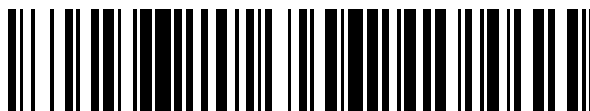


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 493**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2012** **PCT/IB2012/000353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013** **WO13104943**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2012** **E 12709369 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2802345**

54 Título: **Vacuna de MTB-C contra respuestas alérgicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
30.05.2018

73 Titular/es:

ARCHIVEL FARMA, S.L. (100.0%)
C/ Forgars de Tordera 61
08916 Badalona (Barcelona), ES

72 Inventor/es:

CARDONA IGLESIAS, PERE JOAN;
AMAT RIERA, ISABEL;
REYES MORENO, BLANCA y
AMAT FABREGAT, MARIA MERCÈ

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

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

ES 2 670 493 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de MTB-C contra respuestas alérgicas

5 La presente invención se refiere a un agente para el tratamiento o la prevención de un cuadro alérgico, tal como asma, en un mamífero, tal como un humano. El agente comprende fragmentos de una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C).

10 En general, muchas sustancias pueden desencadenar una reacción alérgica, incluyendo, pero sin limitarse a, factores medioambientales tales como polen, polvo, moho, plantas tales como hierba o árboles, caspa de animales, alimentos, medicaciones o productos químicos. Los síntomas de respuestas alérgicas incluyen, sin limitación a los mismos, los siguientes: picor, hinchazón, rinorrea, ojos llorosos, tos, respiración sibilante, dificultad para respirar, urticaria, exantemas, producción de mucosa o, como reacción más intensa, incluso anafilaxia. Las respuestas alérgicas y su intensidad varían en gran medida entre individuos de cualquier especie dada.

15 Se reconoce ampliamente que la base molecular de las reacciones alérgicas se encuentra en el sistema inmunitario de los mamíferos, que está diseñado para proteger al organismo frente a posibles daños. En individuos que muestran reacciones alérgicas, el sistema inmunitario reacciona contra alérgenos, es decir, sustancias que desencadenan una respuesta inmunitaria. Los alérgenos típicos incluyen aquellos tales como polen, ácaros o mohos, y con frecuencia estos alérgenos son inhalables, lo cual hace que sean importantes factores de desencadenamiento de respuestas alérgicas en las vías respiratorias. Por tanto, las respuestas alérgicas son reacciones inmunitarias de hipersensibilidad frente a una sustancia que no es dañina en individuos sanos (no afectados), pero que puede provocar síntomas dañinos en individuos afectados.

25 Una hipersensibilidad localizada frente a un alérgeno también se denomina atopía. La atopía puede tener un componente hereditario, aunque debe producirse el contacto con el alérgeno antes de que pueda desarrollarse la reacción de hipersensibilidad. Una de las enfermedades alérgicas más comunes de las vías respiratorias es el asma alérgica, que se encuentra entre las respuestas alérgicas más comunes. A su vez, se entiende que el asma alérgica es el tipo más común de asma. Aproximadamente el 90 % de los niños con asma infantil tienen (otras) alergias, en comparación con aproximadamente el 50 % de los adultos. Inhalar alérgenos específicos puede desencadenar la aparición de síntomas de asma asociados con asma alérgica. Casi todos los individuos con asma (alérgica o no alérgica) empeoran tras realizar ejercicio en aire frío o tras inhalar cualquier tipo de humo, polvo, gases y algunas veces olores fuertes.

35 El asma es una enfermedad pulmonar obstructiva y uno de los trastornos más comunes que se encuentran en la medicina clínica. El asma se caracteriza normalmente por un grado variable de obstrucción del flujo de aire, inflamación de las vías respiratorias e hipersensibilidad bronquial. Algunos pacientes con asma también muestran una hipersensibilidad a agentes comúnmente inhalados, tales como polen. El asma es un trastorno inflamatorio crónico del sistema respiratorio, que conduce a la alteración del epitelio de las vías respiratorias, infiltración de células inflamatorias, así como tensiones del músculo liso. El asma es un trastorno inflamatorio crónico en el sistema respiratorio que se caracteriza por una obstrucción reversible de las vías respiratorias y por hiperreactividad traqueal y bronquial, lo que conduce al estrechamiento de las vías respiratorias. Se caracteriza de manera clínica por respiración sibilante, disnea y tos. Aunque la forma más común de asma es el asma alérgica, otros factores que contribuyen al asma incluyen infección, ejercicio, contaminación del aire y posiblemente factores emocionales. En un sujeto que padece asma, los conductos de las vías respiratorias desde los pulmones hasta la nariz y la boca se estrechan, lo que conduce a dificultad para respirar. Estos síntomas se producen de manera crónica o aguda, o como brotes agudos de una enfermedad crónica; con frecuencia se producen en respuesta a cambios en el entorno, tales como cambios climatológicos, presencia de alérgenos y/o infecciones de las vías respiratorias. El asma también se define como disnea crónica o paroxística debida a trastorno pulmonar.

