



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 307 402**

⑫ Número de solicitud: 200602754

⑬ Int. Cl.:
A61K 39/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **30.10.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2008**

Fecha de la concesión: **16.09.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **30.09.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
30.09.2009

⑲ Titular/es: **ARCHIVEL FARMA, S.L.**
Ctra. de Mata, 97 (Edif. Matamar)
Polígono Industrial Mata-Rocafonda
08304 Mataró, Barcelona, ES

⑳ Inventor/es: **Cardona Iglesias, Pere Joan y**
Amat Riera, Isabel

㉑ Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

㉒ Título: **Vacuna profiláctica contra la tuberculosis.**

㉓ Resumen:

Vacuna profiláctica contra la tuberculosis.
La presente invención se refiere al uso de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis. El agente inmunoterápico es capaz de inducir una respuesta de tipo Th1 generadora de interferón contra antígenos específicos de *M. tuberculosis* y reducir el número de bacilos viables en los pulmones de los individuos infectados.

ES 2 307 402 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Vacuna profiláctica contra la tuberculosis.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de un agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis.

10 **Estado de la técnica anterior**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica ocasionada por los bacilos *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C), que incluyen actualmente a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*.

15 Según la Organización Mundial de la Salud, en el mundo se registran anualmente 8.000.000 de nuevos casos de personas que manifiestan la enfermedad y mueren unos 3.000.000 de personas. Se considera que en el mundo existen más de 2.000.000.000 de personas infectadas y que cada año se generan otros 90-100 millones de infectados nuevos.

20 La vacuna actual que se emplea en el tratamiento preventivo contra la tuberculosis está basada en bacterias de la cepa denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guerin), una variante atenuada de *M. bovis*.

En el estado de la técnica se describen diversas vacunas contra la tuberculosis basadas en fragmentos de la pared celular de cepas virulentas o avirulentas de *Mycobacterium*. Se describe también que el adyuvante que entra en la composición de la vacuna ejerce una gran influencia sobre la efectividad de la misma.

En E. Ribi *et al*, Nature 1963, 198, páginas 1214 a 1215 se describen los ensayos de inmunización efectuados con una composición que comprende fragmentos de pared celular de la cepa avirulenta BCG y aceite mineral. Dichos fragmentos se obtienen por homogeneización de un cultivo de la mencionada cepa en aceite mineral. La composición resulta ser más efectiva que la vacuna convencional (BCG). No obstante, en el mismo artículo se describe que los fragmentos de pared celular no inducen ninguna respuesta inmunológica cuando se obtienen por homogeneización en agua y en ausencia del aceite mineral.

En D.P. Pal *et al*, Indian J. Med. Res. 1977, 65, páginas 340 a 345 se describe una vacuna preparada con fragmentos de pared celular de la cepa virulenta H₃₇Rv y aceite mineral. En este caso los fragmentos de pared celular se obtienen mediante homogeneización de las células muertas en fase acuosa, y el aceite mineral se añade posteriormente a la composición. También se describe que los fragmentos de pared celular homogeneizados en fase acuosa no son inmunogénicos, y que es necesaria la presencia del aceite mineral para que la vacuna sea eficaz.

40 En G.K. Khuller *et al*, Folia Microbiol., 1992, 37, páginas 407 a 412, se describe la eficacia protectora de diferentes fracciones de la pared celular de la cepa avirulenta H₃₇Ra de *M. tuberculosis* formuladas con el adyuvante incompleto de Freund, que también incluye aceite mineral.

En E.M. Agger *et al*, Scand. J. Immunol., 2002, 56, páginas 443 a 447 se describen vacunas que comprenden fragmentos de la pared celular de la cepa virulenta H₃₇Rv, y que son eficaces cuando incluyen el tensioactivo catiónico bromuro de dimetildioctadecilamonio como adyuvante. Se describe también que los ensayos realizados con bacilos de *M. tuberculosis* homogeneizados y que no contienen el adyuvante mencionado, no generan niveles de resistencia frente a la tuberculosis en el modelo murino.

