

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 556**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

A61K 31/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2012 PCT/EP2012/050080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12093137**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2012 E 12700624 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2661253**

54 Título: **Formulación de liposomas adecuada para tratar o prevenir la tuberculosis**

30 Prioridad:

04.01.2011 EP 11150072

30.09.2011 EP 11183487

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

01.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CARDONA IGLESIAS, PERE-JOAN;
AMAT RIERA, ISABEL;
REYES MORENO, BLANCA;
SELGA PÉREZ, ARIADNA y
AMAT FABREGAT, MERCÉ**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 631 556 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

Formulación de liposomas adecuada para tratar o prevenir la tuberculosis

5 **Introducción y antecedentes de la técnica****Campo de la invención**

10 La presente invención proporciona formulaciones de liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, así como suspensiones y composiciones farmacéuticas que comprenden estas formulaciones y su uso respectivo en un método de tratamiento, particularmente para tratar o prevenir la tuberculosis. La formulación de esta invención contiene sacarosa y/o tiene un tamaño de partícula promedio menor que los agentes a base de liposomas convencionales de la terapia contra la tuberculosis, dando como resultado una mayor biodisponibilidad y eficacia.

15

Antecedentes de la técnica

20 La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica producida por los bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), que incluye las especies de *Mycobacterium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*. La principal característica distintiva de la envoltura celular micobacteriana es la pared celular gruesa y cerosa. Las propiedades de la barrera de pared celular también contribuyen a la supervivencia intracelular del organismo actuando como modulador directo en las reacciones inmunológicas entre el huésped y los bacilos del MTB-C. La envoltura consiste en dos partes distintas, la membrana plasmática y, alrededor de ella, la pared. La pared celular es un esqueleto formado por una estructura unida covalentemente de peptidoglicano, con un polisacárido de cadena ramificada, el arabinogalactano, unido por enlaces fosfodiéster. Los extremos distales de arabinogalactano se esterifican con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaños y estructuras únicas para las micobacterias.

25

30 Según la Organización Mundial de la Salud, se registran 9.000.000 de nuevos casos de personas que manifiestan la enfermedad mundialmente cada año y aproximadamente 2.000.000 de personas mueren. Se considera que hay más de 2.700.000.000 de personas infectadas mundialmente y que se generan 90 - 100 millones más de nuevas infecciones cada año.

30

35 En el estado de la técnica se describen diversas vacunas contra la tuberculosis basadas en fragmentos de pared celular de cepas virulentas o avirulentas de *Mycobacterium*. La vacuna que se usa actualmente en el tratamiento preventivo contra la tuberculosis se basa en bacterias de la cepa denominada BCG (Bacillus Calmette-Guerin), una variante atenuada de *M. bovis*. También se sabe que el adyuvante usado en la composición de la vacuna puede influir enormemente en la eficacia de la misma.

35

40 Los micolatos de trehalosa, particularmente dimicolato de trehalosa, son los lípidos más bioactivos en extractos de *M. tuberculosis*, que inducen una cascada proinflamatoria que influye en la formación de granulomas. Debe indicarse que no existen datos bibliográficos sobre la cantidad de estos compuestos presentes en la pared celular de *M. tuberculosis*. Cualquier muestra derivada de estas especies tiene una alta complejidad biológica. Por tanto, para realizar análisis cuantitativo, se requerirían etapas de purificación agresivas, complejas y largas, dando como resultado cantidades demasiado bajas del compuesto purificado como para realizar análisis estructurales adicionales. Este es el motivo por el que no existen datos publicados sobre el porcentaje exacto de cada compuesto en la pared celular de *M. tuberculosis*. Varios glicolípidos son constituyentes típicos de células de MTB-C, tales como lipoarabinomano. El lipoarabinomano está asociado con la virulencia de MTB-C.

45

50 E. Ribí *et al.*, 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 Bacillus Calmette Guerin (BCG) avirulenta y aceite mineral. Dichos fragmentos se obtienen mediante homogeneización de un cultivo de dicha cepa en aceite mineral. La composición es más eficaz que la vacuna (BCG) convencional. No obstante, en el mismo artículo se describe que los fragmentos de pared celular no inducen ninguna respuesta inmunitaria cuando se obtienen mediante homogeneización en agua y en ausencia del aceite mineral.

55

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

60

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

65

E.M. Agger *et al.*, Scand. J. Immunol., 2002, 56, páginas 443 a 447, describen vacunas que comprenden fragmentos de pared celular de la cepa H37Rv virulenta, que son eficaces cuando incluyen el surfactante catiónico bromuro de dimetil dioctadecilamonio como adyuvante. 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 de ratón.

I.M. Orme Vaccine, 2006, 24, páginas 2 a 19, que es un artículo de revisión de vacunas contra la tuberculosis, describe que la vacuna a base de Bacillus Calmette-Guerin (BCG) convencional es esencialmente ineficaz en la protección de personas adultas contra la tuberculosis.

Los individuos que pueden beneficiarse de un tratamiento o profilaxis en relación con la tuberculosis pueden agruparse en los siguientes cuatro subgrupos:

(I) Individuos que no están expuestos a la enfermedad. La vacunación profiláctica puede prevenir la infección de tales individuos.

(II) Individuos que están expuestos a la enfermedad pero no infectados todavía. La prueba de tuberculina en la piel (TST) es negativa. La profilaxis primaria puede prevenir la infección de tales individuos.

(III) Individuos con tuberculosis latente que no están enfermos. El riesgo del brote de la enfermedad puede reducirse aplicando quimioterapia. La quimioterapia también proporciona la ventaja de que estos individuos básicamente dejan de ser fuentes de alto riesgo de la infección.

(IV) Individuos que están enfermos, es decir que padecen la enfermedad, normalmente con formas primarias de la enfermedad, pero poco o nada contagiosa. La quimioterapia evita que estos individuos lleguen a ser contagiosos.

Una vez que ha empezado la infección, el estado de la técnica describe diversos tratamientos para defender el desarrollo de tuberculosis activa en individuos infectados, es decir individuos con tuberculosis latente.

Por ejemplo, en la solicitud de patente EP2196473 A1, se describe que, para tratar la tuberculosis en individuos infectados, pueden administrarse diversos fármacos a aquellos que todavía no han desarrollado la enfermedad así como aquellos que ya han desarrollado la enfermedad, incluyendo isoniazida, durante un tiempo que se extiende durante varios meses.

En la solicitud de patente ES 2231037 A1 se describe el uso de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos celulares de una cepa virulenta de complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tuberculosis en individuos infectados en combinación con otros fármacos, como isoniazida o rifampicina. Esta solicitud de patente también da a conocer un método para la preparación de un agente inmunoterápico que comprende fragmentos de pared celular de una cepa de MTB-C.

Tal como se explica resumidamente en el documento WO 2010/031883 A1, la transmisión de la infección por tuberculosis latente se produce principalmente a través de la respiración de aerosoles infectados con *M. tuberculosis*. Por tanto, las personas en contacto directo con pacientes que padecen tuberculosis pulmonar, y que por tanto son capaces de diseminar aerosoles infectados, tales como personas que viven juntas o tienen cualquier otro tipo de contacto intenso o frecuente entre ellas, se consideran un grupo de riesgo.

Actualmente, la profilaxis primaria de la infección que se administra normalmente a individuos del grupo I (tal como se indicó anteriormente) es una quimioprofilaxis primaria basada en la administración diaria de isoniazida en una dosis de 5 mg/kg sin exceder 300 mg/día. Este tratamiento está indicado en todos los individuos de cualquier edad que son negativos para TST, que viven juntos y/o tienen cualquier otro tipo de contacto cercano con individuos infectados. En este caso, es necesario mantener la quimioprofilaxis durante tres meses tras haber cesado el contacto con la fuente infecciosa o tras haber dejado de ser infecciosa la fuente. Sin embargo, la quimioprofilaxis puede conducir en algunos casos a efectos secundarios no deseados, tal como se describe por Martínez *et al.*, Arch. Bronchoneumol., 2005, 41(1), páginas 27-33.

Los medicamentos que comprenden fragmentos de una cepa del complejo de *M. tuberculosis* (MTB-C) virulenta se han descrito por ejemplo en los documentos EP1690549 B1, EP2090318 A1 y PCT/ES2009/000436. Los documentos EP2090318 A1 y PCT/ES2009/000436 divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo de *M. tuberculosis* (MTB-C) virulenta para el uso como medicamento adecuado para la prevención profiláctica de la tuberculosis, opcionalmente en combinación con otros fármacos. Por otro lado, el documento EP1690549 B1 divulga composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de tuberculosis, que comprenden fragmentos de MTB-C, opcionalmente en combinación con otros fármacos.

Se ha notificado en la solicitud de patente EP 2090318 A1 que la administración de un fármaco que comprende un agente basado en fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C es capaz de inducir una respuesta que genera interferón- γ de tipo Th1 contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Dichos antígenos incluyen

5 Ag85B y Ag85A, que son parte del complejo Ag85, que consiste en una familia de proteínas de bajo peso molecular que desempeñan un papel decisivo en la biosíntesis de la pared celular y se producen en cantidades considerables cuando el cultivo bacteriano está en la fase de crecimiento logarítmico (log). Se ha notificado adicionalmente en el documento EP 2090318 A1 que la vacuna a base de Bacillus Calmette-Guerin (BCG) convencional no genera una respuesta inmunoprotectora contra antígenos del complejo Ag85. La producción de interferón- γ por los linfocitos específicos tiene un papel clave: permite que los macrófagos infectados detengan el crecimiento de los bacilos (North & Young, Ann. Rev. Immunol., 2004, 22:599-623).

10 La Organización Mundial de la Salud ha reconocido que el riesgo de desarrollo de tuberculosis (TB) se estima que es entre 20-37 veces mayor en personas que viven con VIH que entre aquellas sin infección por VIH. Se proporciona una visión general en "Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with VIH in resource-constrained settings" directrices de la OMS 2011, ISBN: 978 92 4 150070 8). Sin embargo, la terapia preventiva con isoniazida no es una vacunación que proporcionaría una protección duradera para individuos positivos para VIH. En vez de eso, es necesario administrar la isoniazida regularmente, y la resistencia a la isoniazida corrobora esta terapia. Por tanto, sigue habiendo la necesidad de proporcionar tratamientos preventivos y terapéuticos más potentes para sujetos humanos positivos para VIH.

Objeto de la invención

20 El objeto de la presente invención es la provisión de un agente mejorado adecuado para prevenir o tratar la tuberculosis, tal como en la profilaxis de tuberculosis latente, profilaxis primaria y/o el tratamiento de tuberculosis latente o activa, en sujetos tanto positivos para VIH como negativos para VIH. Un objeto adicional es la provisión de una cepa de MTB-C adecuada para la preparación del agente. El procedimiento para preparar el agente es un objeto adicional de esta invención.

25

Definiciones

"FCMtb" significa fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C)

30 "Tamaño de partícula" se refiere a, si no se especifica otra cosa, el diámetro de las partículas. Cuando el tamaño de partícula no puede determinarse exactamente, significa el tamaño de partícula aproximado.

"Promedio z" es el tamaño de partícula promedio, que puede determinarse tal como se describe en la sección de material y métodos.

35

Abreviaturas

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
40 BCG	Bacillus Calmette-Guérin
UFC	Unidad formadora de colonias
DP	Producto terminado
45 DS	Principio activo
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
50 ELISPOT	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos
EMEA	Agencia Europea de Medicamentos
55 FCMtb	Fragmentos de células de <i>M. tuberculosis</i>
FIM	Primero en el hombre
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
60 IFN- γ	Interferón gamma
IGTIP	Institut per a la Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol
PEI	Producto en investigación clínica
65 IPC	Controles en procedimiento

	LCS	Suspensión de concentrado de liposomas
5	LTBI	Infección por tuberculosis latente
	LPS	Lipopolisacárido
	Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
10	Mtb	Complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	NZB	Negro de Nueva Zelanda
15	NZW	Blanco de Nueva Zelanda
	PPD	Derivado de proteína purificada
	c.s.	Cantidad suficiente
20	TB	Tuberculosis
	TST	Prueba en la piel para tuberculosis
25	OMS	Organización Mundial de la Salud
	p/v	peso/volumen
	p/p	peso/peso

30 **Sumario de la invención**

En general, la invención proporciona formulaciones de liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) (FCMtb) y un agente de formación de liposomas.

35 La presente invención proporciona:

1. Una formulación de liposomas que comprende:

40 (a) fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C),

(b) un agente de formación de liposomas,

45 (c) del 1 al 20 % (p/v) de sacarosa, preferiblemente del 2 al 12 % (p/v) de sacarosa, más preferiblemente del 3 al 8 % (p/v) de sacarosa, y lo más preferiblemente del 4 al 6 % (p/v) de sacarosa,

en la que el tamaño promedio z de las partículas es de 120 nm o menos, en la que el tamaño promedio z se determina mediante dispersión de luz dinámica.

50 El tamaño promedio z de las partículas, tal como se determinó por ejemplo mediante dispersión de luz dinámica, es de 120 nm o menos, preferiblemente 110 nm o menos, más preferiblemente 95 nm o menos, y lo más preferiblemente 80 nm o menos. La formulación de liposomas comprende del 1 al 20 % (p/v) de sacarosa, preferiblemente del 2 al 12 % (p/v) de sacarosa, más preferiblemente del 3 al 8 % (p/v) de sacarosa, y lo más preferiblemente del 4 al 6 % (p/v) de sacarosa.

55 En una realización particular la formulación de liposomas descrita anteriormente tiene un tamaño de partícula promedio z en el intervalo de desde 40 hasta 120 nm, preferiblemente desde 50 hasta 110 nm, más preferiblemente desde 55 hasta 95 nm, y lo más preferiblemente desde 55 hasta 80 nm.

60 En una realización particular alternativa el tamaño de partícula promedio de la formulación de liposomas descrita anteriormente puede ser más pequeño, de modo que la formulación de liposomas sea una emulsión, es decir en esta realización particular el tamaño promedio z de las partículas está preferiblemente por debajo de 40 nm.

65 En una realización preferida de una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, la formulación de liposomas es una formulación de liposomas, en la que el índice de polidispersidad de las partículas es 0,4 o menos, preferiblemente 0,3 o menos.

En una realización más preferida de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta.

5 Se prefiere además que en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la proporción de (a): los fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) y (b) el agente de formación de liposomas, sea de entre 0,01:1 y 1:1, preferiblemente entre 0,06:1 y 0,1:1.

10 En una realización más preferida de cualquiera de lo descrito anteriormente, la formulación de liposomas comprende adicionalmente: (d) un agente tensioactivo. En una realización incluso más preferida, la formulación de liposomas que comprende (d) el agente tensioactivo, es una formulación de liposomas, en la que la proporción entre (a) y (d) es de entre 0,1:1 y 10:1 (p/p), preferiblemente 0,5:1 y 2:1 (p/p), y lo más preferiblemente entre 0,6:1 y 0,8:1 (p/p).

15 En una realización particular de lo descrito anteriormente, el agente de formación de liposomas de la formulación de liposomas es un fosfolípido, preferiblemente lecitina, más preferiblemente uno seleccionado del grupo que consiste en lecitina de huevo o lecitina de soja, y lo más preferiblemente lecitina de soja, cada uno de las cuales puede hidrogenarse, hidrogenarse parcialmente o no hidrogenarse.

20 En una realización preferida de la formulación de liposomas que contiene surfactante, el agente tensioactivo se selecciona de colato, desoxicolato, colesterol y hemisuccinato de colesterol.

En una realización más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente es una formulación de liposoma, en la que los fragmentos de células MTB-C son o comprenden fragmentos de pared celular.

25 En otra realización más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente comprende fragmentos de la cepa CNCT 13536 de MTB-C, que se depositó en 2010 en el CNCT (Centro Nacional de Cultivos Tipo) en Londres. Esta cepa se denomina de manera sinónima 511, de modo que los nombres CNCT 13536 y 511 pueden usarse de manera intercambiable.

30 En una realización incluso más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente comprende al menos dos, preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro, lo más preferiblemente todos de los siguientes:

(i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, similar a una huella de masas de proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),

35 (ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa, similar a una huella de masas de proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934),

40 (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, similar a una huella de masas de proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv 1866c), y

(iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, similar a una huella de masas de proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y

45 (v) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa, similar a una huella de masas de proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv3875).

50 En una realización aún más preferida, la formulación de liposomas comprende un lipopolipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa, similar a una huella de masas de precursor LpqH de antígeno de lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 3763).

55 Incluso más preferiblemente, la formulación de liposomas descrita anteriormente se caracteriza además porque al menos uno de los siguientes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, o fragmento del mismo, está presente: HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B. En este sentido un fragmento es cualquier parte, tal como por ejemplo un producto de degradación, de cualquiera de estos polipéptidos.

60 En una realización más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente contiene lípidos que se encuentran normalmente en *Mycobacterium tuberculosis* o derivados del mismo, tales como productos de conjugación como lípidos conjugados con azúcar. Se prefiere además que estén comprendidos uno o más de ácidos micólicos, que pertenecen preferiblemente a uno cualquiera o más de los tipos I, III o IV. Alternativamente o además, un micolato conjugado con azúcar, preferiblemente dimicolato de trehalosa puede estar comprendido en la formulación. Alternativamente o además, se prefiere además que al menos un glicolípido derivado de MTB-C esté presente en la formulación de liposomas según la presente invención, y un glicolípido preferido es liporabinomano.

65 La formulación de liposomas descrita anteriormente puede comprender adicionalmente uno o más surfactantes, que es/son preferiblemente del grupo de surfactantes no iónicos.

En una realización adicional preferida la formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores comprende adicionalmente una o más sales o disolución de las mismas, mediante lo cual la sal preferida es cloruro de sodio.

5 En una realización incluso más preferida de cualquiera de lo anterior la formulación de liposomas de esta invención está liofilizada.

10 La invención también proporciona una suspensión, en la que la formulación de liposomas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores se reconstituye en un disolvente. En una realización preferida, el disolvente de esta suspensión es acuoso, y preferiblemente es o comprende suero fisiológico.

15 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposomas tal como se describió en una cualquiera o más de las realizaciones anteriores, o la suspensión tal como se describió en una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, y un portador o diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, mediante lo cual puede usarse cualquier sustancia adecuada como portador, diluyente o excipiente. En una realización preferida de la misma, esta composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

20 La invención también proporciona un producto para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Es decir, proporciona la formulación de liposomas según una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, la suspensión según una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En una realización particular, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para inyección. En otra realización particular, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención de la tuberculosis. Estas realizaciones particulares pueden conseguirse individualmente o en combinación.

30 En una realización más particular, la invención proporciona la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica según lo que se describió anteriormente en relación con el uso de la misma en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia, caracterizado además porque es para su administración al cuerpo humano en una dosis que comprende de 1 a 1000, preferiblemente de 3 a 250, más preferiblemente de 4 a 80, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5, de aproximadamente 25 o de aproximadamente 50 µg/dosis de FCMtb.

35 En tres realizaciones más particulares (a) a (c), la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica según lo que se describió anteriormente en relación con el uso de la misma en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia es (a) para su uso en un método de prevención de la tuberculosis activa en individuos con una infección por tuberculosis latente, (b) para su uso en un método de profilaxis primaria de la tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que han estado expuestos a la enfermedad, pero no se han infectado todavía, o (c) para su uso en un método de tratamiento o prevención de la tuberculosis latente.