50 Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, con frecuencia se ha implicado una predisposición genética en el asma y otras respuestas alérgicas. Aunque algunos pacientes muestran una historia familiar de asma u otras respuestas alérgicas, grandes números de pacientes no tienen una historia personal o familiar.

55 El asma bronquial se caracteriza por la contracción recurrente del músculo liso y se produce como cuadro crónico o episódico o como síntomas que se producen de manera episódica de una enfermedad crónica. Se caracteriza de manera clínica por la aparición episódica o crónica de respiración sibilante, tos y sensación de opresión en el tórax, limitación del flujo de aire en una prueba de función pulmonar, y reversibilidad completa o parcial de la disfunción obstructiva tras una terapia broncodilatadora.

60 El síndrome subyacente del asma es una inflamación crónica y con frecuencia los pulmones de los pacientes muestran hiperinflamación. El rasgo característico del asma es la hiperreactividad bronquial (hipersensibilidad bronquial). La hipersensibilidad bronquial (u otras combinaciones con vías respiratorias o hiperreactividad) es un estado caracterizado por broncoespasmos fácilmente desencadenados (contracción de los bronquiolos o vías respiratorias pequeñas). El principal síntoma manifestado por pacientes con asma es hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR); es decir, respuesta contráctil excesiva de los músculos bronquiales en reacción a un

broncoconstrictor no específico tal como metacolina. La metacolina (Provocholine) es un éster de colina sintético que actúa como agonista de receptor muscarínico no selectivo en el sistema nervioso parasimpático. Puede usarse para diagnosticar hiperreactividad/hipersensibilidad bronquial (estos dos términos se usan de manera intercambiable) mediante una prueba de exposición bronquial. Para ello, productos químicos tales como metacolina o histamina también desencadenan broncoespasmos en individuos normales, pero los individuos con hipersensibilidad bronquial tienen un umbral inferior.

La prevalencia e intensidad del asma y otras reacciones atópicas/alérgicas han aumentado significativamente desde la mitad del siglo XX. Varios estudios han indicado una correlación entre la prevalencia de trastornos atópicos incluyendo asma con la exposición a antígenos en los primeros años de vida. Los niños que se crían en granjas, que tienen un mayor número de hermanos mayores y que asisten a guardería en grupo a una edad temprana parecen estar protegidos en gran medida frente al asma y otros cuadros atópicos. Esto ha conducido a la formulación de la "hipótesis de la higiene", según la cual el riesgo de una enfermedad atópica está vinculado a una exposición a microbios reducida durante la infancia (Strachan, *BMJ.*, 1989, 299:1259-1260; y Rook *et al.*, *Springer Semin. Immunopathol.*, 2004, 25: 237-255). Actualmente se entiende que la activación del sistema inmunitario innato mediante antígenos en individuos expuestos (niños) puede ser el motivo molecular para este fenómeno. El sistema inmunitario innato se basa en el reconocimiento de patrones "extraños" (patrones asociados con patógenos/microbios (PAMP/MAMP)) y proporciona una respuesta rápida pero no específica a posibles patógenos (se requiere que no haya una exposición previa a un patógeno particular).

Se sabe que las citocinas de linfocitos T cooperadores 2 (Th2) desempeñan un papel importante en el asma alérgica y otras respuestas alérgicas/atópicas. Estas citocinas de Th2, incluyendo IL-4, IL-5 e IL-13 entre otras, inducen muchas de las manifestaciones de atopia e inflamación, tales como conmutación de isotipo de linfocitos B para la producción de IgE, activación y quimiotaxis de eosinófilos, y también respuestas específicas de las vías respiratorias tales como hiperreactividad bronquial (Kline, *Proc. Am. Thor. Soc.*, 4 (3):283-8, 2007). Los granulocitos eosinófilos, habitualmente denominados eosinófilos (o acidófilos), son glóbulos blancos que son uno de los componentes del sistema inmunitario responsables de combatir parásitos multicelulares y determinadas infecciones en vertebrados. Junto con los mastocitos, también controlan mecanismos asociados con la alergia y el asma. Son granulocitos que se desarrollan durante la hematopoyesis en la médula ósea antes de migrar a la sangre. En el asma alérgica, los eosinófilos se encuentran normalmente en zonas que rodean a los bronquios; entonces se denominan eosinófilos peribronquiales.

