestados con VIH.

10 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un inmunomodulador eficaz en mejorar los síntomas asociados con la infección por VIH.

15 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un inmunomodulador eficaz en la gestión de infecciones oportunistas asociadas con la infección por VIH.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un inmunomodulador útil en mejorar la función inmune de sujetos VIH positivos en presencia o ausencia de fármacos anti-retrovirales.

20 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos para la preparación de un medicamento para el tratamiento del VIH, que dan como resultado la mejora de los síntomas de la fase sintomática de la enfermedad.

Es otro objeto de la invención proporcionar un método para la preparación de un medicamento para el tratamiento de infección por VIH que da como resultado un recuento mejorado de las células CD4⁺ T.

25 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención la composición de inmunomodulador, su método de preparación, las características de HPLC, su seguridad y su tolerabilidad, los métodos de uso y los resultados de los tratamientos se describen en los siguientes ejemplos. Los siguientes son ejemplos ilustrativos de la presente invención y el alcance de la invención no debe estar limitado por ellos.

Ejemplo 1

35 Las composiciones inmunomoduladoras

A. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

40	<i>Mycobacterium w.</i> , (matado por calor)	0,50x10 ⁹
	Cloruro de sodio I. P.	0,90% p/v
	Tiomerosal I. P. (como conservante)	0,01% p/v
45	Agua para inyección I. P.	c. s. para 0,1 ml

B. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

50	Extracto de <i>Mycobacterium w</i> después de tratamiento con ultrasonidos de 1x10 ¹⁰ <i>Mycobacterium w</i>	
	Cloruro de sodio I. P.	0,90% p/v
	Tiomerosal I. P. (como conservante)	0,01% p/v
55	Agua para inyección I. P.	c. s. para 0,1 ml

C. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

60	Extracto en metanol de 1x10 ¹⁰ <i>Mycobacterium w</i>	
	Cloruro de sodio I. P.	0,90% p/v
	Tiomerosal I. P. (como conservante)	0,01% p/v
65	Agua para inyección I. P.	c. s. para 0,1 ml

ES 2 324 467 T3

D. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto en cloroformo de 1×10^{10} *Mycobacterium w*

Cloruro de sodio I. P. 0,90% p/v

Tiomerosal I. P. (como conservante) 0,01% p/v

Agua para inyección I. P. c. s. para 0,1 ml

E. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto en acetona de 1×10^{10} *Mycobacterium w*

Cloruro de sodio I. P. 0,90% p/v

Tiomerosal I. P. (como conservante) 0,01% p/v

Agua para inyección I. P. c. s. para 0,1 ml

F. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto en etanol de 1×10^{10} *Mycobacterium w*

Cloruro de sodio I. P. 0,90% p/v

Tiomerosal I. P. (como conservante) 0,01% p/v

Agua para inyección I. P. c. s. para 0,1 ml

G. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Extracto de liticasa de 1×10^{10} *Mycobacterium w*

Cloruro de sodio I. P. 0,90% p/v

Tiomerosal I. P. (como conservante) 0,01% p/v

Agua para inyección I. P. c. s. para 0,1 ml

H. Cada dosis de 0,1 ml de agente terapéutico contiene:

Mycobacterium w (matado por calor) $0,5 \times 10^7$.

Extracto de *Mycobacterium w* obtenido de 1×10^3 *Mycobacterium w* por rotura, extracción con disolventes o extracción enzimática.

Cloruro de sodio I. P. 0,90% p/v

Tiomerosal I. P. (como conservante) 0,01% w/v

Agua para inyección I. P. c. s. para 0,1 ml

Ejemplo 2

El proceso de preparación del inmunomodulador

A. Cultivo usando *Mycobacterium w*

i) Preparación del medio de cultivo.

El *Mycobacterium w* se cultiva en un medio sólido como medio L J o medio líquido como medio *Middlebrook* o medio líquido de Sauton.

Para el mejor rendimiento el medio *Middlebrook* está enriquecido. Preferiblemente puede ser enriquecido por adición de glucosa, bactotripton, y BSA. Se usan preferiblemente en relación de 20:30:2.

ES 2 324 467 T3

El medio de enriquecimiento se añade al medio *Middlebrook*. Se hace preferiblemente en una relación de 15:1 a 25:1 más preferiblemente en una relación de 20:1.

ii) Operación del bio-reactor.

a) Preparación del recipiente:

Las partes de contacto internas del recipiente (Juntas, cierres mecánicos, juntas tóricas/ranuras de juntas, etc.) deben estar adecuadamente limpias para evitar cualquier contaminación. Llenar el recipiente con NaOH 0,1 N y dejarlo durante 24 horas para eliminar los materiales pirógenos y otros contaminantes. El recipiente se limpia luego primero con agua acidificada, luego con agua corriente. Finalmente, el recipiente se lava con agua destilada (3 veces) antes de preparar el medio.

b) Esterilización del bio-reactor:

El bio-reactor que contiene 9 litros de agua destilada se esteriliza con vapor de agua vivo (indirecto). Similarmente el bio-reactor se esteriliza una vez más con medio *Middlebrook*. Los otros frascos de la adición, las entradas/salidas de los filtros de aire etc, se tratan en autoclave (dos veces) a 121°C durante 15 minutos. Antes de su uso, se secan en una estufa a una temperatura de 50°C.

c) Parámetros ambientales:

i. Temperatura: 37±0.5°C

ii. pH: 6,7 a 6,8 inicialmente.

B. Cosecha y concentración

Típicamente se realiza al final del 6º día después del cultivo en condiciones asépticas. La concentración de células (sedimentación) se realiza por centrifugación.

C. Lavado de las células

El sedimento así obtenido se lava un mínimo de tres veces con solución salina normal. Puede lavarse con cualquier otro fluido que preferiblemente sea isotónico.

D. Adición de un vehículo farmacéuticamente aceptable

Se añade al sedimento solución salina normal exenta de pirógenos. Como vehículo farmacéutico puede ser usado cualquier otro fluido isotónico exento de pirógenos. El vehículo se añade en una cantidad tal que se consiga la concentración deseada de ingrediente activo en la forma final.

E. Adición de conservante

Para mantener el producto libre de otras bacterias contaminantes se añade un conservante. El conservante preferido es tiomerosal que se usa en una concentración final de 0,01% p/v.

F. Esterilización final

La esterilización final puede hacerse por diverso métodos físicos como la aplicación de calor o radiación ionizante o filtración en condiciones estériles.

El calor puede ser de la forma de calor seco o de calor húmedo. También puede ser en forma de ebullición o pasteurización.

La radiación ionizante puede ser ultravioleta o rayos gamma o microondas o cualquier otra forma de radiación ionizante.

Es preferible tratar en autoclave el producto final.

Esto puede hacerse antes de antes del llenado del material en un envase.

G. Control de calidad

i. El material se evalúa en cuanto a pureza y esterilidad.

ii. Los organismos se comprueban en cuanto a resistencia a los ácidos después de la tinción de Gram.