50 En I.M. Orme Vaccine, 2006, 24, páginas 2 a 19, que es un artículo de revisión reciente sobre nuevas vacunas contra la tuberculosis, se describe que la vacuna convencional BCG es esencialmente ineficaz para proteger a personas adultas frente a la tuberculosis. En el mismo artículo se indica que están en fase de ensayo varios candidatos de distintos tipos de vacuna (vacunas por subunidades con proteínas, vacunas con ADN, vacunas combinadas con virus, vacunas con cepas recombinantes), y que se está a la espera de nuevos desarrollos.

55 Existe pues la necesidad de disponer de una vacuna profiláctica para prevenir las infecciones causadas por *M. tuberculosis*, que sea más efectiva que la vacuna actual basada en la cepa atenuada BCG.

60 **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es el uso de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de las infecciones causadas por *M. tuberculosis*.

65 **Descripción detallada de la invención**

En la solicitud de patente ES2231037-A1 se describe un procedimiento para la preparación de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex

(MTB-C). También se describen composiciones que lo contienen, y su aplicación terapéutica para el tratamiento combinado de la tuberculosis en asociación con otros fármacos.

Los autores de la presente invención han descubierto el uso de dicho agente inmunoterápico para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis.

El objeto de la presente invención es pues el uso de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C) para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis, en donde dicho agente es obtenible por un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- cultivar la cepa virulenta MTB-C durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas y, posteriormente,
- homogeneizar el cultivo de células en presencia de un tensioactivo no iónico.

La cepa virulenta puede ser cualquier cepa virulenta de MTB-C. Una de las cepas mas utilizadas por los investigadores en este campo es la denominada H₃₇Rv que, por ejemplo, puede ser libremente adquirida en la National Collection of Type Cultures (NCTC), Londres, Gran Bretaña (número de depósito N0007416).

La cepa virulenta se puede cultivar por inoculación en medios de cultivo bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo el agar Middlebrook tipo 7H10 o tipo 7H11, el medio de cultivo Sauton o el medio de cultivo Proskauer-Beck.

El cultivo de la cepa virulenta se efectúa durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas, preferiblemente comprendido entre 3 y 4 semanas. La temperatura del cultivo se mantiene, preferiblemente, entre 34°C y 38°C.

Una vez finalizado el cultivo, se procede al aislamiento de las células empleando técnicas como las descritas, por ejemplo, en la solicitud de patente ES2231037-A1.

La homogeneización de las células vivas se lleva a cabo en presencia de un tensioactivo no iónico, y preferiblemente en un medio tamponado a un pH neutro, por ejemplo a un pH comprendido entre 6 y 8, como el proporcionado por el tampón PBS (solución salina de tampón fosfato).

La homogeneización puede llevarse a cabo mediante sonicación por ultrasonidos, o mediante la utilización de pequeñas bolas de aproximadamente 1 mm de diámetro, por ejemplo, de sílice o de sílice-zirconio, conjuntamente con un homogeneizador mecánico. Un homogeneizador mecánico que se puede utilizar, por ejemplo, es el modelo Beadbeater® de la compañía Biospec.

Mediante este proceso de homogeneización se rompen las células de MTB-C y se obtienen fragmentos pequeños de pared celular.

Preferiblemente el tipo de tensioactivo no iónico utilizado en el proceso de homogeneización se selecciona entre el grupo formado por los alquilfenoles etoxilados, los ésteres de sorbitán etoxilados, y mezclas de los mismos.

De manera más preferible el tensioactivo no iónico se selecciona entre el grupo de los octilfenoles etoxilados. Más preferiblemente se emplean octilfenoles etoxilados con un contenido de óxido de etileno comprendido entre 7 y 8 moles, que se pueden encontrar en el mercado bajo el nombre de Triton X-114®.

El contenido en tensioactivo no iónico en la etapa de homogeneización está comprendido preferiblemente entre el 1% y el 10% en peso con respecto del peso total del homogeneizado. Más preferiblemente entre el 3% y el 6% en peso.

