

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.04.11	(73) Titular(es): LIGHTER, JENNIFER
(30) Prioridade(s): 2007.04.12 US 923301 P	132 EAST 72ND STREET, APT. 1 NEW YORK,
(43) Data de publicação do pedido: 2010.01.20	NY 10021 US
(45) Data e BPI da concessão: 2014.12.03 043/2015	FISHER, JASON US
	(72) Inventor(es):
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
	R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA PARA A TUBERCULOSE E PROCESSO PARA O SEU USO**

(57) Resumo:

É DISPONIBILIZADA UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE INCLUI UMA OU VÁRIAS MYCOBACTERIUM SPP., QUE SÃO PREFERENCIALMENTE INACTIVADAS UTILIZANDO A RADIAÇÃO GAMA, E QUE É ENTÃO FORMULADA PARA ADMINISTRAÇÃO POR VIA DA MUCOSA, OU PULMONAR A UM SUJEITO. AS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS SÃO ÚTEIS PARA EVITAR, OU TRATAR INFECÇÕES ASSOCIADAS COM A MYCOBACTERIUM NUM SUJEITO, INCLUINDO UM SUJEITO HUMANO.

Descrição

"Vacina para a tuberculose e processo para o seu uso"

Campo da Invenção

A invenção diz respeito a uma vacina contra a tuberculose e mais particularmente a uma vacina que utiliza *Mycobacterium tuberculosis* completa inactivada formulada para administração pulmonar, ou por via da mucosa.

Antecedentes da Invenção

A *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb) infecta um terço da população mundial¹. A vacina habitual contra a tuberculose (TB) conhecida como vacina BCG é administrada a recém-nascidos nos países em desenvolvimento. Enquanto esta vacina protege as crianças contra a TB meníngea e disseminada, ela falha em proteger adequadamente contra o estabelecimento da TB latente, ou contra a reactivação da doença pulmonar na vida adulta². Além disso, a eficácia da BCG é reportada como diminuindo ao longo de um período de 10-15 anos³. O tipo mais comum de doença da tuberculose é pulmonar e a transmissão ocorre, através de gotículas de aerossol emitidas, quando se tosse. Assim, apesar da elevada prevalência da vacinação com BCG, a carga da doença não diminuiu. Existe agora evidência para suportar o facto que linhagens microbacterianas de M. tb podem estar adaptadas a mutações em antígenos comuns tanto a M. tb como a BCG^{4,5}. Além disso, estudos recentes sugerem que a BCG administrada por via parenteral pode falhar em reduzir respostas imunitárias das células T na mucosa dos pulmões, que pode ser crítica para a protecção contra a doença pulmonar^{6,7}. Atendendo a estas razões, uma nova vacina é

imperativa para diminuir a prevalência da TB em todo o mundo.

A WO 00/47225 diz respeito a uma composição que compreende um adjuvante e micobactérias que são inactivadas por calor, ou por formalina para fazer uma vacina de mucosa.

Sumário da Invenção

A invenção disponibiliza uma vacina para evitar e/ou tratar a tuberculose. A invenção pode ser utilizada com várias estratégias de vacinação: administração profiláctica antes da infecção para evitar infecção com *M. tb*, após exposição para eliminar, ou conter a TB latente e evitar a reactivação. Pode ser utilizada para substituir a BCG e/ou como reforço à BCG em doentes que já receberam BCG, ou outra sub-unidade TB imunoestimulante.

Num aspecto, a invenção disponibiliza uma composição farmacêutica compreendendo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) completa inactivada, em que a composição é formulada para administração por via intranasal, por via das mucosas, ou intrapulmonar a um hospedeiro mamífero, e em que a composição compreende uma dose imunologicamente protectora, quando administrada ao hospedeiro e em que *M. tb* é inactivada com radiação.

Nalgumas concretizações, pelo menos 90% das células da *Mycobacterium* spp. são inactivadas, por ex. 95%, 98%, 99%, ou 100% das células da *Mycobacterium* spp. Quando o sujeito é um ser humano, 100% das células da *Mycobacterium* spp. encontram-se preferencialmente inactivadas.

Preferencialmente a irradiação é com radiação gama.

A composição farmacêutica pode incluir eventualmente um adjuvante para aumentar uma resposta imunitária num hospedeiro.

A composição farmacêutica pode incluir opcionalmente um veículo farmacêuticamente aceitável, ou ser disponibilizada liofilizada.

Nalgumas concretizações, a composição farmacêutica é formulada para administração nasal ao hospedeiro.

Para além disso, a composição farmacêutica é disponibilizada acondicionada sob a forma de aerossóis, ou como um pulverizador.

Numa concretização, a invenção disponibiliza uma composição farmacêutica que inclui uma *Mycobacterium* spp. irradiada com radiação gama que é formulada para administração intranasal, ou intrapulmonar a um hospedeiro mamífero e que confere uma dose imunologicamente protectora, quando administrada ao hospedeiro, por ex. a um ser humano.

Nalgumas concretizações, a composição farmacêutica é administrada, através de um dispositivo configurado para administração nasal, ou pulmonar.

Ainda num outro aspecto, a invenção disponibiliza um método para preparar uma vacina para tratar a infecção por *Mycobacterium*, compreendendo a formulação com uma dose imunologicamente protectora de *Mycobacterium tuberculosis* completa inactivada, para administração intranasal, ou pulmonar a um mamífero hospedeiro.