ES 2 324 467 T3

iii. Ensayo de inactivación: Se realiza cultivando el producto en medio L J para detectar organismos vivos.

iv. Patogenicidad y/o contaminación con patógenos.

Los organismos cultivados se infectan en ratones Balb/c. Ninguno de los ratones debe morir y todos deben permanecer sanos y con ganancia de peso. No deben observarse lesiones macroscópicas o microscópicas en hígado, pulmón, bazo, o cualquier otro órgano cuando se los animales sacrifican hasta 8 semanas después del tratamiento.

v. Ensayos bioquímicos:

El organismo se somete a los siguientes ensayos bioquímicos:

a) Ureasa

b) Hidrólisis con Tween 80

c) Ensayo de niacina

d) Ensayo de reducción de nitratos.

El organismo da resultados negativos en los ensayos de ureasa, hidrólisis con Tween 80, y de niacina. Da positivo en el ensayo de reducción de nitratos.

H. Preparación de constituyentes de *Mycobacterium w*

Los constituyentes de *Mycobacterium w* pueden ser preparados para los fines de la invención por:

I. Rotura de células

II. Extracción con disolventes

III. Extracción enzimática.

La rotura de células puede realizarse por medio de tratamiento con ultrasonidos o el uso de un fraccionador de alta presión o por aplicación de un ingrediente de presión osmótica.

La extracción con disolventes puede hacerse por cualquier disolvente orgánico como cloroformo, etanol, metanol, acetona, fenol, alcohol isopropílico, ácido acético, urea, hexano etc.

La extracción enzimática puede hacerse por enzimas que digieren las paredes/membranas celulares. Típicamente dichas enzimas son de naturaleza proteolítica. Las enzimas preferidas son liticasa y pronasa. Para los fines de la invención los constituyentes celulares de *Mycobacterium w* pueden usarse solos en lugar de los organismos *Mycobacterium w* o pueden añadirse al producto que contiene *Mycobacterium w*.

La adición de los constituyentes celulares da como resultado una eficacia mejorada del producto.

Ejemplo 3

Características de los constituyentes de *Mycobacterium w* por análisis por HPLC

Los constituyentes de *Mycobacterium w* usados para los fines de la invención cuando se someten a análisis por HPLC dan un solo pico a 11 minutos. Más allá de dicho pico no se encuentran otros picos significativos. El pico es homogéneo y exento de cualquier muesca lo que sugiere homogeneidad del material obtenido.

El análisis por HPLC se realizó usando un aparato de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de Waters System

Columna: Novapak c1860A, 4 μ m, 3,9 x 150 mm.

Columna de protección: Novapak c 18

Temperatura de la columna: 30°C

Caudal: 2,5 ml/min

Volumen de inyección: 25 μ L.

Fase móvil:

Disolvente A: Metanol de calidad para HPLC.

Disolvente B: Cloruro de metileno de calidad para HPLC

Gradiente binario:

El gradiente de HPLC comprendía inicialmente 98% (v/v) de metanol (disolvente B).

El gradiente se aumentó linealmente hasta 80% de A y 20% de B en un minuto; 35% de A y 65% de B en 10 minutos, mantenido durante 5 segundos y luego disminuido de nuevo en 10 segundos hasta 98% de A y 2% de B.

Ejemplo 4

Seguridad del inmunomodulador

El *Mycobacterium w* cuando se usa en animales sanos o seres humanos se encuentra seguro, es bien tolerado y carece de efectos sobre el sistema de órganos, la bioquímica o hematología incluyendo las diversas células de la sangre. Se encontró que no produce linfocitosis ni cambios de la relación de células CD4:CD8 como se observa con otras estimulaciones no específicas del sistema inmune.

El único efecto observado es en el sitio de la inyección. Incluye morfológicamente la formación de eritemas, ulceración por induración y formación de cicatrices. Histológicamente se encuentra que el sitio de inyección presenta infiltración de diversas clases de linfocitos, células plasmáticas, células gigantes que presentan un cuadro histológico de granulomas de células epiteloideas.

Ejemplo 5

Efecto del inmunomodulador sobre pacientes VIH positivos sintomáticos

A 11 sujetos que eran VIH positivos y sufrían ataques recurrentes de fiebre, infección del tracto respiratorio, y diarrea se les administró *Mycobacterium w* (5×10^8) intradérmicamente. Todos mejoraron y no mostraron recurrencia de síntomas después del 2º mes de tratamiento.

Ejemplo 6

Efecto del inmunomodulador sobre el recuento de CD4 en pacientes adultos infestados con VIH 1

a) Cuando el inmunomodulador se usa solo

En 17 individuos VIH positivos que presentaban síntomas atribuidos al VIH y que buscaban ayuda se usó *Mycobacterium w* como única terapia. El *Mycobacterium w* se administró intradérmicamente sobre una región deltoide. La cantidad de *Mycobacterium w* inyectada fue 5×10^8 en una sola inyección. En el momento de la inclusión en el estudio se administró *Mycobacterium w* en una inyección intradérmica sobre ambas regiones deltoideas siendo la dosis total de 1×10^9 *Mycobacterium w*; subsiguientemente en el intervalo de un mes se les administró una sola inyección intradérmica sobre una región deltoide que incluía 5×10^8 organismos.

No se observó mortalidad ni morbilidad durante el ensayo. Todos los sujetos toleraron la terapia y completaron el ensayo. Se apreció un alivio sintomático dentro de los dos meses de iniciación de la terapia.

Todos los sujetos se evaluaron en cuanto al recuento de CD4 al comienzo de la terapia y 5 meses más tarde. El recuento medio antes del tratamiento fue 204,70 (intervalo 430-6).

Todos los sujetos mostraron una mejora en el recuento de CD4. Al final de los 5 meses el cambio medio en el recuento de CD4 fue 163,17 (intervalo 8-628). En siete (41,2%) de los individuos el aumento en el recuento de CD4 fue más de 80%. La mejora en el recuento de CD4 fue menor que 40% en 3 individuos (17,6%) solamente.

La terapia no estaba asociada sistemáticamente con ningún efecto secundario sistémico. Se apreció una reacción local en el sitio de inyección. Tenía la forma de reacción eritematosa que estaba asociada con induración. Progresó a ulceración en el sitio de inyección en algunos de los cuales sanó espontáneamente dejando en este sitio una cicatriz como señal.

Ninguno de los sujetos que participó en la prueba recibió terapia anti-retroviral.

ES 2 324 467 T3

Resumen de los resultados

A	Nº de sujetos VIH positivos	-	17
B	Recuento medio de CD4 en la línea base	-	204,70
C	Recuento medio de CD4 después del tratamiento	-	368,93
	Intervalo	-	850 a 32
D	Cambio en el recuento de CD4	-	163,17 (104,43%)
	Intervalo	-	628 a 8 (433,33 a 4,08%)

Los detalles del cambio en el recuento de CD4 en cada uno de los individuos se recogen en la Tabla 1.