45 En una realización preferida de la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica anterior para el uso de la misma en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia es su uso en terapia de combinación o terapia adyuntiva. La terapia adyuntiva es una terapia adicional o secundaria combinada con un tratamiento primario que aumenta la eficacia en el tratamiento de un estado. Una realización particular de terapia de combinación es una en la que la terapia de combinación comprende un antibiótico, preferiblemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, mediante lo cual la ansamicina es lo más preferiblemente rifampicina. En una realización particular de la presente invención, la terapia adyuntiva se administra a un sujeto humano positivo para VIH, y se prefiere una única dosis de 25 µg de FCMtb.

50 La divulgación en el presente documento también proporciona un procedimiento para preparar cualquiera de los agentes, que son la formulación de liposomas, la suspensión o la composición farmacéutica.

55 La divulgación en el presente documento proporciona además la cepa CNCT 13536 de MTB-C, depositada en 2010 en el CNCT en Londres.

Descripción detallada de la invención

60 La invención proporciona formulaciones de liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) (FCMtb) y un agente de formación de liposomas.

65 A menos que se especifique específicamente otra cosa, el término "que comprende" se usa en el contexto de la presente solicitud para indicar que pueden estar presentes elementos adicionales opcionalmente además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". Sin embargo, se contempla como realización específica de la presente invención que el término "que comprende" abarque la posibilidad de que no estén presentes miembros adicionales, es decir con el propósito de esta realización "que comprende" ha de entenderse como que tiene el

significado de “que consiste en”.

La descripción detallada divulga variantes específicas y/o preferidas de las características individuales de la invención. La presente invención también contempla como realizaciones particularmente preferidas aquellas realizaciones que se generan combinando dos o más de las variantes específicas y/o preferidas descritas para dos o más de las características de la presente invención.

En general se acepta que un procedimiento de liposomación genera un entorno lipídico, que facilita la solubilidad y conduce a una suspensión de sustancias, tales como FCMtb. Los liposomas dentro del significado de esta invención pueden ser unilamelares, multilamelares o combinaciones de los mismos.

FCMtb puede ser de cualquier tipo de sustancia derivada de la cepa de MTB-C, mediante lo cual se prefieren fragmentos derivados de proteínas y/o lípidos. FCMtb dentro del sentido de esta solicitud es normalmente una mezcla de diferentes lípidos y antígenos proteicos de células de MTB-C. Los fragmentos celulares pueden obtenerse por cualquier método conocido por el experto en la técnica, adecuado para fragmentar células microbianas o bacterianas, tales como específicamente células de MTB-C, por ejemplo homogeneización. La homogeneización puede llevarse a cabo por medio de sonicación con ultrasonidos, o por medio del uso de pequeñas perlas de aproximadamente 0,1 mm de diámetro, por ejemplo, perlas de sílice o circon/sílice, junto con un homogeneizador mecánico. Un homogeneizador mecánico que puede usarse, por ejemplo, es el modelo BeadBeater® de BioSpec. Las células de MTB-C se rompen por medio de este procedimiento de homogeneización, de modo que se obtienen pequeños fragmentos celulares, que incluyen normalmente pequeños fragmentos de pared celular. Una característica normalmente relevante de la fabricación de los fragmentos celulares es la “destoxificación” de los fragmentos de pared celular mediante deslipidación, que conoce bien el experto en la técnica, un procedimiento que permite retirar las moléculas de tipo endotoxina. Por tanto, FCMtb se destoxifica preferiblemente y se pasteuriza, la formulación de liposomas obtenida es entonces estéril y está libre de endotoxinas. La dispersión de fragmentos celulares en tampón puede liofilizarse opcionalmente para facilitar el almacenamiento de los mismos. A tal fin, la dispersión puede distribuirse en viales y liofilizarse a una temperatura de entre -15 °C y -120 °C, tal como por ejemplo -45 °C y con un vacío, tal como de entre 0,1 y 0,5 mbar.

Los liposomas según esta invención tienen habitualmente una distribución de tamaño en la que al menos el 99,9 % (en número) son menores de 1 µm. En una realización particular, el tamaño promedio z de las partículas, tal como puede determinarse mediante dispersión de luz dinámica, es de 120 nm o menos, preferiblemente 110 nm o menos, más preferiblemente 95 nm o menos, y lo más preferiblemente 80 nm o menos. En la dispersión de luz dinámica el parámetro promedio z se considera un número estable e importante que puede obtenerse mediante la técnica, y el número de tamaño que se usa preferiblemente para propósitos de control de calidad. Preferiblemente, los liposomas de la formulación según esta invención son monomodales, es decir muestran solo un pico en mediciones de dispersión de luz dinámica. Más preferiblemente, los liposomas de la formulación según esta invención son esféricos, tal como puede someterse a prueba mediante microscopio electrónico de preparaciones de fracturación por congelación de la formulación de liposomas, tal como se muestra en el ejemplo 9. Esférico significa de ese modo que para al menos el 90 % de las partículas de liposomas (en número), todos los puntos de superficie de las partículas individuales tienen una distancia similar o idéntica al centro del liposoma, es decir el radio mínimo de una partícula de este tipo se refiere al radio máximo de la misma partícula en una proporción de 0,6 o más, 0,7 o más, 0,8 o más o 0,9 o más. La formulación de liposomas según la presente invención puede comprender liposomas multilamelares o unilamelares, o una mezcla de los mismos. De conformidad con el conocimiento convencional del experto en la técnica, las mediciones de dispersión de luz dinámica deben realizarse en un tampón adecuado, es decir un tampón que no produzca por sí mismo alteración, disgregación o fusión de los liposomas o los desestabilice significativamente de cualquier otra manera físicamente. Como regla general, puede ser adecuado cualquier tampón siempre que tanto la fuerza iónica como el valor de pH sean comparables al tampón en el que se habían formado los liposomas. Preferiblemente, se usa un tampón de composición similar o idéntica al tampón en el que se habían formado los liposomas.

La formulación de liposomas comprende adicionalmente del 1 al 20 % (p/v) de sacarosa, preferiblemente del 2 al 12 % (p/v) de sacarosa, más preferiblemente del 3 al 8 % (p/v) de sacarosa, y lo más preferiblemente del 4 al 6 % (p/v) de sacarosa. Se prefiere particularmente el 5 % de sacarosa aproximadamente.

Es importante indicar que, mientras que cada una de estas realizaciones relativas, una relativa a un tamaño de partícula particular y la otra relativa a la presencia de sacarosa, pueden realizarse individualmente, estas realizaciones no tienen que considerarse como mutuamente exclusivas y pueden producirse bien en combinación.

En una realización particular, la formulación de liposomas descrita anteriormente tiene un tamaño de partícula promedio z en el intervalo de desde 40 hasta 120 nm, preferiblemente desde 50 hasta 100 nm, y más preferiblemente desde 55 hasta 95 nm, y más preferiblemente desde 55 hasta 80 nm. El tamaño de partícula promedio z se mide de ese modo preferiblemente mediante dispersión de luz dinámica, tal como se describió en general anteriormente y en detalle en la sección “Materiales y métodos”

En una realización particular alternativa, el tamaño de partícula promedio z de la formulación de liposomas descrita

anteriormente puede ser más pequeño, de modo que la formulación de liposomas sea una emulsión, es decir en esta realización particular el tamaño promedio z de las partículas está preferiblemente por debajo de 40 nm.

En una realización preferida de una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, los liposomas de la formulación según esta invención son además monodispersos, lo que significa que no se observa amplitud significativa de la distribución de tamaño. Esto se somete a prueba técnicamente mediante un índice de polidispersidad bajo (PDI) tal como se determina mediante dispersión de luz dinámica, tal como 0,4 o menos, preferiblemente 0,3 o menos. Por tanto, la formulación de liposomas es una formulación de liposomas, en la que el índice de polidispersidad de las partículas tal como puede determinarse mediante dispersión de luz dinámica es de 0,4 o menos, preferiblemente 0,3 o menos, y lo más preferiblemente 0,25 o menos.

Los fragmentos de la cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende un procedimiento anterior y un procedimiento posterior. Para propósitos ilustrativos, las cinco etapas principales se describen en el presente documento brevemente y los modos particulares de llevar a cabo el procedimiento se proporcionan en los ejemplos 2 y 3 más adelante.

Procedimiento anterior (ejemplo 2):

Etapas 1: cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Etapas 2: recogida de *Mycobacterium tuberculosis* y congelación de extracto en bruto

Procedimiento posterior (ejemplo 3):

Etapas 3: fragmentación de células y deslipidación

Etapas 4: pasteurización

Etapas 5: secado por congelación (opcional)

En una realización más preferida de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta. Virulenta se refiere a la patogenicidad por caso y/o la capacidad de los bacilos para invadir los tejidos del huésped. La cepa virulenta puede ser cualquier cepa virulenta de cualquiera de las especies que pertenecen a MTB-C, pero se prefiere una cepa que pertenece a *M. tuberculosis*. La cepa de MTBC según esta invención puede cultivarse mediante inoculación en medios de cultivo bien conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo Middlebrook 7H10 o agar 7H11, medio de Sauton o medio de Proskauer-Beck. El cultivo de la cepa virulenta se realiza preferiblemente a lo largo de un periodo de tiempo prolongado, tal como, por ejemplo, un periodo igual a o mayor de tres semanas, comprendido preferiblemente entre 3 y 4 semanas. La temperatura del cultivo se mantiene preferiblemente entre 34 °C y 38 °C. Una vez que termina el cultivo, se recogen las células y se aíslan usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.

El agente de liposoma de la formulación de liposomas es preferiblemente un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. El fosfolípido usado puede ser o comprender, por ejemplo: fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidil-inositol. Lo más típico es fosfatidilcolina, que puede sintetizarse o aislarse de una variedad de fuentes naturales. Preferiblemente el agente de formación de liposomas es o comprende lecitina, seleccionada del grupo que consiste en lecitina de huevo y lecitina de soja. La lecitina de soja es una mezcla compleja de fosfolípidos que incluye entre otros fosfatidilcolina, y se prefiere particularmente. Lípidos típicos que también pueden estar comprendidos en la formulación, o bien como el propio agente de formación de liposomas, o bien como componente adicional, son: fosfato de dicetilo (DCP), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilcolina (PC) y/o fosfatidilserina (PS), mediante lo cual el respectivo lípido puede estar hidrogenado, hidrogenado parcialmente o no hidrogenado. Los liposomas pueden formarse usando técnicas y lípidos auxiliares convencionales que conoce bien el experto en la técnica, tales como los descritos en la solicitud de patente ES2231037-A1.

Se prefiere además que en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la proporción de (a): los fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) y (b) el agente de formación de liposomas, sea de entre 0,01:1 y 1:1, preferiblemente entre 0,06:1 y 0,1:1. En una realización más preferida de cualquiera de lo anterior, la formulación de liposomas comprende adicionalmente: (d) un agente tensioactivo. Generalmente, pueden usarse todos los tipos de agentes que son capaces de cambiar el valor de tensión superficial como agente tensioactivo en el sentido de esta invención, pero se excluyen los compuestos que se encuentran en la definición del agente de formación de liposomas dada anteriormente. El experto en la técnica conoce diversos tipos de agente tensioactivos y pueden usarse en la formulación de liposomas según la presente invención. Tal como conoce el experto en la técnica, los agentes tensioactivos son generalmente productos químicos con una estructura polar-no polar. Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, los agentes tensioactivos tienen generalmente

tendencia a localizarse en la superficie de las partículas, creando de ese modo una capa monomolecular sobre la superficie de contacto que reduce el valor de tensión superficial. Los agentes tensioactivos también se denominan surfactantes o agentes activos de superficie. En una realización preferida de la formulación de liposomas que contiene surfactante, el agente tensioactivo se selecciona de esteroides y derivados de los mismos, tales como colesterol, y/o sales biliares o derivados de las mismas, tales como colato. Realizaciones particularmente preferidas son aquellas en las que el agente tensioactivo se selecciona de colato, desoxicolato, colesterol y hemisuccinato de colesterol. Un modo bueno, pero no limitante de llevar a cabo la invención es cuando los liposomas de la formulación comprenden tanto lecitina derivada de soja como colato de sodio.

En una realización incluso más preferida, la formulación de liposomas que comprende (d) el agente tensioactivo, es una formulación de liposomas, en la que la proporción entre (a) y (d) es de entre 0,05:1 y 3:5 (p/p). Pueden usarse diversos tipos de agentes de formación de liposomas, tal como conoce bien el experto en la técnica.

Los liposomas pueden contener opcionalmente aditivos que mejoran su estabilidad, por ejemplo: vitamina E, que se cree que actúa como antioxidante de lípidos.

En una realización más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente es una formulación de liposomas, en la que los fragmentos de células MTB-C son o comprenden fragmentos de pared celular.

Puede usarse cualquier cepa que pertenece a MTBC, y preferiblemente cualquier cepa que pertenece a *Mycobacterium tuberculosis*. En otra realización más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente comprende fragmentos de la cepa CNCT 13536 de MTB-C, que se depositó en 2010 en el CNCT en Londres (ejemplo 1). Otra cepa que puede usarse, y cuyos fragmentos pueden estar comprendidos por tanto en la formulación de liposomas, se denomina H37Rv, que, por ejemplo, puede obtenerse de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (CNCT), Londres, Gran Bretaña (número de depósito NC007416) y que los investigadores usan a menudo en este campo. También es posible que se use más de una cepa, es decir que la formulación de liposomas comprenda fragmentos de diversas, tales como dos, tres, o más de tres cepas.

Considerando los aproximadamente 4000 supuestos antígenos de *M. tuberculosis*, es imposible analizar un principio activo para todas estas proteínas. No obstante, se ha mostrado que determinadas proteínas MTB-C son relevantes para la respuesta inmunitaria deseada. Estas cinco bandas de proteínas tienen tamaños aproximados de 6, 10, 30, 38 y 70 kDa (Renshaw, *et al.*, 2005, EMBO Journal 24, 2491-2498; Singh, *et al.*, 2005, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12(2), 354-358). Por tanto, en una realización incluso más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente comprende al menos dos, preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro, y lo más preferiblemente todos de los siguientes:

(i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el primer polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),

(ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el segundo polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934),

(iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el tercer polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv 1866c), y

(iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el cuarto polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y

(v) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el quinto polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv3875).

En una realización aún más preferida de la misma, la formulación de liposomas comprende además un lipopolipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el lipopolipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de precursor LpqH de antígeno de lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 3763). La banda respectiva puede visualizarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como tinción con plata. Los investigadores de la presente invención encontraron sorprendentemente que este polipéptido induce una alta respuesta humoral de IgG total, que puede ser la respuesta humoral más alta entre todos los antígenos en la formulación.

En el ejemplo 4, se proporcionan ejemplos de cómo pueden identificarse los polipéptidos o lipopolipéptidos.

Incluso más preferiblemente, la formulación de liposomas descrita anteriormente se caracteriza además porque en al menos uno de los siguientes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, o fragmento de los mismos, está presente: HSP70, proteína de 38 kDa, Ag85B, y lo más preferiblemente al menos uno de HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B.

En este sentido, fragmento es cualquier parte, tal como por ejemplo un producto de degradación, de cualquiera de estos polipéptidos. Son posibles diversas maneras de obtención de tales fragmentos, por ejemplo hidrólisis química o enzimática, mediante lo cual no es relevante si la fragmentación se había producido intencionadamente o no, antes de la formación de liposomas o después. Se prefiere que el fragmento respectivo pueda asignarse a su origen respectivo, tal como, por ejemplo, mediante superposición sustancial en la secuencia de aminoácidos, tal como al menos 5, al menos 10, al menos 20 aminoácidos consecutivos.

Los fragmentos según la presente invención se obtienen preferiblemente a partir de crecimiento de bacilos en condiciones estresantes de inanición, bajo oxígeno y bajo pH. El bajo oxígeno se debe al crecimiento de las bacterias sobre placas que se cierran en bolsas herméticas durante el periodo de crecimiento, que es por ejemplo de 21 días, lo que conduce a un entorno microaerobio. El bajo pH se explica tal como sigue: al inicio del cultivo el valor de pH es de 7,0 - 6,8, y al final, tras normalmente 21 días de cultivo, el valor de pH es de 6,4 - 6,5). En estas condiciones, el metabolismo de las bacterias es más lento, lo que conduce a un crecimiento estacionario. Se entiende que esto hace que los bacilos sean más resistentes al estrés. En tales condiciones los bacilos cultivados desarrollan características similares a bacilos latentes *in vivo* en ITBL (infección por tuberculosis latente). Se espera por tanto que los antígenos presentes en FCMtb desencadenen una nueva respuesta inmunitaria contra los antígenos de los bacilos latentes, es decir los denominados antígenos "estructurales", así como aquellos asociados a respuestas al estrés.

Se reconoce desde hace tiempo que los glicolípidos micobacterianos tienen actividad inmunomoduladora, especialmente la inducción de respuestas granulomatosas y que ejercen efectos de tipo adyuvante potentes. Por tanto, en una realización más preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente contiene lípidos que se encuentran normalmente en *Mycobacterium tuberculosis*, o derivados de los mismos, tales como productos de conjugación como lípidos conjugados con azúcar. Se han identificado varios componentes lipídicos inmunogénicos en muestras de *M. tuberculosis* (Brennan, Tuberculosis (Edimburgo), 2003, 83(1-3), 91-97) y se han desarrollado métodos analíticos para su determinación (electroforesis, SDS-PAGE, cromatografía en capa fina). Aunque el aislamiento de cada componente lipídico requeriría un tratamiento tan agresivo que son difíciles de obtener datos cuantitativos o porcentajes de cada componente que puede detectarse en el extracto de MTB-C o en la formulación de liposomas, la caracterización cualitativa servirá para caracterizar una realización adicional preferida de esta invención. Según esta realización adicional preferida, están comprendidos uno o más de ácidos micólicos, que pertenecen preferiblemente a uno cualquiera o más de los tipos I, III o IV. Alternativamente o además, un micolato conjugado con azúcar, preferiblemente dimicolato de trehalosa puede estar comprendido en la formulación. Alternativamente o además, un lipoarabinomano de glicolípidos (LAM) puede estar comprendido en la formulación. Además la naturaleza multiantigénica de los fragmentos (mezcla de proteínas multiantigénicas más lípidos, en lugar de antígenos purificados solos) se cree que es una ventaja y por tanto el experto en la técnica puede adaptar el proceso de fragmentación celular de modo que permita la mezcla de antígenos celulares óptima.

La homogeneización de las células de MTB-C se lleva a cabo en presencia de uno o más surfactantes, preferiblemente un surfactante no iónico. Por tanto, la formulación de liposomas descrita anteriormente puede comprender adicionalmente uno o más de tales surfactantes. Un gran número de tales surfactantes están dentro del conocimiento convencional de un experto en la técnica. Preferiblemente, el surfactante no iónico usado se selecciona del grupo que consiste en etoxilatos de alquifenol y etoxilatos de éster de sorbitano. Más preferiblemente, el surfactante no iónico se selecciona del grupo de etoxilatos de octilfenol. Incluso más preferiblemente, se usan etoxilatos de octilfenol con un contenido en óxido de etileno comprendido entre 7 y 8 moles, surfactantes que pueden encontrarse en el mercado con el nombre de Triton X-114®. 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. Puede usarse por ejemplo centrifugación a diferentes velocidades y lavado con disolución tampón tal como se describió en la solicitud de patente ES2231037-A1. El sedimento que contiene los fragmentos de pared celular se obtiene tras realizar los procedimientos de purificación mencionados. Dicho sedimento se dispersa en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se somete a un tratamiento convencional para garantizar la inactivación completa de las células de MTB-C que pueden haber permanecido viables tras el procedimiento de purificación y fragmentación. El tratamiento mencionado puede ser un procedimiento químico, por ejemplo por medio de tratamiento con formaldehído, o un procedimiento físico, por ejemplo por medio de tratamiento con autoclave o pasteurización. Más adelante en el ejemplo 5 se proporcionan ejemplos de caracterización de lípidos.

