

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 018**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08745627 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2144626**

54 Título: **Vacuna contra la tuberculosis y método de uso de la misma**

30 Prioridad:

**12.04.2007 US 923301 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.03.2015**

73 Titular/es:

**MICO BIO, INC. (100.0%)  
154 Grand Street  
New York, NY 10013, US**

72 Inventor/es:

**LIGHTER, JENNIFER y  
FISHER, JASON**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 531 018 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 contra la tuberculosis y método de uso de la misma

5 Campo de la invención

La invención se refiere a una vacuna frente a la tuberculosis, y más particularmente a una vacuna que usa *Mycobacterium tuberculosis* inactivada completa formulada para una administración pulmonar y mucosal.

10 Antecedentes de la invención

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) infecta a un tercio de la población humana mundial<sup>1</sup>. La vacuna habitual contra la tuberculosis (TB), conocida como vacuna BCG, es administrada a los recién nacidos en los países en desarrollo. Aunque esta vacuna protege frente a la TB meníngea y diseminada en niños, no consigue proteger adecuadamente frente al establecimiento de una TB latente con una reactivación de la enfermedad pulmonar en la vida adulta<sup>2</sup>. Además, se ha informado de que la eficacia de la BCG disminuye durante un periodo de 10 - 15 años<sup>3</sup>. El tipo más habitual de enfermedad por tuberculosis es la pulmonar, y la transmisión se produce a través de las gotitas en aerosol expulsadas durante la tos. Por lo tanto, a pesar de la alta prevalencia de la vacunación con BCG, la carga de morbilidad no ha disminuido. Ahora existen pruebas que apoyan que los linajes micobacterianos de *M. tb* pueden haberse adaptado a las mutaciones en los antígenos comunes a ambas *M. tb* y BCG<sup>4,5</sup>. Además, algunos estudios recientes sugieren que la BCG administrada por vía parenteral puede no conseguir la inducción de las respuestas inmunitarias de los linfocitos T en la mucosa pulmonar, lo que puede ser crítico para la protección frente a la enfermedad pulmonar<sup>6,7</sup>. Dadas estas razones, es imperativa una nueva vacuna para disminuir la prevalencia de la TB en todo el mundo.

El documento WO 00/47225 se refiere a una composición que comprende un adyuvante y micobacterias que son inactivadas por calor o con formalina para la elaboración de una vacuna mucosal.

30 Sumario de la invención

La invención proporciona una vacuna para la prevención y/o el tratamiento de la tuberculosis. La invención puede ser utilizada con diversas estrategias de vacunación: profilácticamente, administrada antes de la infección para prevenir una infección por *M. tb*, o después de la exposición para eliminar o contener la TB latente y prevenir la reactivación. Puede usarse para sustituir a la BCG y/o como refuerzo de la BCG en pacientes que ya han recibido la BCG o cualquier otra subunidad inmunoestimulante de la TB.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) inactivada completa, en la que la composición está formulada para su administración intranasal, mucosal o intrapulmonar a un hospedador mamífero, y en la que la composición comprende una dosis inmunológicamente protectora cuando es administrada al hospedador, y en la que dicha *M. tb* está inactivada con irradiación.

En algunas formas de realización, están inactivadas al menos el 90 % de las células de *Mycobacterium* spp., por ejemplo, el 95 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de las células de *Mycobacterium* spp. Cuando el sujeto es un ser humano, preferiblemente están inactivadas el 100 % de las células de *Mycobacterium* spp.

Preferiblemente la irradiación es con irradiación gamma.

La composición farmacéutica puede incluir opcionalmente un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria en el hospedador.

La composición farmacéutica puede incluir opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, o proporcionarse liofilizada.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está formulada para su administración intranasal en el hospedador.

Además, la composición farmacéutica se proporciona en forma de un aerosol o de un envase con pulverizador.

En una forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye *Mycobacterium* spp. irradiada con gamma que está formulada para su administración intranasal o intrapulmonar a un hospedador mamífero y que confiere una dosis inmunológicamente protectora cuando es administrada al hospedador, por ejemplo, a un ser humano.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es administrada a través de un dispositivo configurado para una administración nasal o pulmonar.

En otro aspecto adicional más, la invención proporciona un método para la preparación de una vacuna para el tratamiento de una infección por *Mycobacterium*, que comprende la formulación de una dosis inmunológicamente protectora de una *Mycobacterium tuberculosis* inactivada completa para su administración intranasal o pulmonar a un hospedador mamífero.