TABLA 1

Nº	RECuento DE CD4 ANTES DEL TRATAMIENTO	RECuento DE CD4 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	CAMBIO (Nº)	CAMBIO (%)
1	168	270	102	60,7
2	302	948	628	196
3	280	453	155	52
4	280	496	216	77
5	120	182	62	51,6
6	330	620	290	88
7	430	850	420	97,6
8	296	338	112	49,5
9	294	519	225	76,7
10	47	61	14	29,78
11	112	224	112	100
12	196	204	8	4,08
13	186	384	198	106,5
14	182	270	88	48,35
15	42	110	68	161,90
16	6	32	26	433,33
17	261	311	50	19,15
Media	204,70	368,93	163,17	104,43

El resultado es mucho mejor que el que se consigue con el uso de interleuquina-2 cuando se empleó junto con dos fármacos anti-retrovirales. También es mejor que el que se consiguió con terapia anti-retroviral altamente activa (abreviadamente en lo sucesivo TARAA) sola durante el mismo periodo. También merece tenerse en cuenta que todos los pacientes mostraron una mejora en el recuento de CD4. El curso natural de la enfermedad en ausencia de terapia anti-retroviral está asociado con una disminución mes a mes del recuento de CD4. Por término medio se pierden 12 células al mes según el estudio con ziduvadina para individuos sintomáticos publicado en *New Eng. J. Med.* En un estudio de cohortes de 2664 personas VIH positivas asintomáticas la disminución del recuento de CD4 es 4,6 células/mes.

Independientemente del número obtenido en el recuento de CD4 al comienzo de la terapia la mejora en dicho recuento de CD4 se observa en todos los individuos. El recuento de CD4 antes del tratamiento varió desde 6 a 430. El análisis de regresión de la mejora (Figura 5) sugiere que la mejora que se observa en un periodo de cinco meses es proporcional al recuento inicial de CD4. Cuanto mayor es el recuento mejor es la mejora.

b) *Dos fármacos anti-retrovirales [(inhibidores de transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN)) + Inmunomodulador*

En otro conjunto de sujetos que eran VIH positivos y tenían síntomas relacionados con el VIH el *Mycobacterium w* se usó junto con dos fármacos anti-retrovirales (ambos de la clase ITINN). Ninguno de los sujetos había recibido fármacos anti-retrovirales antes de estos. El *Mycobacterium w* se administró intradérmicamente en una región deltoide. La cantidad de *Mycobacterium w* inyectada fue 5×10^8 en una sola inyección. En el momento de la inclusión en el estudio el *Mycobacterium w* se administró como una inyección intradérmica en ambas regiones deltoides siendo la dosis total de 1×10^8 *Mycobacterium w*, subsiguientemente en el intervalo de un mes se administró una sola inyección intradérmica en una región deltoide que incluía 5×10^8 organismos.

Durante la prueba no se observó mortalidad ni morbilidad. Todos los sujetos toleraron bien la terapia y completaron la prueba. Se apreció un alivio sintomático dentro del periodo de dos meses desde la iniciación de la terapia.

Todos los sujetos se evaluaron en cuanto a su recuento de CD4 al comienzo de la terapia y 5 meses más tarde. El recuento medio antes del tratamiento fue 200,99 (286 a 96). Todos los sujetos mostraron una mejora en el recuento de CD4. Al final de los 5 meses el cambio medio en el recuento de CD4 fue 137,37 (intervalo 24-588).

La terapia no estaba asociada con ningún efecto secundario sistémico. Se observó una reacción local en el sitio de la inyección. Estaba en la forma de una reacción eritematosa que estaba asociada con la induración. Progresó a ulceración en el sitio de la inyección en pocos individuos que sanaron espontáneamente dejando como señal una cicatriz.

Ninguno de los sujetos que participó en la prueba recibió terapia anti-retroviral.

Resumen de resultados

A	Nº de sujetos VIH positivos	-	16
B	Recuento medio de CD4		
	en la línea base	-	200,99
C	Recuento medio de CD4		
	después del tratamiento	-	338,37
	Intervalo		860 a 199
D	Cambio en el recuento de CD4	-	137,37 (68,44%)
	Intervalo	-	58 a 24 (294,15 a 16%)

Los detalles del cambio en el recuento de CD4 en cada uno de los individuos se recogen en la Tabla 2.

TABLA 2

Nº	RECuento DE CD4 ANTES DEL TRATAMIENTO	RECuento DE CD4 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	CAMBIO (Nº)	CAMBIO (%)
1	162	238	76	47
2	192	240	48	25
3	286	860	574	200
4	142	199	57	40
5	250	290	40	16
6	196	230	34	17,3
7	238	504	266	111,76
8	216	328	112	51,85
9	236	824	588	249,15
10	194	236	42	21,64
11	96	210	114	118,75
12	262	319	57	21,75
13	244	310	66	27,04
14	160	210	50	31,25
15	230	280	50	21,73
16	1,12	136	24	21,42
Media	200,99	338,37	137,37	68,44

Todos los sujetos se evaluaron en cuanto a recuento de CD4 al comienzo de la terapia y 5 meses más tarde. Ninguno de los sujetos mostró deterioro en el recuento de CD4. Todos los sujetos independientemente del recuento antes del tratamiento (intervalo 96 a 286) mostraron una mejora en el recuento de CD4. El curso natural de la enfermedad sugiere un cambio mínimo o ningún cambio en el recuento de CD4 cuando se usaron dos fármacos anti-retrovirales como los empleados en este estudio. Por tanto, la mejora observada en el estudio es significativamente mucho mayor y no puede ser atribuida a la terapia anti-retroviral usada en el estudio.

El análisis de regresión (Figura 6) muestra que la mejoras observada en el recuento de CD4 es proporcional al recuento inicial de CD4. Cuanto mayor es el recuento inicial mejor es la mejora que sigue a la comparación de terapias de mejora entre pacientes que reciben terapia anti-retroviral (dos fármacos) y los que no reciben terapia muestran que la tasa de mejora es mejor sin el uso de los dos fármacos anti-retrovirales cuando el recuento de CD4 es bajo. Sin embargo, cuando el recuento inicial de CD4 es alto la tasa de mejora es mejor cuando se usan los dos fármacos anti-retrovirales.

c) Terapia TARAA + Inmunomodulador

En otro conjunto de sujetos que eran VIH positivos y que tenían síntomas relacionados con el VIH se administró el *Mycobacterium w* junto con terapia TARAA (tres fármacos). Ninguno de los sujetos había recibido anti-retrovirales antes de esto. El *Mycobacterium w* se administró intradérmicamente en una región deltoide. La cantidad de *Mycobacterium w* inyectada fue 5×10^8 en una sola inyección. En el momento de la inclusión en el estudio el *Mycobacterium*

ES 2 324 467 T3

w se administró en forma de una inyección intradérmica en ambas regiones deltoides con una dosis total de 1×10^9 *Mycobacterium w*, subsiguientemente en el intervalo de un mes se administró una sola inyección intradérmica sobre una región deltoide que incluía 5×10^8 organismos.