En una realización adicional preferida, la formulación de liposomas descrita anteriormente comprende adicionalmente una o más sales o disolución/disoluciones de la misma, mediante lo cual la sal preferida es cloruro de sodio.

En una realización incluso más preferida de cualquiera de las anteriores, la formulación de liposomas se seca por congelación. Los liposomas pueden someterse a liofilización para obtener así el agente inmunoterapéutico en forma

de liposomas liofilizados. A tal fin, la dispersión puede distribuirse en viales y liofilizarse a baja temperatura, tal como entre -15 °C y -120 °C, tal como por ejemplo -45 °C y con un vacío, tal como entre 0,1 y 0,5 mbar. Los viales obtenidos tras la liofilización contienen la formulación de liposomas adecuada como agente inmunoterapéutico y pueden almacenarse preferiblemente a muy bajas temperaturas, por ejemplo a -70 °C.

La invención también proporciona una suspensión, en la que la formulación de liposomas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores se reconstituye en un disolvente. En una realización preferida, el disolvente de esta suspensión es acuoso, más preferiblemente y lo más preferiblemente es o comprende suero fisiológico. Los métodos de suspensión de formulaciones de liposomas en un disolvente los conoce bien el experto en la técnica. Es una propiedad particularmente ventajosa de la formulación según esta invención que puede suspenderse más rápido que formulaciones de liposomas convencionales que comprenden fragmentos de MTB-C (véase el ejemplo 9).

Un objeto de la invención es la provisión de un agente que comprende fragmentos de pared celular de una cepa de MTB-C para la preparación de una composición farmacéutica, mediante lo cual el agente es o comprende la formulación de liposomas descrita anteriormente en cualquiera de las realizaciones descritas o combinaciones de las mismas. El principal alcance de la formulación farmacéutica/formulación galénica del principio activo es obtener una suspensión eficaz y suficientemente estable como para que las células puedan reconocerla bien y que tenga el potencial para desencadenar una respuesta inmunitaria celular relevante en un cuerpo humano o animal. A tal fin, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposomas, o la suspensión tal como se describió en una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El experto en la técnica conoce diversos de tales portadores, excipientes y diluyentes, y no están limitados de ningún modo por esta divulgación. Más bien, puede usarse cualquier sustancia adecuada como portador, excipiente o diluyente. En una realización preferida, esta composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Adyuvante ha de entenderse de ese modo como una sustancia comprendida en esta realización de la invención, mediante lo cual el adyuvante es una sustancia que puede estimular el sistema inmunitario cuando se aplica a un cuerpo humano o animal en respuesta al antígeno diana, mediante lo cual el adyuvante no confiere por sí mismo inmunidad. Sin querer limitarse a ninguna sustancia adyuvante particular, realizaciones preferidas son en las que el adyuvante es una sal de aluminio, tal como cloruro de aluminio, o un aceite mineral o una composición que comprende aceite mineral, tal como adyuvante incompleto de Freund (IFA) o adyuvante completo de Freund (CFA), o un halogenuro de amonio, tal como un bromuro de amonio alquilado, tal como bromuro de dimetildiodecilaamónio.

La invención también proporciona un producto para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Es decir, proporciona la formulación de liposomas según una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, la suspensión según una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, o la composición farmacéutica según una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

El fármaco puede administrarse a una mucosa, por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, intestinal, vaginal, o mucosa del tracto urinario, o por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal. Se prefiere la administración parenteral. En una realización particular, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para inyección.

En otra realización particular, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o prevención de la tuberculosis. Estas realizaciones particulares pueden conseguirse individualmente o en combinación. Los inventores del presente estudio han encontrado que la formulación según la presente invención conduce a una respuesta inmunitaria celular aumentada y también controla el procedimiento de reinfección constante que puede producirse de lo contrario en la infección por tuberculosis latente, reforzando la inmunidad contra bacilos en crecimiento e induciendo inmunidad contra los bacilos que no se replican.

La dosis adecuada de la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica según lo que se describió anteriormente en relación con el uso de la misma en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia depende de varios parámetros, incluyendo el método de administración y el sujeto que va a tratarse. En una realización preferida, es para su administración al cuerpo humano. En una realización preferida de la misma, esto se produce en una dosis que comprende de 1 a 1000, preferiblemente de 3 a 250, más preferiblemente de 4 a 80, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5, aproximadamente 25 o aproximadamente 50 µg/dosis de FCMtb. Se prefiere particularmente una dosis de 25 µg.

En tres realizaciones más particulares (a) a (c), la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica según lo que se describió anteriormente en relación con el uso de la misma en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia es (a) para su uso en un método de prevención de la tuberculosis activa en individuos con una infección por tuberculosis latente. En una realización más particular alternativa, (b) para su uso en un método de profilaxis primaria de la tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que han estado expuestos a la enfermedad, pero no se han infectado todavía o (c) para su uso en un método de tratamiento o

prevención de la tuberculosis latente.

La formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso de la misma en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia puede administrarse en forma de una única dosis o de varias, tal como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco dosis, por medio de la repetición a determinados intervalos de tiempo. Preferiblemente se administran por separado dos dosis en un periodo comprendido entre 2 y 5 semanas, preferiblemente entre 3 y 4 semanas.

Los ejemplos 8, 10 y 12 son ejemplos de cómo la formulación de liposomas según esta invención puede aplicarse a sujetos humanos o animales.

Una realización preferida de la sustancia anterior es la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para su uso en terapia adyuntiva o de combinación. Los facultativos médicos usan la terapia adyuntiva frecuentemente para conseguir mejores velocidades de curación o una respuesta más rápida al tratamiento primario. Una terapia de combinación o terapia adyuntiva implica usar más de un medicamento para tratar el cuerpo humano o animal mediante terapia. Una primera realización particular de una terapia de combinación es una en la que la terapia de combinación comprende un antibiótico, preferiblemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, mediante lo cual la ansamicina es lo más preferiblemente rifampicina. Una segunda realización particular de la misma es cuando la terapia de combinación comprende otras vacunas profilácticas contra la tuberculosis, tales como las mencionadas en S.H.E. Kaufmann, *Nature Rev. Immunol.*, 2006, 6, páginas 699-704, tales como por ejemplo la vacuna de Bacillus Calmette-Guerin (BCG), vacunas de subunidades o vacunas de BCG recombinantes. La primera y segunda realización particular pueden combinarse.

En terapia de combinación o terapia adyuntiva, la administración de estas dos (o más) sustancias puede ser simultánea, o puede realizarse en dos (o más) inoculaciones por separado a lo largo del tiempo. El periodo entre las inoculaciones puede ser incluso a lo largo de varios años. En el caso de una terapia de combinación, inoculaciones por separado a lo largo del tiempo, en primer lugar se administra preferiblemente una vacuna profiláctica contra la tuberculosis, y posteriormente se administra el fármaco que comprende los fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C, que actúa como un agente de reestimulación (refuerzo) de la vacuna inoculada inicialmente. En una realización, sólo se administra una única dosis al sujeto humano, y esta dosis es preferiblemente de 25 µg de FCMtb.

Alternativamente, se emplean simultáneamente varias estrategias o tipos o cuidados de tratamiento diferentes en terapia adyuntiva. En una realización particular de la presente invención, se administra terapia complementaria a un sujeto humano con un sistema inmunitario deteriorado, tal como un individuo que padece VIH, o cualquier individuo propenso de otro modo a infección por tuberculosis y/o que necesita tal terapia. También puede administrarse isoniazida en la terapia adyuntiva. Además, la terapia adyuntiva puede comprender la administración de cualquier fármaco o combinación de fármacos para tratar el sistema inmunitario deteriorado, tal como para tratar la infección por VIH. Fármacos típicos para tratar infecciones por VIH son fármacos antirretrovirales, y puede encontrarse una visión general no limitativa en: "Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents Recommendations for a public health approach: 2010 revision", autores: Organización Mundial de la Salud, ISBN: 9789241599764.

Por tanto, los presentes inventores han proporcionado una solución para la necesidad de proporcionar una protección frente a la tuberculosis eficaz, tal como vacunación, a sujetos humanos positivos para VIH.

Si un individuo va a considerarse positivo para VIH o no (es decir, negativo para VIH) puede someterse a prueba mediante cualquier prueba que permita la detección de la presencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus que provoca el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en un fluido corporal del individuo que va a someterse a prueba, en el que el fluido corporal normalmente es uno cualquiera seleccionado de suero, saliva u orina. Tales pruebas pueden detectar anticuerpos, antígenos o ARN. Se proporciona una visión general de pruebas de examen adecuadas en Chou *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 5 de julio de 2005; 143(1):55-73.

Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que una única dosis de 25 µg de FCMtb administrada a un sujeto humano positivo para VIH proporciona una respuesta fuerte.

Una única dosis de 25 µg de FCMtb también era potente cuando se administraba a un sujeto humano negativo para VIH. Los presentes inventores mostraron que esto es particularmente útil en sujetos que padecen tuberculosis latente (ejemplo 12). Por tanto, es una realización preferida de la invención una única dosis de 25 µg de FCMtb que va a administrarse a un individuo positivo para VIH o negativo para VIH.

La divulgación en el presente documento también proporciona un método de fabricación, caracterizado porque es adecuado para obtener una formulación de liposomas según una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, así como de una suspensión, o una composición farmacéutica que comprende la misma. Un ejemplo no limitativo del mismo se proporciona como ejemplo 11 más adelante.

La divulgación en el presente documento proporciona además la cepa CNCT 13536 de MTB-C, depositada en 2010

en el CNCT en Londres. La cepa tiene un polimorfismo genético bajo. Por tanto, las formulaciones que comprenden fragmentos de CNCT 13536 tienen la ventaja de muy alta reproductibilidad debido al polimorfismo genético bajo.

Modo preferido de llevar a cabo la invención

5 Se prefiere que se usen dosis específicas de 50 µg de FCMtb/dosis, o 25 µg de FCMtb/dosis o 5 µg de FCMtb/dosis. Por ejemplo, cuando la dosis es de 50 µg de FCMtb, las cantidades/sustancias proporcionadas en la tabla 1 están presentes en un vial de la formulación:

COMPONENTES	UNIDAD POR VIAL	FUNCIÓN
PRINCIPIO ACTIVO		
FCMtb	66,7 µg	Inmunógeno
Componentes adicionales		
Sacarosa	20.000,0 µg	Sustancia de carga (secado por congelación) y crioprotector
Lecitina de soja ¹	845,8 µg	Agente de formación de liposomas
Colato de sodio	92,0 µg	Tensoactivo
Cloruro de sodio ²	20,8 µg	Disolvente
Caracterización de partícula		
Tamaño de partícula promedio z	75 +/- 20 nm	
Índice de polidispersidad	≤ 0,350	

¹ Que contiene fosfatidilcolina (94,0 % (p/p))

² Añadido como disolución de NaCl al 0,9 %.

Tabla 1.

15 Para la aplicación de 25 µg/dosis o 5 µg/dosis, se preparan otros viales, en los que todos los valores numéricos mostrados en la tabla 1, excepto sacarosa, han de dividirse entre el factor de 2 ó 10, respectivamente. El contenido de sacarosa en las formulaciones (50 µg, 25 µg y 5 µg) es siempre de 20.000 µg de unidades/vial.

20 Una formulación de liposomas elaborada de lecitina de soja (agente de formación de liposomas) altamente enriquecida con fosfatidilcolina (94,0 % (p/p)) y colato de sodio (agente tensioactivo) se ha mostrado que es adecuada para garantizar una mayor solubilidad del principio activo durante la fabricación así como en la suspensión reconstituida. Un parámetro importante para la estabilidad del FCMtb en la formulación de liposomas es la proporción de los componentes que constituyen el liposoma. Tras someter a prueba diferentes proporciones de FCMtb/componente lipídico, se estableció que una muy buena proporción es de aproximadamente 0,03:0,2:0,7 (FCMtb:colato de sodio:lecitina de soja, p/p/p). Se observó además que la formación de liposomas se mejoraba por la presencia de sales en la fase acuosa. Por tanto, se incluye cloruro de sodio en esta formulación particular.

Parámetro	Criterio de aceptación		Métodos de prueba	
Aspecto	Polvo blanco a blanquecino		Inspección visual	
Morfología de la torta	Plana a casi plana y homogénea		Inspección visual	
Uniformidad de dosificación	Uniformidad de masa (mg/vial)	21,02 ± 15 %	Pesada, método interno	
	Media de masa (mg/vial)	Masa ± 5 %	Pesada, método interno	
Contenido en agua (%)	≤ 3 %		Ensayo coulométrico de Karl Fischer, Ph. Eur. 2.5.12 (USP<921>)	
Contenido de proteína total de FCMtb	90-140 µg/mg de FCMtb		Ensayo BCA, Farmacopea Europea. 2.5.33 (USP <1057>)	
Tiempo hasta la reconstitución (s)	Bien reconstituido ≤10 s		Inspección visual	
pH	7-8		Potenciometría, Ph. Eur. 2.2.3 (USP<791>)	
Tamaño de partícula	Promedio z (nm) (índice de polidispersidad)		75 ± 20 (≤ 0,310)	Dispersión de luz dinámica Ph. Eur. 2.9.31
Potencia inmunogénica en modelo murino infectado por <i>M. tuberculosis</i>	Unidades formadoras de puntos de IFN-γ específico de antígeno	PPD	3-12 Proporción de UFP/10 ⁶ células con respecto al valor basal (valor basal en UFP/10 ⁸ células)	ELISpot
Perfil de proteínas	SDS-PAGE		Positivo para bandas: 70, 38, 30, 10, 6 kDa	Electroforesis mediante SDS-PAGE

	Inmunotransferencia de tipo Western	Positivo para HSP70 (Rv0350), 38 kDa (Rv0934), Ag85B (Rv1886c)	Inmunotransferencia de tipo Western
Esterilidad		Estéril	Farmacopea Europea 2.6.1 (USP<71>)
Endotoxinas bacterianas (UI/dosis)		≤ 10 UI/vial	Farmacopea Europea 2.6.14 método D (USP<85>)

Tabla 2: producto terminado (FCMtb), medido tras la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada

En un modo preferido la invención se lleva a cabo de manera que la formulación de liposomas según esta invención tiene las propiedades según la tabla 2.

Para su administración a sujetos vivos, puede reconstituirse el vial con 0,4 ml de agua para inyecciones para dar una suspensión que contiene 166,7 µg/ml de FCMtb.

La tabla 3 muestra la concentración de cada componente por vial tras la reconstitución a 50 µg/dosis. Para la aplicación de 25 µg/dosis o 5 µg/dosis, se usan otros viales, de modo que de conformidad con lo que se dijo anteriormente sobre la tabla 1, todos los valores numéricos mostrados en la tabla 3, excepto sacarosa, han de dividirse entre el factor de 2 ó 10, respectivamente. El contenido de sacarosa en las formulaciones (50 µg, 25 µg y 5 µg) es siempre de 50.000 µg/ml.

Componentes	Concentración por ml
PRINCIPIO ACTIVO	
FCMtb	166,7 µg/ml
EXCIPIENTES	
Sacarosa	50.000,0 µg/ml
Lecitina de soja	2.114,4 µg/ml
Colato de sodio	230,0 µg/ml
Cloruro de sodio	52,1 µg/ml

Tabla 3 concentración de componentes tras la reconstitución en 0,4 ml de agua para inyección

Materiales y métodos

Materiales de referencia

a) Anticuerpos monoclonales: se usan anticuerpos monoclonales específicos (anti-HSP70, anti-38kDa, anti-Ag85B, (de Lionex Diagnostic GmbH, Braunschweig, Alemania)) para la identificación del perfil de proteínas de lotes de FCMtb.

b) Patrón de albúmina: este patrón, usado para la determinación del contenido de proteína, se compone de albúmina bovina en solución salina al 0,9 % (2 mg/ml), conservada en azida de sodio (fabricante: Pierce).

c) 6,6'-dimicolato de trehalosa de patrón de *Mycobacterium tuberculosis* (TDM): se usa TDM disponible comercialmente (Sigma) para la identificación de TDM de lotes de FCMtb.

d) Ácidos micólicos de un patrón de *Mycobacterium tuberculosis*

Se usa un ácido micólico disponible comercialmente (Sigma) para la identificación de ácido micólico de lotes de FCMtb.

e) Marcador de peso molecular: se usa un marcador de peso molecular disponible comercialmente denominado patrón preteñido SeeBlue® Plus (Invitrogen).

Determinación de parámetros

a) pH

El pH de la suspensión reconstituida de FCMtb (20 mg/ml) se determina mediante potenciometría según la Farmacopea Europea 2.2.3 y USP<791>.

b) Contenido en agua

La prueba para la determinación de agua residual del FCMtb liofilizado se lleva a cabo usando equipos de Karl Fisher coulométricos, y sigue las indicaciones generales de la Farmacopea Europea, método 2.5.12, y USP <921> *Determinación de agua*.

5

c) *Determinación del contenido de proteína total*

La prueba para la determinación del contenido de proteína total del FCMtb se lleva a cabo usando un kit comercial (kit BCA, Pierce) y siguiendo la Farmacopea Europea, método 2.5.33, método 4 (ensayo de BCA o ácido bicinconínico) y USP <1057>.

10

d) *Identificación del perfil de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)*

La prueba se realiza según la Farmacopea Europea, método 2.2.31 y USP <726>; la detección de proteínas en el gel se realiza mediante una tinción de Coomassie adaptada o mediante tinción con plata. *Muestras de prueba*: reconstituir FCMtb en agua purificada a una concentración de 40 o 20 mg/ml. *Disoluciones de referencia*: marcador de peso molecular, antígenos purificados, patrón de referencia de FCMtb

15

Antígenos purificados
Proteína HSP70 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv 0350)
Proteína de 38 kDa de <i>M. tuberculosis</i> (Rv0934)
Proteína Ag85B de <i>M. tuberculosis</i> (Rv1886c)
Proteína de 19 kDa de <i>M. tuberculosis</i> (Rv 3763)
Proteína CFP10 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3874)
Proteína ESAT6 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3875)

20

Tabla 4: antígenos de referencia

Para la tinción de Coomassie, se usa disolución de reactivo Gel-Code Blue Stain (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Para la tinción con plata, se usa el kit PROTSIL1 de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western, se separan las proteínas mediante SDS PAGE según métodos conocidos convencionales en la técnica y entonces se transfieren electroforéticamente sobre una membrana PVDF para su inmunodetección usando anticuerpos monoclonales específicos. La interacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante incubación con un anti-anticuerpo que desencadena una reacción quimioluminiscente. Se usan antígenos de Lionex (Braunschweig, Alemania) (proteína HSP70 (70 kDa) de *M. tuberculosis*, proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, proteína Ag85B (30 kDa) de *M. tuberculosis* y anticuerpos monoclonales específicos anti-HSP70, anti-38kDa y anti-Ag85B de Lionex.