La masa homogeneizada, que contiene los fragmentos de pared celular, se somete a un tratamiento convencional para separar y rechazar las células no fragmentadas y los componentes solubilizados. Por ejemplo se puede emplear la centrifugación a diferentes velocidades y los lavados con solución tampón como se describe en la solicitud de patente ES2231027-A1. Después de efectuar los procedimientos de purificación mencionados se obtiene un sedimento, que contiene los fragmentos de pared celular. Dicho sedimento se dispersa en tampón PBS y se somete a un tratamiento convencional para asegurar la inactivación total de las células de MTB-C que hubieran podido permanecer viables tras el proceso de fragmentación y de purificación. El mencionado tratamiento puede ser un proceso químico, por ejemplo mediante tratamiento con formol, o físico, por ejemplo mediante tratamiento en autoclave o pasteurización.

La dispersión de fragmentos de pared celular en tampón PBS obtenida tras el tratamiento de inactivación se puede liofilizar para facilitar su conservación. Para ello se puede distribuir la dispersión en viales y liofilizar a una temperatura comprendida entre -15°C y -25°C y con un vacío comprendido entre 0,1 y 0,5 mbar.

ES 2 307 402 B1

Los viales obtenidos tras el proceso de liofilización contienen el agente inmunoterápico que comprende los fragmentos de pared celular de MTB-C, y se conservan generalmente a temperaturas muy bajas, por ejemplo a -70°C.

5 Como ya se ha indicado, el objeto de la invención es el uso del agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis, es decir, para la preparación de una vacuna profiláctica contra la tuberculosis.

10 El medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis comprende el agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular y, opcionalmente, diluyentes, adyuvantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. El medicamento puede estar en forma de solución salina de tampón fosfato, solución acuosa, emulsión, o en forma de liposomas.

Preferiblemente el medicamento está en forma de liposomas.

15 La formación de liposomas puede efectuarse empleando técnicas y lípidos auxiliares convencionales, bien conocidas por el experto, como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.

En general, los liposomas incluyen fosfolípidos, con carga neta neutra y/o negativa, y esteroides.

20 Los fosfolípidos empleados pueden ser, por ejemplo: la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol.

Habitualmente, el componente mayoritario de los liposomas es la fosfatidilcolina, que puede ser sintetizada o aislada de fuentes naturales. Un producto comercial frecuentemente usado es la lecitina de soja, que es una mezcla compleja de fosfolípidos entre los cuales se encuentra la fosfatidilcolina.

25 Los esteroides que se emplean en la preparación de liposomas pueden ser, entre otros, el colesterol y las sales biliares.

Preferiblemente, los liposomas se forman empleando una mezcla de lecitina de soja y colato sódico.

30 Opcionalmente los liposomas pueden contener aditivos que mejoren su estabilidad, por ejemplo: la vitamina E, que actúa de antioxidante de los lípidos.

35 Los liposomas obtenidos presentan habitualmente una distribución de tamaño en la que el 99,9% son más pequeños que 1 micra.

Los liposomas se pueden someter a liofilización para obtener de este modo el agente inmunoterápico en forma de liposomas liofilizados.

40 La administración del medicamento puede realizarse en forma de una dosis única o de varias dosis, mediante la repetición a intervalos de tiempo determinados. Preferiblemente se administran dos dosis separadas por un período de tiempo comprendido entre 2 y 5 semanas, preferiblemente entre 3 y 4 semanas.

45 El medicamento se puede administrar a una mucosa, por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, intestinal, vaginal, o el tracto urinario, o, por vía parenteral, por ejemplo, subcutánea, intradermal, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal. Resulta preferida la administración por vía parenteral.

50 La dosis apropiada depende de varios parámetros, entre ellos la vía de administración y el sujeto a ser tratado, pero de forma preferible la dosis se encuentra comprendida entre 1 µg y 1000 µg, más preferiblemente entre 25 y 700, y aún más preferiblemente entre 50 µg y 200 µg.

55 El medicamento que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C se puede administrar en combinación con otras vacunas profilácticas contra la tuberculosis, como las mencionadas en S.H.E. Kaufmann, Nature Rev. Immunol. 2006, 6, 699-704, como por ejemplo la vacuna BCG, las vacunas por subunidades o las vacunas BCG recombinantes.

La combinación de las vacunas puede ser simultánea o bien se puede llevar a cabo en dos inoculaciones separadas en el tiempo. El período entre las inoculaciones incluso puede llegar a ser de varios años.

