

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.10.17	(73) Titular(es): ARCHIVEL FARMA, SL C/ FOGARS DETORDERA, 61 POLIGON INDUSTRIAL BONAVISTA 08916 BADALONA ES
(30) Prioridade(s): 2006.10.30 ES 200602754	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.08.19	
(45) Data e BPI da concessão: 2012.08.08 219/2012	(72) Inventor(es): PERE JOAN CARDONA IGLESIAS ES ISABEL AMAT RIERA ES
	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VACINA PROFILÁTICA CONTRA A TUBERCULOSE**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO RELACIONA-SE COM O USO DE UM AGENTE IMUNOTERAPÊUTICO CONTENDO FRAGMENTOS DA PAREDE CELULAR DE UMA ESTIRPE VIRULENTE DO COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (C-MBT) PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO PROFILÁTICO DA TUBERCULOSE, NA QUAL O DITO AGENTE PODE SER OBTIDO USANDO UM MÉTODO COMPREENDENDO OS SEGUINTE PASSOS: CULTURA DA ESTIRPE DE C-MBT VIRULENTE AO LONGO DE UM PERÍODO IGUAL A OU SUPERIOR A TRÊS SEMANAS; E, SUBSEQUENTEMENTE, HOMOGENEIZAÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS NA PRESENÇA DE UM SURFATANTE NÃO IÓNICO.

RESUMO

"VACINA PROFILÁTICA CONTRA A TUBERCULOSE"

A invenção relaciona-se com o uso de um agente imunoterapêutico contendo fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (C-MBT) para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático da tuberculose, na qual o dito agente pode ser obtido usando um método compreendendo os seguintes passos: cultura da estirpe de C-MBT virulenta ao longo de um período igual a ou superior a três semanas; e, subsequentemente, homogeneização da cultura de células na presença de um surfatante não iônico.

DESCRIÇÃO

"VACINA PROFILÁTICA CONTRA A TUBERCULOSE"

Área da Técnica

A presente invenção relaciona-se com o uso de um agente imunoterapêutico baseado em fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático da tuberculose.

Estado Anterior da Técnica

A tuberculose é uma doença infecciosa crónica causada pelos bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (C-MBT), os quais correntemente incluem as espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum*.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 8.000.000 novos casos de pessoas manifestando a doença são registados em todo o mundo todos os anos e cerca de 3.000.000 pessoas morrem. Considera-se que existem mais do que 2.000.000.000 pessoas infetadas em todo o mundo e que 90-100 milhões mais novas infeções são geradas em cada ano.

A vacina corrente que é usada no tratamento preventivo contra a tuberculose é baseada em bactérias da estirpe chamada BCG (Bacilo Calmette-Guerin), uma variante atenuada de *M. bovis*.

Várias vacinas contra a tuberculose baseadas nos fragmentos da parede celular de estirpes virulentas e avirulentas de *Mycobacterium* são descritas no estado da técnica. É também

descrito que o adjuvante usado na composição da vacina influencia grandemente a sua eficácia.

E. Ribi et al., Nature 1963, 198, páginas 1214 a 1215, descrevem os ensaios de imunização realizados com uma composição compreendendo fragmentos da parede celular de uma estirpe de BCG avirulenta e óleo mineral. Os referidos fragmentos são obtidos pela homogeneização de uma cultura da estirpe mencionada em óleo mineral. A composição é mais eficaz do que a vacina convencional (BCG). Não obstante, é descrito no mesmo artigo que os fragmentos da parede celular não induzem qualquer resposta imunológica quando eles são obtidos pela homogeneização em água e na ausência de óleo mineral.

D.P. Pal et al., Indian J. Med. Res. 1977, 65, páginas 340 a 345, descrevem uma vacina preparada com fragmentos da parede celular da estirpe H₃₇Rv virulenta e óleo mineral. Neste caso, os fragmentos da parede celular são obtidos por meio da homogeneização das células mortas em fase aquosa, e o óleo mineral é subsequentemente adicionado à composição. É também descrito que os fragmentos da parede celular homogeneizados em fase aquosa são não imunogênicos e que a presença do óleo mineral é necessária para que a vacina seja eficaz.

G.K. Khuller et al., Folia Microbiol., 1992, 37, páginas 407 a 412, descrevem a eficácia protetora de diferentes frações da parede celular da estirpe H₃₇Ra avirulenta de *M. tuberculosis* formulada com o adjuvante incompleto de Freund, o qual também inclui óleo mineral.