25

30

e) *Identificación de ácidos micólicos*

Se examinan los ácidos micólicos en FCMtb mediante CCF unidimensional, siguiendo la Farmacopea Europea, método 2.2.27. *Muestras de prueba*: FCMtb liofilizado, 40 mg. *Disoluciones de referencia*: patrón de ácido micólico (Sigma). Procedimiento:

35

40

a) Procedimiento de extracción: se extrae la muestra con cloroformo:metanol (1:1) y entonces se incuba durante la noche. Se elimina la fracción de sobrenadante.

45

b) Esterificación de ácido micólico: se añaden 2 ml de metanol:tolueno:ácido sulfúrico (30:15:1; vol/vol) en cada tubo, y se logra la esterificación durante la noche. Entonces, se añaden 4 ml de n-hexano. Se seca bajo flujo de nitrógeno y se resuspende con 500 µl de hexano.

c) CCF: se aplican 10 µl de cada muestra en una línea paralela al borde de la placa (gel de sílice 60 (20x20 cm) (Merck). La separación cromatográfica se realiza en un tanque saturado con una fase móvil (éter etílico:n-hexano (15:85, vol/vol)) tres veces. Entonces, se permite que se seque la placa en aire.

50

d) Se revelan los ácidos micólicos pulverizando las placas con una disolución de ácido fosfomolibdico en etanol de 96° y calentar a 120 °C durante 10 min.

Los ácidos micólicos en muestras de FCMtb se determinan por comparación con puntos de patrón comercial de ácido micólico. Los resultados se expresan como datos cualitativos (presencia (positivo)/ausencia (negativo) del ácido micólico evaluado.

55

f) *Identificación de 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM)*: muestras de prueba: FCMtb liofilizado, 40 mg. *Disoluciones de referencia*: patrón de TDM (Sigma). Procedimientos

(i) Procedimiento de extracción: se extrae la muestra con cloroformo:metanol (1:1; vol/vol) y entonces se incuba durante la noche. Se seca la fracción de sobrenadante bajo flujo de nitrógeno y se pesa. Finalmente, se resuspenden muestras secas en cloroformo a una concentración final de 40 mg/ml.

(ii) CCF: se aplican 10 µl de cada muestra en una línea paralela al borde de la placa (gel de sílice 60 (20x20 cm) (Merck). La separación cromatográfica se realiza en un tanque saturado con una fase móvil (cloroformo:metanol:agua (60:12:1; vol /vol). Entonces, se permite que se seque la placa en aire.

(iii) Detección: se revela el TDM pulverizando las placas con una disolución de antrona al 1 % en ácido sulfúrico y calentar a 120 °C durante 5 minutos.

(iv) Identificación: el TDM en las muestras de FCMtb se determina mediante comparación con TDM comercial que se usa para generar un punto patrón. Los resultados se expresan como datos cualitativos, es decir, presencia (positivo)/ausencia (negativo) del TDM evaluado.

g) *Identificación de lipoarabinomano (LAM)*: para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de LAM, se separan los compuestos mediante SDS PAGE según métodos convencionales y entonces se transfieren electroforéticamente sobre una membrana de nitrocelulosa para su inmunodetección usando anticuerpo específico CS35. La interacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante incubación con un anti-anticuerpo (colorante 800 CW para IR de IgG de cabra anti-ratón) que desencadena una reacción fluorescente.

h) *Esterilidad*

Todos los procedimientos que requieren esterilidad, según el conocimiento del experto en la técnica, se llevan a cabo en condiciones estériles; esto también se aplica aunque no se mencione explícitamente la esterilidad para cualquier etapa dada que requiera lo mismo. Se evaluó la prueba de esterilidad tal como se prescribe en la Farmacopea Europea 2.6.1 (USP <71>).

i) *Inactivación de micobacterias*

La inactivación de micobacterias se evaluó según la Farmacopea Europea 2.6.2

j) *Endotoxinas bacterianas*

La prueba para endotoxinas bacterianas (prueba LAL, lisado de amebocitos de *Limulus*) se realiza según las indicaciones generales de la Farmacopea Europea, método 2.6.14, siguiendo el método D (Método cinético cromogénico) así como USP <85>.

Fragmentación de los bacilos

La elección de fragmentación de los bacilos se piensa para permitir la presentación óptima de antígenos celulares, particularmente antígenos de pared celular. La fragmentación del FCMtb se determina mediante tanto dispersión de luz dinámica (tal como se describirá más adelante) como metodologías de difracción de láser. La difracción de láser permite medir la fragmentación en un intervalo entre 0,04 µm y 2000 µm. Se lleva a cabo el ensayo en los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona, España. Instrumentación: Coulter LS 13320 equipado con un módulo de líquido universal (MLU). Disolvente: agua purificada / aceite mineral. Resultados: representado como un histograma, que expresa la frecuencia relativa del número de partículas (%) con respecto al diámetro de partícula (0,04 µm - 2000 µm).

Determinación del tamaño de partícula promedio z e índice de polidispersidad

El tamaño de partícula promedio tal como se describió en este documento se determina mediante dispersión de luz dinámica (DLS), que se basa en el concepto físico del movimiento browniano de las partículas, definido en la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde:

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico

D = coeficiente de difusión translacional

k = Contante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

η = viscosidad

Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, la ecuación de Stokes-Einstein establece que las partículas suspendidas en un medio líquido están en movimiento constante y aleatorio, con una velocidad que depende de su tamaño: cuanto mayor es la partícula, más lento será el movimiento browniano.

En las mediciones de dispersión de luz dinámica, la muestra que contiene las partículas que van a medirse se ilumina con una fuente de luz monocromática, preferiblemente un láser, y se analiza en una función de correlación cómo la intensidad de luz dispersada fluctúa con el tiempo. Si, por ejemplo, están midiéndose partículas grandes, dado que se mueven lentamente, la intensidad de luz dispersada fluctúa lentamente, y la correlación tarda mucho tiempo hasta la degradación; por otro lado, si están midiéndose partículas pequeñas, dado que se mueven rápidamente, la intensidad de luz dispersada fluctúa rápidamente, y la correlación de la señal se degrada más rápidamente. Según esta invención, las partículas se miden preferiblemente con la siguiente instrumentación: Zetasizer nano zs (Malvern Instruments), usando agua purificada / aceite mineral como disolventes.

Si no se indica lo contrario, la instrumentación se usa según las instrucciones del fabricante, y el ajuste y la calibración, si es aplicable, también son según las instrucciones del fabricante.

El tamaño se calcula a partir de la función de correlación usando diversos algoritmos. En el presente caso, se aplica el 'análisis de cumulantes', tal como se define en la norma ISO13321 parte 8. La función de correlación se ajusta a los resultados en una única curva exponencial que permite el cálculo de los siguientes parámetros:

- El tamaño medio, o diámetro promedio z , de la distribución de partículas. Este tamaño medio es la media de la intensidad.

- El índice de polidispersidad (pdi), es decir correspondiente a la anchura de la distribución del tamaño de partícula.

Normalmente los resultados se representan gráficamente como un histograma, que expresa la frecuencia relativa del número de partículas (%) con respecto al diámetro de partícula que puede ser cualquier diámetro que esté comprendido en el intervalo desde 1 nm hasta 3 μm .

Pruebas de potencia

Se proporcionan ratones C57BL/6 hembra de 6-7 semanas de edad, libres de patógenos específicos por Harlan Iberica (España). Muestra de prueba: formulación de la tabla 3 y placebo (formulación de vacuna sin componente activo).

a) Modelo murino infectado con *M. tuberculosis in vivo* vacunado con una única dosis: el diseño experimental consiste en: día 0: infección subcutánea en el abdomen inferior de ratones con la cepa H37Rv Pasteur de Mtb (4×10^4 UFC). Día 14: tratamiento quimioproláctico de los animales con una única dosis oral de rifapentina (25 mg/kg) e isoniazida (10 mg/kg) conduciendo así a un efecto antibiótico de 1 semana. Día 21: vacunación con una única dosis de vacuna/placebo y/o H₂O por vía subcutánea en el cuello. Se obtienen todas las muestras y se analizan para ratones individuales. Cada experimento incluye: un grupo basal de ratones infectados más placebo y el grupo experimental de ratones infectados más vacunación. Los grupos consisten en 6-7 animales, y los experimentos se realizan por duplicado. Día 28: se anestesia a los animales con isofluorano.

b) Modelo murino infectado con *M. tuberculosis in vivo* vacunado con dos dosis: el diseño experimental consiste en: día 0: infección subcutánea en el abdomen inferior de ratones con la cepa H37Rv Pasteur de Mtb (4×10^4 UFC). Día 14: tratamiento quimioproláctico de los animales con una única dosis oral de rifapentina (25 mg/kg) e isoniazida (10 mg/kg) conduciendo así a un efecto antibiótico de 1 semana. Día 21: vacunación con una primera dosis de vacuna/placebo y/o H₂O por vía subcutánea en el cuello. Día 36: vacunación con una segunda dosis de vacuna/placebo y/o H₂O por vía subcutánea en el cuello. Se obtienen todas las muestras y se analizan para ratones individuales. Cada experimento incluye: un grupo basal de ratones infectados más placebo y el grupo experimental de ratones infectados más vacunación. Los grupos consisten en 6-7 animales, y los experimentos se realizan por duplicado. Día 42: se anestesia a los animales con isofluorano.

Para tanto a) como b) anteriores, tras el sacrificio, se realiza el análisis *ex vivo* del parámetro de unidades formadoras de puntos (UFP) de interferón- γ mediante ELISPOT usando suspensiones de células del bazo para determinar la respuesta inmunitaria celular.

Determinación de la potencia inmunogénica en modelo murino sano de *M. tuberculosis*. Se proporcionan ratones

C57BL/6 hembra de 6-7 semanas de edad, libres de patógenos específicos por Harlan Iberica (España). Modelo murino sano de *M. tuberculosis in vivo* vacunado con dos dosis. El diseño experimental consiste en: día 0: vacunación con una primera dosis vacuna según el modo preferido de llevar a cabo esta invención, o placebo y/o H₂O por vía subcutánea en el cuello. Día 21: vacunación con una segunda dosis de vacuna/placebo y/o H₂O por vía subcutánea en el cuello. Se obtienen todas las muestras y se analizan para ratones individuales. Cada experimento incluye: un grupo basal de ratones sanos más placebo y el grupo experimental de ratones sanos más vacunación. Día 28: se anestesia a los animales con isofluorano. Tras el sacrificio, se realiza el análisis de anticuerpos IgG mediante ELISA usando suero de ratón para determinar la respuesta inmunitaria humoral.

10 Diagnóstico de tuberculosis

El experto en la técnica conoce bien métodos para el diagnóstico de tuberculosis. La prueba de Quantiferon y la TST se sabe que suministran resultados fiables y pueden usarse solas o en combinación para clasificar sujetos por su idoneidad a someterse a terapia con el producto de la presente invención. QuantiFERON, también conocida como QFT, es una prueba disponible comercialmente para detectar infección por tuberculosis o tuberculosis latente, fabricada por Cellestis Limited, Chadstone, Melbourne, Victoria, Australia. QFT es un ensayo de liberación de interferón- γ (IGRA) usado en el diagnóstico de tuberculosis. Se usa según las instrucciones del fabricante. La prueba de Mantoux (también conocida como la prueba de examen de Mantoux, prueba de sensibilidad a la tuberculina, (prueba TST), prueba de Pirquet o prueba de PPD para derivado de proteína purificada) es una herramienta de diagnóstico para tuberculosis. Puede encontrarse una visión general de ambas pruebas en Franken *et al.*, Clin Vaccine Immunol. Abril de 2007; 14(4): 477-480.

Ejemplos:

25 Los ejemplos que se dan a continuación proporcionan al experto en la técnica un modo y explicación viables de algunas realizaciones específicas de la invención. Estos ejemplos tienen propósitos ilustrativos y no pretenden limitar en modo alguno el alcance de la invención.

30 Ejemplo 1: Aislamiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* CNCT 13536

El material de partida para la producción de FCMtb es un inóculo de la cepa CNCT 13536, denominado de manera sinónima 511 o *Mycobacterium tuberculosis* CNCT 13536, una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente inmunocompetente diagnosticado de tuberculosis pulmonar en Barcelona, España. Se depositó en 2010 en el CNCT en Londres, que es una organización de depósito oficial según el Tratado de Budapest. Adicionalmente se ha depositado la cepa por la colección de cepas del servicio de microbiología del Hospital de Sant Pau, Barcelona, España.

Se han realizado dos pases de la cepa original en los años 1995, y 1996 respectivamente. MSL PB#1 corresponde al segundo pase de la cepa original de *M. tuberculosis* CNCT 13536, que se realizó en octubre de 1996 dando como resultado 100 viales (viales de vidrio estéril de 3 ml) almacenados a -70 ± 5 °C. La cepa tiene un polimorfismo genético bajo, tal como se identificó mediante métodos convencionales en la técnica.

40 Ejemplo 2: Procedimiento anterior para la producción de células MTB-C

45 En la figura 1 se proporciona un diagrama de flujo de este procedimiento. El material de partida para la producción de FCMtb es un inóculo de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* CNCT 13536 (ejemplo 1). Para garantizar el suministro continuo de este material de partida, se usa preferiblemente un sistema de lotes de semillas. Por tanto, se usa un lote de semillas de trabajo (WSL) derivado de un lote de semillas maestro (MSL) para la producción de FCMtb. Se cultiva *Mycobacterium tuberculosis* CNCT 13536 (ejemplo 1) durante 3 - 5 semanas en medio de Löwenstein-Jensen. Entonces se subcultiva el crecimiento bacteriano en medios Proskauer Beck a 37 ± 2 °C con agitación a 100 ± 5 rpm. Una vez que se consigue la concentración bacteriana máxima (mediante inspección visual), se inicia un subcultivo en medios Proskauer Beck y se incuba. Cuando se consigue una concentración bacteriana similar, se toman pequeñas alícuotas. Se determina el recuento de bacterias viables mediante el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas en medio de agar Middlebrook tras la incubación a 37 ± 2 °C durante 3 - 4 semanas. El recuento de bacterias debe ser de $2 - 5 \times 10^7$ UFC/ml.

(1) Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

60 La producción de FCMtb comienza con la siembra de 0,2 ml de un WSL en una placa de agar 7H11 e incubación a 37 ± 1 °C durante 15 ± 2 días. Entonces, se transfieren las colonias a un tubo que contiene unas pocas de perlas de vidrio. Tras el mezclado, se añaden aproximadamente 5 ml de agua para inyección (WFI) para obtener una suspensión bacteriana. En este punto, se realizan un recuento en placa de viables y un ensayo de esterilidad. Se siembran aproximadamente 100 placas de agar Middlebrook 7H11 con *M. tuberculosis* usando hisopos empapados con la suspensión bacteriana para obtener cultivos confluentes. Se incuban las placas a 37 ± 1 °C durante 21 ± 2 días.

La prueba de esterilidad como control en procedimiento se realiza tal como sigue:

Las pruebas de esterilidad están dirigidas a garantizar la ausencia de hongos y bacterias distintos de micobacterias. Las pruebas se llevan a cabo mediante inoculación directa, siguiendo las condiciones descritas en Farmacopea Europea 2.6.1 para la prueba de esterilidad. Las muestras sometidas a prueba deben ser estériles. Se usa medio 7H11 en lugar de 7H10 (tal como se menciona en Farmacopea Europea 2.6.2). 7H11 se basa en medio 7H10 añadiendo un gramo de digesto pancreático de caseína con el fin de potenciar el crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

(2) Recogida de *Mycobacterium tuberculosis* y congelación de extracto en bruto

Tras el periodo de incubación, se controla la pureza del cultivo bacteriano mediante una inspección visual de las placas de agar y la realización de un ensayo de esterilidad. Entonces, se recoge el crecimiento bacteriano de las placas de agar y se transfiere a un tubo estéril. Se pesa el extracto en bruto obtenido (20-22 g). Se mantiene la mezcla a $-80\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.

Ejemplo 3: Procedimiento posterior para la producción de liposomas obtenidas del extracto en bruto

En la figura 2 se proporciona un diagrama de flujo de este procedimiento.

(3) Fragmentación de células y deslipidación

Se descongela el extracto en bruto congelado (ejemplo 2) a $37 \pm 1\text{ °C}$ y entonces se añade tampón PBS estéril con Triton-X114 al 4 % (p/p) (pH 7,0 -7,5) a 4 °C . Tras el mezclado, se transfiere posteriormente a un envase de policarbonato estéril que contiene perlas de circona/sílice estériles. Entonces, se lleva a cabo la fragmentación celular en un instrumento Beadbeater aplicando el siguiente método de fragmentación: 3 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en 5 periodos de ENCENDIDO/APAGADO más 10 minutos de pausa. Una vez que finaliza el procedimiento, se separa la fracción fragmentada celular de las perlas mediante lavados posteriores (agitación y sedimentación repetida) en tampón PBS estéril con Triton-X114 al 4 %, (pH 7-7,5). Entonces se recoge una alícuota de la suspensión lavada de la fracción fragmentada celular para el control del pH y continúa una centrifugación final a 845 g a 4 °C durante 30 minutos.

Para retirar la fracción citosólica y para obtener una suspensión enriquecida en fragmentos celulares, se realiza una centrifugación a alta velocidad dos veces a 20000 g aproximadamente durante 60 minutos, a 4 °C . Tras la primera centrifugación, se descarta el sobrenadante amarillento (rico en lípidos y proteínas solubles) y el sedimento se resuspende en PBS y se centrifuga adicionalmente en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de eso, el aspecto del sobrenadante descartado debe ser claro e incoloro. Finalmente, se resuspende el sedimento obtenido en un volumen final de 50 - 60 ml de PBS (suspensión de FCMtb)

(4) Pasteurización

Entonces se pasteuriza la suspensión de FCMtb a $65 \pm 2\text{ °C}$ durante 60 min. Una vez que termina la pasteurización, se determina el pH del FCMtb pasteurizado mediante papel de tornasol. Se considera aceptable en el intervalo de pH de 6,5 - 7,5. Se cargan viales estériles y despirogenados con 0,5 ml de la suspensión de producto y se realizan IPC de esterilidad e inactivación de micobacterias. Finalmente, se congelan los viales cargados a $-80 \pm 5\text{ °C}$. Una vez que el material se somete a pasteurización, se segregará físicamente del material no tratado, es decir los espacios usados antes de las pasteurizaciones se separan claramente de los usados durante el procedimiento de carga posterior.

(5) Secado por congelación

Entonces se liofilizan todos los viales que contienen el producto congelado a una temperatura de aproximadamente -45 °C a 30 °C y una presión de 0,310 mbar durante aproximadamente 18 horas (0,5 ml de volumen por vial). Usando técnicas asépticas y bajo atmósfera de N_2 , se tapan los viales y se marcan. El principio activo empaquetado se almacena entonces a $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ durante hasta 12 meses.

Ejemplo 4: Caracterización de proteínas

La figura 3 proporciona una visión general de la estrategia de caracterización en cuanto al perfil de proteínas.