5 En algunas formas de realización, el método incluye el ensayo de la vacuna en un modelo animal no humano de tuberculosis. El modelo animal puede ser, por ejemplo, un ratón, una cobaya, un conejo, un bóvido o un primate no humano.

10 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o el ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, los métodos y los materiales adecuados se describen a continuación. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

### 20 Descripción detallada de la invención

Una vacuna de acuerdo con la invención se prepara mediante el uso de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada que después se formula para una administración pulmonar y mucosal a un sujeto. Se postula que cuando se administra la micobacteria inactivada en el pulmón o la mucosa / mucosa nasal de un sujeto, desencadena una respuesta inmunitaria mucho más potente de la que se ha observado con las vacunas de Tb previamente descritas.

La investigación en modelos murinos de gripe sugiere que las células inmunitarias pulmonares permanecen localizadas, y únicamente unos pocos linfocitos B y T migran sistémicamente<sup>8,9</sup>.

30 La investigación demuestra que los linfocitos T clave CD8 específicos de la gripe pueden permanecer bloqueados en un circuito semiaislado en el tórax, sin alcanzar apenas el torrente sanguíneo ni los tejidos linfáticos periféricos, sino más bien circular entre la mucosa respiratoria y los nódulos linfáticos locales. Zammit y col. sugieren que una razón puede ser la especial anatomía del drenaje linfático pulmonar<sup>8</sup>. Las células que entran en el conducto torácico desde los nódulos pulmonares locales son suministradas al pulmón a través de la sangre arterial pulmonar. Algunas pueden pasar a la circulación sistémica, pero las células activadas tienden a adherirse al endotelio vascular y moverse del nuevo hacia el pulmón, manteniendo por tanto las células en el sitio de la infección. Desde aquí, las células se mueven de nuevo a los nódulos locales, donde vuelven a encontrarse con el antígeno. De hecho, se ha averiguado en el modelo murino de TB que los linfocitos T de memoria específicos del antígeno vuelven preferiblemente de nuevo al sitio de vacunación, y que la ubicación de los linfocitos T en las vías respiratorias en el momento de la infección es importante<sup>10-11</sup>.

40 Aplicando estos hallazgos a la actual invención, por lo tanto, para que una vacuna contra la TB tenga éxito provocando una respuesta inmunitaria protectora en el sistema de las mucosas pulmonar y respiratoria, estimula preferiblemente directamente las células presentadoras del antígeno del epitelio respiratorio. La invención consigue esto mediante la administración de una micobacteria irradiada directamente en la interfase pulmonar y mucosal.

45 Un estudio publicado en 1968 no notificaba efectos adversos cuando se administraba una BCG aerogénica a 439 niños<sup>12</sup>. En especies animales experimentales, la administración en aerosol o intratraqueal de la BCG tenía una eficacia variable, desde una protección superior a la de la inoculación parenteral en primates<sup>13</sup>, ganado<sup>14</sup>, cobayas<sup>15r</sup> y ratones<sup>16,17,18,19</sup>, hasta ninguna ventaja aparente con respecto a la vía subcutánea en otros estudios<sup>20</sup>. Otros estudios mostraron que la respuesta inmunitaria dependía de la dosis inicial inoculada de BCG<sup>12,21</sup>.

55 Recientemente, diversos grupos de investigación han publicado datos sobre el uso de vacunas mucosales de subunidad de *M tb* como refuerzo cuando se administraban varias semanas después de una inmunización primaria en el modelo murino. Los hallazgos de Goonetilleke y col. apoyan la importancia de las propiedades de migración dirigida de los linfocitos T cuando se exponen a una vacuna modificada recombinante del virus de Ankara, que expresa el Ag 85A de *Mycobacterium tuberculosis*. El refuerzo intranasal indujo una respuesta de los linfocitos T cinco veces mayor en los pulmones que la BCG parenteral, proporcionando así un apoyo a que los linfocitos T de los pulmones están de alguna forma compartimentalizados<sup>22</sup>. Santosuosso y col. demostraron que un vector adenovirico intranasal que expresa el Ag85A reforzaba la respuesta primaria de los linfocitos T CD4 y CD8 en la luz de las vías aéreas y mejoraba la protección frente a la exposición pulmonar a *M. tuberculosis*<sup>23</sup>. Otros estudios con ratones que hacen uso de antígenos de micobacterias (el Ag 85A o el Ag 85B-ESAT-6) tanto en vectores recombinantes bacterianos / víricos como en proteínas y adyuvantes administrados en la mucosa como refuerzo, han demostrado una inmunidad protectora cuando se compara con la BCG parenteral estándar cuando se exponían a *M. tb* viva<sup>24,25,26</sup>. Todos estos estudios demostraron estadísticamente menos unidades formadoras de colonias de micobacterias en los pulmones y el bazo después del refuerzo con una vacuna de subunidad mucosal cuando se comparaba con la BCG sola.

