

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 007**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07822990 .3**

96 Fecha de presentación: **17.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2090318**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.2009**

54 Título: **Vacuna profiláctica contra la tuberculosis**

30 Prioridad:

**30.10.2006 ES 200602754**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**17.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**17.12.2012**

73 Titular/es:

**ARCHIVEL FARMA, SL (100.0%)  
C/ Fogars deTordera, 61 Poligon Industrial  
Bonavista  
08916 BADALONA, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**CARDONA IGLESIAS, PERE JOAN y  
AMAT RIERA, ISABEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 393 007 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Vacuna profiláctica contra la tuberculosis

**Campo técnico**

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

**Estado de la técnica anterior**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica producida por los bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), que actualmente incluyen a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*.

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

15 La vacuna actual que se usa en el tratamiento preventivo contra la tuberculosis se basa 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 a base de fragmentos de pared celular de cepas virulentas o avirulentas de *Mycobacterium*. También se describe que el adyuvante usado en la composición de la vacuna ejerce gran influencia sobre su eficacia.

20 E. Ribi y col., Nature 1963, 198, páginas 1214 a 1215, describen los ensayos de inmunización realizados con una composición que comprende fragmentos de pared celular de la cepa de BCG avirulenta y aceite mineral. Dichos fragmentos se obtienen por homogeneización de un cultivo de la cepa mencionada en aceite mineral. La composición es más eficaz que la vacuna convencional (BCG). Sin embargo, en el nuevo 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.

25 D.P. Pal y col., Indian J. Med. Res. 1977, 65, páginas 340 a 345, describen una vacuna preparada con fragmentos de pared celular de la cepa H<sub>37</sub>Rv virulenta y aceite mineral. En este caso los fragmentos de pared celular se obtienen por 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 para que la vacuna sea eficaz se requiere la presencia de aceite mineral.

30 G.K. Khuller y col., Folia Microbiol., 1992, 37, páginas 407 a 412, describen la eficacia protectora de diferentes fracciones de la pared celular de la cepa H<sub>37</sub>Ra avirulenta de *M. tuberculosis* formulada con adyuvante incompleto de Freund que también incluye aceite mineral.

35 E.M. Agger y col., Scand. J. Immunol., 2002, 56, páginas 443 a 447, describen vacunas que comprenden fragmentos de pared celular de la cepa H<sub>37</sub>Rv virulenta, que son eficaces cuando incluyen, como adyuvante, el tensioactivo catiónico bromuro de dimetildioctadecilamonio. También se describe que los ensayos realizados con bacilos de *M. tuberculosis* homogeneizados que no contienen el adyuvante mencionado no generan niveles de resistencia contra la tuberculosis en el modelo murino.

40 En I.M. Orme Vaccine, 2006, 24, páginas 2 a 19, que es un artículo de revisión reciente de nuevas vacunas contra la tuberculosis, se describe que la vacuna BCG convencional es esencialmente ineficaz en la protección de personas adultas contra la tuberculosis. En el mismo artículo se indica que se están realizando ensayos con diversos candidatos para diferentes tipos de vacunas (vacunas subunitarias con proteínas, vacunas con ADN, vacunas combinadas con virus, vacunas con cepas recombinantes) y que se esperan nuevos desarrollos.

Por lo tanto es necesario disponer de una vacuna profiláctica que prevenga infecciones ocasionadas por *M. tuberculosis* y que sea más eficaz que la vacuna actual basada en la cepa de BCG atenuada.

**Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es el uso de un agente inmunoterapéutico que consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT en forma de liposomas para la preparación de un fármaco para el tratamiento profiláctico de infecciones ocasionadas por *M. tuberculosis*.

**Descripción detallada de la invención**

50 La solicitud de patente ES2231037-A1 desvela un procedimiento para la preparación de un agente inmunoterapéutico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa virulenta del complejo *Mycobacterium*

*tuberculosis* (CMT). También desvela 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 inmunoterapéutico para la preparación de un fármaco para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis.