Basándose en la bibliografía (Andersen P., 1997, Scand J. Immunol.; 45(2):115-31; Geisel *et al.*, 2005, J. Immunol.; 174(8):5007-15; Stewart *et al.* 2005, Infect. Immun., 73(10):6831-7., Wang *et al.*, 2007, J. Mol. Biol., 366(2):375-81), se seleccionaron 6 bandas de proteínas como representativas para la evaluación del perfil de proteínas: proteína HSP70 (Rv0350), proteína de 38 kDa (Rv 0934), (Rv 1866c), proteína de 19 kDa (Rv 3763), proteína CFP10

(Rv3874) y proteína ESAT-6 (Rv3875).

A. Determinación del contenido de proteína total: se cuantifican los niveles de proteína total en FCMtb mediante la metodología de ácido bicinonínico (BCA). La proteína total representa aproximadamente el 10 % (p/p) del contenido de FCMtb. Los patrones de referencia FCMtb-0429-16 y FCMtb-52.1 contienen 167 µg de proteína/mg de FCMtb y 115 µg de proteína/mg de FCMtb, respectivamente.

B. Identificación del perfil de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE): el perfil de proteínas del principio activo FCMtb se determinó mediante comparación con antígenos de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* que corresponden a ESAT6 (6 kDa) (7); CFP10 (10 kDa) (6); Ag85B (30 kDa) (1); 38kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4) así como marcador de peso molecular MW (5), se muestran (véase la figura 4). Determinación del perfil de proteínas de FCMtb de principio activo y se lleva a cabo la identificación de bandas (aproximadamente 70 kDa, 38 kDa, 30 kDa, 10 kDa y 6 kDa) mediante tinción de Coomassie. La identificación de la banda de 19 kDa (lipopolipéptido) se lleva a cabo mediante tinción con plata.

C. Identificación del perfil de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos monoclonales específicos: el perfil de proteínas del principio activo FCMtb se determina mediante los patrones obtenidos usando análisis de inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos monoclonales (AcM): anti-HSP70 (70 kDa, figura 5c), anti-38kDa (figura 5d), anti-Ag85B (30 kDa, figura 5e).

FCMtb-52,1 es el lote de referencia para FCMtb según el modo preferido de llevar a cabo esta invención.

Ejemplo 5: Caracterización de lípidos

La caracterización del perfil de lípidos de FCMtb consiste en un procedimiento de fraccionamiento basado en la extracción con cloroformo:metanol (1:1). El procedimiento de fraccionamiento llevado a cabo en estos estudios se ha basado en el procedimiento descrito por Delmas *et al.*, 1997, *Glycobiology* 7(6), 811-7. La cromatografía en capa fina (CCF) ha sido el método usado para analizar el contenido de lípidos y glicolípidos presentes en FCMtb. Específicamente, se han identificado poliactilrehalosa (PT), dimicolato de trehalosa (TDM), diactilrehalosa (DAT), fosfatidilinositolmanósidos (PIMs) y otros fosfolípidos, así como fitoceroles dimicocerosatos (PDIM) y ácidos micólicos mediante cromatografía en capa fina (CCF) en las cepas de referencia tanto H37rv como CNCT 13536, así como en lotes de FCMtb diferentes. Véase la figura 7a. El contenido de 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) se analiza mediante CCF en el sobrenadante. La determinación de ácidos micólicos se lleva a cabo en el sedimento, siguiendo un método de CCF. Aunque no se conocen datos cuantitativos para el perfil de lípidos de MTB-C, el perfil de lípidos cualitativo establecido en los estudios es de conformidad con el conocimiento científico actual y permite una caracterización convencional de los lípidos inmunogénicos hasta ahora conocidos. Se ha comparado FCMtb con la fracción de lípidos de células completas de las cepas CNCT 13536 y H37Rv de *M. tuberculosis* y patrón comercial de TDM (véanse las figura 7a y 7b). Globalmente, el contenido de lípidos se ha mostrado que concuerda con lotes diferentes de liposomas que comprenden FCMtb según esta invención. La figura 7d muestra la identificación de LAM.

Ejemplo 6: Caracterización de material de células fragmentadas

Los resultados preliminares usando ambas metodologías muestran que el tamaño de los fragmentos de FCMtb es principalmente inferior a 1 µm (99 % < 1 µm), lo que se corrobora mediante microscopio electrónico para FCMtb: el tamaño de los fragmentos oscila principalmente entre 100 y 300 nm.

Los niveles de ADN residual tras la extracción con una mezcla de fenol/cloroformo se han investigado mediante absorbancia a 260 nm (límite de detección: 0,2 µg de ADN/mg de FCMtb). Los resultados típicos obtenidos hasta ahora son inferiores a 15 µg de ADN/mg de FCMtb.

La consistencia del procedimiento de producción del principio activo se muestra mediante un perfil de lípidos y proteínas que es reproducible para diferentes lotes de FCMtb.

Ejemplo 7: Inmunización de ratones y visualización de la actividad biológica

Interacción de bandas de proteínas de FCMtb con inmunosuero de ratón: usando la metodología de inmunotransferencia de tipo Western ha sido posible visualizar bandas de proteínas de FCMtb que interaccionan con anticuerpos IgG presentes en suero obtenido de ratones infectados inoculados dos veces con la vacuna a base de formulación de liposomas según esta invención. Esto se considera que es un indicador de la actividad biológica (figura 6).

Ejemplo 8: Actividad *in vivo* de una formulación de liposomas que comprende FCMtb

La actividad biológica de la vacuna se estudia en un modelo *in vivo* evaluando la potencia inmunogénica de FCMtb

sin liposomas (reconstituido con agua para inyección, WFI) y con FCMtb en la formulación de liposomas según el mejor modo de llevar a cabo la presente invención (sacarosa al 5 %, véase lo anterior) (figura 8). Estos resultados muestran las ventajas de la formulación de liposomas con sacarosa.

5 Los estados de agregación o fusión de los liposomas son parámetros que se ha demostrado que tienen un impacto significativo sobre la actividad biológica de la vacuna. Por tanto, los investigadores de la presente invención realizan un control exhaustivo del tamaño de partícula y el índice de polidispersidad durante la fabricación y en la liberación de lotes de las vacunas.

10 Ejemplo 9: Efecto de la sacarosa

En una prueba inicial, uno de los siguientes excipientes (a) glicina al 1,5 % y (b) sacarosa al 5 %, respectivamente, se incorporó opcionalmente a una formulación de liposomas que comprendía fragmentos de la cepa CNCT 13536 de MTB-C. Posteriormente, se emprende una evaluación comparativa sobre las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica asociadas con ambas formulaciones.

15 En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos mediante medición tras la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada y tras las pruebas según los parámetros de especificación de liberación de lotes actual.

Parámetro		Criterios de aceptación	FCMtb formulado en una suspensión de liposomas			
			Sin excipiente	Sacarosa al 5 %	Glicina al 1,5 %	
			FCMtb formulado en una suspensión liposómica			
Aspecto		Polvo de blanco a blanquecino	ND	Cumple	Cumple	
Morfología de la torta		Plana a casi plana y homogénea	ND	Cumple	Cumple	
Contenido en agua (%)		≤ 3 %	ND	1,4	3,0	
Tiempo hasta la reconstitución (s)		Bien reconstituido ≤10 s	ND	5	12	
pH		7-8	8,1	7,4	7,0	
Tamaño de partícula	Pdi promedio z (nm) (a)	75 ± 20 (≤ 0,250)	370 ⁽¹⁾ (0,492)	66 (0,215)	504 ⁽¹⁾ (0,569)	
Potencia inmunogénica en modelo murino infectado con <i>M. tuberculosis</i>	Unidades formadoras de puntos de IFN-γ específico de antígeno	PPD	3-12 Proporción de UFP/10 ⁶ células con respecto a valor basal (valor basal en UFP/10 ⁶ células)	3,6 (183)	5,1 (183)	2,8 (183)
		Ag85B (30 kDa)	5-20 Proporción de UFP/10 ⁶ células con respecto a valor basal (valor basal en UFP/10 ⁶ células)	5,5 (73)	9,6 (73)	5,4 (73)

20 (a) Índice de polidispersidad

(1) Presencia de agregados liposomales
ND = no determinado

25 Tabla 5: resultados de especificaciones para 3 formulaciones diferentes, medidos tras la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada.

Los investigadores de este estudio encontraron sorprendentemente que una formulación de sacarosa al 5 % proporciona la ventaja de mejores resultados fisicoquímicos, tales como contenido en agua o tiempo hasta la reconstitución, respectivamente. Pero el hecho más crucial es la importante reducción en la agregación liposómica (tamaño de partícula, promedio z) mostrada con la formulación que comprende sacarosa en comparación con las otras dos formulaciones. El análisis mediante dispersión de luz dinámica ha mostrado un promedio z de 75 ± 20 nm (índice de polidispersidad $\leq 0,350$) de los liposomas que contienen sacarosa. La microscopía electrónica de las preparaciones de fracturación por congelación de la formulación de liposomas que contiene sacarosa muestra una mezcla de liposomas multilamelares y unilamelares con tamaños de entre 40 y 100 nm (figura 9).

Debido a este parámetro mejorado junto con los niveles de contenido en agua menores observados (≤ 2 %) para la formulación de sacarosa al 5 %, se esperan resultados de estabilidad mejorados para esta formulación. Este es de hecho el caso. Los datos de los investigadores del presente estudio de lotes experimentales formulados con glicina al 1,5 % almacenados a temperatura ambiente durante 3 meses han indicado una pérdida drástica de actividad biológica para PPD (potencia inmunogénica). Por el contrario, la actividad biológica para PPD permanece básicamente sin cambios cuando se estudia la formulación que comprende sacarosa al 5 % tras 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Por tanto, la sacarosa también proporciona la ventaja de un mejor mantenimiento de la actividad biológica.

Ejemplo 10: Propiedades biológicas de la formulación que comprende sacarosa

Se usó la formulación según la tabla 3 para estudios biológicos. La respuesta inmunitaria celular desencadenada mediante inoculación de vacuna según el modo preferido de llevar a cabo esta invención (única inoculación) en un modelo murino infectado con *Mycobacterium tuberculosis* puede medirse mediante ELISPOT, los resultados se proporcionan en la tabla 6.

Parámetro		Lote (50 µg/dosis, 166,7 µg/ml)			
		a09	c09	d09	e09
Unidades formadoras de puntos (UFP) de IFN-γ específico de antígeno	PPD Proporción de UFP/10 ⁶ células con respecto al valor basal (valor basal: UFP/10 ⁶ células)	5,1 (Basal: 183 UFP/10 ⁶ células)	6,3 (Basal: 98 UFP/10 ⁶ células)	7,2 (Basal: 164 UFP/10 ⁶ células)	6,5 (Basal: 164 UFP/10 ⁶ células)
	Ag85B Proporción de UFP/10 ⁶ células con respecto al valor basal (valor basal: UFP/10 ⁶ células)	9,6 (Basal: 73 UFP/10 ⁶ células)	9,9 (Basal: 44 UFP/10 ⁶ células)	11,9 (Basal: 90 UFP/10 ⁶ células)	12,3 (Basal: 88 UFP/10 ⁶ células)

ND: no determinado.

Tabla 6: respuesta celular tras inoculación en ratones.

La inoculación de la vacuna a base de formulación de liposomas conduce a un aumento significativo de la respuesta inmunitaria celular *in vivo* en comparación con valores basales de animales infectados cuando se usa ELISPOT para la determinación de los niveles de respuesta. La proporción con respecto a la respuesta basal es de 4-8 veces para PPD y de 8 a 14 veces para Ag85B. La vacuna a base de formulación de liposomas también puede inducir una respuesta humoral poliantigénica, que tiene un efecto protector especialmente cuando existe una alta diseminación de la infección (Guirado *et al.*, 2006, *Microbes Infect.* 8, 1252-1259).

Se realizó específicamente una comparación entre los datos de potencia inmunogénica obtenidos con la formulación sin sacarosa frente a la formulación que contiene sacarosa como excipiente principal. Los resultados obtenidos indican claramente que la respuesta inmunitaria celular lograda por una dosis de FCMtb de 50 µg de la formulación con sacarosa es aproximadamente 1,5-veces más alta que la obtenida con una dosis idéntica de la formulación sin sacarosa en un modelo de única vacunación. Estos niveles más altos de respuesta inmunitaria celular se obtienen en ambas pruebas de potencia: la realizada para especificaciones de liberación por lotes (un modelo de única vacunación) y la prueba adicional incluida para el ejercicio de comparabilidad (modelo vacunado dos veces). Además, en ambas pruebas de potencia, la respuesta inmunitaria celular lograda por una dosis de FCMtb de 50 µg de la formulación con sacarosa muestra similares niveles a los obtenidos con los 200 µg de FCMtb de la formulación sin sacarosa. Los resultados, medidos tras la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada se proporcionan en la figura 10a y 10b. La formulación que comprende sacarosa muestra una reducción significativa de la agregación liposómica. Se cree que éste es el motivo del aumento de inmunogenicidad. La respuesta inmunitaria

celular lograda con una dosis de 50 µg de la nueva formulación es casi comparable a la observada con una dosis de 200 µg obtenida con la formulación sin sacarosa. En el campo se sabe que la respuesta celular se considera que es la respuesta relevante (North RJ, Jung YJ (2004). Annu. Rev. Immunol. 22: 599-623).

5 Ejemplo 11: Procedimiento de fabricación de la formulación de liposomas liofilizada

Una realización del procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposomas según la presente invención se muestra en la figura 11a y 11b. En resumen, comprende las siguientes etapas 1 a 5.

10 (1) Preparación de los componentes a granel de LCS

15 Se disuelve lecitina de soja a granel de LCS en etanol (1:1; p/p) y se disuelve colato de sodio en agua (1:5; p/p). Se esterilizan las disoluciones mediante filtración. Tras el mezclado de disolución de lecitina de sodio y disolución de colato de sodio, se añade FCMtb liofilizado (ejemplo 1) tras agitación. Las proporciones de los componentes son 0,03:0,2:0,7 (FCMtb:colato de sodio:lecitina de soja; p/p/p).

(2) Preparación a granel de LCS

20 La fase acuosa se transfiere a un mezclador de acero inoxidable esterilizado. Se añade la fase de lípidos de (1), que contiene lecitina de soja, colato de sodio y FCMtb, en una proporción de 0,7:0,3 (fase acuosa:fase de lípidos, p/p). Se mezclan las fases a 2200 rads/s durante 3 min para la homogeneización y formación de liposomas. Tras la homogeneización, la LCS a granel se transfiere a otro recipiente y se deja en reposo durante al menos 5 minutos. Se realiza un IPC de tamaño de partícula sobre la LCS a granel.

25 (3) Dilución de formulación final a granel de LCS de suspensión de liposomas

30 Se preparó y se esterilizó una disolución de sacarosa al 10 % (p/p). Se mezcló la disolución de sacarosa con agua y LCS a granel en las proporciones adecuadas para conseguir la suspensión de liposomas (LS) final a granel constituida de 21 de mg de LCS/ml en disolución de sacarosa al 5 %. Se someten a prueba el pH, la esterilidad y el tamaño de partícula como controles en el procedimiento.

(4) Carga

35 Los viales se cargan con 0,4 ml de LS (en agitación continua) y se cierran parcialmente para congelación y liofilización.

(5) Liofilización, envasado y etiquetado

40 Los viales se congelan a -80 °C ±5 °C hasta continuar la liofilización. El procedimiento de liofilización se realiza en el intervalo de -45 °C a 25 °C de temperatura y 0,150 mbar. El procedimiento dura 24 horas. Al final de la liofilización se tapan completamente los viales en atmósfera de N₂, se encapsulan, se etiquetan y se almacenan a 5 °C ± 3 °C.

45 Ejemplo 12: La terapia adyuntiva contra ITBL requerirá solo una única inyección de 25 µg de FCMtb

50 Se estableció un ensayo clínico aleatorizado de doble ciego de fase II para evaluar 3 dosis de FCMtb (5, 25, 50 µg, preparada cada una tal como se describe en el modo preferido de llevar a cabo esta invención) y placebo en 96 sujetos positivos para VIH (VIH+) y negativos para VIH (VIH-) con infección por tuberculosis latente (ITBL) (TST+ y Quantiferon+) que se distribuyeron aleatoriamente en grupos de n=12 por brazo tras recibir 1 mes tratamiento de isoniazida. Se inoculó a los sujetos dos veces FCMtb (5, 25, 50 µg, preparada cada una tal como se describe en el modo preferido de llevar a cabo esta invención), inmediatamente tras quimioterapia con isoniazida y 4 semanas de diferencia.

55 Perfil inmunitario: FCMtb (5, 25, 50 µg, preparada cada una tal como se describe en el modo preferido de llevar a cabo esta invención) logró una respuesta con forma de campana, poliantigénica contra antígenos secretados (ESAT-6, Ag85B) y estructurales (16 kDa, 38 kDa) que se estimularon en todas las dosis (figuras 12 y 13). FCMtb (5, 25, 50 µg, preparada cada una tal como se describe en el modo preferido de llevar a cabo esta invención) logró también una respuesta de memoria a largo plazo (la prueba de la OMS) a las dosis más altas, compatible con un efecto profiláctico. Sorprendentemente, aunque las respuestas inmunitarias globalmente eran más intensas en VIH- que en VIH+, la única inoculación de 25 µg de FCMtb (5, 25, 50 µg, preparada cada una tal como se describe en el modo preferido de llevar a cabo esta invención) logró la mejor respuesta inmunitaria en ambas poblaciones (figuras 12 y 13).