*E.M. Agger et al., Scand. J. Immunol., 2002, 56, páginas 443 a 447, descrevem vacinas compreendendo fragmentos da parede celular da estirpe H₃₇RV virulenta, as quais são eficazes quando elas incluem o surfatante catiónico brometo de dimetildiocetadecilamônio como um adjuvante. É também descrito que os ensaios conduzidos com bacilos de *M. tuberculosis* que não contenham o adjuvante mencionado não geram níveis de resistência contra a tuberculose no modelo murino.*

I.M. Orme Vaccine, 2006, 24, páginas 2 a 19, o qual é um artigo de revisão recente sobre novas vacinas contra a tuberculose, descreve que a vacina de BCG convencional é essencialmente ineficaz na proteção de pessoas adultas contra a tuberculose. É indicado no mesmo artigo que vários candidatos para diferentes tipos de vacinas (vacinas subunitárias com proteínas, vacinas com ADN, vacinas combinadas com vírus, vacinas com estirpes recombinantes) são a ser ensaiados e que novos desenvolvimentos são esperados.

É portanto necessário ter uma vacina profilática para prevenir infecções causadas por *M. tuberculosis* que seja mais eficaz do que as vacinas correntes baseadas na estirpe de BCG atenuada.

Objeto da Invenção

O objeto da presente invenção é o uso de um agente imunoterapêutico consistindo essencialmente em fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT na forma de lipossomas para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático de infecções causadas por *M. tuberculosis*.

Descrição Detalhada da Invenção

A aplicação de patente ES2231037-A1 divulga um método para a preparação de um agente imunoterapêutico compreendendo fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (C-MBT). Também divulga composições contendo-o e a sua aplicação terapêutica para o tratamento combinado da tuberculose em associação com outros medicamentos.

Os autores da presente invenção descobriram o uso do referido agente imunoterapêutico para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático da tuberculose.

O objeto da presente invenção é, portanto, o uso de um agente imunoterapêutico consistindo essencialmente em fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (C-MBT) para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático da tuberculose, em que o referido agente é obtível por um método compreendendo os seguintes passos:

- cultivar a estirpe de C-MBT virulenta ao longo de um período igual a ou maior do que três semanas e, subsequentemente,
- homogeneizar a cultura de células na presença de um surfatante não iônico,
- separar as células não fragmentadas e os componentes solubilizados por meio de centrifugação,
- sujeitar a fração dos fragmentos da parede celular a tratamento químico ou físico para inativar as eventuais células da estirpe virulenta que eles eventualmente contenham, e

- secar o agente imunoterapêutico obtido por meio de liofilização,

em que o medicamento está na forma de lipossomas.

A estirpe virulenta pode ser qualquer estirpe virulenta do C-MBT. Uma das estirpes mais usadas pelos investigadores nesta área é chamada H₃₇Rv a qual, por exemplo, pode ser livremente adquirida na Coleção Nacional de Culturas-Tipo (CNCT), Londres, Grã-Bretanha (número do depósito NC007416).

A estirpe virulenta pode ser cultivada por inoculação em meios de cultura bem conhecidos pela pessoa perita na técnica, por exemplo ágar de Middlebrook 7H10 ou 7H11, meio de Sauton ou meio de Proskauer-Beck.

A cultura da estirpe virulenta é realizada ao longo de um período igual a ou maior do que três semanas, preferencialmente compreendido entre 3 e 4 semanas. A temperatura da cultura é preferencialmente mantida entre 34°C e 38°C.

Uma vez que a cultura acabe, as células são isoladas usando técnicas tais como aquelas descritas, por exemplo, na aplicação de patente ES2231037-A1.

A homogeneização de células vivas é levada a cabo na presença de um surfatante não iónico, e preferencialmente num meio tamponado a pH neutro, por exemplo a pH compreendido entre 6 e 8, tal como o proporcionado pelo tampão TFS (tampão fosfato salino).

A homogeneização pode ser levada a cabo por meio de sonicação por ultrassons, ou por meio do uso de pequenas esférulas de aproximadamente 1 mm de diâmetro, por exemplo, esférulas de sílica ou zircônio/sílica, em conjunto com um homogeneizador mecânico. Um homogeneizador mecânico que pode ser usado, por exemplo é o modelo BeadBeater[®] da BioSpec.

As células do C-MBT são quebradas por meio deste processo de homogeneização e pequenos fragmentos da parede celular são obtidos.