La respuesta inmunitaria adaptativa frente a una infección por *M tuberculosis* está retrasada en comparación con otras infecciones, y esto permite que la población de bacilos de los pulmones aumente notablemente durante la fase preinmunitaria de la infección<sup>27</sup>. Mediante el uso de bacilos muertos en una formulación de vacuna en aerosol no hay ninguna micobacteria multiplicándose, y la respuesta inmunitaria tendría el tiempo adecuado para responder a los

5 antígenos de las paredes celulares de las bacterias. Además, durante miles de años de exposiciones de entrenamiento, *M tb* ha encontrado muchas formas de evadir la respuesta inmunitaria innata durante la presentación inicial del antígeno<sup>28,29,30,31</sup>. Las micobacterias muertas no tienen la capacidad de producir enzimas que provoquen formas de evadir el sistema inmunitario humano y evitar una presentación del antígeno con éxito.

10 Una razón por la que creemos que este método de uso de micobacterias completas inactivadas ha sido ignorado en el pasado es debido a los estudios realizados por Robert Koch a finales del siglo XIX<sup>32</sup>. Koch usó un filtrado estéril de cultivos de *M. tuberculosis* como vacuna terapéutica en sujetos. Esto indujo una respuesta inmunitaria inflamatoria tan grave en algunos individuos con la enfermedad activa que algunos murieron. Conocido como el

15 fenómeno de Koch, esta reacción necrótica parece ser debida a la sobreproducción de numerosas citocinas proinflamatorias, pero en particular del TNF- $\alpha$ <sup>33</sup>. Este incidente obsesionó a los vacunólogos durante décadas, y creemos que los científicos han ignorado desde entonces el uso potencial de bacilos completos. Las *Mycobacterium* inactivadas completas se utilizarán en unas cantidades lo suficientemente bajas como para evitar una reacción inflamatoria desproporcionada y aun así desencadenar una fuerte respuesta inmunoprotectora.

20 En general, puede utilizarse cualquier tipo de procedimiento de inactivación siempre que el tratamiento deje a la población de bacterias incapaz de producir una infección productiva en el hospedador, preservando al mismo tiempo las estructuras antigénicas necesarias para desencadenar una respuesta productiva frente a la correspondiente micobacteria causante de la enfermedad. La preparación de micobacterias está normalmente incapacitada. Por

25 "incapacitada" en el contexto de una célula bacteriana incapacitada producida de acuerdo con la invención, se entiende que la célula bacteriana está en un estado de bacteriostasis irreversible. Aunque la bacteria conserva su estructura -- y por lo tanto conserva, por ejemplo, la inmunogenicidad, la antigenicidad y/o las interacciones receptor-ligando asociadas a una bacteria natural -- no es capaz de replicarse. En algunas formas de realización, es incapaz de replicarse debido a la presencia de un fago infeccioso en la célula bacteriana.

30 Un tipo de inactivación preferido es la irradiación gamma. Otros tipos de inactivaciones conocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, otros tipos de radiaciones (incluyendo la irradiación ultravioleta). En algunas formas de realización, para un uso no humano se inactiva > 70 %. En las formas de realización para uso humano se inactiva el 100 % de las células.

35 Sin desear ceñirnos a la teoría, se postula que la micobacteria irradiada con gamma es especialmente adecuada para su uso en las composiciones y los métodos de la invención. Las bacterias irradiadas con gamma se usan habitualmente en el laboratorio debido a que son consideradas como seguras y no se replican. En muchos ensayos se ha demostrado no obstante que desencadenan una respuesta inmunoprotectora, incluyendo respuestas desencadenadas por antígenos sobre la pared de los bacilos<sup>34,35,36</sup>. Además, las micobacterias irradiadas con

40 gamma experimentan una apoptosis y son engullidas por las células dendríticas. Las células dendríticas presentan los antígenos de las micobacterias a los linfocitos T, que activan los linfocitos citotóxicos CD4 Th1 y CD8. Las *M tb* irradiadas con gamma también pueden inducir la liberación de óxido nítrico<sup>34</sup> y desencadenar unas respuestas similares de los Th2 frente a la *M tb* viva<sup>35</sup>. En 1963, Nishihara y col. inyectaron intradérmicamente *M tb* irradiadas con gamma en ratones y averiguaron que era tan protectora como la BCG inyectada intradérmicamente frente a la

45 exposición a un aerosol con *M tb*<sup>37</sup>.