Nalgumas concretizações, o método inclui o teste da vacina num modelo animal não-humano da tuberculose.

O modelo animal, pode ser por ex., um ratinho, um porquinho-da-índia, um coelho, um bovino, ou um primata não humano.

A não ser quando especificado de outro modo, todos os termos técnicos e científicos possuem o mesmo significado habitual compreendido por um vulgar perito no estado da técnica, ao qual pertence esta invenção. Apesar de processos e materiais semelhantes aos aqui descritos

poderem ser utilizados na prática, ou no teste da presente invenção, processos adequados e materiais são descritos abaixo. Para além disso, os materiais, processos, e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser limitativos.

Outras características e vantagens da invenção serão visíveis a partir da seguinte descrição detalhada e das reivindicações.

Descrição Detalhada da Invenção

Uma vacina de acordo com a invenção é preparada utilizando *Mycobacterium tuberculosis* inactivada que é então formulada para administração por via pulmonar e da mucosa a um sujeito. Quando a mycobacterium inactivada é administrada ao pulmão, ou à mucosa/mucosa nasal de um sujeito é postulado provocar uma resposta imunitária muito mais forte do que a que foi observada com as vacinas TB anteriormente descritas.

A investigação num modelo de murino da gripe sugere que as células imunitárias pulmonares permanecem localizadas e apenas algumas células B e T migram sistematicamente^{8,9}. A investigação mostra que células T CD8 específicas da gripe podem permanecer fechadas dentro de um circuito semi-isolado dentro do peito, atingindo dificilmente a corrente sanguínea, ou o tecido linfoide periférico, mas em vez disso fazem um ciclo entre a mucosa respiratória e os nódulos linfáticos locais. Zammit et al sugeriram que uma razão para este facto pode ser a anatomia especial da drenagem linfática dos pulmões⁸. As células que entram no ducto torácico, a partir dos nódulos linfáticos pulmonares são alimentadas aos pulmões, através do sangue arterial pulmonar. Algumas podem passar através da circulação sistémica, mas as células activadas tendem a

aderir ao endotélio vascular e movimentar-se de volta para os pulmões, mantendo assim as células no local da infecção. A partir daqui as células movimentam-se até aos nódulos locais, onde reencontram o antigénio. De facto verificou-se no modelo TB de murino que células T de memória específicas para o antigénio regressam preferencialmente ao local da vacinação e que a localização das células T na via aérea na altura da infecção é importante¹⁰⁻¹¹.

Aplicando estas constatações à presente invenção, para uma vacina TB ser bem sucedida a provocar uma resposta imunitária protectora no sistema da mucosa pulmonar e respiratória, estimula preferencialmente directamente as células apresentadoras de antígenos no epitélio respiratório. A invenção consegue isto administrando a mycobacterium irradiada directamente à interface pulmonar e da mucosa.

Um estudo publicado em 1968 não reportou efeitos adversos, quando a BCG aerogénica foi administrada a 439 crianças.¹² Nas espécies animais experimentais, a administração da BCG por via de aerossóis ou intraqueal variou em eficácia com uma protecção superior na inoculação parenteral em primatas¹³, gado¹⁴ porquinhos da índia^{15r}, e ratinhos^{16,17,18,19} e sem vantagem aparente em relação à via subcutânea noutros estudos²⁰. Outros estudos mostraram uma resposta imunitária dependente da dose de BCG inicial de inóculo^{12,21}.

Recentemente, vários grupos de investigação publicaram dados sobre a utilização de subunidades de vacinas de M tb de mucosa como reforço, quando administradas semanas após imunização primária no modelo de murino. As constatações de Goonetilleke et al suportam a importância das propriedades de regresso a casa das células T, quando expostas a vírus vaccinia recombinantes Ankara, que expressam Mycobacterium tuberculosis Ag85A. Um reforço intranasal

induziu uma resposta das células T cinco vezes mais elevada nos pulmões do que a BCG parenteral suportando o facto de que as células T nos pulmões encontram-se nalguma forma compartimentalizadas²². Santosuosso et al mostrou que um vector adenoviral intranasal que expressa Ag85A reforçou a resposta primária das células T CD4 CD8 T no lúmen das vias respiratórias e aumentou a protecção contra a provocação pulmonar por *M. tuberculosis*²³. Outros estudos nos ratinhos que utilizam antigénios micobacterianos (Ag 85A ou Ag 85B-ESAT-6) em vectores recombinantes bacterianos / virais ou com proteínas e adjuvantes administrados por via da mucosa como reforço mostraram imunidade protectora, quando comparados com BCG parenteral padrão, quando desafiados *M.tb* viva^{24,25,26}. Todos estes estudos mostraram estatisticamente menos unidades formadoras de colónias de micobactérias nos pulmões e no baço após o reforço da subunidade da vacina, quando comparada com a BCG isoladamente.

A resposta imunitária adaptativa à infecção por *M tuberculosis* viva é atrasada, quando comparada com outras infecções e isto permite à população de bacilos aumentar notoriamente nos pulmões durante a fase pré-imunitária da infecção²⁷. Utilizando bacilos mortos numa formulação de aerossóis da vacina não existe multiplicação das micobactérias e a resposta imunitária teria um tempo adequado para responder aos antigénios na parede celular das bactérias. Para além disso, ao longo de milhares de anos, através de desafios adequados a *M tb* encontrou maneiras de evadir a resposta imunitária inata durante a apresentação inicial de antigénios^{28,29,30,31}. Micobactérias mortas não possuem a capacidade de produzir enzimas que evocam meios de evadir o sistema imunitário humano e evitam uma apresentação bem sucedida dos antigénios.