5 No se observó mortalidad ni morbilidad durante la prueba. Todos los sujetos toleraron bien la terapia y completaron la prueba. El alivio sintomático se observó dentro de los dos meses de iniciación de la terapia.

10 Todos los sujetos se evaluaron en cuanto a su recuento de CD4 al comienzo de la terapia y 5 meses más tarde. El recuento medio de CD4 antes del tratamiento fue 213,23 (intervalo 536-40).

Todos los sujetos mostraron una mejora en el recuento de CD4. Al final de los 5 meses el cambio medio en el recuento de CD4 258,79 (intervalo 40-887).

15 La terapia no estaba asociada con ningún efecto secundario sistemático. Estos fueron una reacción local observada en el sitio de la inyección. Estaba en la forma de una reacción eritematosa que estaba asociada con induración. Progresó a ulceración en el sitio de la inyección en unos cuantos sujetos que sanaron espontáneamente dejando como señal una cicatriz.

20 Ninguno de los sujetos que participaron en la prueba recibió terapia anti-retroviral.

Resumen de resultados

25	A	Nº de sujetos VIH positivos	-	17
	B	Recuento medio de CD4		
30		en la línea base	-	213,23
	C	Recuento medio de CD4		
		después del tratamiento	-	445,58
35		Intervalo	-	1423 a 130
	D	Cambio en el recuento de CD4	-	258,79 (155,85%)
40		Intervalo	-	887 a 40 (338,88 a 17,4%)

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 324 467 T3

Los detalles del cambio en el recuento de CD4 en cada uno de los individuos se recogen en la Tabla 3.

TABLA 3

Nº	RECuento DE CD4 ANTES DEL TRATAMIENTO	RECuento DE CD4 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	CAMBIO (Nº)	CAMBIO (%)
1	72	220	148	205
2	130	230	100	77
3	40	130	90	225
4	230	270	40	17,4
5	127	276	149	117
6	148	336	188	127
7	230	490	260	113,04
8	356	950	594	166,85
9	199	432	233	117,08
10	236	539	303	128,38
11	204	660	456	223,5
12	536	1423	887	165,48
13	108	269	161	149,07
14	92	198	106	115,21
15	203	582	379	186,69
MEDIA	194,06	466,99	266,90	137,06
16	72	316	244	338,88
17	60	212	152	253,33
MEDIA	66	264	198	296,10
MEDIA	213,23	445,58	258,79	155,85

Todos los sujetos se evaluaron respecto al cambio del recuento de CD4 al comienzo de la terapia y la final de la terapia. Todos los pacientes mostraron una mejora significativa en el recuento de CD4. A los pacientes nº 1 a 15 se les administró un ITINN como tercer fármaco. A los pacientes nº 16 y 17 se les administró un inhibidor de proteasa usado como tercer fármaco. La mejora fue significativamente mayor que incluso la descrita en la literatura científica. La mejora en el recuento de CD4 fue significativamente mayor cuando se usó inhibidor de proteasa en comparación con cuando se usó ITINN como parte de la terapia TARAA. El análisis de regresión de los resultados (Figura 7) sugiere que la tasa de mejora observada es más o menos idéntica independientemente del recuento inicial de CD4. Fue poco inferior cuando el recuento inicial de CD 4 era mayor comparado con cuando era inferior.

Ejemplo 7

Efecto del inmunomodulador en el recuento de CD4 en niños infestados con VIH-1

- 5 También se evaluó el efecto del inmunomodulador en niños. El inmunomodulador se administró en forma de una inyección intradérmica de 0,1 ml cada mes sobre una región deltoide durante cinco meses. De los cinco niños tratados con el inmunomodulador solo todos mostraron mejora.

10 *Niños*

TABLA

Recuento de CD4 antes y después del tratamiento

15

20

25

30

Nº	ANTES DEL TRATAMIENTO	DESPUÉS DEL TRATAMIENTO	CAMBIO (Nº)	CAMBIO (%)
28	506	1100	594	117,39
29	246	720	474	192,68
30	398	562	164	41,21
31	720	1230	510	70,83
32	1120	1460	340	30,36
MEDIA	598	1014,4	416,4	90,49

El efecto del inmunomodulador no está restringido a la edad de los pacientes VIH positivos.

35

Ejemplo 8

Efecto de inmunomodulador en individuos infestados con VIH-2

40

45

En otro conjunto de tres sujetos (VIH-2 positivos), se administró como terapia inmunomodulador solo. Se administró intradérmicamente sobre una región deltoide. La cantidad de inmunomodulador inyectada fue 0,1 ml en una sola inyección. En el momento de la inclusión en el estudio el inmunomodulador se administró en forma de una inyección intradérmica en ambas regiones deltoides con un dosis total de 0,2 ml y subsiguientemente a intervalos de un mes se administró una sola inyección intradérmica sobre una región deltoide.

Todos los tres sujetos mostraron una mejora en el recuento de CD4.

50

55

60

Nº de sujetos	Género	Recuento de CD4 antes del tratamiento	Recuento de CD4 después del tratamiento	Cambio en el recuento de CD4	%
46	Hembra	268	312	54	17,30
32	Hembra	324	402	78	19,40
49	Varón	363	427	64	14,98

65

Por tanto el efecto del inmunomodulador no se encuentra limitado a solamente el VIH 1.

Ejemplo 9

Efecto del inmunomodulador en sujetos VIH positivos con linfadenopatía por tuberculosis cervical que no responde a cinco fármacos antituberculosos

A siete sujetos VIH positivos con linfadenopatía por tuberculosis cervical que no respondían a cinco fármacos antituberculosis se les administró inmunomodulador intradérmicamente. Todos presentaban un aumento inicial en el tamaño del nódulo linfático cervical, que llegó a ser eritematoso. En 3 semanas disminuyó el tamaño del nódulo linfático y en dos meses la linfadenopatía sanó completamente.

El *Mycobacterium w* se ha usado en lepra para una eliminación más rápida del *M. Leprae* de las lesiones y un resultado clínico mejorado que hizo posible liberar a los pacientes de la terapia [terapia multifármaco (TMF)] en una fecha más temprana. También se ha encontrado que convierte a las personas negativas a la lepromina en positivas a la lepromina y por tanto proporciona inmunidad contra la lepra.

De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que es útil en la gestión del VIH. Se observa que los síntomas relacionados con el VIH desaparecen rápidamente cuando se administra el *Mycobacterium w*. También se encontró que mejora la inmunidad en la forma del recuento de CD4.

El *Mycobacterium w* hace todo esto en ausencia de terapia anti- retroviral.

Sin embargo, la respuesta es aumentada cuando se incluyen fármacos anti-retrovirales junto con la forma de terapia TARAA.

La falta de efectos secundarios sistémicos que se observan con las otras terapias lo hace incluso más adecuado.

Figura 1. Análisis por HPLC del extracto en bruto obtenido después de la rotura de células de *Mycobacterium w* por tratamiento con ultrasonidos.

Figura 2. Análisis por HPLC de extracto en metanol de *Mycobacterium w*.