65 Conclusión: una única inoculación de 25 µg es la mejor elección para la terapia adyuntiva contra ITBL en sujetos negativos para VIH y positivos para VIH.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: diagrama de flujo que muestra el procedimiento anterior del principio activo FCMtb, incluyendo los materiales y reactivos implicados en el procedimiento y controles en el procedimiento adecuados.
- Figura 2: diagrama de flujo que muestra el procedimiento posterior del principio activo FCMtb, incluyendo los materiales y reactivos implicados en el procedimiento y controles en el procedimiento adecuados.
- 10 Figura 3: diagrama de flujo de la caracterización de proteínas.
- Figura 4: identificación de antígenos mediante SDS-PAGE y metodología de tinción con azul de Coomassie. Se muestran antígenos de referencia ESAT6 (6 kDa) (7); CFP10 (10 kDa) (6); Ag85B (30 kDa) (1); 38kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4) así como el marcador de peso molecular MW (5).
- 15 Figura 5: caracterización de proteínas. Figura 5a: perfil de proteínas: perfil de proteínas de patrón de referencia FCMtb-52.1 (1 a 6) a concentraciones finales de 15,6 µg de FCMtb/ml (1, 2), 6,25 µg de FCMtb/ml (3, 4) y 1,56 µg de FCMtb/ml (5, 6), SDS page seguido por tinción de Coomassie. MW en kDa. 5b: identificación de la banda de 19 kDa, SDS page seguido por tinción con plata. 5c: perfil de proteínas: identificación de bandas (10 kDa y 6 kDa) en los lotes de FCMtb indicados mediante SDS-PAGE y metodología de tinción con plata llevada a cabo en paralelo con patrón de ESAT-6 de Lionex. Lotes de FCMtb diferentes (1, 2, 3, 9, 10, 11, (lote FCMtb-52.1 en carril 9)), patrón de ESAT-6 de Lionex a concentraciones diferentes (de 4 a 8); 5d: identificación por inmunotransferencia de tipo Western de antígeno HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv 0350) en lotes de FCMtb mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos en paralelo a patrón de HSP70 de *M. tuberculosis*. Lotes de FCMtb diferentes (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9), patrón de HSP70 (5, 6); 5e: identificación de antígeno de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934) en lotes de FCMtb mediante metodología de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo específico y llevada a cabo en paralelo con patrón de 38 kDa de *M. tuberculosis* de Lionex. Detección de fluorescencia usando el sistema Odyssey. Lotes de FCMtb diferentes (1, 2, 3, 6, 7), patrón de 38 kDa (4, 5). 5f: identificación de antígeno Ag85B (Rv 1886c) en lotes de FCMtb mediante metodología de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo específico y llevada en paralelo con patrón de Ag85B de *M. tuberculosis* de Lionex. Detección de fluorescencia usando el sistema Odyssey. Lotes de FCMtb (1, 2, 3, 5, 6, 7), patrón de Ag85B (4).
- 20 Figura 6: interacción de bandas de proteínas indicadas de lotes de FCMtb diferentes (50 µg/carril) con suero diluido 1/8000 obtenido de ratones infectados tras inocularse a dos veces con la composición de vacuna farmacéutica a base de formulación de liposomas según esta invención, usando metodología de inmunotransferencia de tipo Western.
- Figura 7: análisis de lípidos. 7a: identificación de poliactiltrehalosa (PT), 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) y diactiltrehalosa (DAT) en cepas de referencia (H37Rv (2) y CNCT 13536 (1) y lotes de FCMtb diferentes (3-9), y patrón de TDM (10) mediante metodología de CCF. 7b: identificación de 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) en lotes de FCMtb mediante metodología de CCF. Los paneles (A) y (B) representan dos ensayos independientes. (A) Patrón de TDM (11) y (12), otros carriles lotes de FCMtb diferentes. B: (1) Patrón de TDM (1), otros carriles lotes de FCMtb diferentes. 7c: patrón de ácidos micólicos I, III y IV en lotes de FCMtb mediante metodología de CCF. Los paneles (A), (B) y (C) representan tres ensayos independientes. (A) lotes de FCMtb (1-6 (FCMtb-51.2 patrón 6)). (B) Para ilustración/referencia, (C) lote FCMtb-47b (1) en comparación con patrón de ácido micólico (2). 7d: identificación de LAM (referencia en carril izquierdo, muestras derivadas de liposomas según la invención en los carriles restantes).
- 25 Figura 8: comparación de inmunopotencia celular de FCMtb resuspendido con agua para inyección (WFI) frente a FCMtb formulada con liposomas (vacuna RUTI etiquetada, lote 10a), a la misma dosis (50 µg/dosis).
- Figura 9: preparación de fracturación por congelación de concentrado liposómico (LCS) a granel (microscopio electrónico).
- Figura 10: a: respuesta inmunitaria celular por lote sometido a prueba con las dos formulaciones de vacuna en una prueba de potencia (una vacunación). b: como en a, pero dos vacunaciones. "Formulación II": que comprende sacarosa al 5 % (p/p), según la tabla 1 de este documento. "Formulación I": como formulación II, excepto que no está presente sacarosa. µg se refiere a µg de FCMtb/dosis. 85B: Ag85B.
- 30 Figura 11: diagrama de flujo del procedimiento según el modo preferido de llevar a cabo esta invención.
- Figura 12: perfil inmunitario de 1 inoculación de RUTI de 25 µg tal como se describió en el ejemplo 12.
- Figura 13: inmunogenicidad (VIH- y VIH+) tal como se describió en el ejemplo 12.

REIVINDICACIONES

1. Formulación de liposomas que comprende:
 - 5 (a) fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C),
 - (b) un agente de formación de liposomas,
 - 10 (c) del 1 al 20 % (p/v) de sacarosa, preferiblemente del 2 al 12 % (p/v) de sacarosa, más preferiblemente del 3 al 8 % (p/v) de sacarosa, y lo más preferiblemente del 4 al 6 % (p/v) de sacarosa,

en la que el tamaño promedio z de las partículas es de 120 nm o menos, en la que el tamaño promedio z se determina mediante dispersión de luz dinámica.
- 15 2. Formulación de liposomas según la reivindicación 1, en la que tamaño promedio z de las partículas está en el intervalo de desde 40 hasta 110 nm, más preferiblemente desde 55 hasta 95 nm.
3. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la formulación de liposomas es una emulsión, y en la que el tamaño promedio z de las partículas está preferiblemente por
 - 20 debajo de 40 nm.
4. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el índice de polidispersidad de las partículas es de 0,4 o menos, preferiblemente 0,3.
- 25 5. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta, y preferiblemente la cepa CNCT 13536 de MTB-C, depositada en 2010 en el CNCT en Londres, y/o
 - 30 en la que los fragmentos de células MTB-C son o comprenden fragmentos de pared celular,
 - y en la que la formulación comprende preferiblemente fragmentos de la cepa CNCT 13536 de MTB-C, depositada en 2010 en el CNCT en Londres.
- 35 6. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente
 - (d) un agente tensioactivo
 - 40 y/o
 - (e) uno o más surfactantes no iónicos,

y en la que la proporción entre (a) y (d) es opcionalmente de entre 0,05:1 y 1:5 (p/p),

45 y en la que opcionalmente el agente tensioactivo se selecciona de colato, desoxicolato, colesterol y hemisuccinato de colesterol.
- 50 7. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente de formación de liposomas es un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado, preferiblemente lecitina, y lo más preferiblemente lecitina de soja,
 - y/o
 - 55 en la que dicha formulación de liposomas comprende adicionalmente uno o más surfactantes no iónicos,
 - y/o
 - 60 en la que dicha formulación de liposomas contiene adicionalmente una o más sales o una disolución de las mismas, en la que la sal es preferiblemente cloruro de sodio,
 - y/o en la que la formulación de liposomas está secada por congelación.
- 65 8. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos dos, preferiblemente tres, más preferiblemente cuatro, y lo más preferiblemente todos de los siguientes:

- (i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el primer polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),
- 5 (ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el segundo polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934),
- 10 (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el tercer polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv 1866c), y
- 15 (iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el cuarto polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y
- 20 (v) (i) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa tal como se midió tras electroforesis en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS), en la que el quinto polipéptido tiene una huella de masas similar a una huella de masas de proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv3875).
9. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos uno de los siguientes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, o fragmento de los mismos, está presente: HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B.
- 25 10. Formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende uno o más ácidos micólicos y/o un micolato conjugado con azúcar, preferiblemente dimicolato de trehalosa y/o un glicolípido, preferiblemente liporabinomanano.
- 30 11. Suspensión, en la que la formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores se reconstituye en un disolvente, en la que el disolvente es preferiblemente acuoso, y más preferiblemente es o comprende suero fisiológico.
- 35 12. Composición farmacéutica que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la suspensión según la reivindicación 11, y un portador farmacéuticamente aceptable o diluyente, y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Formulación de liposomas según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 10, suspensión según la reivindicación 11, o composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 45 14. Formulación de liposomas según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 10, suspensión según la reivindicación 11, o composición farmacéutica según la reivindicación 12, para su uso en un método de tratamiento o prevención de tuberculosis.
- 50 15. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 14, seleccionada de lo siguiente:
- a) para su uso en un método de prevención de la tuberculosis activa en individuos con una infección por tuberculosis latente;
- b) para su uso en un método de profilaxis primaria de tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que habían estado expuestos a la enfermedad, pero no se han infectado todavía, o
- 55 c) para su uso en un método de tratamiento o prevención de la tuberculosis latente.
- 60 16. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 14 ó 15 para su administración al cuerpo humano en una dosis que comprende de 1 a 1000, preferiblemente de 3 a 250, más preferiblemente de 4 a 80, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5, aproximadamente 25 o aproximadamente 50 µg/dosis de FCMtb.
- 65 17. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 14 ó 15 para su administración al cuerpo humano en una única dosis de inoculación de 25 pg de FCMtb.
18. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las

reivindicaciones 14 a 17, en la que el uso es una terapia de combinación, que comprende preferiblemente un antibiótico, más preferiblemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, mediante lo cual la ansamicina es lo más preferiblemente rifampicina.

- 5 19. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 17, en la que el uso es terapia adyuntiva.
20. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 19 para su administración en terapia adyuntiva a un sujeto humano positivo para VIH.
- 10 21. Formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 17 para su administración a un sujeto humano negativo para VIH.