60 En el caso de inoculaciones separadas en el tiempo, en primer lugar se administra preferiblemente una vacuna profiláctica contra la tuberculosis, y posteriormente el medicamento que comprende los fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C, que actúa como agente reestimulador (*boost*) de la vacuna inoculada inicialmente.

65 Sorprendentemente, se ha encontrado que la administración del medicamento que comprende el agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C es capaz de inducir una respuesta de tipo Th1 generadora de interferón-γ y contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Entre dichos antígenos se encuentran el Ag85B y Ag85A, que forman parte del complejo Ag85, que consiste en una familia de proteínas de bajo

peso molecular, que juegan un papel decisivo en la biosíntesis de la pared celular, y que son producidas en cantidades considerables cuando el cultivo bacteriano se encuentra en la fase logarítmica.

Se ha observado que la vacuna convencional BCG no genera respuesta inmunoprotectora frente a los antígenos del complejo Ag85, lo que podría representar una capacidad de protección inferior.

También se ha comprobado que el número de bacilos viables presentes en los pulmones de los ratones vacunados con dicho agente inmunoterápico infectados posteriormente con la cepa virulenta H₃₇Rv, es inferior al número de bacilos viables presentes en el grupo de ratones control, y dicho número es comparable al de los ratones vacunados con la vacuna convencional BCG.

Los ejemplos que siguen a continuación se expone a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación detallada de realizaciones concretas dentro de la invención.

Ejemplo 1

Efectividad del agente inmunoterápico como vacuna profiláctica contra la infección por M. tuberculosis

El agente inmunoterápico empleado en este Ejemplo fue preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1.

La efectividad del agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C57BL/6, libres de patógenos específicos.

Los ratones se dividieron en tres grupos de 12 animales cada uno de ellos, y se sometieron al siguiente protocolo de vacunación:

1) Sin vacunación (grupo Control),

2) Inoculados por vía subcutánea con dos dosis de 285 pg del agente inmunoterápico obtenido en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1 a las semanas 3 y 6 del experimento.

3) Inoculados por vía subcutánea con una dosis de 2×10^6 Unidades Formadoras de Colonias de la cepa BCG Danish (Statens Serum Institute, Dinamarca) la semana 0 del experimento.

Para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur), que se cultivó en medio Proskauer-Beck hasta una fase media logarítmica, y se conservó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -70°C hasta su utilización.

Los ratones se infectaron por aerosol con dicha cepa virulenta a la novena semana del experimento mediante su ubicación en un aparato Middelbrook de infección por aerosol que proporcionó un inóculo aproximado de 10-50 bacilos viables en los pulmones de los ratones.

El número de bacilos viables en los pulmones se determinó a las 3 semanas después de la infección por aerosol de los animales (semana 12 del experimento) incubando diluciones seriadas de homogeneizados de pulmón en agar Middelbrook 7H11 durante 4 semanas a 37°C. La homogeneización del pulmón se llevó a cabo en presencia de 1 ml de agua bidestilada.

Los resultados de la Tabla I expresan el logaritmo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml que se han identificado en el pulmón:

TABLA I

Grupo de ratones	Vacuna	Log ₁₀ UFC/ml
1	Ninguna (Grupo Control)	6,42±0,24
2	Agente inmunoterápico liposomado	5,72±0,30
3	BCG	5,71±0,58

Las diferencias entre el resultado del grupo de ratones que no ha sido vacunado y los resultados de los grupos vacunados son estadísticamente significativas.

ES 2 307 402 B1

Se puede observar que en el pulmón del grupo de ratones vacunado con el agente inmunoterápico liposomado se detecta un menor número de bacilos viables que en el pulmón de los ratones no vacunados, y un número substancialmente idéntico al de los ratones vacunados con la vacuna convencional BCG.

- 5 Por tanto, la vacunación con el agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C consigue proteger frente a las infecciones causadas por *M. tuberculosis*.

Ejemplo 2

- 10 Efectividad del agente inmunoterápico como generador de una respuesta Th1 específica contra la infección por *M. tuberculosis*

El agente inmunoterápico empleado en este Ejemplo fue preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1.

15

La efectividad del agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C se ensayó en ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad del tipo C57BL/6, libres de patógenos específicos, en un experimento *ex vivo*.