Figura 3. Análisis por HPLC de extracto en cloroformo de *Mycobacterium w*.

Figura 4. Análisis por HPLC de extracto en acetona de *Mycobacterium w*.

Figura 5. Análisis de regresión del cambio en el recuento de CD4 antes y después del tratamiento cuando el inmuno-modulador se usa solo.

Figura 6. Análisis de regresión del cambio en el recuento de CD4 antes y después del tratamiento cuando el inmuno-modulador se usa con dos fármacos anti-retrovirales (ITINN)

Figura 7. Análisis de regresión del cambio en el recuento de CD4 antes y después del tratamiento cuando el inmuno-modulador se usa junto con terapia HAART.

REIVINDICACIONES

1. Uso de *Mycobacterium w* o sus constituyentes en la preparación de un medicamento para uso en la gestión de la infección por VIH.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en mejorar la función inmune de los sujetos VIH positivos.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en la gestión de infecciones oportunistas asociadas con la infección por VIH.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en la mejora de los síntomas asociados con el VIH.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en la profilaxis o tratamiento del SIDA o el complejo relacionado con el SIDA (CRS).
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en retrasar el desarrollo de SIDA o el complejo relacionado con el SIDA (CRS) en pacientes infectados con el VIH.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en causar la regresión o eliminación, de síntomas manifiestos de SIDA incluso en pacientes en los que la enfermedad está bastante avanzada.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en tratar pacientes que sufren infección por VIH con o sin SIDA y con o sin tuberculosis.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en mejorar el recuento de células CD⁺ T en pacientes que padecen VIH.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho medicamento es para uso en mejorar el recuento de células CD⁺ T en pacientes que padecen VIH en ausencia de, así como en presencia de, terapia anti-retroviral.
11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la *Mycobacterium w* o sus constituyentes se usan solos o en combinación unos con otros.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el medicamento comprende además adyuvantes, excipientes, diluyentes, agentes de puesta en suspensión o conservantes.
13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la *Mycobacterium w* es *Mycobacterium w* muerta.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la *Mycobacterium w* es matada por medios físicos como calor, o radiación por calor en forma de tratamiento en autoclave.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la *Mycobacterium* es matada por calor en forma de tratamiento en autoclave.
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se usan los constituyentes de *Mycobacterium w* y se obtienen por tratamiento con ultrasonidos.
17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se usan los constituyentes de *Mycobacterium w* y se obtienen mediante un fraccionador de células a alta presión.
18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se usan los constituyentes de *Mycobacterium w* y se obtienen por un ingrediente de presión osmótica.
19. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se usan los constituyentes de *Mycobacterium w* y se obtienen por extracción.
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde los constituyentes de *Mycobacterium w* se extraen por disolventes orgánicos.
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde los disolventes orgánicos se seleccionan de cloroformo, etanol, metanol, acetona, fenol, alcohol isopropílico, ácido acético, urea y hexano.
22. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se usan los constituyentes de *Mycobacterium w* y se obtienen por tratamiento enzimático.

ES 2 324 467 T3

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde el *Mycobacterium w* se obtiene por el uso de las enzimas liticasa y/o pronasa.

5 24. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en donde los constituyentes de *Mycobacterium w* tienen un peso molecular de más de 12.000 daltons.

25. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en donde los constituyentes de *Mycobacterium w* son insolubles en agua.

10 26. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el medicamento es una forma farmacéutica de dosificación unitaria que comprende 1×10^8 *Mycobacterium w* o más.

15 27. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el medicamento está en una forma de dosificación unitaria que comprende 1×10^7 *Mycobacterium w* o más.

28. El uso as de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el medicamento está en una forma de dosificación unitaria que comprende entre 1×10^8 y 1×10^{10} *Mycobacterium w*.

20 29. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el *Mycobacterium w* es negativo a la ureasa, no hidroliza el monooleato de polioxietilen-sorbitán, no produce niacina y da una fuerte reacción positiva en el ensayo de reducción de nitratos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

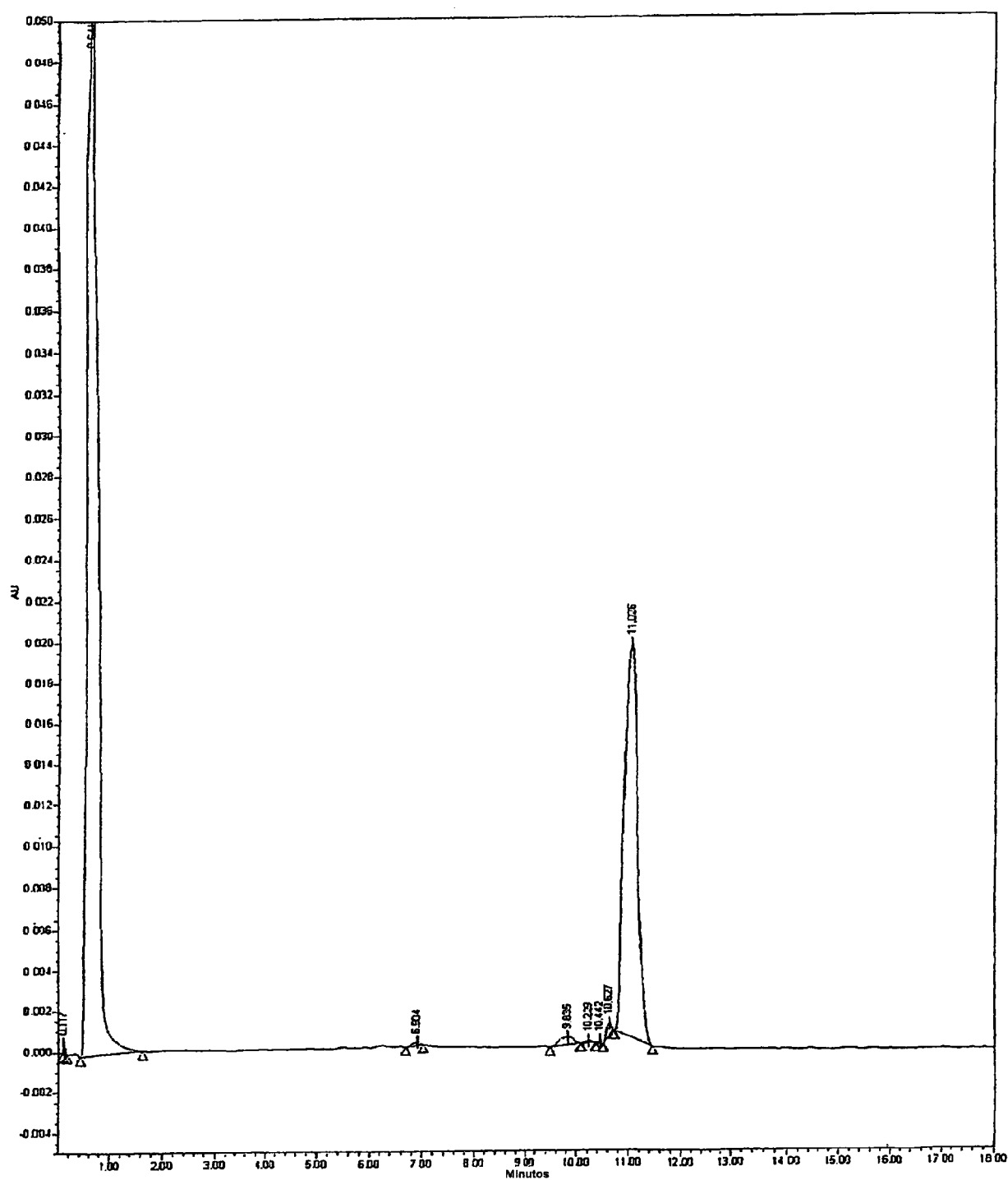


Fig. 1 Análisis por HPLC del extracto en bruto obtenido de la rotura de células de *Mycobacterium w* por tratamiento con ultrasonidos