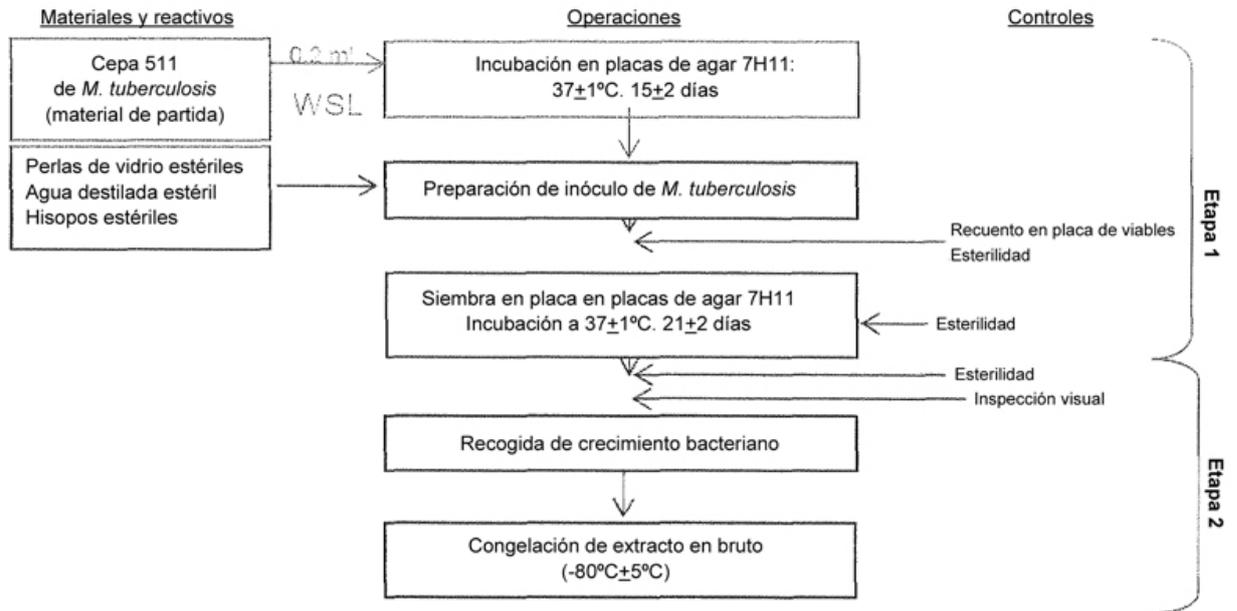


Figura 1

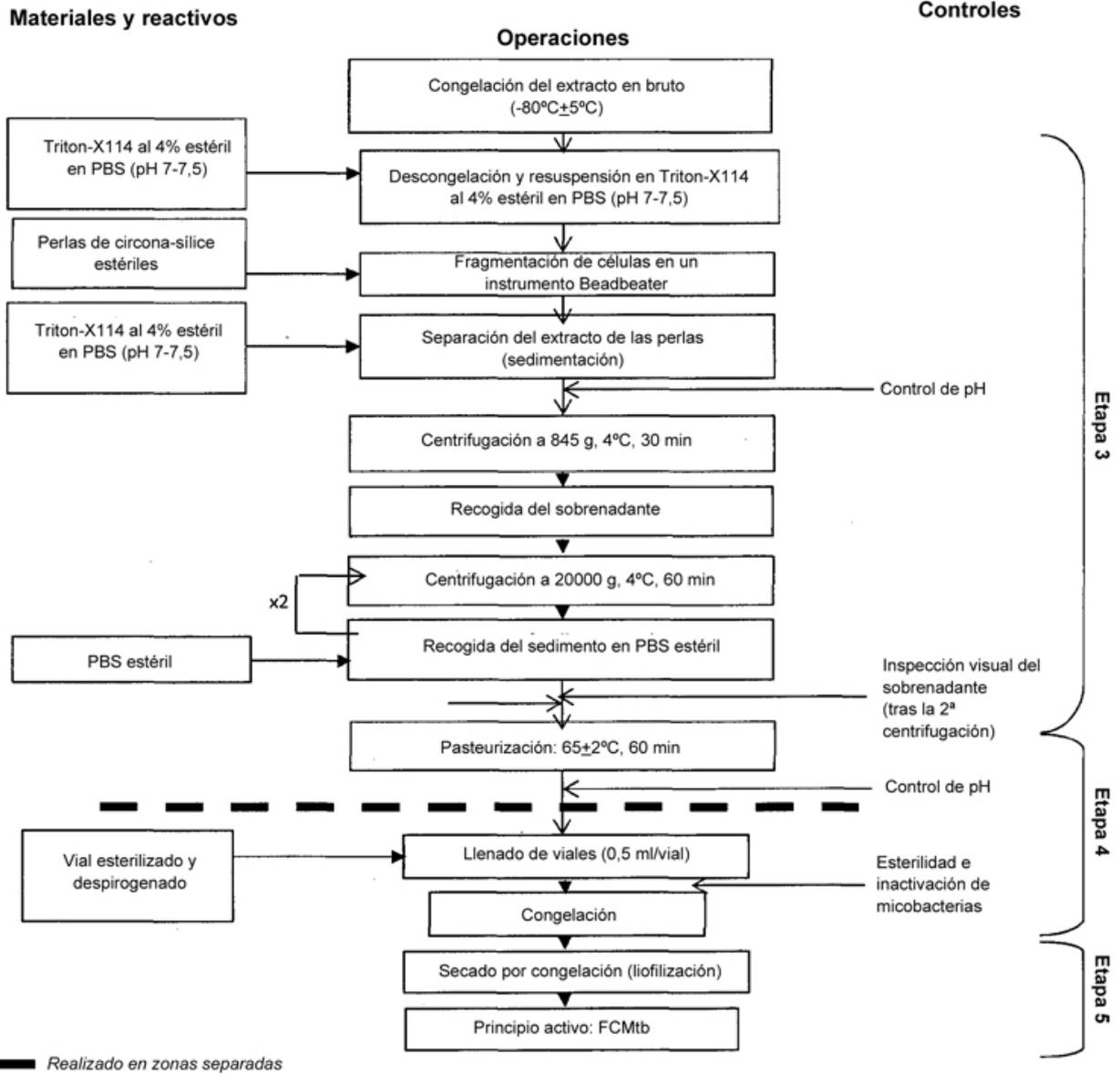


Figura 2

PERFIL DE PROTEÍNAS

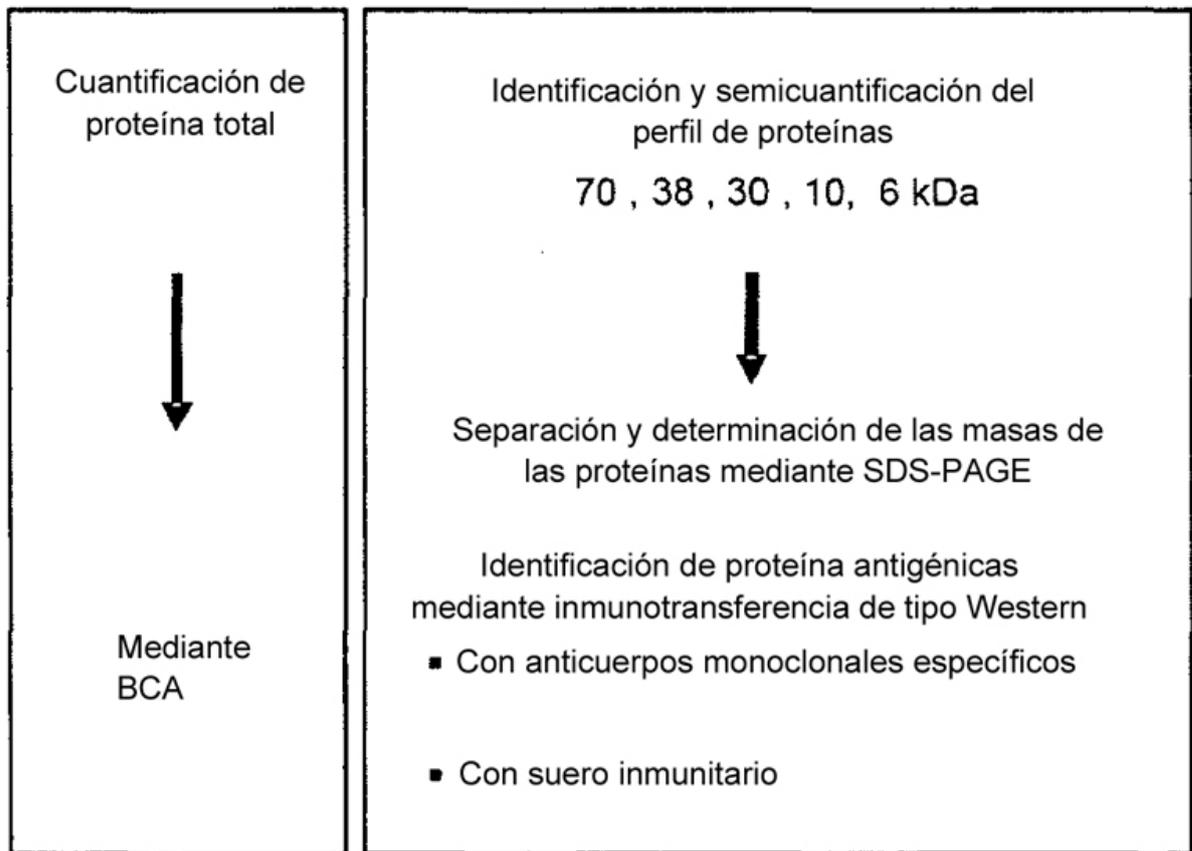


Figura 3

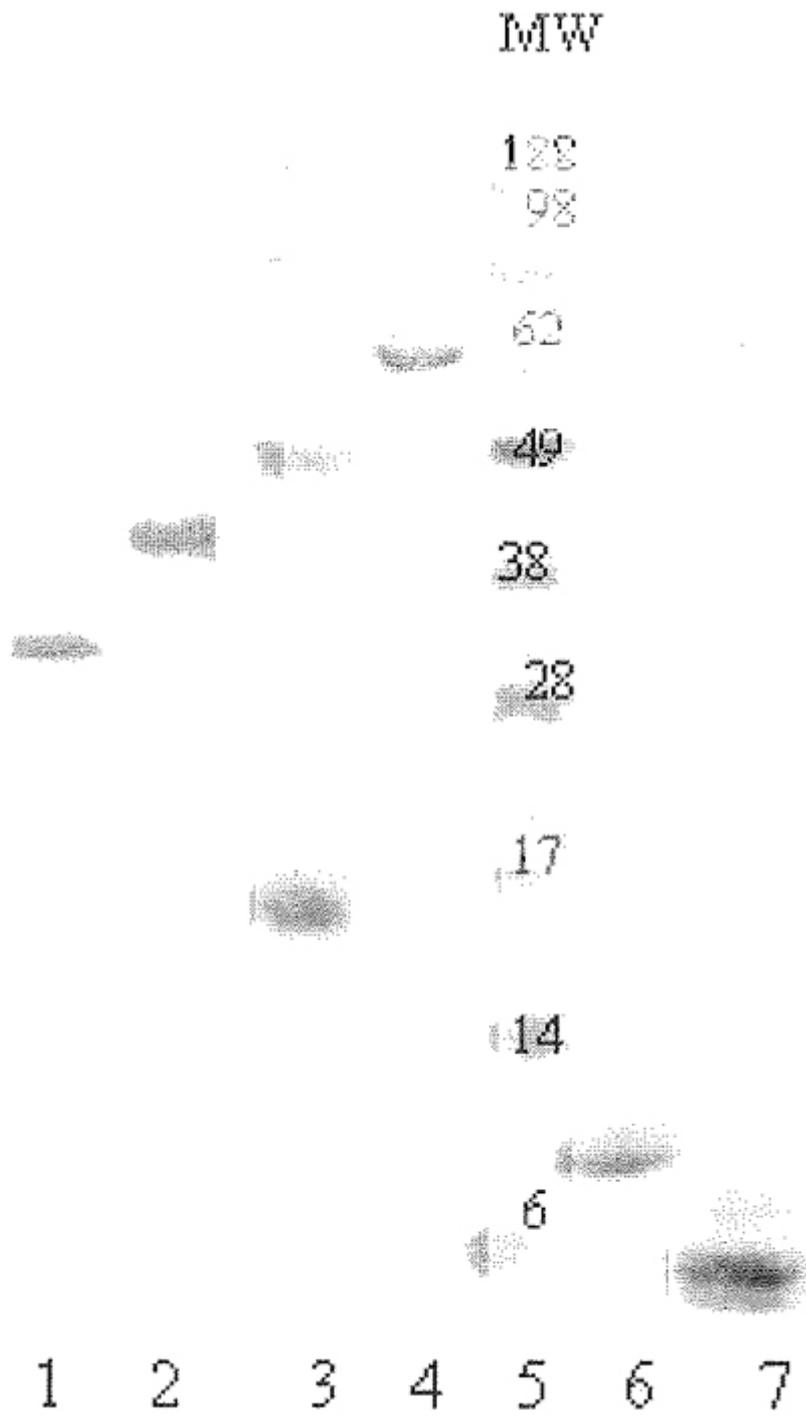


Figura 4



Figura 5a

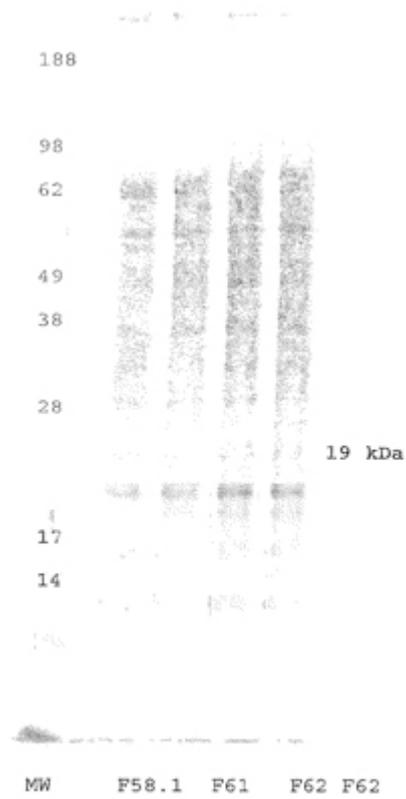


Figura 5b

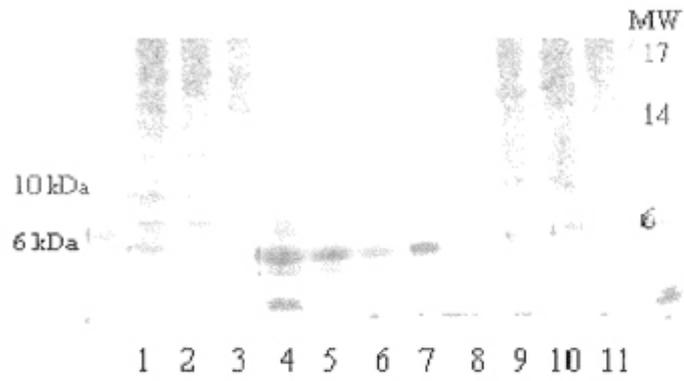


Figura 5c

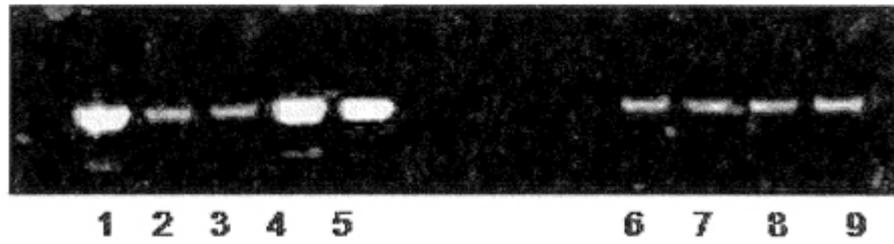


Figura 5d

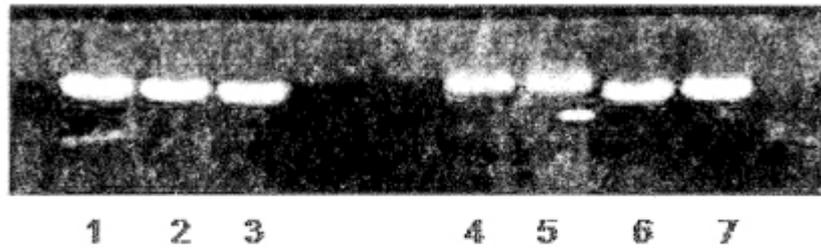


Figura 5e

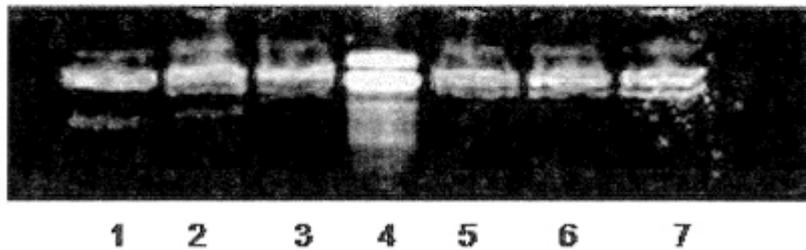


Figura 5f

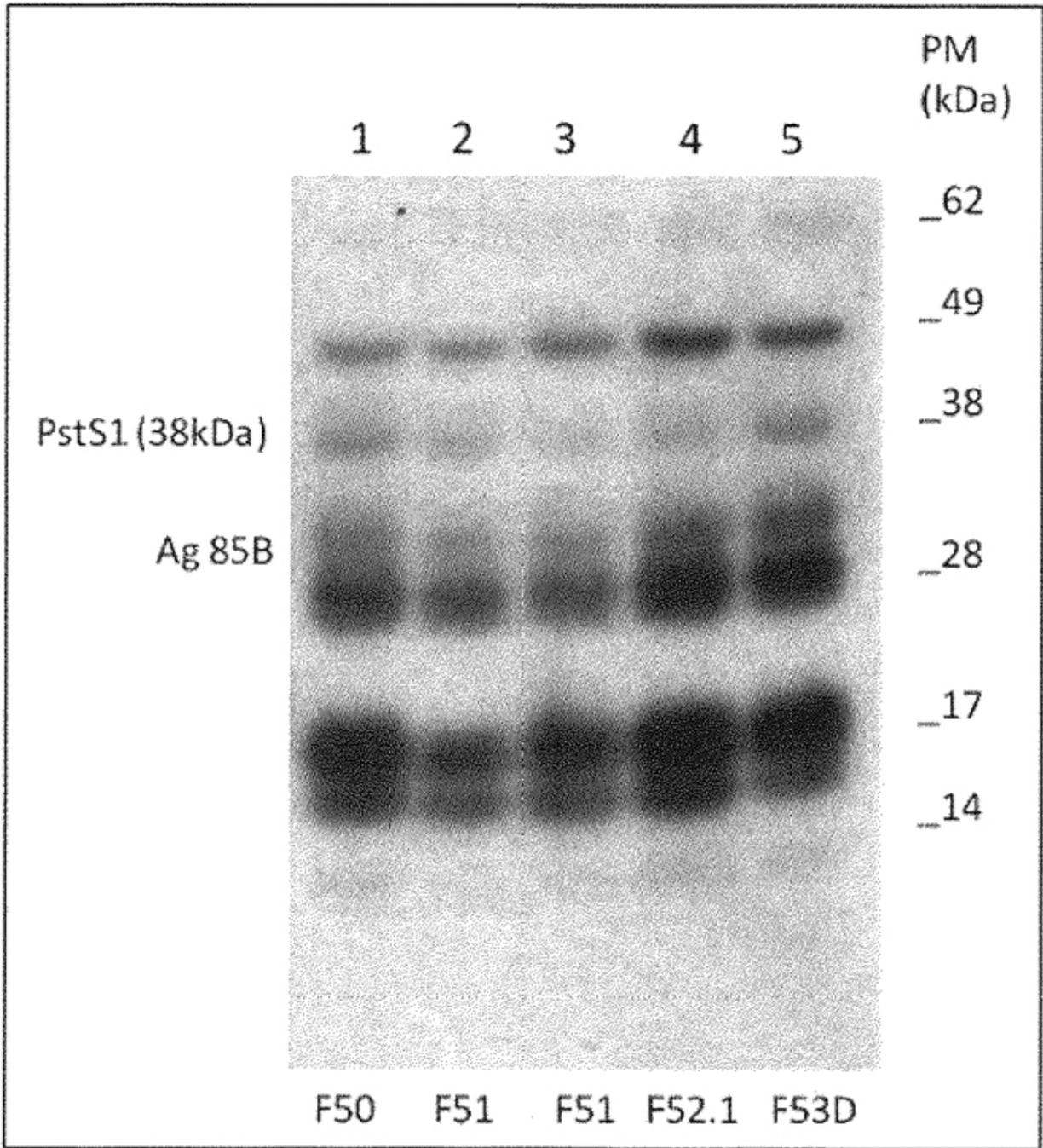


Figura 6

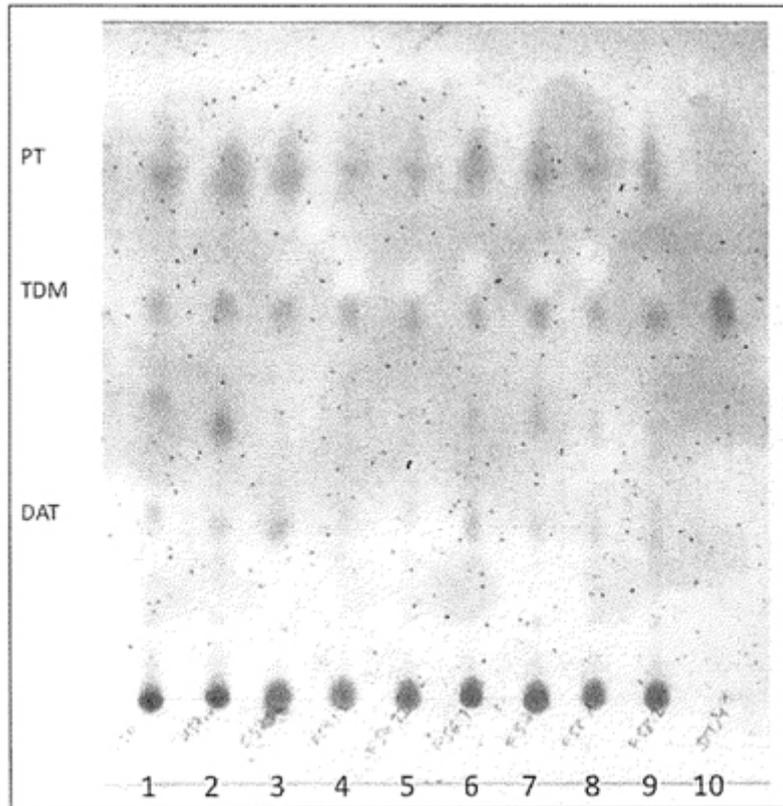


Figura 7a

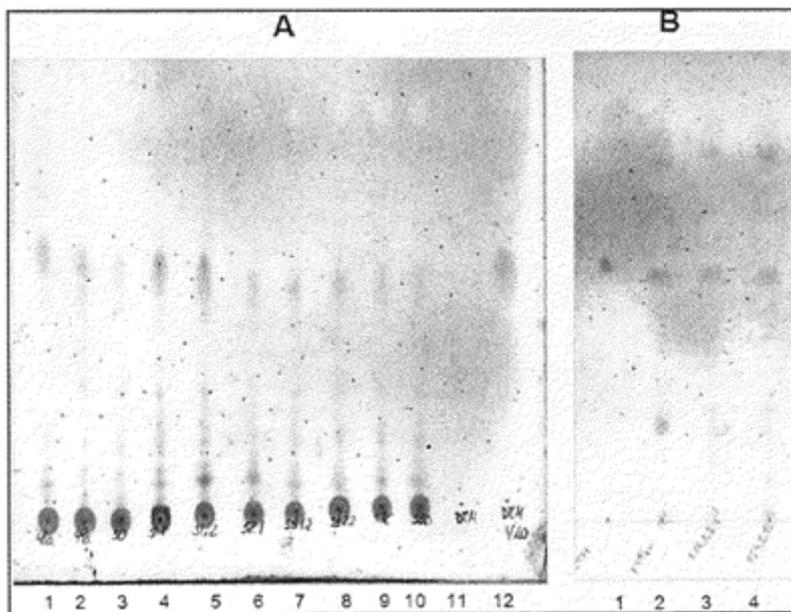


Figura 7b

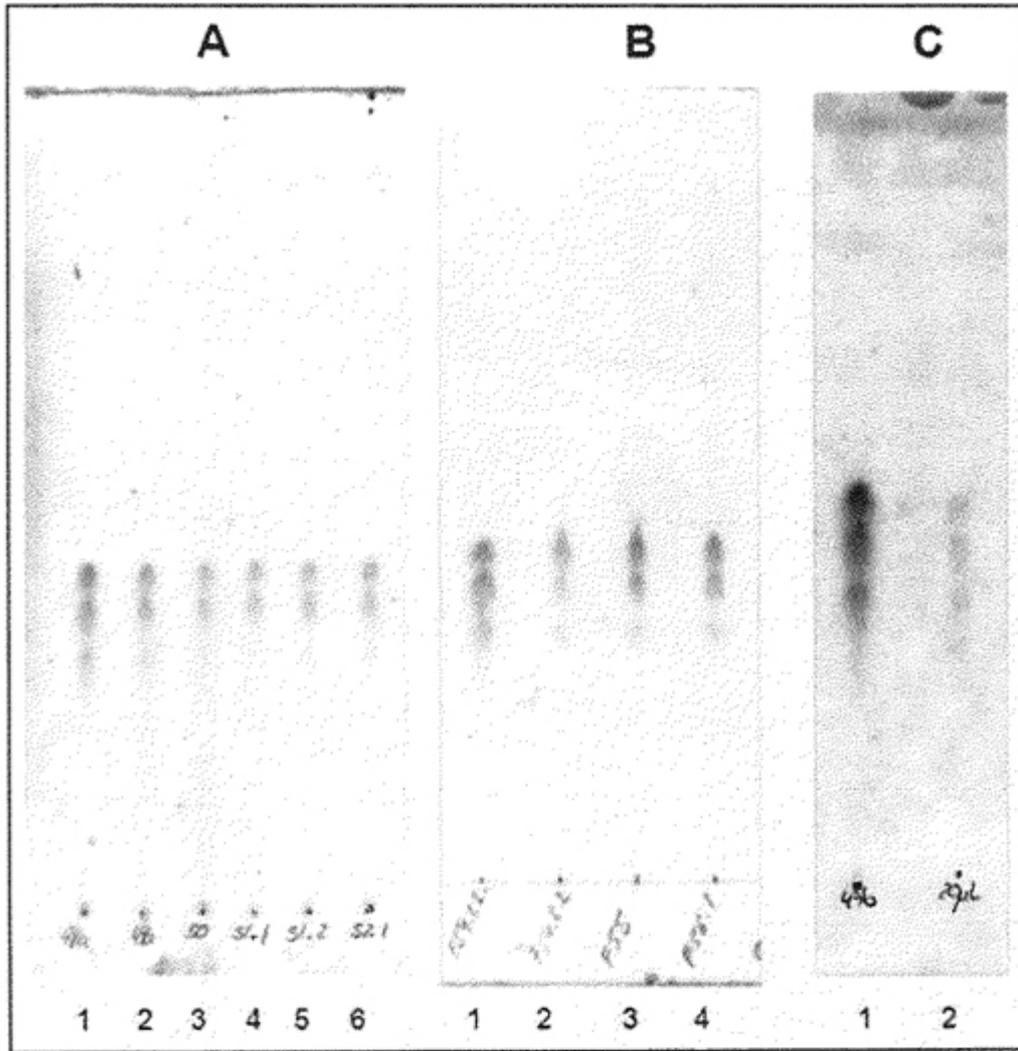


Figura 7c

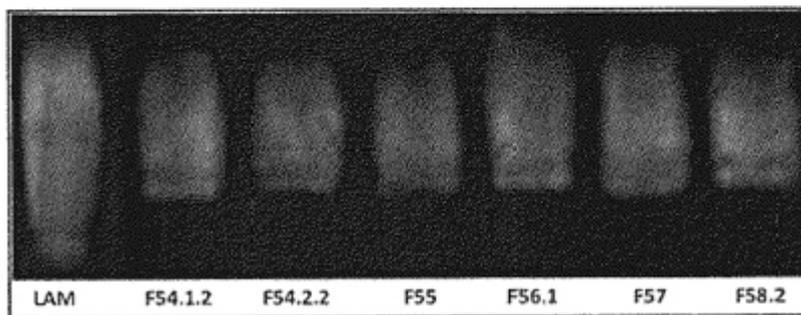


Figura 7d

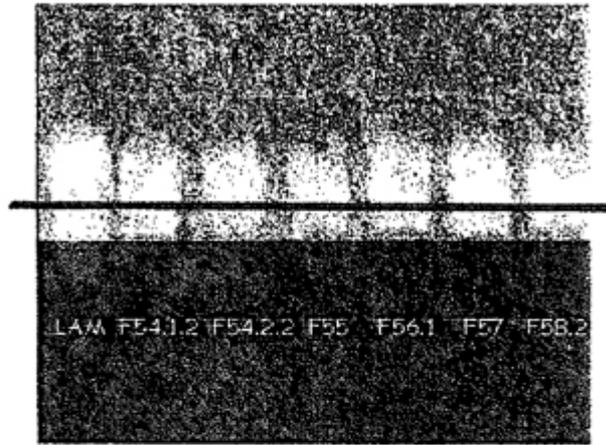


Figure 7

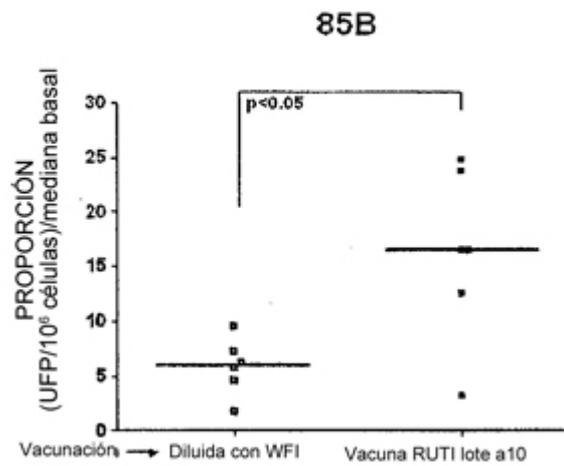
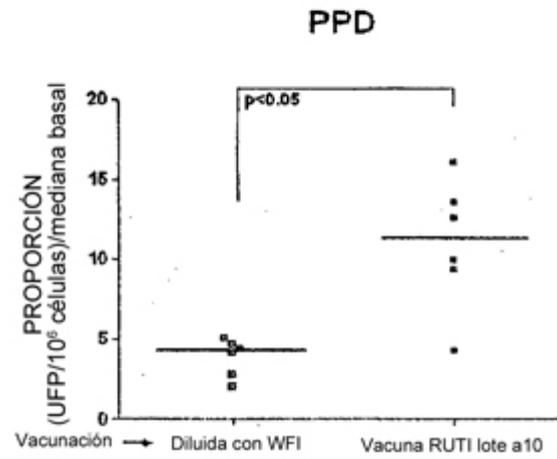