O tipo de surfatante não iônico usado no processo de homogeneização é preferencialmente selecionado do grupo consistindo em etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de éster de sorbitano, e suas misturas.

Mais preferencialmente, o surfatante não iônico é selecionado do grupo de etoxilatos de octilfenol. Mais preferencialmente, são usados etoxilatos de octilfenol com um conteúdo em óxido de etileno compreendido entre 7 e 8 moles, que podem ser encontrados no mercado sob o nome Triton X-114[®].

O conteúdo do surfatante não iônico no passo de homogeneização é preferencialmente compreendido entre 1% e 10% em peso com respeito ao peso total do homogenato, mais preferencialmente entre 3% e 6% em peso.

A massa homogeneizada contendo os fragmentos da parede celular é sujeita a um tratamento convencional para separar e rejeitar as células não fragmentadas e os componentes solubilizados. Pode ser usada por exemplo centrifugação a

diferentes velocidades e lavagem com solução tampão como descrito na aplicação de patente ES2231027-A1. O sedimento contendo os fragmentos da parede celular é obtido depois de se terem realizado os processos de purificação mencionados. O referido sedimento é disperso no tampão TFS e é sujeito a um tratamento convencional para assegurar a completa inativação das células do C-MBT que tenham permanecido viáveis depois do processo de fragmentação e purificação. O tratamento mencionado pode ser um processo químico, por exemplo por meio de tratamento com formaldeído, ou um processo físico, por exemplo por meio de autoclavagem ou tratamento de pasteurização.

A dispersão dos fragmentos da parede celular em tampão TFS obtida depois do tratamento de inativação pode ser liofilizada para facilitar o seu armazenamento. Para esse fim, a dispersão pode ser distribuída em frascos e liofilizada a uma temperatura compreendida entre -15°C e -25°C e com um vácuo compreendido entre 0,1 e 0,5 mbar.

Os frascos obtidos depois do processo de liofilização contém o agente imunoterapêutico consistindo essencialmente em fragmentos da parede celular do C-MBT, e eles são geralmente armazenados a temperaturas muito baixas, por exemplo a -70°C .

Como previamente indicado, o objeto da invenção é o uso do agente imunoterapêutico consistindo essencialmente em fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático da tuberculose, i.e., para a preparação de uma vacina profilática contra a tuberculose.

O medicamento para o tratamento profilático da tuberculose consiste essencialmente no agente imunoterapêutico baseado nos fragmentos da parede celular. O medicamento está na forma de lipossomas.

Os lipossomas podem ser formados usando lípidos auxiliares convencionais e técnicas bem conhecidas pela pessoa perita na técnica, tais como aqueles descritos na aplicação de patente ES2231037-A1.

Os lipossomas geralmente incluem fosfolípidos, com uma carga líquida neutra e/ou negativa, e esteróis.

Os fosfolípidos usados podem ser, por exemplo: fosfaditilcolina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol.

O principal componente dos lipossomas é usualmente fosfaditilcolina, a qual pode ser sintetizada ou isolada de fontes naturais. Um produto comercial frequentemente usado é lecitina baseada em soja, a qual é uma mistura complexa de fosfolípidos incluindo lá dentro fosfaditilcolina.

Os esteróis que são usados na preparação dos lipossomas podem ser, entre outros, colesterol e sais biliares.

Os lipossomas são preferencialmente formados usando uma mistura de lecitina baseada em soja e colato de sódio.

Os lipossomas podem opcionalmente conter aditivos melhorando a sua estabilidade, por exemplo: vitamina E, a qual atua como um antioxidante lipídico.

Os lipossomas obtidos usualmente têm uma distribuição de tamanho na qual 99,9% são mais pequenos do que 1 micron.

Os lipossomas podem ser sujeitos a liofilização para assim se obter o agente imunoterapêutico na forma de lipossomas liofilizados.

O medicamento pode ser administrado na forma de uma dosagem simples ou de várias dosagens, por meio da repetição a certos intervalos de tempo. Preferencialmente duas dosagens são administradas por um período compreendido entre 2 e 5 semanas, preferencialmente entre 3 e 4 semanas.

O medicamento pode ser administrado numa mucosa, por exemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, intestinal, vaginal, ou mucosa do trato urinário, ou parenteralmente, por exemplo, subcutaneamente, intradermicamente, intramuscularmente, intravenosamente, ou intraperitonealmente. A administração parenteral é preferencial.