Consideramos que uma razão para este método que utiliza mycobacterium completa morta ter sido esquecido no passado é devido aos estudos realizados por Robert Koch no passado século XIX³². Koch utilizou um filtrado estéril de culturas de *M. tuberculosis* como uma vacina terapêutica nos sujeitos. Isto induziu uma resposta inflamatória de tal modo severa nalguns sujeitos com a doença activa, que alguns morreram. Conhecido como o fenómeno de Koch, esta reacção necrótica parece ser devida à produção em excesso de várias citocinas pro-inflamatórias, mas em particular devido à TNF- α ³³. Este incidente assombrou os imunologistas durante décadas e consideramos que desde essa altura os cientistas esqueceram a utilização potencial de bacilos completos. A mycobacterium completa morta vai ser utilizada em quantidades suficientemente pequenas para evitar uma reacção inflamatória esmagadora, mas que ainda assim provoque uma forte resposta imunoprotectora.

Em geral, qualquer tipo de procedimento de inactivação pode ser utilizado desde que o tratamento deixe a população de bactérias incapaz de produzir uma infecção produtiva no hospedeiro, enquanto ao mesmo tempo a preservação de estruturas antigénicas necessárias para provocar uma resposta produtiva à mycobacterium que provoca a doença correspondente. A preparação de mycobacterium é tipicamente incapacitada. Por "incapacitada" num contexto de uma célula bacteriana incapacitada produzida de acordo com a invenção significa que a célula bacteriana encontra-se num estado de bacteriostase irreversível. Enquanto a bactéria mantém a sua estrutura e assim retém por exemplo, a imunogenicidade, antigenicidade, e/ou as interacções receptor-ligando associadas com uma bactéria do tipo selvagem não é capaz de se replicar. Nalgumas concretizações, é incapaz de se replicar devido à presença de um fago de infecção dentro da célula bacteriana.

Um tipo preferido de inactivação é a irradiação com radiação gama. Outros tipos de inactivação conhecidos no estado da técnica incluem, por ex. outros tipos de radiação (incluindo radiação ultravioleta). Nalgumas concretizações, >70% foram mortas para uso não -humano. Nas concretizações para uso humano, foram mortas 100% das células.

Não se pretendendo estar limitado pela teoria, é postulado que as *Mycobacterium* irradiadas com radiação gama são especialmente adequadas para serem utilizadas nas composições e métodos da invenção. Bactérias irradiadas com radiação gama são utilizadas habitualmente no laboratório, porque são consideradas seguras e não se replicam. Em muitos ensaios, verificou-se no entanto que provocam uma resposta imunoprotectora, incluindo respostas provocadas por antígenos na parede dos bacilos^{34,35,36}. Para além disso, *mycobacterium* irradiada com radiação gama sofrem apoptose e são envolvidas por células dendríticas. As células dendríticas apresentam os antígenos da *mycobacterium* a células T que activam as células citotóxicas Th1 CD4 e CD8. A *M tb* irradiada com radiação gama pode também induzir a libertação de óxido nítrico³⁴ e pode provocar respostas Th2 semelhantes a *M tb* viva³⁵. Em 1963, Nishihara et al injectaram por via intradérmica *M tb* irradiada com radiação gama em ratinhos e verificaram que era igualmente tão protectora como a BCG injectada por via intradérmica contra uma provocação com aerossóis com *M tb*³⁷.

Pensa-se que a administração das bactérias irradiadas ou dos antígenos bacterianos aos pulmões e limites da mucosa facilita uma resposta imunitária efectiva no hospedeiro. Por administração à mucosa nasal, ou às passagens alveolares, as bactérias, ou antígenos das bactérias são detectados por células que apresentam antígenos, especificamente células dendríticas no espaço

alveolar/intersticial do pulmão. Estas células dendríticas migram seguidamente para as regiões enriquecidas em células T CD4+ e CD8 naïve e que constituem a zona paracortical dos nódulos linfáticos regionais do pulmão. Estas células T são activadas pelos antígenos dos bacilos mortos. As micobactérias mortas vão ser submetidas a fagocitose por macrófagos.

Em geral, qualquer espécie ou estirpe de *Mycobacterium* que é membro do complexo *M. tuberculosis* pode ser utilizada na composição e processos da memória descritiva. Espécies adequadas, de *Mycobacterium* que são membros do complexo *M. tb* incluem, por ex. *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microtti*, e *Mycobacterium tuberculosis*. Micobactérias que são geneticamente semelhantes incluem *Mycobacterium canettii* e *Mycobacterium marinum*. A espécie em particular, ou combinações de espécies são seleccionadas para as espécies hospedeiras correspondentes e tipo de doença associada à micobactéria a ser tratada. Outras micobactérias que provocam doença nos seres humanos incluem, por ex., *Mycobacterium avium* intracelular, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacteria paratuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium flavum*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium thermoresistente*, e *Mycobacterium xenopi*.

A *Mycobacterium* a ser utilizada na composição farmacêutica inclui células completas.