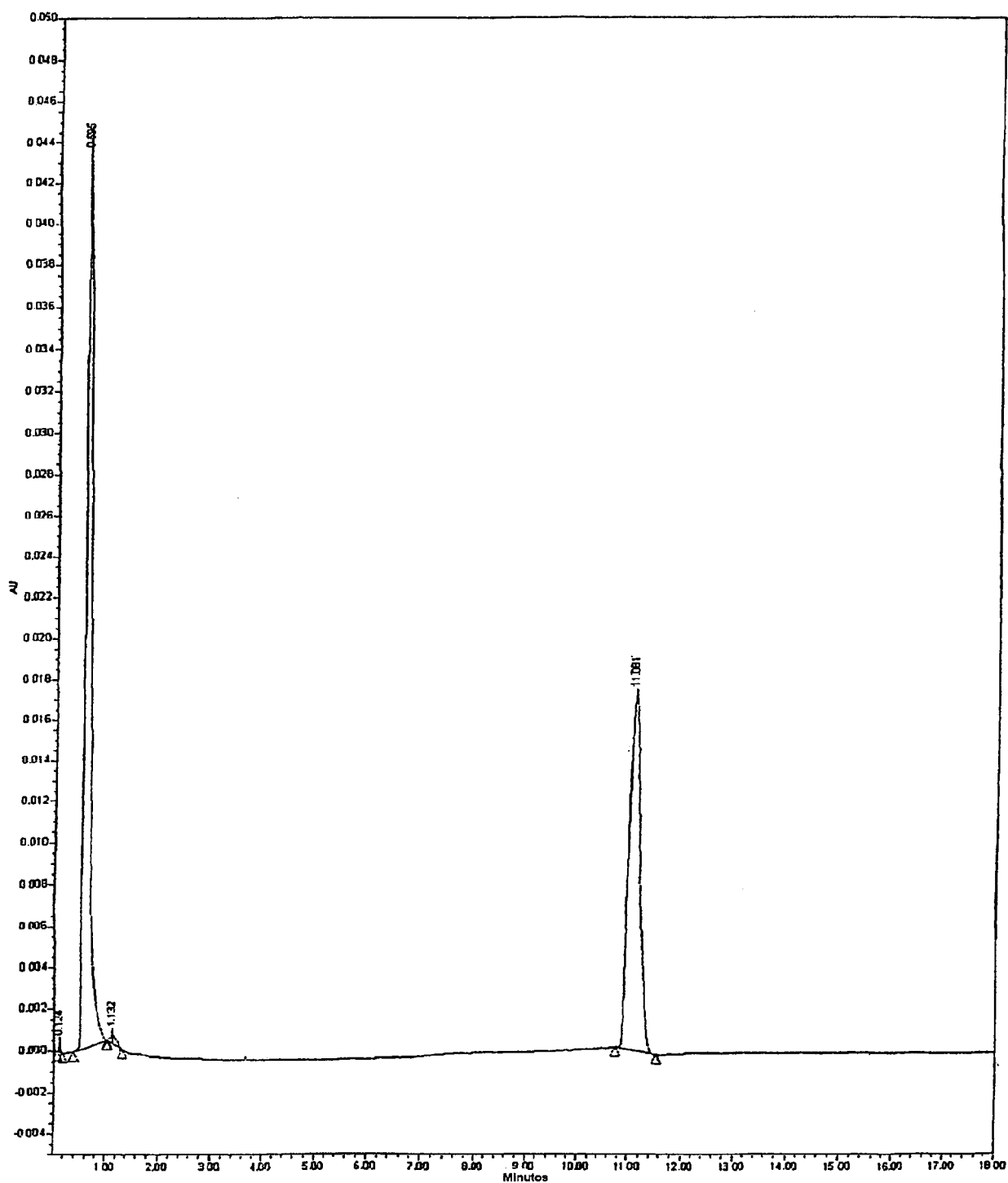


Fig. 2 **Análisis por HPLC del extracto en metanol de *Mycobacterium w.***

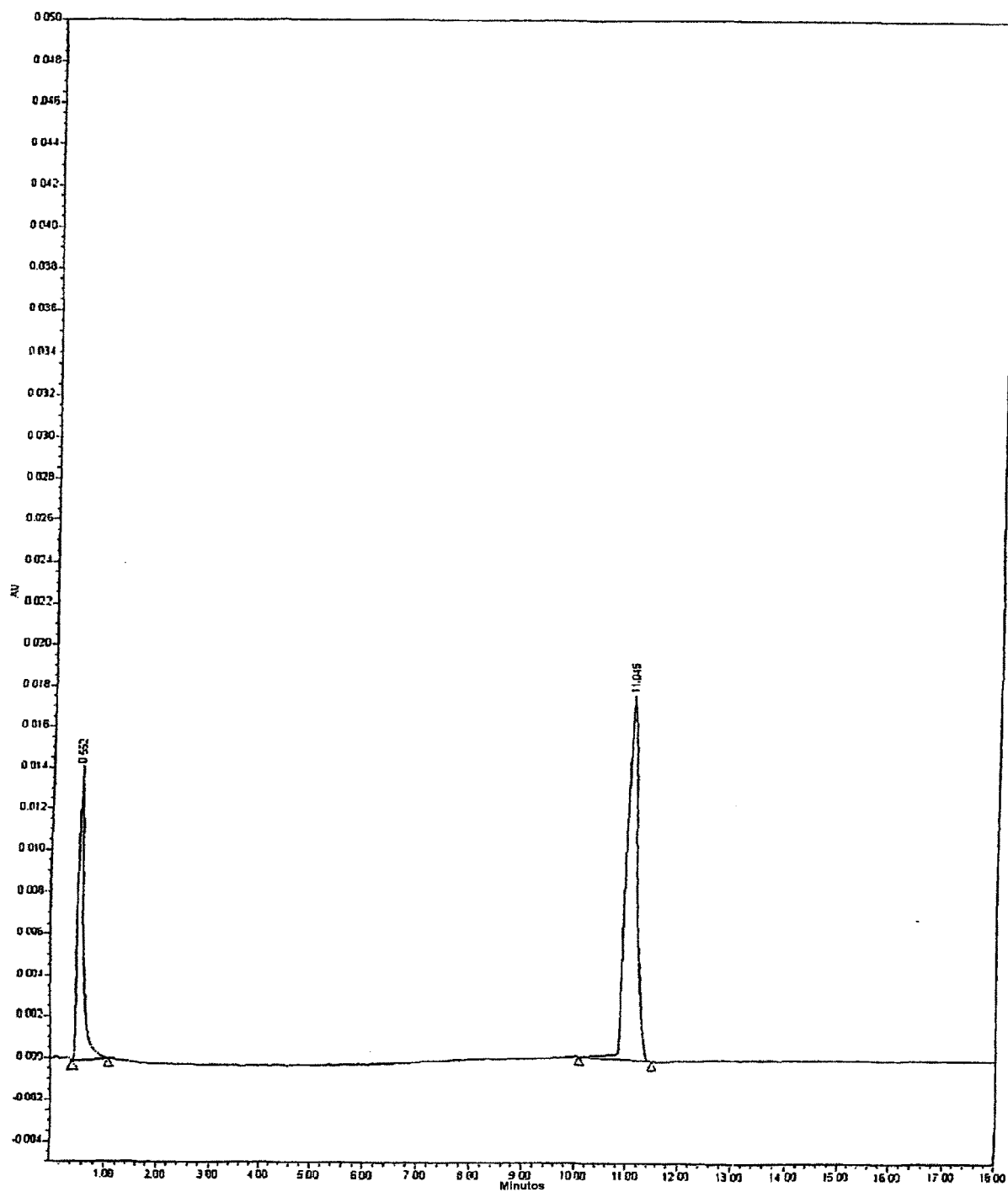


Fig. 3 Análisis por HPLC del extracto en cloroformo de *Mycobacterium w.*