A dosagem adequada depende de vários parâmetros, incluindo entre eles o método de administração e o sujeito a ser tratado, mas preferencialmente a dosagem é compreendida entre 1 µg e 1000 µg, mais preferencialmente entre 25 e 700, e ainda mais preferencialmente entre 50 µg e 200 µg.

O medicamento consistindo essencialmente nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT na forma de lipossomas pode ser administrado em combinação com outras vacinas profiláticas contra a tuberculose, tais como aquelas mencionadas em *S.H.E. Kaufmann, Nature Rev. Immunol.* 2006, 6, 699-704, tal como por exemplo a vacina de BCG, vacinas subunitárias ou vacinas de BCG recombinantes.

A combinação de vacinas pode ser simultânea ou pode ser feita em duas inoculações separadas ao longo do tempo. O período entre as inoculações pode ser até de vários anos.

No caso das inoculações separadas ao longo do tempo, primeiro é preferencialmente administrada uma vacina profilática contra a tuberculose, e o medicamento consistindo essencialmente nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT, o qual atua como um agente (impulso) reestimulante da vacina inicialmente inoculada, é subsequentemente administrado.

Foi surpreendentemente descoberto que a administração do medicamento consistindo essencialmente no agente imunoterapêutico baseado nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT na forma de lipossomas é capaz de induzir uma resposta geradora do interferão- γ do tipo Th1 contra antigénios específicos de *M. tuberculosis*. Os ditos antigénios incluem Ag85B e Ag85A, os quais são parte do complexo Ag85, consistindo numa família de proteínas de baixo peso molecular desempenhando um papel decisivo na biossíntese da parede celular e produzida em quantidades consideráveis quando a cultura bacteriana está na fase *log*.

Tem sido observado que a vacina de BCG convencional não gera uma resposta imunoprotetora contra os antigénios do complexo Ag85, o que pode representar uma menor capacidade de proteção.

Foi também descoberto que o número de bacilos viáveis presentes nos pulmões de camundongos vacinados com o referido agente imunoterapêutico subsequentemente infetados

com a estirpe de H₃₇Rv virulenta é menor do que o número de bacilos viáveis presentes no grupo de camundongos de controlo, e o dito número é comparável àquele de camundongos vacinados com a vacina de BCG convencional.

Os exemplos abaixo são mostrados para proporcionar à pessoa perita na técnica uma explanação detalhada de formas de realização específicas no âmbito da invenção.

Exemplo 1.- Eficácia do agente imunoterapêutico como uma vacina profilática contra a infecção causada por *M. tuberculosis*

O agente imunoterapêutico usado neste exemplo foi preparado de acordo com o método descrito no Exemplo 2 da aplicação de patente ES2231037-A1.

A eficácia do agente imunoterapêutico baseado nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT foi ensaiada em camundongos fêmeas C57BL/tipo 6 de 6 a 8 semanas de idade e livres de patogénicos específicos.

Os camundongos foram divididos em três grupos de 12 animais cada e foram sujeitos ao seguinte protocolo de vacinação:

- 1) Sem vacinação (grupo de controlo),
- 2) Subcutaneamente inoculados com duas dosagens de 285 µg do agente imunoterapêutico obtido no Exemplo 2 da aplicação de patente ES2231037-A1 às semanas 3 e 6 da experiência,
- 3) Subcutaneamente inoculados com uma dosagem de 2 x 10⁶ unidades formadas de colónia do BCG.

Estirpe dinamarquesa (States Serum Institute, Dinamarca) à semana 0 da experiência.

A estirpe virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H³⁷Rv Pasteur), a qual foi cultivada em meio de Proskauer-Beck até à fase *mid-log*, foi usada para a infecção e foi armazenada em alíquotas de 1 mL a uma temperatura de -70°C até ao seu uso.

Os camundongos foram infetados por aerossol com a dita estirpe virulenta à semana nove da experiência por meio da sua colocação num dispositivo de infecção por aerossol de Middlebrook o qual proporcionou um inóculo de aproximadamente 10-50 bacilos viáveis nos pulmões dos camundongos.

O número de bacilos viáveis nos pulmões foi determinado 3 semanas após a infecção por aerossol dos animais (semana 12 da experiência) incubando diluições em série de homogenato do pulmão em ágar de Middlebrook 7H11 durante 4 semanas a 37°C. O pulmão foi homogeneizado na presença de 1 mL de água duas vezes destilada.