Preparação de Composições Farmacêuticas

As células mortas são preparadas por administração a um hospedeiro combinando células inactivadas, ou lisados celulares com um veículo farmacêuticamente aceitável para formar uma composição farmacêutica. O veículo pode ser por ex., soro fisiológico, óleo mineral, óleos vegetais, carboximetilcelulose sódica, ou polivinilpirrolidona aquosa.

Nalgumas concretizações, o veículo é suficientemente puro para ser administrado terapêuticamente a um ser humano. Os peritos no estado da técnica são bem capazes de preparar soluções adequadas, utilizando por exemplo, veículos isotónicos, tais como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, ou injeção de lactato de Ringer. Podem estar incluídos conservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos de acordo com o necessário.

Um perito no estado da técnica familiar com os protocolos, formulações, dosagens e prática clínica associada com por ex. a administração de M. bovis BCG pode além disso, adaptar facilmente estes protocolos para serem utilizados com as composições farmacêuticas da presente invenção. As vacinas são administradas de uma maneira compatível com a dosagem da formulação, e numa tal quantidade que será terapêuticamente eficaz e imunogénica.

A quantidade a ser administrada depende do sujeito a ser tratado, incluindo, por ex., a capacidade do sistema imunitário do indivíduo de montar uma resposta imunitária, e o grau de protecção desejado. Gamas de dosagem adequadas são da ordem de algumas centenas de micrograma de princípio activo por vacinação com uma gama preferida de cerca de 0,1 µg a 1000 µg, tal como na gama de cerca de 1 µg a 300 µg, e especialmente na gama de cerca de 10 µg a 50 µg. Regimes adequados para a administração inicial e administração de reforço são também variáveis, mas são tipificadas por uma

administração inicial seguida por inoculações subsequentes ou outras administrações. Assim, a vacina pode ser administrada numa dose única, ou numa pluralidade de doses. Numa concretização, a vacina pode ser administrada em duas doses com cerca de 1-12 meses de intervalo. O sujeito pode ser vacinado em qualquer altura, apesar de ser preferido administrar a vacina num período curto (de forma óptima cerca de 10 dias a duas semanas) antes dos períodos do stress antecipado, tal como durante o transporte ou manipulação. Também se considera que a vacina pode ser administrada a animais prenhes antes do nascimento para aumentar a produção de colostro híper-imunitário.

Uma composição pode ser administrada isoladamente, ou em combinação com outros tratamentos ou vacinas BCG padrão, simultaneamente, ou sequencialmente dependendo da condição a ser tratada. A composição pode ser administrada após vacinação com BCG e por isso actuar como uma vacinação de reforço contra a tuberculose. Além disso, pode ser administrada após uma inoculação subcutânea inicial de bacilos completos mortos seguida de um reforço por via intranasal ou por via da mucosa.

As células mortas podem ser incorporadas em micropartículas, ou microcápsulas para prolongar a exposição do material antigénico ao sujeito animal e proteger deste modo o animal contra infecção durante longos períodos de tempo. As micropartículas e cápsulas podem ser formadas a partir de uma variedade de materiais de matriz bem conhecidos inertes, biocompatíveis utilizando técnicas convencionais no estado da técnica. Materiais de matriz adequados incluem, por ex., polímeros naturais ou sintéticos, tais como alginatos, ácido poliláctico, ácido poli(láctico/glicólico), poli(caprolactona), policarbonatos, poliamidas, polianidridos, poliortoésteres, poliacetais, policianoacrilatos, poliuretanos, copolímeros

de etileno-acetato de vinilo, poliestirenos, cloreto de polivinilo, fluoreto de polivinilo, poli(vinilimidazol), poliolefinas clorosulfonadas, óxido de polietileno, e em particular agár e poliacrilatos. Exemplos de técnicas para incorporação de materiais em micropartículas, ou encapsulação que podem ser aqui utilizadas são descritas por Sparks³⁸, Kydonius³⁹, e El-Nokaly⁴⁰.

A mycobacterium inactivada pode estar contida em pequenas partículas suspensas em água, ou em soro fisiológico. As formulações da vacina podem também conter adjuvantes opcionais, agentes antibacterianos ou outros princípios activos farmacêuticos convencionais do estado da técnica. Os adjuvantes podem incluir, mas não se encontram limitados a sais, emulsões (incluindo composições óleo/água), saponinas, formulações de lipossomas, partículas de vírus, polipéptidos, padrões moleculares associados a antigénios (PAMPS), compostos baseados em ácidos nucleicos ou outras formulações que utilizam determinados antigénios. Adjuvantes adequados incluem, por ex., óleos vegetais, alúmen, adjuvante incompleto de Freund, ou adjuvante incompleto de Freund com óleos sendo o adjuvantes incompleto de Freund particularmente preferido. Outros adjuvantes incluem agentes tais como hidróxido de alumínio, ou fosfato (alúmen), complexos imuno-estimuladores (ISCOMs), polímeros sintéticos de açúcares (CARBOPOL®), agregação da proteína na vacina por tratamento com calor, agregação por reactivação com anticorpos tratados com pepsina (Fab) à albumina, mistura com células bacterianas, tais como *C. parvum* ou endotoxinas ou componentes de lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas, emulsão em veículos oleosos fisiologicamente aceitáveis, tais como manido mono-oleato (Aracel A) ou podem ser também utilizadas emulsões com uma solução a 20

por cento de perfluorocarbono (Fluosol-DA) utilizado como substituto de bloco.