5 El objeto de la presente invención es por tanto el uso de un agente inmunoterapéutico que consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) para la preparación de un fármaco para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis, en el que dicho agente puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 10 - cultivar la cepa virulenta CMT durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas y, posteriormente,
- homogeneizar el cultivo celular en presencia de un tensioactivo no iónico,
- 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
- secar el agente inmunoterapéutico obtenido mediante liofilización,

15 en el que el fármaco está en forma de liposomas.

La cepa virulenta puede ser cualquier cepa virulenta de CMT. Una de las cepas más usadas por los investigadores en este campo es la denominada H<sub>37</sub>Rv que, por ejemplo, puede adquirirse libremente en la Colección Nacional de Cultivos Tipo (CNCT), Londres, Gran Bretaña (número de depósito NC007416).

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

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

25 Una vez finalizado el cultivo, las células se aíslan usando técnicas como las descritas, por ejemplo, en la solicitud de patente ES2231037-A1.

La homogeneización de las células vivas se realiza en presencia de un tensioactivo no iónico y preferentemente 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).

30 La homogeneización puede realizarse por tratamiento con ultrasonidos o usando pequeñas perlas de aproximadamente 1 mm de diámetro, por ejemplo, de sílice o de sílice/circona, conjuntamente con un homogeneizador mecánico. Un homogeneizador mecánico que puede usarse, por ejemplo, es el modelo BeadBeater® de BioSpec

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

35 El tipo de tensioactivo no iónico usado en el proceso de homogeneización se selecciona preferentemente del grupo que consiste en etoxilados de alquilfenol, etoxilados de éster de sorbitán y mezclas de los mismos.

Más preferentemente, el tensioactivo no iónico se selecciona en el grupo de etoxilados de octilfenol. Más preferentemente, se usan etoxilados de octilfenol con un contenido de óxido de etileno comprendido entre 7 y 8 moles, cuyos tensioactivos pueden encontrarse en el comercio con el nombre de Triton X-114®.

40 El contenido de tensioactivo no iónico en la etapa de homogeneización está preferentemente comprendido entre el 1 % y el 10 % en peso con respecto al peso total del homogeneizado, más preferentemente entre el 3 % y el 6 % en peso.

45 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, puede usarse la centrifugación a diferentes velocidades y los lavados con solución tampón como se describe en la solicitud de patente ES2231027-A1. Después de realizar los procedimientos de purificación mencionados, se obtiene un sedimento que contiene los fragmentos de pared celular. Dicho sedimento se dispersa en tampón con PBS y se somete a un tratamiento convencional para asegurar la inactivación total de las células de CMT que hubieran podido permanecer viables tras el procedimiento de fragmentación y de purificación. El tratamiento mencionado puede ser  
50 un proceso químico, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído, o un proceso físico, por ejemplo, mediante tratamiento en autoclave o pasteurización.

La dispersión de fragmentos de pared celular en tampón PBS obtenida después del tratamiento de inactivación puede liofilizarse para facilitar su conservación. Para ello, la dispersión puede distribuirse en viales y liofilizarse a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C y con un vacío comprendido entre 0,01 y 0,05 kPa (0,1 y 0,5 mbar).

- 5 Los viales obtenidos después del proceso de liofilización contienen al agente inmunoterapéutico que consiste esencialmente en los fragmentos de pared celular de CMT y generalmente se conservan a temperaturas muy bajas, por ejemplo a -70 °C.

10 Como ya se ha indicado, el objeto de la invención es el uso del agente inmunoterapéutico que consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT para la preparación de un fármaco para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis, es decir, para la preparación de una vacuna profiláctica contra la tuberculosis.

El fármaco para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis consiste esencialmente en el agente inmunoterapéutico basado en fragmentos de pared celular. El fármaco está en forma de liposomas.

15 Los liposomas pueden formarse usando técnicas y lípidos auxiliares convencionales bien conocidos por el experto en la técnica, como los descritos en la solicitud de patente ES2231037-A1.

Los liposomas generalmente incluyen fosfolípidos, con una carga neta neutra y/o negativa y esteroides.

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

20 Habitualmente, el componente mayoritario de los liposomas es la fosfatidilcolina, que puede sintetizarse o aislarse de fuentes naturales. Un producto comercial frecuentemente usado es la lecitina de soja que es una mezcla compleja de fosfolípidos entre los cuales se incluye la fosfatidilcolina.