Se cree que la administración de las bacterias irradiadas o de los antígenos bacterianos en el pulmón y en la frontera de mucosa facilita una respuesta inmunitaria eficaz en el hospedador. Tras la administración en la mucosa nasal o en las vías alveolares, las bacterias o los antígenos bacterianos son detectados por las células

50 presentadoras del antígeno, específicamente por las células dendríticas en el espacio alveolar / intersticial del pulmón. Estas células dendríticas migran entonces a las regiones enriquecidas en linfocitos T CD4+ y CD8+ indiferenciados y que constituyen la zona paracortical de los nódulos linfáticos regionales del pulmón. Estos linfocitos T son activados por los antígenos de los bacilos muertos. Las micobacterias muertas serán fagocitadas por los macrófagos.

55 En general, en la composición y en los métodos de la divulgación puede usarse cualquier especie o cepa de micobacteria que sea miembro del complejo de *M. tuberculosis*. Algunas especies adecuadas de micobacteria que son miembros del complejo de *M tb* incluyen, por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium tuberculosis*. Las *Mycobacterium* que son genéticamente similares incluyen

60 *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium marinum*. La especie o la combinación de especies en particular se eligen según la especie hospedadora correspondiente y el tipo de enfermedad asociada a *Mycobacterium* que se va a tratar. Otras micobacterias que causan enfermedades en seres humanos incluyen, por ejemplo, *Mycobacterium avium* intracelular, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacteria paratuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium chelonae*,

65 *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium farcinogenes*, *Mycobacterium flavum*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium senegalense*,

*Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium thermoresistibile* y *Mycobacterium xenopi*.

La micobacteria que se van a usar en la composición farmacéutica incluye células completas.

##### 5 Preparación de las composiciones farmacéuticas

Las células inactivadas se preparan para su administración a un hospedador mediante la combinación de células inactivadas o de lisados celulares con un portador farmacéuticamente aceptable, para formar una composición farmacéutica. El portador puede ser, por ejemplo, tal como solución salina fisiológica, aceite mineral, aceites vegetales, carboximetil celulosa sódica acuosa o polivinilpirrolidona acuosa. En algunas formas de realización, el portador es lo suficientemente puro como para ser administrado terapéuticamente a un sujeto humano. Los expertos con pericia en la técnica pueden preparar fácilmente soluciones adecuadas mediante el uso de, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer-lactato. Según sea necesario, pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Una persona experta en el campo familiarizada con los protocolos, las formulaciones, las dosis y la práctica clínica asociados con, por ejemplo, la administración de BCG de *M. bovis*, puede además adaptar fácilmente estos protocolos para su uso con las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Las vacunas se administran de una forma compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz e inmunógena. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se vaya a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmunitario del individuo de establecer una respuesta inmunitaria, y del grado de protección deseado. Los intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de principio activo por vacunación, con un intervalo preferido de entre aproximadamente 0,1 µg y 1.000 µg, tal como en el intervalo de desde aproximadamente 1 µg hasta 300 µg, y especialmente en el intervalo de desde aproximadamente 10 µg hasta 50 µg. Los regímenes adecuados de administración inicial y de dosis de recuerdo son también variables, pero están tipificados por una administración inicial, seguida de inoculaciones posteriores y otras administraciones. Por lo tanto, la vacuna puede ser administrada en una única dosis o en una pluralidad de dosis. En una forma de realización, la vacuna puede ser administrada en dos dosis separadas aproximadamente 1 - 12 meses. El sujeto puede ser vacunado en cualquier momento, aunque se prefiere administrar la vacuna poco antes (óptimamente entre aproximadamente 10 días y dos semanas) de periodos de estrés anticipado, tal como durante el embarque u otro transporte. También se contempla que la vacuna pueda ser administrada a animales preñados antes del parto para aumentar la producción del calostro hiperinmune.

Una composición puede administrarse sola o junto con otros tratamientos o vacunas estándar de BCG, tanto simultánea como secuencialmente dependiendo de la afección que se vaya a tratar. La composición puede ser administrada después de una vacunación con BCG y actuar por lo tanto como una vacuna de refuerzo de tuberculosis. Además, puede ser administrada después de una inoculación subcutánea inicial de los bacilos inactivados completos, seguida de un refuerzo intranasal o mucosal.