A mycobacterium inactivada pode encontrar-se contida num adjuvante de toxina bacteriana da mucosa, tal como *Escherichia coli* labile toxigena (LT) e a toxina da cólera (CT) ou o oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN)⁴¹. Outro adjuvante possível do lípido de monofosforilo A da mucosa (MPL), um derivado e uma forma menos tóxica do que LPS, quando combinado com lipossomas verificou-se que induzia respostas imunoprotectoras da mucosa⁴². Demonstrou-se que um novo adjuvante desenhado para vacinação nasal, Eurocine L3™, induzia uma imunidade de longa duração contra TB em modelos experimentais de animais após administração intranasal⁴³⁻⁴⁵. A tecnologia do adjuvante consiste numa formulação farmacêutica não-tóxica baseada numa combinação de lípidos endógenos e lípidos farmacêuticamente aceitáveis. A vacina pode incluir adicionalmente substâncias imunomoduladoras, tais como citocinas ou indutores sintéticos IFN- γ , tais como poli I:C isoladamente, ou em combinação com os adjuvantes acima mencionados.

Outros adjuvantes incluem ainda micropartículas ou esferas de materiais de matriz biocompatíveis. As micropartículas podem ser compostas por quaisquer materiais de matriz biocompatíveis como os convencionais do estado da técnica, incluindo, mas não se encontrando limitados a agár e poliacrilatos. O perito no estado da técnica irá reconhecer que outros veículos ou adjuvantes, também podem ser utilizados. Por exemplo, o quitosano, ou qualquer sistema de administração bioadesivo que possa ser utilizado são descritos por Webb e Winkelstein⁴⁶, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência.

A composição farmacêutica que contém a mycobacterium inactivada é preferencialmente formulada para administração

intranasal ou intrapulmonar que utilizam processos conhecidos no estado da técnica. A formulação da mycobacterium irradiada combinada com o adjuvante é seleccionada preferencialmente para minimizar os efeitos laterais, tais como a inflamação, associada com a vacinação ou pode melhorar a estabilidade da formulação. O adjuvante pode também possuir um papel de imunoestimulador, ou como um depósito.

Nalgumas concretizações as mycobacterium inactivadas são administradas por refinamento de um nebulizador, ou através de três tipos de dispositivos portáteis compactos, inaladores de doses calibradas (IDC) e o inalador de pó seco (IPS). A administração intranasal pode ocorrer, através de um pulverizador nasal, conta-gotas, ou dispositivo de administração nasal de doses calibradas. A mycobacterium inactiva pode ser administrada, através de um inalador de doses calibradas. Tipicamente, apenas 10-20% da dose emitida é depositada nos pulmões. A elevada velocidade e a grande dimensão das partículas do pulverizador provoca aproximadamente o impacto de 50-80% do aerossol do fármaco na região orofaríngea.

A mycobacterium pode encontrar-se contida numa formulação de pó seco, tal como, mas não limitada a sistema de veículo de açúcar. O sistema de veículo de açúcar poderia incluir lactose, manitol, e/ou glucose. Lactose, manitol, e glucose estão todos aprovados pelo FDA como veículos. Também existem partículas de açúcar maiores, tais como de lactose monohidrato tipicamente de 50-100 micrometros de diâmetro, que permanecem na naso-orofaringe, mas permite aos bacilos inactivados viajarem, através da árvore respiratória até aos alvéolos.⁴⁷

Se desejado, a mycobacterium pode encontrar-se contida numa formulação lipossomal. Os lipossomas, tais como outras

partículas inaladas que atingem os alvéolos são libertados pelos macrófagos.

O processamento, absorção e reciclagem dos fosfolípidos lipossomais ocorre, através do mesmo mecanismo do que o agente tensioactivo endógeno, através das células alveolares do tipo II.

Uma composição farmacêutica contendo, a mycobacterium irradiada descrita acima é administrada a um indivíduo adequado para evitar, ou tratar a tuberculose. Aqui uma referência à "tuberculose" inclui referência a tuberculi pulmonares, ou extra-pulmonares. Os termos "indivíduo", "sujeito", "hospedeiro" e "doente" são aqui utilizados de forma permutável e referem-se a qualquer sujeito que possui uma infecção bacteriana passível de tratamento utilizando a vacina terapêutica de acordo com a invenção, e cujo tratamento ou terapia é desejado. A composição farmacêutica pode ser preparada para qualquer hospedeiro mamífero que seja susceptível de infecção pela mycobacterium. Hospedeiros mamíferos adequados incluem, por ex., animais de quinta, como suínos e bovinos.

Os termos "tratamento", "tratar" e semelhantes são aqui utilizados para referir de forma geral à obtenção do efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profiláctico em termos de evitar completamente ou parcialmente uma doença, ou um seu sintoma e/ou pode ser terapêutico em termos de uma estabilização parcial, ou completa ou cura de uma doença e/ou efeito secundário atribuível à doença. Quando aqui utilizado "tratamento" cobre qualquer tratamento de uma doença num sujeito, particularmente um sujeito mamífero, mais particularmente um ser humano, e inclui:

(a) evitar que a doença, ou sintoma ocorra num sujeito que pode estar predisposto à doença ou ao sintoma, mas que não foi ainda diagnosticado como possuindo-o; (b) inibir o

sintoma da doença, i.e. parar o seu desenvolvimento; ou para aliviar o sintoma da doença, i.e. provocando a regressão da doença ou do sintoma (c) evitar a reactivação da doença na TB latente, i.e. evitar que os bacilos transitem de uma fase de dormência para uma fase de crescimento. Assim, a administração encontra-se preferencialmente numa quantidade "profilacticamente" eficaz, ou numa quantidade "terapeuticamente eficaz" (conforme o caso, apesar da profilaxia poder ser considerada como terapia), sendo isto suficiente para demonstrar benefício ao indivíduo. A quantidade administrada e taxa e decurso da administração vão depender da natureza e severidade do que está a ser tratado. A prescrição do tratamento, por ex. decisões, quanto à dosagem etc. encontra-se no âmbito da responsabilidade dos médicos de clínica geral e de outros profissionais da medicina ou veterinária.