- 20 Los ratones se dividieron en cuatro grupos de 4 animales cada uno de ellos, y se sometieron al siguiente programa de inoculaciones:

- 1) Inoculados por vía subcutánea con suero fisiológico a las semanas 3 y 6 del experimento (grupo Control),
- 25 2) Inoculados por vía subcutánea con dos dosis de 285 μg del agente inmunoterápico obtenido en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1 a las semanas 3 y 6 del experimento.
- 3) Inoculados por vía subcutánea con una dosis de 2×10^6 Unidades Formadoras de Colonias de la cepa BCG Danish (Statens Serum Institute, Dinamarca) la semana 0 del experimento, y con suero fisiológico las
- 30 semanas 3 y 6 del experimento.
- 4) Inoculados por vía subcutánea con 2×10^6 Unidades Formadoras de Colonias de la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur) la semana 3 del experimento, y con suero fisiológico la semana 6 del experimento.

35

- Los ratones fueron sacrificados la semana 7, y se extrajeron los bazo, que se sumergieron en tubos que contenían 5 ml de L-glutamina-RPMI (Gibco). Los tubos se mantuvieron en hielo hasta el final del experimento. Los bazo fueron disgregados mecánicamente y la suspensión se filtró a través de una malla de nylon de 70 μm de diámetro. A
- 40 continuación se centrifugó durante 10 minutos a 300 g. Los pellets fueron reconstituidos con 15 ml de una solución formada por Tris y cloruro amónico en agua bidestilada para proceder a la tisis de las células. Después de 8 minutos se procedió al lavado con 20 ml de L-glutamina-RPMI y al centrifugado durante 10 minutos a 300 g.

- Los pellets obtenidos se resuspendieron con 5 ml de L-glutamina-RPMI, y se filtró la suspensión a través de una
- 45 malla de nylon de 70 μm de diámetro. Las células fueron contabilizadas con la cámara de Neubauer.

- Las células del bazo de los ratones se sembraron en placas a razón de 1×10^5 células/pocillo, y fueron cultivadas con 200 μl del medio de cultivo completo (MCC) formado por L-glutamina-RPMI complementado con suero fetal vacuno inactivado, penicilina, estreptomycin, piruvato sódico, y 2-mercaptoetanol, o bien con 200 μl del medio de
- 50 cultivo completo (MCC) complementado con antígenos de *M. tuberculosis*: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antígeno PPD (Statens Serum Institut, Dinamarca) y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ESAT-6, Ag85A y Ag85B (Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH, República Federal de Alemania).

- Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Después de 96 horas, las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 300 g, y se recogió el sobrenadante de cada una de ellas.
- 55

- Los sobrenadantes se congelaron y después de permanecer en dicho estado un mínimo de 24 horas se analizó el contenido en interferón- γ aplicando la técnica ELISA de doble *sandwich* y empleando un anticuerpo monoclonal específico para interferón- γ murino (Diacclone).
- 60

65

ES 2 307 402 B1

En la Tabla II se presenta el promedio de la concentración de interferón- γ expresada como $\log_{10}$ pg/ml que se indujo en cada uno de los grupos de ratones frente a los antígenos de *M. tuberculosis*:

TABLA II

Grupo	Inóculo	Antígenos				
		Control	PPD	ESAT-6	Ag85B	Ag85A
1	Control	0	0	0	0	0
2	Agente inmunoterápico liposomado	0	2,57	0	2,69 ⁽¹⁾	2,53 ⁽¹⁾
3	BCG	0	2,01 ⁽³⁾	0	0	0
4	H ₃₇ Rv	0	3,06 ⁽³⁾	2,86 ⁽²⁾⁽³⁾	2,76 ⁽³⁾	2,50 ⁽³⁾

(1) Diferencias entre el Grupo 2 y el Grupo 3 estadísticamente significativas

(2) Diferencias entre el Grupo 2 y el Grupo 4 estadísticamente significativas

(3) Diferencias entre el Grupo 3 y el Grupo 4 estadísticamente significativas

Los resultados de la Tabla II muestran que las dos inoculaciones efectuadas con el agente inmunoterápico liposomado basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *M. tuberculosis* son capaces de inducir la producción de interferón- γ contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Esto significa que inducen una respuesta protectora del tipo Th1.