Las células inactivadas pueden ser incorporadas en micropartículas o en microcápsulas para prolongar la exposición del material antigénico en el sujeto animal, y proteger por tanto al animal frente a la infección durante periodos prolongados de tiempo. Las micropartículas y las cápsulas pueden estar formadas por diversos materiales inertes biocompatibles bien conocidos, mediante el uso de las técnicas convencionales en la técnica. Algunos materiales de matriz adecuados incluyen, por ejemplo, polímeros naturales o sintéticos tales como alginatos, ácido poliláctico, ácido poliláctico / glicólico, policaprolactona, policarbonatos, poliamidas, polianhídridos, poliortoésteres, poliacetales, policianoacrilatos, poliuretanos, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, poliestirenos, cloruro de polivinilo, fluoruro de polivinilo, polivinilimidazol, poliolefinas clorosulfonadas, óxido de polietileno, y particularmente agar y poliácridatos. Algunos ejemplos de las técnicas de incorporación de materiales en micropartículas o de encapsulación que pueden usarse en este documento las describen Sparks<sup>38</sup>, Kydonius<sup>39</sup> y El-Nokaly<sup>40</sup>.

Las micobacterias inactivadas pueden estar contenidas en pequeñas partículas suspendidas en el agua o en una solución salina. Las formulaciones de vacuna también pueden contener adyuvantes, agentes antibacterianos u otros agentes farmacéuticamente activos opcionales, como es convencional en la técnica. Algunos adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan, a sales, emulsiones (incluyendo composiciones de aceite / agua), saponinas, formulaciones liposómicas, partículas víricas, polipéptidos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS), compuestos basados en ácidos nucleicos u otras formulaciones que utilizan ciertos antígenos. Algunos adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, alum, adyuvante incompleto de Freund, o adyuvante incompleto de Freund con aceites, siendo particularmente preferido el adyuvante incompleto de Freund. Otros adyuvantes incluyen agentes tales como hidróxido o fosfato de aluminio (alum), complejos inmunoestimulantes (ISCOMs), polímeros sintéticos de azúcares (CARBOPOL®), agregación de la proteína de la vacuna por tratamiento térmico, agregación mediante la reactivación con tratamiento con anticuerpos (Fab) tratados con pepsina contra la albúmina, mezcla de células bacterianas, tales como *C. parvum*, o también pueden emplearse endotoxinas o componentes lipopolisacáridos de bacterias gramnegativas, emulsión en vehículos oleosos fisiológicamente aceptables tales como monooleato de manida (Aracel A) o emulsión con una solución al 20 por ciento de un perfluorocarbono (Fluosol-DA) usado como bloque sustituto.

La micobacteria inactivada puede estar contenida en un adyuvante de toxina bacteriana mucosal tal como la toxina lábil de *Escherichia coli* (LT) y la toxina colérica (CT), o en un oligodesoxinucleótido de CpG (CpG ODN)<sup>41</sup>. Se averiguó que otro posible adyuvante mucosal, el Monofosforil lípido A (MPL), un derivado y una forma menos tóxica del LPS, cuando se combina con liposomas, induce respuestas inmunoprotectoras en la mucosa<sup>42</sup>. Se ha demostrado que un nuevo adyuvante diseñado para la vacunación nasal, Eurocine L3<sup>TM</sup>, induce una inmunidad a largo plazo frente a la TB en modelos animales experimentales después de una administración intranasal<sup>43-45</sup>. La tecnología del adyuvante consiste en una formulación farmacéutica no tóxica basada en una combinación de lípidos endógenos y farmacéuticamente aceptados. La vacuna puede incluir opcionalmente sustancias inmunomoduladoras adicionales tales como citocinas o inductores sintéticos del IFN- $\gamma$  tales como poli I:C solos o junto con los adyuvantes mencionados anteriormente.

Otros adyuvantes más incluyen micropartículas o microesferas de materiales de matriz biocompatibles. Las micropartículas pueden estar formadas por cualquier material de matriz biocompatible como es convencional en la técnica, incluyendo, pero no se limitan a, agar y poliacrilatos. El profesional experto en la técnica reconocerá que también pueden usarse otros portadores o adyuvantes. Por ejemplo, el Chitosan o cualquier sistema de administración bioadhesivo que puede usarse, son descritos por Webb y Winkelstein <sup>46</sup> cuyo contenido está incorporado como referencia en este documento.