O sujeito a ser tratado com a vacina vai possuir, ou desenvolver tipicamente imunidade protectora a uma bactéria infecciosa. O termo "imunidade protectora" significa que uma vacina, composição imunogénica ou esquema de imunização que é administrado a um mamífero induz uma resposta imunitária que evita, atrasa o desenvolvimento de, ou reduz a severidade de uma doença que é provocada por uma bactéria patogénica ou diminui, ou elimina totalmente os sintomas da doença. Por "bactéria infecciosa" entende-se uma bactéria que estabeleceu uma infecção no hospedeiro, e que pode estar associada com uma doença, ou sintoma indesejável resultante da infecção. Geralmente, as bactérias infecciosas são bactérias patogénicas.

A frase "numa quantidade suficiente para provocar uma resposta imunitária" significa que existe uma diferença detectável entre o indicador da resposta imunitária medida antes e depois da administração de uma preparação de vacina

em particular, ou composição imunogénica. Os animais, aos quais foi administrada a vacina de teste vão ser testados contra os animais aos quais foram administrados BCG intradérmica (como padrão de ouro). Várias semanas após a última vacinação, os animais vão ser provocados com um aerossol virulento com M tb. A resposta clínica e molecular imunitária vai ser avaliada várias semanas após a provocação com M. tb.

Teste e Desenvolvimento de Vacinas de Tuberculose

Uma vacina de teste pode ser pesquisada, ou optimizada submetendo uma população de células de mycobacterium, ou das suas fracções (como descrito acima) a vários regimes de inactivação, preparando uma formulação farmacêutica candidata contendo as células tratadas, ou fracções de células e testando a capacidade da composição tratada utilizando os processos descritos acima para provocar uma resposta imunitária e/ou montar uma provocação eficaz à infecção por mycobacterium num hospedeiro.

Os termos "composição bacteriana imunogénica", "composição imunogénica", e "vacinas" são aqui utilizadas de forma permutável para significar uma preparação capaz de provocar uma resposta celular e/ou humoral num sujeito quando administrada numa quantidade suficiente para provocar uma resposta imunitária aos epitopos presentes na dita preparação.

A imunopotência da molécula antigénica expressa pela célula de mycobacterium ou preparação de um seu extracto pode ser determinada monitorizando a resposta imunitária dos animais de teste a seguir à imunização com as bactérias que expressam o antigénio recombinante. Os animais de teste podem incluir ratinhos, porquinhos-da-índia, coelhos,

bovinos, primatas não-humanos, e eventualmente sujeitos humanos.

A resposta imunitária do sujeito de teste pode adicionalmente ser analisada, através de várias abordagens, tais como: (a) produção de citocinas associadas às células T (b) produção de citocinas do plasma (c) proliferação das células T, citotoxicidade, perfis de citocinas (d) repertórios de antigénios de células T (e) perfis reguladores de células T (f) perfis de ARNm (g) perfis de imunidade inatos (h) perfis de anticorpos (i) genética e (j) protecção de doenças e/ou mitigação de sintomas infecciosos em animais imunizados.

Referências Bibliográficas:

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning Financing. WHO report 2002. Geneva, Switzerland: WHO, 2002.
2. Fine, PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995;346:1339-1345
3. World Health Organization. 2001. WHO-vaccine preventable diseases: monitoring system. 2000 global summary. World Health Organization, Geneva Switzerland.
4. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284(5419):1328-1334
5. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host -pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(8):2869-2873
6. Gallichan W S and Rosentahl KL. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *Journal of Experimental Medicine* 1996.;184:1879

7. Belyakov IM, Moss B, Strober W, Berzofsky JA. Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity. *Proceedings for the National Academy of Science* 1999;96:4512
8. Zammit DJ, Turner DL, Klonowski KD, Lefrancois L, Cauley LS. Residual Antigen Presentation after Influenza Virus Infection Affects CD8 T Cell Activation and Migration. *Immunity*. 2006; 24: 439-449.
9. Zammit DJ, Cauley LS, Pham QM, Lefrancois L. Dendritic Cells Maximize the Memory CD8 T Cell Response to Infection. *Immunity*. 2005; 22: 561-570.
10. Kamath, A. B., J. Woodworth, X. Xiong, C. Taylor, Y. Weng, S. M. Behar. 2004. Cytolytic CD8+ T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* 200: 1479-1489.
11. Santosuosso, M., X. Zhang, S. McCormick, J. Wang, M. Hitt, Z. Xing. 2005. Mechanisms of mucosal and parenteral tuberculosis vaccinations: adenoviral-based mucosal immunization preferentially elicits sustained accumulation of immune protective CD4 and CD8 T cells within the airway lumen. *J. Immunol.* 174: 7986-7994.
12. Rosenthal SR, McEnery JT, Raisys N. Aerogenic BCG Vaccination Against Tuberculosis in Animal and Human Subjects. *The Journal of Asthma Research*. 1968; 5: 3030-322.
13. Barclay WR, Busey WM, Dalgard DW, Good RC, Janicki BW, Kasik JE, Ribic E, Ulrich CE, Wolinsky E. Protection of Monkeys against Airborne Tuberculosis by Aerosol Vaccination and Bacillus Calmette- Guerin. *American Review of Respiratory Disease*. 1973; 107:351-358.
14. Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, Mc-Carthy AR, Heslop J, De Lisle GW, Standford, JL, Aldwell FE. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by

vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. Research in Veterinary Science. 1995; 59: 10-16.

15. Lagraderie M, Balazuc AM, Deriaud E, Leclerc CD, Gheorghiu M. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. Infection Immunity. 1996; 64 (1): 1-9.

16. Lefford MJ. Immunization of Mice after Airborne Infection with Various Strains of BCG. American Review of Respiratory Disease. 1978; 117: 103-109

17. Falero-Diaz G, Challacombe S, Banerjee D, Douce G, Boyd A, Ivanyi J. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Vaccine. 2000; 18 (28): 3223- 3229.

18. Nuermberger EL, Yoshimatsu T, Tyagi S, Bishai WR, Grosset JH. Paucibacillary Tuberculosis in Mice after Prior Aerosol Immunization with *Mycobacterium bovis* BCG. Infection and Immunity. 2004; 72 (2): 1065-1071.

19. Giri PK, Verma I, Khuller GK. Protective efficacy of intranasal vaccination with *Mycobacterium bovis* BDG against airway *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. 2006 Journal of Infection. 53:350-356.

20. Orme, IM and Collins FM. Aerogenic vaccination of mice with *Mycobacterium bovis* BCG. Tubercle 1986; 67:133-140

21. Middlebrook G. Immunological Aspects of Airborne Infection: Reactions to Inhaled Antigens. National Jewish Hospital Denver. Bact Review. 1961; 25: 331-346.

22. Goonetilleke NP, McShane H Hannan CM, Anderson RJ, Brookes RH Hill AVS. Enhanced Immunogenicity and Protective Efficacy Against *Mycobacterium tuberculosis* of Baccille Calmette-Guerin Vaccine Using Mucosal Administration and Boosting with a Recombinant modified vaccinia virus Ankara. Journal of Immunology 2003;171(3):1602-1609

23. Santosuosso M, McCormick S, Zhang X, Zganiacz A, Xing Z. Intranasal boosting with an adenovirus-vectored vaccine

markedly enhances protection by parenteral *Mycobacterium bovis* BCG immunization against pulmonary tuberculosis. *Infection and Immunity* 2006;74(8):4634-4643

24. Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG, Andersen P. Mucosal Administration of Ag85B-ESAT-6 Protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior *Bacillus Calmette-Guerin* Immunity. *The Journal of Immunology* 2006;177:6353-6360

25. Xing Z, Lichty BD. Use of recombinant virus-vectored tuberculosis vaccines for there respiratory mucosal immunization. *Tuberculosis* 2006;86:211-217

26. Gartner T, Baeten M, Otieno S, Revets H, Baetselier PD, Huygen K. Mucosal prime-boost vaccination for tuberculosis based on TLR triggering OprI lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa* fused to mycolyl-transferase Ag85A. *Immunology Letters* 2007;111:26-35.

27. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD *J Exp Med*. 2008 Jan 21;205(1):105-15. Epub 2007 Dec 24

28. Gagliardi MC, Lemassu A, Teloni R, Mariotti S, Sargentini V, Pardini M, Daffé M, Nisini R. Cell wall associated alpha-glucan is instrumental for *Mycobacterium tuberculosis* to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte. *Cell Microbiol*. 2007 Aug;9(8):2081-92. Epub 2007 Apr 17.

29. Pai RK, Convery M, Hamilton TA, Boom WH, Harding CV. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J Immunol*. 2003 Jul 1;171(1):175-84.

30. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al. Apoptosis facilitates antigen

presentation to T lymphocytes through MHC-1 and CD1 in tuberculosis. *Nature Medicine* 2003;9(8):1039-1046

31. Kaufman SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *Journal of Experimental Medicine* 2005;201(11):1693-1697

32. Koch R. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch, Berlin Germany, 1882> *Review of Infectious Diseases* (1982) 4(6):1270-1274

33. Rook GA, Stanford JL: The Koch phenomenon and the immunopathology of tuberculosis. *Current Topics of Microbiology and Immunology* (1996) 215: 239-262

34. Roy S, Sharma S, Sharma M, Aggarwal R, Bose M. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*. 2004; 112: 471-480.

35. Pereira RMS, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MCV, Sarno EN, Sampaio EP, Lopez UG. *Mycobacterium leprae* induces NF- κ B-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 335: 20-26.

36. Barrera SDL, Aleman M, Musella R, Schierloh P, Pasquinelli V, Garcia V, Abbate E, Sasian MDC. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on *Mycobacterium tuberculosis* pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clinical Exp Immunology*. 2004;138: 128-138.