En particular, la respuesta inducida por el grupo de ratones inoculado con el agente inmunoterápico liposomado frente a los antígenos PPD, Ag85B y Ag85A no presenta diferencias significativas con la respuesta del grupo de ratones inoculado con la cepa virulenta H₃₇Rv de *M. tuberculosis*. Dicha respuesta es mejor que la respuesta del grupo de ratones inoculado con la cepa BCG, que constituye la vacuna convencional, ya que la misma solamente induce una respuesta frente a PPD, y no frente a Ag85B y Ag85A.

Solamente el grupo de ratones inoculado con la cepa virulenta fue capaz de inducir una respuesta frente al antígeno ESAT-6.

Por tanto, el agente inmunoterápico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *M. tuberculosis* es capaz de inducir una respuesta protectora del tipo Th1 contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*, lo que es un indicador de que se puede emplear eficazmente para prevenir las infecciones causadas por *M. tuberculosis*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C) para la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis, en donde dicho agente es obtenible por un procedimiento que comprende las siguientes etapas:
 - cultivar la cepa virulenta MTB-C durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas y, posteriormente,
 - 10 - homogeneizar el cultivo de células en presencia de un tensioactivo no iónico.
2. El uso según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el período de tiempo de cultivo está comprendido entre 3 y 4 semanas.
- 15 3. El uso según las reivindicaciones 1 ó 2 **caracterizado** porque el tensioactivo no iónico se selecciona entre el grupo formado por los alquilfenoles etoxilados, los ésteres de sorbitán etoxilados, y mezclas de los mismos.
4. El uso según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el tensioactivo no iónico se selecciona entre el grupo de los octilfenoles etoxilados.
- 20 5. El uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el tensioactivo no iónico se selecciona entre los octilfenoles etoxilados con un contenido de óxido de etileno comprendido entre 7 y 8 moles.
- 25 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** porque la homogeneización se efectúa en un medio tamponado a pH neutro.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** porque el procedimiento comprende además las siguientes etapas:
 - 30 - separar mediante centrifugación las células no fragmentadas y los componentes solubilizados,
 - someter a tratamiento químico o físico la fracción de fragmentos de pared celular para inactivar las eventuales células de cepa virulenta que eventualmente contenga, y
 - 35 - desecar el agente inmunoterápico obtenido mediante liofilización.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 **caracterizado** porque el medicamento está en forma de liposomas.
- 40 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 **caracterizado** porque el medicamento se administra en forma de dosis única o de varias dosis.
10. El uso según la reivindicación 9 **caracterizado** porque el medicamento se administra en dos dosis.
- 45 11. El uso según la reivindicación 10 **caracterizado** porque las dosis se administran separadas por un período de tiempo comprendido entre 2 y 5 semanas.
12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado** porque el medicamento se administra en combinación con otras vacunas profilácticas contra la tuberculosis.
- 50 13. El uso según la reivindicación 12 **caracterizado** porque la combinación de las vacunas se lleva a cabo en dos inoculaciones separadas en el tiempo.
- 55 14. El uso según la reivindicación 13 **caracterizado** porque en primer lugar se administra una vacuna profiláctica contra la tuberculosis, y posteriormente el medicamento que comprende los fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 307 402

⑫ Nº de solicitud: 200602754

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 30.10.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A61K 39/04** (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2231037 A1 (ARCHIVEL TECHNOLOGIES, SL) 01.05.2005, todo el documento.	1-14
A	WO 03063897 A1 (MODI, R.) 07.08.2003, todo el documento.	1-14
A	RU 2153354 C1 (IMMUNOL. INST. RES. CENTRE et al.) 27.07.2000, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 22.01.2008]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200102, N° DE ACCESO 2001-014156.	1-14
A	WO 0021983 A1 (STATENS SERUM INSTITUT) 20.04.2000, todo el documento.	1-14
A	US 20020127700 A1 (ZHANG, Y.) 12.09.2002, todo el documento.	1-14
A	SINHA, S. et al.: "Proteome Analysis of the Plasma Membrane of Mycobacterium tuberculosis", Comparative and Functional Genomics (2002), vol. 3, pp.: 470-483; todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.10.2008

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1