La composición farmacéutica que contiene la micobacteria inactivada está formulada preferiblemente para una administración intranasal o intrapulmonar mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. La formulación de la micobacteria irradiada combinada con el adyuvante se elige preferiblemente para minimizar los efectos secundarios, tales como la inflamación, asociados a la vacunación, o pueden mejorar la estabilidad de la formulación. El adyuvante también puede tener el papel de inmunoestimulante o como un *depot*.

En algunas formas de realización, la micobacteria inactivada es administrada mediante el procesamiento de un nebulizador o a través de tres tipos de dispositivos compactos portátiles, el inhalador dosificador (MDI) y el inhalador de polvo seco (DPI). La administración intranasal puede producirse a través de un pulverizador nasal, un dispositivo nasal de administración de gotas o dosificador de fármaco. La micobacteria inactiva puede ser administrada a través de un inhalador dosificador. Normalmente, únicamente se deposita en el pulmón el 10 - 20 % de la dosis emitida. La alta velocidad y el gran tamaño de partícula del aerosol provoca que aproximadamente el 50 - 80 % del fármaco del aerosol impacte en la región orofaríngea.

La micobacteria puede estar contenida en una formulación en polvo seco, tal como, pero no se limita a, un sistema portador de azúcar. El sistema portador de azúcar podría incluir lactosa, manitol y/o glucosa. La lactosa, el manitol y la glucosa están todos aprobados por la FDA como portadores. También hay partículas de azúcar mayores, tales como lactosa monohidratada, normalmente de 50 - 100 micrómetros de diámetro, que permanecen en la nasoorofaríngea pero permiten que los bacilos inactivados viajen a través del árbol respiratorio de los alvéolos <sup>47</sup>.

Si se desea, la micobacteria puede estar contenida en una formulación liposómica. Los liposomas, como otras partículas inhaladas que reaccionan en los alveolos, son eliminados por los macrófagos. El procesado, la captación y el reciclado de los fosfolípidos liposómicos se produce a través del mismo mecanismo que el del tensioactivo endógeno, a través de las células alveolares de tipo II.

Una composición farmacéutica que contiene la micobacteria irradiada descrita anteriormente es administrada a un individuo adecuado para la prevención o el tratamiento de la tuberculosis. La referencia en este documento a "tuberculosis" incluye la referencia a tubérculos pulmonares y extrapulmonares. Los términos "individuo", "sujeto", "hospedador" y "paciente" se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren a cualquier sujeto con una infección bacteriana susceptible de tratamiento mediante el uso de la vacuna terapéutica de la invención, y para quienes se desea el tratamiento o la terapia. La composición farmacéutica puede ser preparada para cualquier hospedador mamífero que sea susceptible de ser infectado por micobacterias. Algunos hospedadores mamíferos adecuados incluyen, por ejemplo, animales de granja tales como ganado porcino y bovino.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se usan en este documento para referirse de forma general a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una estabilización o una cura parcial o completa de una enfermedad y/o de un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", según se usa en este documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto, particularmente en un sujeto mamífero, más particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o del síntoma en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o al síntoma pero que todavía no ha sido diagnosticado como tal; (b) inhibir el síntoma de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; o aliviar el síntoma de la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o del síntoma (c) prevenir la reactivación de la enfermedad en la TB latente, es decir, prevenir que los bacilos pasen de una fase latente a una fase en crecimiento. Por lo tanto, la administración es preferiblemente en una "cantidad profilácticamente eficaz" o en una "cantidad terapéuticamente eficaz" (como puede ser el caso, aunque la profilaxis puede ser considerada una terapia), siendo esto suficiente para mostrar un beneficio en el individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el desarrollo temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y de la

gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosis, etc., es responsabilidad de los profesionales generales y de otros médicos o veterinarios.

5 El sujeto tratado con la vacuna tendrá o desarrollará normalmente una inmunidad protectora frente a una bacteria infecciosa. El término "inmunidad protectora" significa que una vacuna, una composición inmunógena o un programa de inmunización que es administrado a un mamífero induce una respuesta inmunitaria que previene, retrasa el desarrollo o reduce la gravedad de una enfermedad que está causada por una bacteria patógena, o disminuye o elimina completamente los síntomas de la enfermedad. Por "bacteria infecciosa" se entiende una bacteria que tiene una infección establecida en el hospedador, y que, como resultado, puede estar asociada con una enfermedad o síntoma no deseable. Generalmente, las bacterias infecciosas son bacterias patógenas.