37. Nirshihara H, Lawrence CA, Taplin GV, Carpenter CM. Immunogenicity of gamma-irradiated *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GIV) in mice. *The American Review of Respiratory Disease*. 1963; 88: 827-832.

38. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, third edition, John Wiley & Sons, New York, (1981) volume 15, pages 470-493
39. Controlled Release Technologies: Methods, Theories, and Applications, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1980
40. Polymeric Delivery Systems, Properties and Applications, ACS Symposium Series 520, American Chemical Society, Washington, D.C., 1993
41. Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. Vaccine 2005 ;23(15): 1804-1813
42. Childers NK, Miller KL, Tong G, Llarena JC, Greenway T, Ulrich JT et al. Adjuvant activity of monophosphoryl lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen. Infection and Immunity 2000;68:5509-5516
43. M. Haile, B. Hamasur, T. Jaxmar, D. Gavier-Widen, M.A. Chambers and B. Sanchez et al., Nasal boost with adjuvanted heat-killed BCG or arabinomannan-protein conjugate improves primary BCG-induced protection in C57BL/6 mice, Tuberculosis (Edinburgh) 85 (2005), pp. 107-114.
44. M. Haile, U. Schroder, B. Hamasur, A. Pawlowski, T. Jaxmar and G. Kallenius et al., Immunization with heat-killed Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin (BCG) in Eurocine L3 adjuvant protects against tuberculosis, Vaccine 22 (2004), pp. 1498-1508
45. B. Hamasur, M. Haile, A. Pawlowski, U. Schroder, A. Williams and G. Hatch et al., Mycobacterium tuberculosis arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis, Vaccine 21 (2003), pp. 4081-4093
46. Basic & Clinical Immunology, Stites et al. (ed.), fifth edition, Lange Medical Publications, Los Altos, Calif., 1984, pages 282-285
47. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug

formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. British Journal of Clinical Pharmacology. 2003; 56; 600-612.

Lisboa, 25 de Fevereiro de 2015.

Reivindicações

1. Composição farmacêutica compreendendo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) completa, inativada, em que a dita composição é formulada para administração por via intranasal, da mucosa, ou intrapulmonar a um sujeito mamífero e em que a dita composição compreende uma dose imunologicamente protectora, quando administrada ao dito hospedeiro e em que a dita *M. tb* encontra-se inativada por irradiação.
2. Composição compreendendo *M. tb* completa inativada para ser utilizada na vacinação de um mamífero contra a tuberculose (TB), em que a dita vacinação do dito animal é intranasal, ou intrapulmonar, e em que a dita composição compreende uma dose imunologicamente protectora quando administrada ao dito hospedeiro e em a dita *M. tb* é inativada por irradiação.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou a composição de acordo com a reivindicação 2, em que 100% das ditas *M. tb* encontram-se inativadas.
4. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou a composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 2, em que a dita radiação é a radiação gama.
5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou a composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 2, compreendendo ainda lisados celulares de *Mycobacterium*.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda um adjuvante para aumentar a resposta imunitária no dito hospedeiro.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou a composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 2, compreendendo ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

8. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a dita composição encontra-se liofilizada.

9. Acondicionamento na forma de aerossol, ou de pulverizador compreendendo a composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1.

10. Composição de acordo com a reivindicação 7, ou a composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 7, em que a dita composição é para uma utilização profiláctica, ou terapêutica no dito mamífero.

11. Processo de preparação de uma composição farmacêutica compreendendo a formulação de uma dose imunologicamente protectora de uma *M. tb* completa inactivada para administração intranasal, ou pulmonar a um hospedeiro mamífero e em que as ditas *M. tb* estão inactivadas por irradiação.

12. Composição para ser utilizada de acordo com a reivindicação 2, compreendendo ainda um adjuvante para aumentar uma resposta imunitária no dito hospedeiro sem provocar uma inflamação debilitante.

13. Composição para uso de acordo com a reivindicação 12, para utilização simultânea ou sequencial com Bacille Calmette-Guerin (BCG).

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3-8 ou 10, ou a composição para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-5, 7, 10, 12 ou 13, acondicionamento na forma de pulverizador de aerossóis de acordo com a reivindicação 9, ou o processo de acordo com a reivindicação 11, em que a dose de *M. tb* vai de 0,1 a 50 microgramas.

15. Composição de acordo com as reivindicações 10 ou 14 ou a composição para o uso de acordo com as reivindicações 10, 12 ou 13, acondicionamento em pulverizador de aerossóis de acordo com a reivindicação 9 ou 14, ou processo de acordo com a reivindicação 11, ou 14, em que a composição é disponibilizada liofilizada.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3-8, 10, 14 ou 15 ou a composição para ser utilizada de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-5, 7, 10, 12, 13, 14 ou 15, acondicionamento em pulverizador de aerossóis de acordo com qualquer uma das reivindicações 9, 14 ou 15 ou o processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 11, 14 ou 15, em que o mamífero é um ser humano.

Lisboa, 25 de Fevereiro de 2015.

Resumo

"Vacina para a tuberculose e processo para o seu uso"

É disponibilizada uma composição farmacêutica que inclui uma ou várias *Mycobacterium* spp., que são preferencialmente inactivadas utilizando a radiação gama, e que é então formulada para administração por via da mucosa, ou pulmonar a um sujeito. As composições farmacêuticas são úteis para evitar, ou tratar infecções associadas com a *mycobacterium* num sujeito, incluindo um sujeito humano.