Os resultados da Tabela 1 expressam o logaritmo das unidades formadas de colónia (UFC) por mL que foram identificadas no pulmão:

Tabela 1

Grupo de camundongos	Vacina	Log ₁₀ UFC/mL
1	Nenhuma (grupo de controlo)	6,42 ± 0,24
2	Agente imunoterapêutico encapsulado em lipossoma	5,72 ± 0,30
3	BCG	5,71 ± 0,58

As diferenças entre os resultados do grupo de camundongos que não foram vacinados e os resultados dos grupos vacinados são estatisticamente significantes.

Pode ser observado que no pulmão do grupo de camundongos vacinados com o agente imunoterapêutico encapsulado em lipossoma um menor número de bacilos viáveis é detetado do que no pulmão dos camundongos não vacinados, e um número substancialmente idêntico àquele de camundongos vacinados com a vacina de BCG convencional.

Portanto, a vacinação com o agente imunoterapêutico baseado nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT alcança proteção contra infecções causada por *M. tuberculosis*.

Exemplo 2.- Eficácia do agente imunoterapêutico como um gerador de uma resposta específica de Th1 contra infecção causada por *M. tuberculosis*

O agente imunoterapêutico usado neste exemplo foi preparado de acordo com o método descrito no Exemplo 2 da aplicação de patente ES2231037-A1.

A eficácia do agente imunoterapêutico baseado nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT foi ensaiada em camundongos fêmeas C57BL/tipo 6 de 6 a 8 semanas de idade e livres de patogênicos específicos numa experiência *ex vivo*.

Os camundongos foram divididos em grupos de 4 animais cada e foram sujeitos ao seguinte calendário de inoculação:

- 1) Subcutaneamente inoculados com salino às semanas 3 e 6 da experiência (grupo de controlo),
- 2) Subcutaneamente inoculados com duas dosagens de 285 µg do agente imunoterapêutico obtido no Exemplo 2 da aplicação de patente ES2231037-A1 às semanas 3 e 6 da experiência,
- 3) Subcutaneamente inoculados com uma dosagem de 2×10^6 unidades formadas de colónia da estirpe Dinamarquesa BGC (States Serum Institute, Dinamarca) à semana 0 da experiência, e com salino às semanas 3 e 6 da experiência,
- 4) Subcutaneamente inoculados com uma dosagem de 2×10^6 unidades formadas de colónia da estirpe virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H₃₇Rv Pasteur) à semana 3 da experiência, e com salino à semana 6 da experiência.

Os camundongos foram sacrificados à semana 7, e os seus baços foram extraídos e imersos em tubos contendo 5 mL de L-glutamina-RPMI (Gibco). Os tubos foram mantidos em gelo até ao final da experiência. Os baços foram mecanicamente desintegrados e a suspensão foi filtrada através de uma malha de náilon com 70 µm de diâmetro. Depois ela foi centrifugada durante 10 minutos a 300 g. As pelotas foram reconstituídas com 15 mL de uma solução consistindo em Tris e cloreto de amónio em água duas vezes destilada para realizar a lise das células. Após 8 minutos, elas foram lavadas com 20 mL de L-glutamina-RPMI e centrifugadas durante 10 minutos a 300 g.

As pelotas obtidas foram ressuspensas com 5 mL de L-glutamina-RPMI, e a suspensão foi filtrada através de uma

malha de náilon com 70 μm de diâmetro. As células foram contadas com a câmara de Neubauer.

AS células do baço dos camundongos foram semeadas em pratos com uma razão de 1×10^5 células/poço e foram cultivadas com 200 μL de meio de cultura completo (MCC) consistindo em L-glutamina-RPMI complementada com soro fetal bovino inativado, penicilina, estreptomicina, piruvato de sódio, e 2-mercaptoetanol, ou com 200 μL de meio de cultura completo (MCC) complementado com antigénios de *M. tuberculosis*: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do antigénio DPP (States Serum Intitut, Dinamarca) e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AASI-6, Ag85A e Ag85B (Lionex Diagnostics and Therapeutics GmbH, República Federal da Alemanha).

As células foram incubadas a 37°C numa atmosfera com 5% de CO_2 . Após 96 horas, os pratos foram centrifugados durante 10 minutos a 300 g, e o sobrenadante de cada um deles foi recolhido.

Os sobrenadantes foram congelados e depois de permanecerem no referido estado pelo menos 24 horas, o conteúdo em interferão- γ foi analisado aplicando a técnica ELISA de sanduíche dupla e usando uma anticorpo monoclonal específico para o interferão- γ de murino (Diaclone).