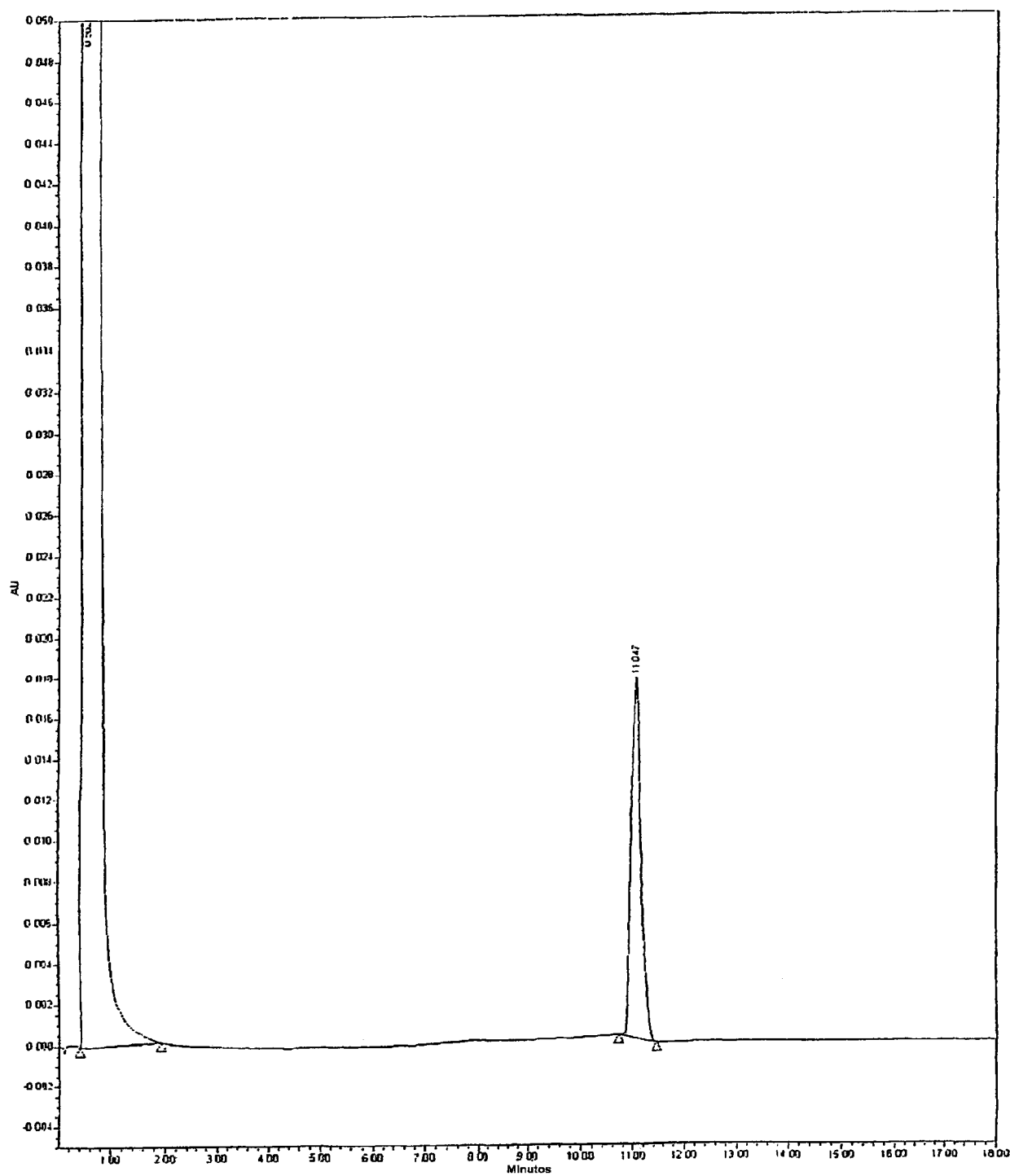


Fig. 4 **Análisis por HPLC del extracto en acetona de *Mycobacterium w.***

Fig. 5
Análisis de regresión del cambio antes y después del tratamiento en el recuento
de CD4 cuando sólo se usa inmunomodulador