Figura 8



Figura 9

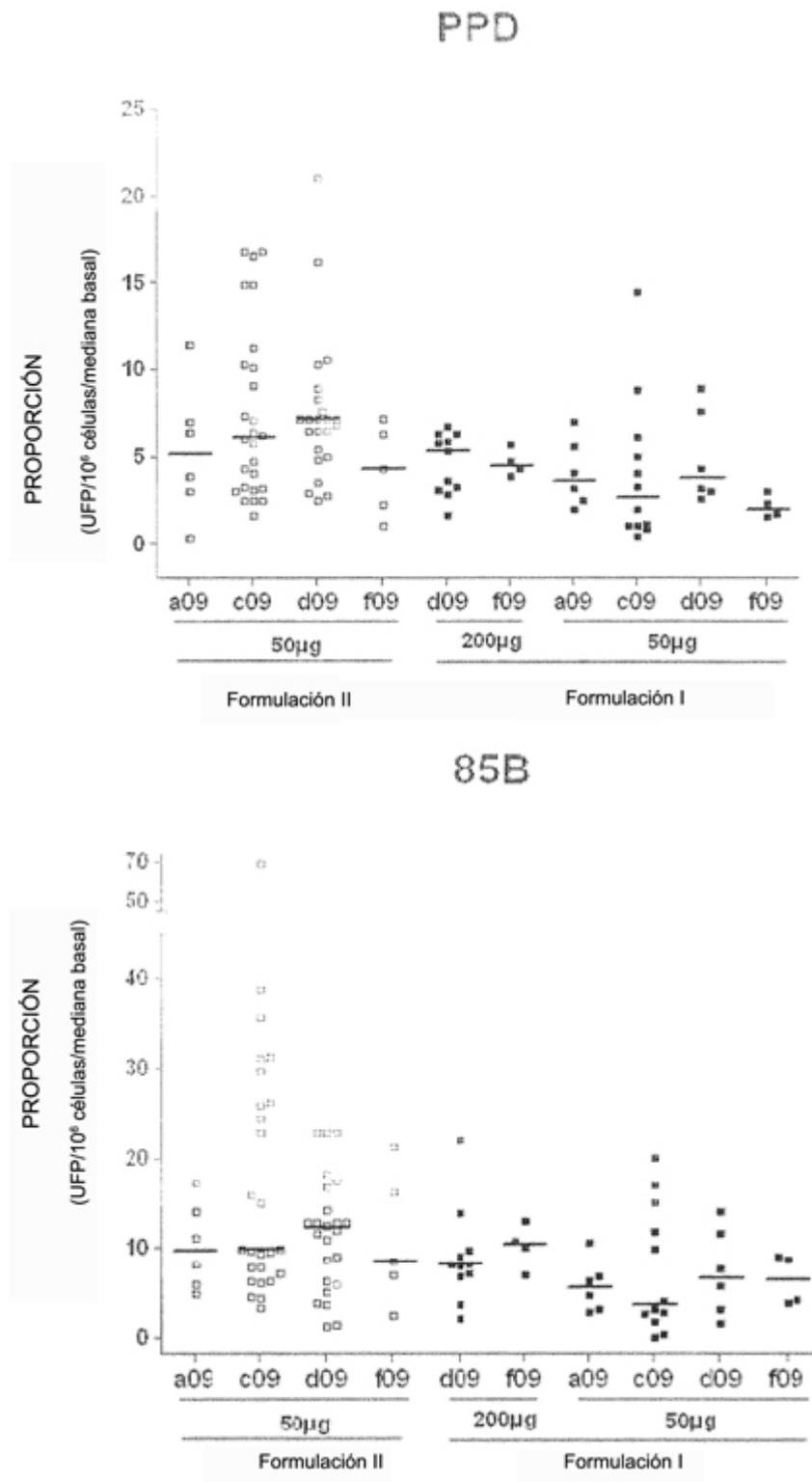


Figura 10a

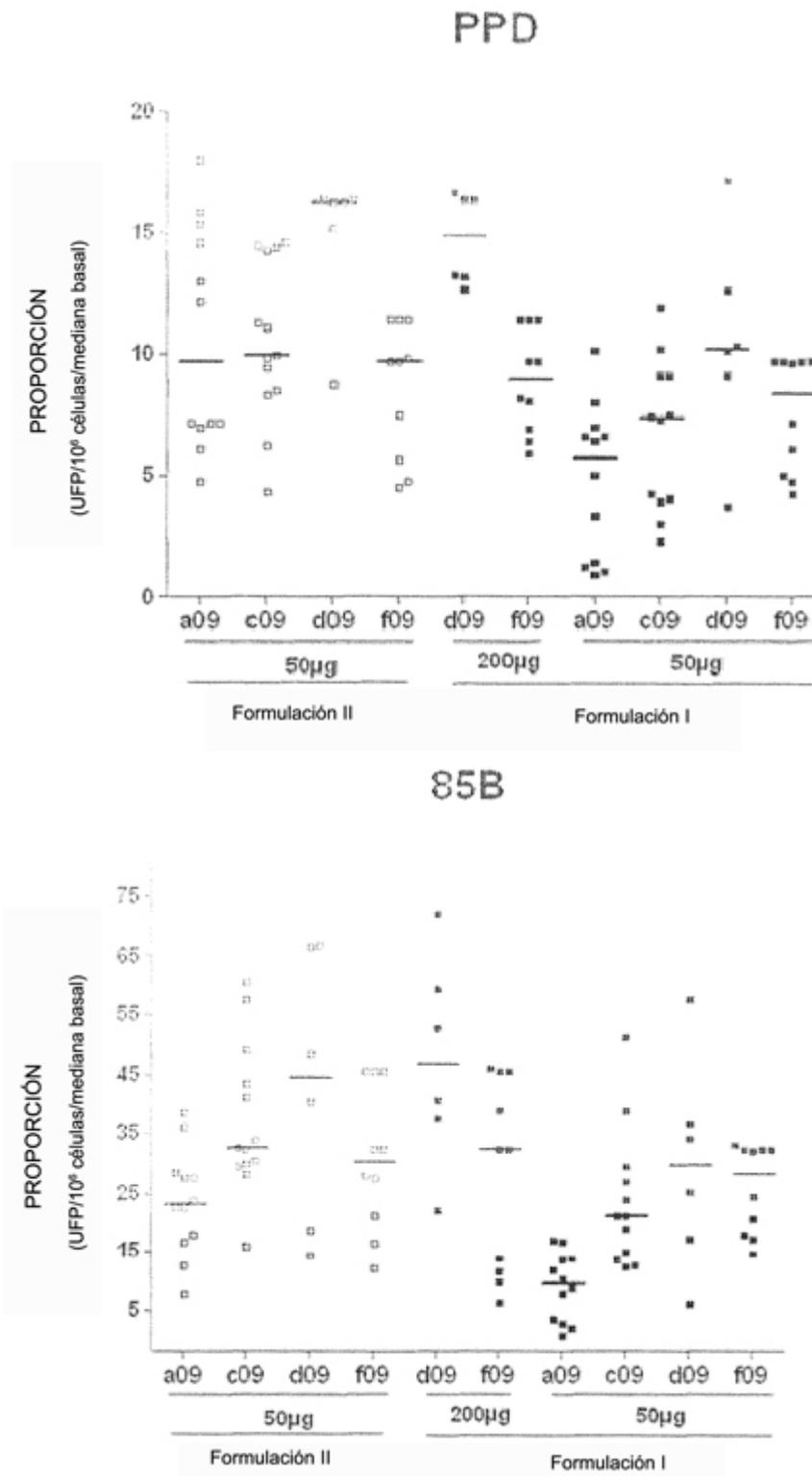


Figura 10b

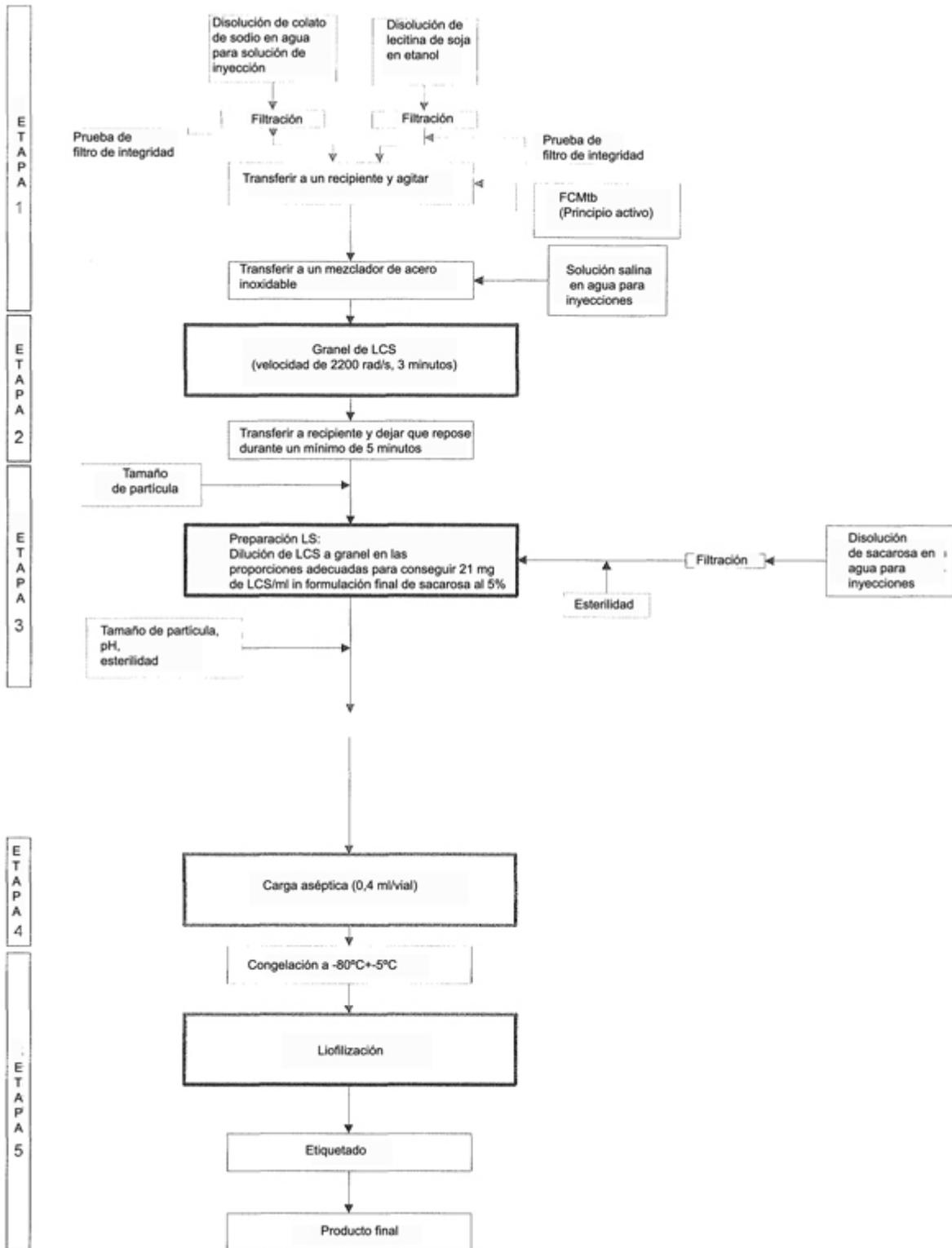


Figura 11

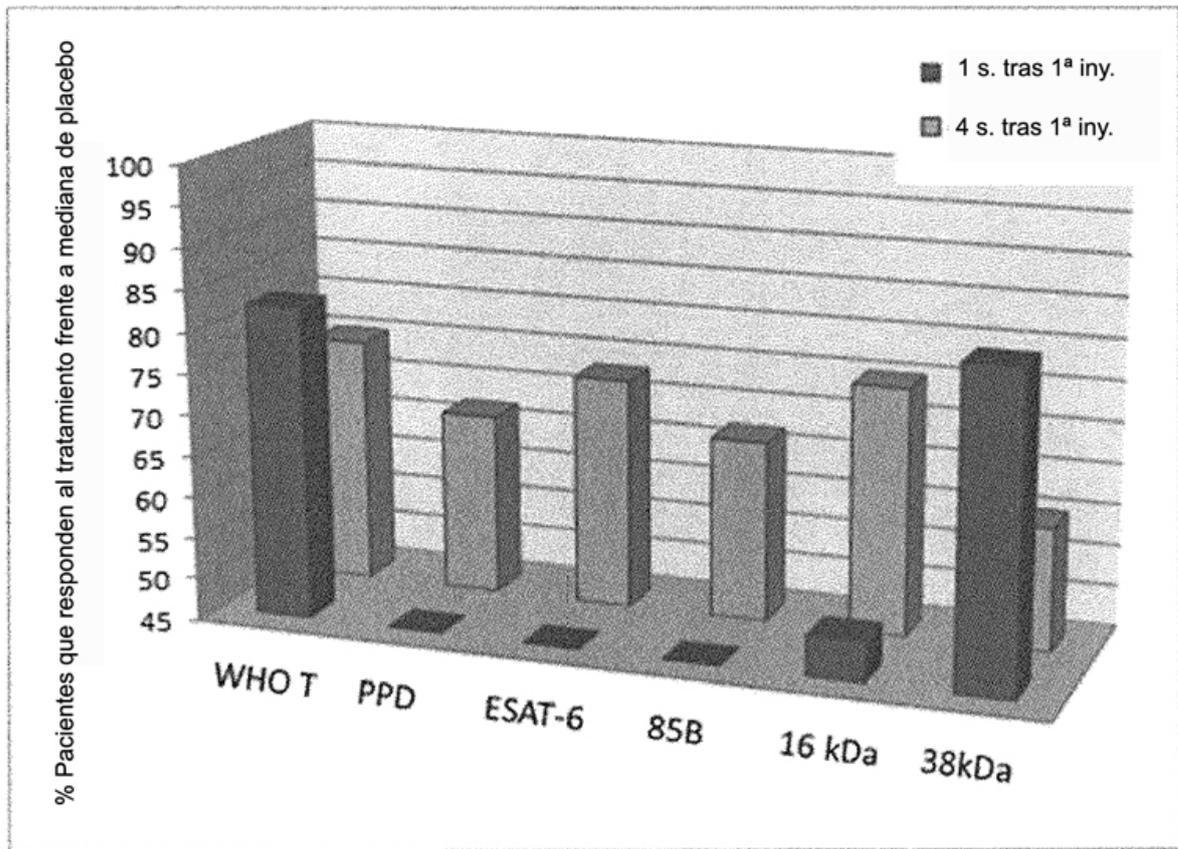


Figura 12

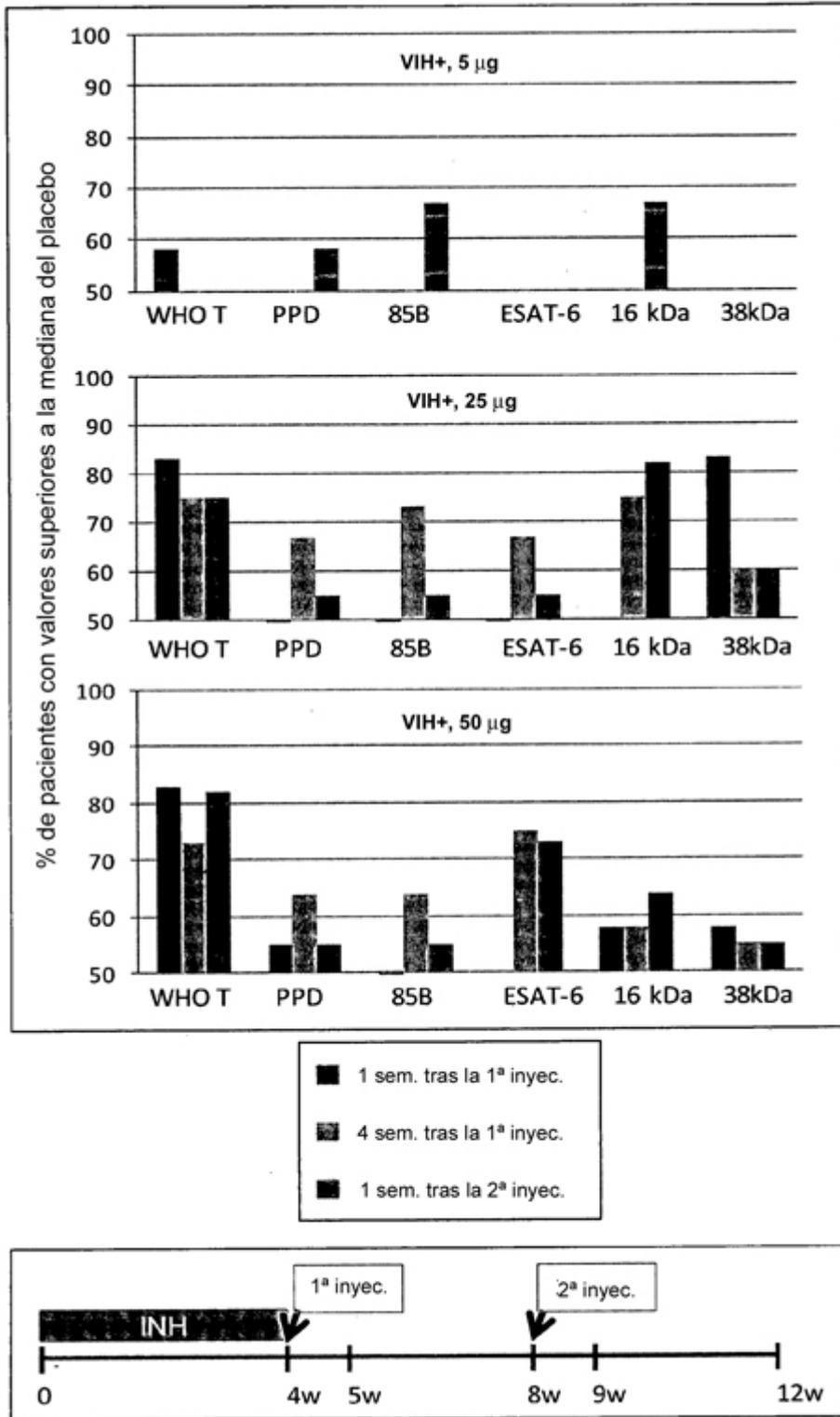


Figura 13