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

Los liposomas se forman preferentemente usando una mezcla de lecitina de soja y colato sódico.

Opcionalmente, los liposomas pueden contener aditivos que mejoren su estabilidad, por ejemplo: la vitamina E, que actúa como un antioxidante lipídico.

25 Los liposomas obtenidos normalmente tienen una distribución de tamaño en la que el 99,9 % son más pequeños que 1 micrómetro.

Los liposomas pueden someterse a liofilización para obtener de este modo el agente inmunoterapéutico en forma de liposomas liofilizados.

30 El fármaco puede administrarse en forma de una sola dosis o de diversas dosis, mediante la repetición a intervalos de tiempo determinados. Preferentemente se administran dos dosis con un intervalo de tiempo entre ellas comprendido entre 2 y 5 semanas, preferentemente entre 3 y 4 semanas.

El fármaco puede administrarse a una mucosa, por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, intestinal, vaginal o el tracto urinario o por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Se prefiere la administración por vía parenteral.

35 La dosis adecuada depende de diversos parámetros, incluyendo entre ellos el procedimiento de administración y el sujeto a tratar, pero preferentemente la dosis está comprendida entre 1 µg y 1000 µg, más preferentemente entre 25 y 700 y aún más preferentemente entre 50 µg y 200 µg.

40 El fármaco consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT en forma de liposomas que puede administrarse en combinación con otras vacunas profilácticas contra la tuberculosis, como las mencionadas en S.H.E. Kaufmann, Nature Rev. Immunol. 2006, 6, 699-704, tal como por ejemplo la vacuna BCG, vacunas subunitarias o vacunas de BCG recombinantes.

La combinación de vacunas puede ser simultánea o puede realizarse en dos inoculaciones separadas en el tiempo. El período entre las inoculaciones puede llegar a ser muy largo.

45 En el caso de inoculaciones separadas en el tiempo, preferentemente, en primer lugar se administra una vacuna profiláctica contra la tuberculosis y después se administra el fármaco que consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT, que actúa como un agente re-estimulante (de refuerzo) de la vacuna inicialmente inoculada.

50 Sorprendentemente se descubrió que, la administración del fármaco que consistía esencialmente en el agente inmunoterapéutico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT en forma de liposomas, era capaz de inducir una respuesta generadora de interferón-γ de tipo Th1 contra antígenos específicos de *M.*

*tuberculosis*. Dichos antígenos incluyen Ag85B y Ag85A, que forman parte del complejo Ag85, que consiste en una familia de proteínas de bajo peso molecular que desempeñan una función decisiva en la biosíntesis de la pared celular y se produce en cantidades considerables cuando el cultivo bacteriano está en la fase logarítmica.

5 Se ha observado que la vacuna BCG convencional no genera ninguna respuesta inmunoprotectora contra antígenos del complejo Ag85, lo que podría representar una baja capacidad de protección más baja.

También se ha descubierto que el número de bacilos viables presentes en los pulmones de ratones vacunados con dicho agente inmunoterapéutico posteriormente infectados con la cepa virulenta H<sub>37</sub>Rv es menor que el número de bacilos viables presentes en el grupo de ratones control y que dicho número es comparable al de los ratones vacunados con la vacuna BCG convencional.

10 Se muestran los siguientes ejemplos para proporcionar al experto en la materia una explicación detallada de realizaciones específicas dentro de la invención.

**Ejemplo 1.- Eficacia del agente inmunoterapéutico como una vacuna profiláctica contra la infección ocasionada por *M. tuberculosis***

15 El agente inmunoterapéutico usado en este ejemplo se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1.

La eficacia del agente inmunoterapéutico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT se sometió a ensayo en ratones hembra de tipo C57BL/6, de 6 a 8 semanas de vida y 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:

- 20
- 1) Sin vacunación (grupo control),
  - 2) Inoculados por vía subcutánea con dos dosis de 285 µg del agente inmunoterapéutico obtenido en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1 a las 3 y 6 semanas del experimento.
  - 3) Inoculados por vía subcutánea con una dosis de 2 x 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias de la cepa BCG danesa (Statens Serum Institute, Dinamarca) la semana 0 del experimento.