A tabela II mostra a concentração média de interferão- γ expressa como \log_{10} pg/mL a qual foi induzida em cada um dos grupos de camundongos contra os antigénios de *M. tuberculosis*:

Tabela II

Grupo	Inóculo	Antigénios				
		Controlo	DPP	AASI-6	Ag85B	Ag85A
1	Controlo	0	0	0	0	0
2	Agente imunoterapêutico encapsulado em lipossoma	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)	Diferenças estatisticamente diferentes entre o Grupo 2 e o Grupo 3					
(2)	Diferenças estatisticamente diferentes entre o Grupo 2 e o Grupo 4					
(3)	Diferenças estatisticamente diferentes entre o Grupo 3 e o Grupo 4					

Os resultados da Tabela II mostram que as duas inoculações realizadas com o agente imunoterapêutico encapsulado em lipossoma baseado nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta de *M. tuberculosis* são capazes de induzir a produção do interferão- γ contra antigénios específicos de *M. tuberculosis*. Isto significa que eles induzem uma resposta protetora do tipo Th1.

Particularmente, a resposta induzida pelo grupo de camundongos inoculados com o agente imunoterapêutico encapsulado em lipossoma contra os antigénios DPP, Ag85G, Ag85A não apresenta diferenças significativas com a resposta do grupo de camundongos inoculados com a estirpe de H₃₇Rv virulenta de *M. tuberculosis*. A referida resposta é melhor do que a resposta do grupo de camundongos inoculados com a estirpe de BCG, a qual é a vacina convencional, uma vez que ela somente induz a resposta contra DPP e não contra Ag85B e Ag85A.

Somente o grupo de camundongos inoculados com a estirpe virulenta foi capaz de induzir a resposta contra o antígeno AASI-6.

Portanto, o agente imunoterapêutico baseado nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta de *M. tuberculosis* é capaz de induzir resposta protetora do tipo Th1 contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*, o que é um indicador de que ele pode ser usado eficazmente para prevenir infecções causadas por *M. tuberculosis*.

Lisboa, 31 de Outubro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. O uso de um agente imunoterapêutico consistindo essencialmente em fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (C-MBT) para a preparação de um medicamento para o tratamento profilático da tuberculose, em que o referido agente é obtível por um método compreendendo os seguintes passos:
 - cultivar a estirpe de C-MBT virulenta ao longo de um período igual a ou maior do que três semanas e, subsequentemente,
 - homogeneizar a cultura de células na presença de um surfatante não iônico,
 - separar as células não fragmentadas e os componentes solubilizados por meio de centrifugação,
 - sujeitar a fração dos fragmentos da parede celular a tratamento químico ou físico para inativar as eventuais células da estirpe virulenta que eles eventualmente contenham, e
 - secar o agente imunoterapêutico obtido por meio de liofilização, em que o medicamento está na forma de lipossomas.
2. O uso de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o período de cultura estar compreendido entre 3 e 4 semanas.
3. O uso de acordo com as reivindicações 1 ou 2, **caracterizado por** o surfatante não iônico ser selecionado do grupo consistindo em etoxilatos de

alquilfenol, etoxilatos de éster de sorbitano, e suas misturas.

4. O uso de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** o surfatante não iónico ser selecionado do grupo de etoxilatos de octilfenol.
5. O uso de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** o surfatante não iónico ser selecionado dos etoxilatos de octilfenol com um conteúdo em óxido de etileno compreendido entre 7 e 8 moles.
6. O uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** a homogeneização ser realizada num meio tamponado a pH neutro.
7. O uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** o medicamento ter que ser administrado na forma de uma dosagem única ou de várias dosagens.
8. O uso de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado por** o medicamento ter que ser administrado em duas dosagens.
9. O uso de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado por** as dosagens terem que ser administradas separadas por um período compreendido entre 2 e 5 semanas.
10. O uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9, **caracterizado por** o medicamento ter que ser administrado em combinação com outras vacinas profiláticas contra a tuberculose.

11. O uso de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado por** as vacinas serem combinadas em duas inoculações separadas ao longo do tempo.
12. O uso de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado por** primeiramente uma vacina profilática contra a tuberculose ter que ser administrada, e o medicamento consistindo essencialmente nos fragmentos da parede celular de uma estirpe virulenta do C-MBT ser subsequentemente administrado.

Lisboa, 31 de Outubro de 2012