15 La expresión "en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria" significa que hay una diferencia detectable entre un indicador de respuesta inmunitaria medido antes y después de la administración de una preparación de vacuna o de una composición inmunógena en particular. Los animales a los que se les administra la vacuna en el ensayo serán probados frente a animales a los que se les administra la BCG intradérmicamente (como estándar de referencia). Varias semanas después de la última vacunación, los animales serán expuestos a un aerosol virulento de *M. tb*. Se evaluará la respuesta inmunitaria clínica y molecular varias semanas después de la exposición a la *M. tb* virulenta.

20 Cribado y desarrollo de vacunas contra la tuberculosis

25 Una vacuna de prueba puede ser cribada u optimizada sometiendo a una población de células de micobacterias, o a fracciones de las mismas (como se ha descrito anteriormente), a diversos regímenes de inactivación, preparando una composición farmacéutica candidata que contenga las células o las fracciones celulares tratadas, y ensayando la capacidad de la composición tratada mediante el uso de los métodos descritos anteriormente, de desencadenar una respuesta inmunitaria y/o de establecer una exposición eficaz frente a la infección por micobacterias en un hospedador.

30 Los términos "composición bacteriana inmunógena", "composición inmunógena" y "vacuna" se usan de forma intercambiable en este documento para significar una preparación capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria celular y/o humoral en un sujeto cuando es administrada en una cantidad suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria frente a los epítomos presentes en dicha preparación.

35 La potencia inmunógena de la molécula antigénica expresada por la preparación de células o extractos celulares de micobacterias puede ser determinada monitorizando la respuesta inmunitaria de los animales de prueba después de la inmunización con las bacterias que expresan al antígeno recombinante. Los animales de prueba pueden incluir ratones, cobayas, conejos, bóvidos, primates no humanos, y finalmente, sujetos humanos.

40 La respuesta inmunitaria del sujeto de prueba puede ser adicionalmente analizada mediante diversas metodologías tales como: (a) la producción de citocinas asociadas a los linfocitos T (b) la producción de citocinas plasmáticas (c) los perfiles de proliferación de linfocitos T, la citotoxicidad, los perfiles de citocinas (d) el repertorio de antígenos de los linfocitos T (e) los perfiles reguladores de los linfocitos T (f) los perfiles de ARNm (g) los perfiles de inmunidad innata (h) los perfiles de anticuerpo (i) la genética y (j) la protección frente a la enfermedad y/o la mitigación de los síntomas de la infección en los animales inmunizados.