25 Para la infección se empleó la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (Pasteur H<sub>37</sub>Rv), 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 uso.

30 Los ratones se infectaron por aerosol con dicha cepa virulenta a la semana nueve del experimento poniéndolos en un aparato Middlebrook 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 3 semanas después de la infección por aerosol de los animales (semana 12 del experimento) incubando diluciones en serie de homogeneizados de pulmón en agar Middlebrook 7H11 durante 4 semanas a 37 °C. El pulmón se homogeneizó en presencia de 1 ml de agua bidestilada.

35 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 <sub>10</sub> UFC/ml
1	Ninguna (grupo de control)	6,42 ± 0,24
2	Agente inmunoterapéutico encapsulado en liposomas	5,72 ± 0,30
3	BCG	5,71 ± 0,58

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

40 Puede observarse que en el pulmón del grupo de ratones vacunados con el agente inmunoterapéutico encapsulado en liposomas se detecta un menor número de bacilos viables que en el pulmón de los ratones no vacunados y un número sustancialmente idéntico al de los ratones vacunados con la vacuna BCG convencional.

Por lo tanto, la vacunación con el agente inmunoterapéutico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT consigue proteger contra infecciones ocasionadas por *M. tuberculosis*.

45 **Ejemplo 2.- Eficacia del agente inmunoterapéutico como generador de una respuesta Th1 específica contra**

**infección ocasionada por *M. tuberculosis***

El agente inmunoterapéutico usado en este ejemplo se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 de la solicitud de patente ES2231037-A1.

5 La eficacia del agente inmunoterapéutico basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT se sometió a ensayo, en un experimento *ex vivo*, en ratones hembra de tipo C57BL/6 de 6 a 8 semanas de vida y libres de patógenos específicos.

Los ratones se dividieron en grupos de 4 animales cada uno de ellos y se sometieron al siguiente programa de inoculación:

- 10 1) Inoculados por vía subcutánea con solución salina las semanas 3 y 6 del experimento (grupo control),  
 2) Inoculados por vía subcutánea con dos dosis de 285 µg del agente inmunoterapéutico obtenido en el Ejemplo 2 de solicitud de patente ES2231037-A1 las semanas 3 y 6 del experimento.  
 3) Inoculados por vía subcutánea con una dosis de  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias de la cepa danesa BCG (Statens Serum Institute, Dinamarca) la semana 0 del experimento y con solución salina las semanas 3 y 6 del experimento.  
 15 4) Inoculados por vía subcutánea con  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias de la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (Pasteur H<sub>37</sub>Rv) la semana 3 del experimento y con solución salina la semana 6 del experimento.

20 A la semana 7 los ratones se sacrificaron y sus bazos se extrajeron y se sumergieron en tubos que contenían 5 ml de L-glutamina-RPMI (Gibco). Los tubos se conservaron en hielo hasta el final del experimento. Los bazos se disgregaron mecánicamente y la suspensión se filtró a través de una malla de nylon de 70 µm de diámetro. Después se centrifugó durante 10 minutos a 300 g. Los sedimentos se reconstituyeron con 15 ml de una solución que consistía en Tris y cloruro amónico en agua bidestilada para realizar la lisis en las células. Después de 8 minutos se lavaron con 20 ml de L-glutamina-RPMI y se centrifugó durante 10 minutos a 300 g.

25 Los sedimentos obtenidos se resuspendieron con 5 ml de L-glutamina-RPMI y la suspensión se filtró a través de una malla de nylon de 70 µm de diámetro. Las células se contaron con la cámara Neubauer.

30 Las células del bazo de los ratones se sembraron sobre discos a una proporción de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se cultivaron con 200 µl de medio de cultivo completo (MCC) que consistía en L-glutamina-RPMI complementado con suero de ternero fetal inactivado, penicilina, estreptomycin, piruvato sódico y 2-mercaptoetanol, o con 200 µl de medio de cultivo completo (MCC) complementado con antígenos de *M. tuberculosis*: 10 µg/ml del antígeno PPD (Statens Serum Institut, Dinamarca) y 5 µg/ml de ESAT-6, Ag85A y Ag85B (Lionex Diagnostic and Therapeutics GmbH, República Federal de Alemania).

Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 96 horas, los discos se centrifugaron durante 10 minutos a 300 g y se recogió el sobrenadante de cada uno de ellos.

35 Los sobrenadantes se congelaron y después permanecieron en dicho estado al menos durante 24 horas, el contenido de interferón-γ se analizó aplicando la técnica de ELISA de doble sándwich y usando un anticuerpo monoclonal específico para el interferón-γ murino (Diaclone).

La tabla II muestra la concentración media de interferón-γ expresada como log<sub>10</sub> pg/ml que se indujo en cada uno de los grupos de ratones contra 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 inmunoterapéutico encapsulado en liposomas	0	2,57	0	2,69 <sup>(1)</sup>	2,53 <sup>(1)</sup>
3	BCG	0	2,01 <sup>(3)</sup>	0	0.	0
4	H <sub>37</sub> Rv	0	3,06 <sup>(3)</sup>	2,86 <sup>(2)(3)</sup>	2,76 <sup>(3)</sup>	2,50 <sup>(3)</sup>

(1) Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 2 y el grupo 3  
 (2) Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 2 y el grupo 4  
 (3) Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 3 y el grupo 4

40

Los resultados de la Tabla II muestran que las dos inoculaciones realizadas con el agente inmunoterapéutico encapsulado en liposomas a base de fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *M. tuberculosis* son capaces de inducir la producción de interferón- $\gamma$  contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Esto significa que inducen una respuesta protectora de tipo Th1.

- 5 Particularmente, la respuesta inducida por el grupo de ratones inoculados con el agente inmunoterapéutico encapsulado en liposomas contra los antígenos PPD, Ag85B y Ag85A no presenta diferencias significativas con la respuesta del grupo de ratones inoculados con la cepa virulenta H<sub>37</sub>Rv de *M. tuberculosis*. Dicha respuesta es mejor que la respuesta del grupo de ratones inoculados con la cepa BCG, que es la vacuna convencional, ya que ésta solamente induce una respuesta contra PPD y no contra Ag85B ni contra Ag85A.
- 10 Únicamente el grupo de ratones inoculados con la cepa virulenta fue capaz de inducir una respuesta contra el antígeno ESAT-6.

Por lo tanto, el agente inmunoterapéutico a base de fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de *M. tuberculosis* es capaz de inducir una respuesta protectora de tipo Th1 contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*, lo cual es un indicador de que puede usarse eficazmente para prevenir infecciones ocasionadas por *M. tuberculosis*.

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de un agente inmunoterapéutico que consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) para la preparación de un fármaco para el tratamiento profiláctico de la tuberculosis, en el que dicho agente puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- cultivar la cepa virulenta CMT durante un período de tiempo igual o superior a tres semanas y, posteriormente,
  - homogeneizar el cultivo celular en presencia de un tensioactivo no iónico,
  - separar mediante centrifugación las células no fragmentadas y los componentes solubilizados,
  - 10 - someter a tratamiento químico o físico la fracción de fragmentos de pared celular para inactivar las eventuales células de la cepa virulenta que eventualmente contenga, y
  - secar el agente inmunoterapéutico obtenido mediante liofilización, en el que el fármaco está en forma de liposomas.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el período de cultivo está comprendido entre 3 y 4 semanas.
- 15 3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque** el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en etoxilados de alquilfenol, etoxilados de éster de sorbitán y mezclas de los mismos.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo de etoxilados de octilfenol.
- 20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** el tensioactivo no iónico se selecciona de los etoxilados de octilfenol con un contenido de óxido de etileno comprendido entre 7 y 8 moles.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la homogeneización se realiza en un medio tamponado a pH neutro.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el fármaco se administra en forma de una dosis única o de varias dosis.
- 25 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado porque** el fármaco se administra en dos dosis.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** las dosis se administran separadas por un período comprendido entre 2 y 5 semanas.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el fármaco se administra en combinación con otras vacunas profilácticas contra la tuberculosis.
- 30 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** las vacunas se combinan en dos inoculaciones separadas en el tiempo.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado porque** en primer lugar se administra una vacuna profiláctica contra la tuberculosis y posteriormente se administra el fármaco que consiste esencialmente en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de CMT.