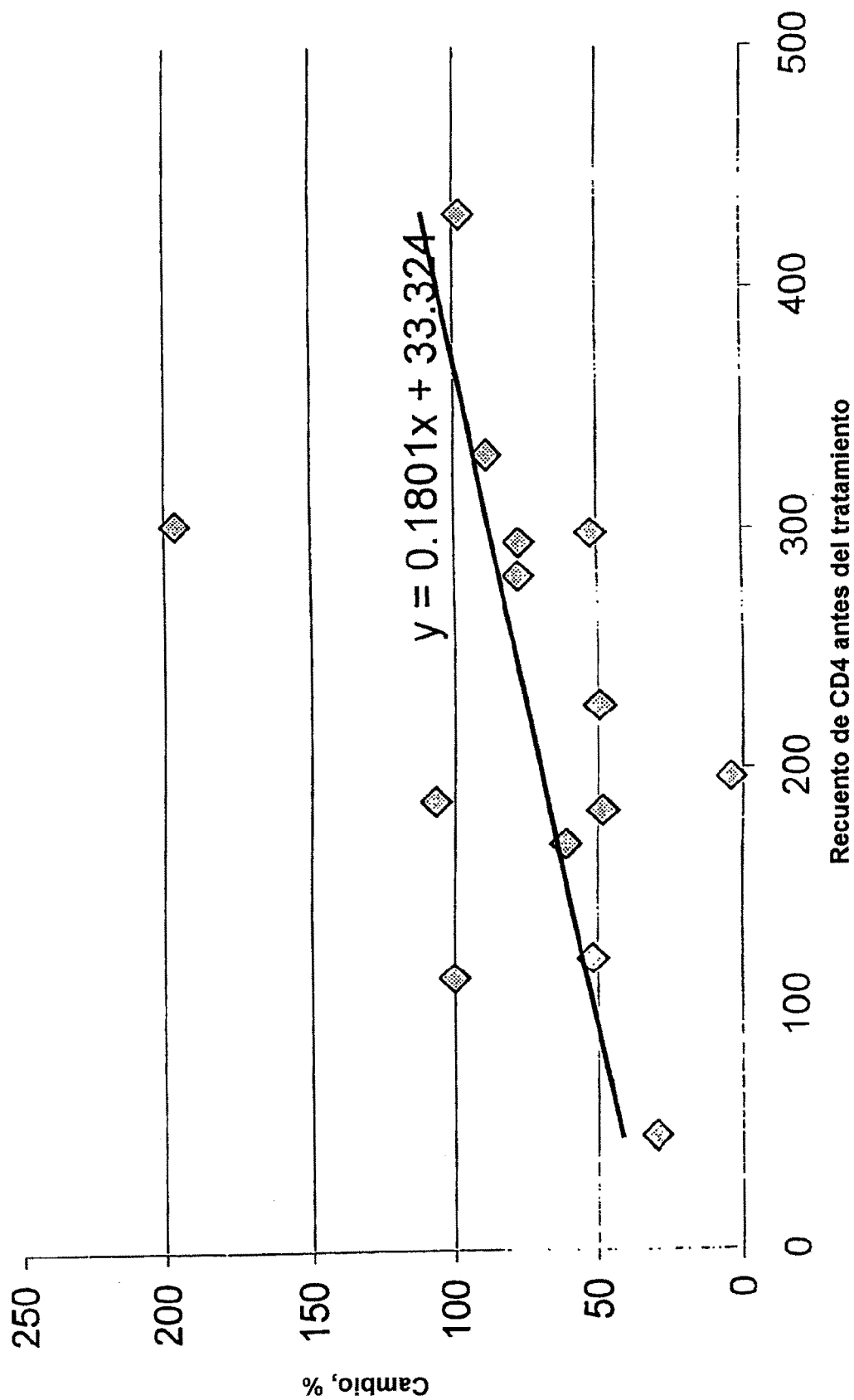


Fig. 6
Análisis de regresión del cambio antes y después del tratamiento en el recuento de CD4 cuando el inmunomodulador se usa con dos fármacos anti-retrovirales (ITINN)

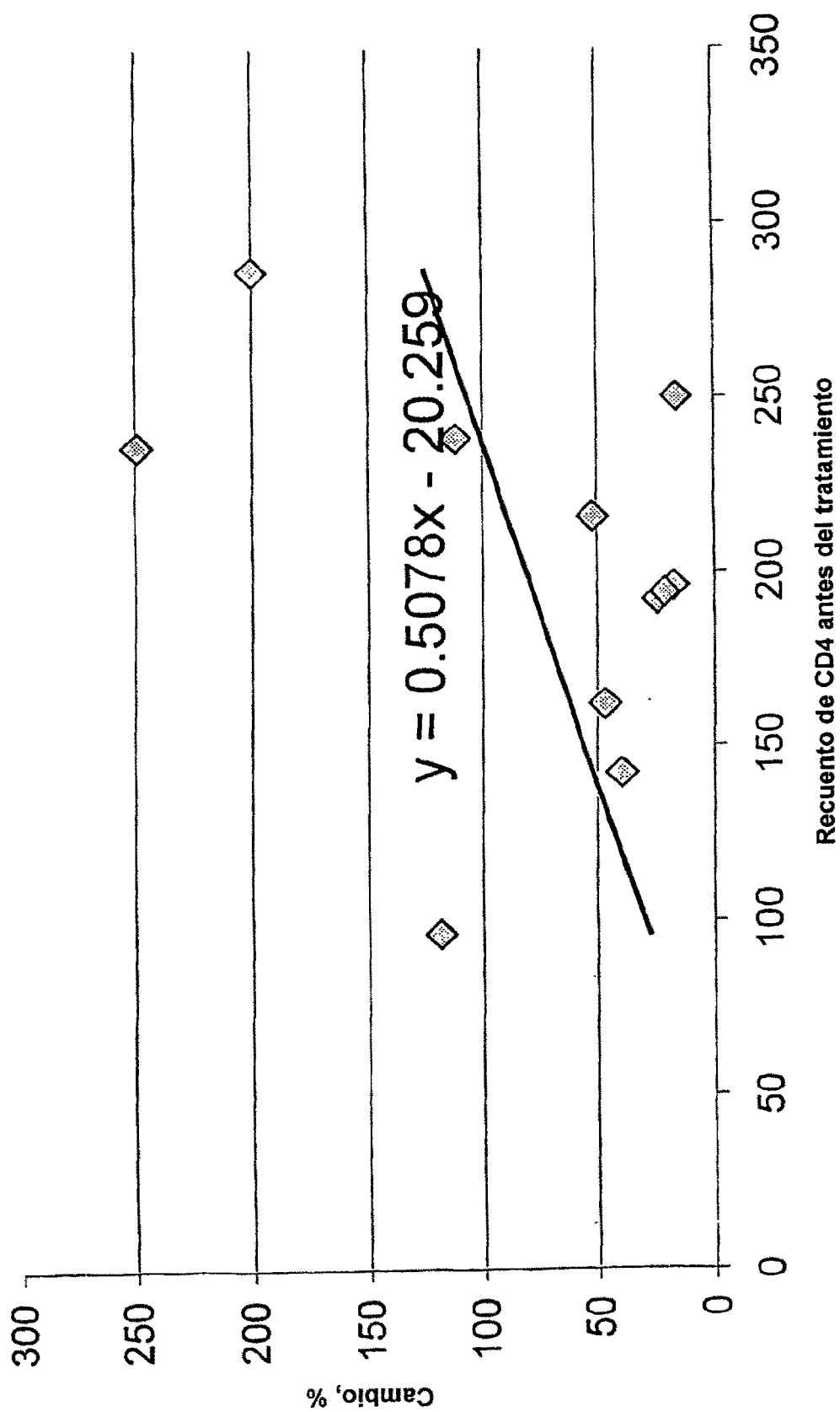


Fig. 7
Análisis de regresión del cambio antes y después del tratamiento en el recuento de CD4 cuando el inmunomodulador se usa junto con terapia TARAA