45 Referencias:

1. Organización Mundial de la Salud. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning Financing. Informe de OMS de 2002. Ginebra, Suiza: WHO, 2002.
- 50 2. Fine, PE. Variation on protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 1995; 346: 1339 - 1345
3. Organización Mundial de la Salud. 2001. WHO-vaccine preventable diseases: monitoring system. Resumen global de 2000. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
4. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, y col. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 1999; 284 (5419): 1328 - 1334
- 55 5. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato - Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, y col. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2006; 103 (8): 2869 - 2873
6. Gallichan W S y Rosenthal KL. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. Journal of Experimental Medicine 1996.; 184: 1879
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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 y 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.
- 10 13. Barclay WR, Busey WM, Dalgard DW, Good RC, Janicki BW, Kasik JE, Ribí E, Ulrich CE, Wolinsky E. Protection of Monkeys against Airborne Tuberculosis by Aerosol Vaccination and Bcillus Calmette-Guerin. *American Review of Respiratory Disease.* 1973; 107: 351 - 358.
14. Buddle BM, Keen D, Thomson A, Jowett G, McCarthy 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 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
- 20 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.
- 25 20. Orme, IM y 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.
- 30 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, Zgani - acz 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
- 35 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
- 40 26. Gartner T, Baeten M, Otieno S, Revets H, Baetselier PD, Huygen K. Mucosal prime-boost vaccination for tuberculosis based on TLR triggering Oprl 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.* 21 de enero de 2008; 205 (1): 105 - 15. Epub del 24 de diciembre de 2007
- 45 28. Gagliardi MC, Lemassu A, Teloni R, Mariotti S, Sargentini V, Pardini M, Daffé M, Nisini R. Cell wall-associated alfa-glucan is instrumental for Mycobacterium tuberculosis to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte. *Cell Microbiol.* Agosto de 2007; 9 (8): 2081 - 92. Epub del 17 de abril de 2007.
- 50 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.* 1 de julio de 2003; 171 (1): 175 - 84.
30. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, y col. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC - 1 and CD1 in tuberculosis. *Nature Medicine* 2003; 9 (8): 1039 - 1046
- 55 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, Berlín, Alemania, 1882> *Review of Infectious Diseases* (1982) 4 (6): 1270 - 1274
- 60 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.
- 65 35. Pereira RMS, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MCV, Sarno EN, Sampaio EP, Lopez UG. Mycobacterium leprae induces NF-kB-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.
- 5 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*, tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York, (1981) volumen 15, páginas 470 - 493
39. *Controlled Release Technologies: Methods, Theories, and Applications*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1980
- 10 40. *Polymeric Delivery Systems, Properties and Applications*, ACS Symposium Series 520, American Chemical Society, Washington, D.C., 1993
41. Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvantes. *Vaccine* 2005; 23 (15): 1804 - 1813
42. Childers NK, Miller KL, Tong G, Llarena JC, Greenway T, Ulrich JT y col. Adjuvante activity of monofosforil lipid A for nasal and oral immunization with soluble or liposome-associated antigen. *Infection and Immunity* 2000; 68: 5509 - 5516
- 15 43. M. Haile, B. Hamasur, T. Jaxmar, D. Gavier-Widen, M. A. Chambers y B. Sánchez y col., Nasal boost with adjuvanted heat-killed BCG or arabinomannan-protein conjugate improves primary BCG-induced protection in C57BL/6 mice, *Tuberculosis (Edimburgo)* 85 (2005), páginas 107 - 114.
44. M. Haile, U. Schroder, B. Hamasur, A. Pawlowski, T. Jaxmar y G. Kallenius y col., Immunization with heat-killed Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin (BCG) in Eurocine L3 adjuvante protects against tuberculosis, *Vaccine* 22 (2004), páginas 1498 - 1508
- 20 45. B. Hamasur, M. Haile, A. Pawlowski, U. Schroder, A. Williams y G. Hatch y col., Mycobacterium tuberculosis arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis, *Vaccine* 21 (2003), páginas 4081 - 4093
46. *Basic & Clinical Immunology*, Stites y col. (ed.), quinta edición, Lange Medical Publications, Los Altos, California, 1984, páginas 282 - 285
- 25 47. Labires NR, Dolovich MB. Pulmonary drug administration. Parte II: The role of inhalant administration devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2003; 56: 600 - 612.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) inactivada completa, en la que dicha composición está formulada para una administración intranasal, mucosal o intrapulmonar a un hospedador mamífero, y en la que dicha composición comprende una dosis inmunológicamente protectora cuando es administrada a dicho hospedador, y en la que dicha *M. tb* está inactivada con irradiación.
- 10 2. Una composición que comprende *M. tb* inactivada completa para su uso en la vacunación de un mamífero frente a la Tuberculosis (TB), en la que dicha vacunación de dicho mamífero es intranasal o intrapulmonar, y en la que dicha composición comprende una dosis inmunológicamente protectora cuando es administrada a dicho hospedador, y en la que dicha *M. tb* está inactivada con irradiación.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el 100 % de dichas *M. tb* están inactivadas.
- 20 4. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha irradiación es una radiación gamma.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente lisados de células de *Mycobacterium*.
- 25 6. La composición de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria en dicho hospedador.
7. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 8. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición está liofilizada.
9. Un aerosol o un envase de pulverizador que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 1.
- 35 10. La composición de la reivindicación 7 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha composición es para su uso profiláctico o terapéutico en dicho mamífero.
- 40 11. Un método para la preparación de una composición farmacéutica, que comprende la formulación de una dosis inmunológicamente protectora de una *M. tb* inactivada completa para su administración intranasal o pulmonar a un hospedador mamífero, y en el que dichas *M. tb* están inactivadas por irradiación.
12. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria en dicho hospedador sin provocar una inflamación debilitante.
- 45 13. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, para su uso simultáneo o secuencial con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG).
- 50 14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 - 8 o 10, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 - 5, 7, 10, 12 o 13, el envase de pulverizador de aerosol de acuerdo con la reivindicación 9, o el método de acuerdo con la reivindicación 11, en los que la dosis de *M. tb* es de entre 0,1 y 50 microgramos.
- 55 15. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 o 14, o la composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 10, 12 o 13, el envase de pulverizador de aerosol de acuerdo con la reivindicación 9 o 14, o el método de acuerdo con la reivindicación 11 o 14, en los que la composición se proporciona liofilizada.
16. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 - 8, 10, 14 o 15 o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 - 5, 7, 10, 12, 13, 14 o 15, el envase de pulverizador de aerosol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9, 14 o 15, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 14 o 15, en los que el mamífero es un ser humano.