Dado que las respuestas de Th1 y las respuestas de Th2 son contrarreguladoras, se propuso que una inducción de una respuesta de Th1 puede proteger contra respuestas de Th2 no deseadas (tales como en cuadros atópicos tales como asma alérgica) y que tal inducción de respuesta de Th1 puede proporcionar una propensión aumentada al asma atópica. Sin embargo, trastornos alérgicos reducidos en niños con infestaciones helmínticas (con intensa inflamación por Th2) así como la prevalencia creciente de trastornos dependientes de Th1 (tales como diabetes de tipo 1, enfermedad inflamatoria del intestino y esclerosis múltiple) que se ha producido en paralelo con la epidemia de asma, sugieren que la inducción de inmunidad impulsada por Th1 no explica de manera adecuada la protección descrita por la hipótesis de la higiene. Un trabajo reciente se ha centrado en la promoción de respuestas de tipo regulador (células Treg), que se sabe que suprimen la inflamación tanto de tipo Th1 como de tipo Th2, mediante patrones moleculares asociados con patógenos (Kline *et al.*, *J allergy Clin Immunol* 2005; 116:1202-5).

El asma alérgica es una enfermedad de las vías respiratorias cada vez más prevalente en la actualidad, cuyo tratamiento se centra, no siempre de manera satisfactoria, en el tratamiento de los síntomas.

Tales tratamientos pueden implicar la inhalación de corticoesteroides o la administración de agonista beta, metilxantina, agentes colinérgicos o agonistas de leucotrieno. Sin embargo, normalmente estos agentes no solo se dirigen al asma, sino que tienen considerables efectos secundarios. Por tanto, se desea el uso de agentes adaptados al cuadro y en este sentido un área productiva de investigación actual es investigar la utilidad de productos microbianos para la modulación de inflamación en asma y trastornos atópicos. Para ello, en el estado de la técnica se usan los siguientes agentes, que se han sometido a prueba en ensayos clínicos: (1) ácidos nucleicos con motivos de CpG; (2) BCG (bacilo de Calmette-Guerin, *M. bovis*) que es una vacuna contra la tuberculosis profiláctica viva y deriva de una cepa atenuada de *M. bovis*; (3) un agente que comprende *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*) desactivada por calor está actualmente en desarrollo clínico.

1. Dinucleótidos de CpG: El ADN bacteriano se diferencia del ADN de mamífero en la presencia de patrones de secuencia sin metilar de dinucleótidos de citosina-guanina (CpG), y muchos de los efectos de ADN bacteriano pueden resumirse por oligodesoxinucleótidos (ODN) que contienen estos CpG en motivos de secuencias de bases específicas (ODN de CpG). Una hipótesis es que ODN de CpG previenen un asma atópica provocando una regulación en el equilibrio Th1/Th2. El papel de ADN de CpG como posible inmunomodulador en el paciente con asma se revisa, por ejemplo, por Kline *et al.*, *J allergy Clin Immunol* 2005; 116:1202-5.

2. Vacuna contra tuberculosis de BCG: Dado que algunos estudios han propuesto que una disminución en las infecciones bacterianas tales como tuberculosis es un factor subyacente a la prevalencia e intensidad crecientes de trastorno atópico en países desarrollados, se ha sometido a prueba una vacuna profiláctica de BCG (bacilo de

Calmette-Guerin) contra *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que consiste en una cepa viva de *Mycobacterium bovis* atenuada, en la terapia preventiva del asma. Sin embargo, todavía hay ideas enfrentadas sobre la relación inversa entre la vacunación de BCG y el asma dado que diferentes estudios epidemiológicos han mostrado resultados opuestos. La explicación biológica para el BCG como agente que inhibe respuestas alérgicas se basa generalmente en su capacidad para estimular la producción de citocinas de Th1. El papel de BCG en el asma se ha revisado por Zhang *et al.*, Chin. Med. J., 2009, 122(5):577-583. Yu Deng *et al.* (J Clin Immunol (2011) 31:419-429) divulgan que el efecto antiasmático de la vacunación con BCG neonatal depende del equilibrio IL-17/IFN- γ en un modelo de asma de ratón BALB/c.

3. *Mycobacterium vaccae*: Un tercer enfoque se basa en la hipótesis de que la vacuna de *Mycobacterium vaccae* (*M. vaccae*), inicialmente en desarrollo para el tratamiento de la tuberculosis, puede atenuar reacciones asmáticas que se producen tras la exposición a alérgeno. La vacuna de *Mycobacterium vaccae* consiste en una cepa desactivada por calor de *M. vaccae*. Se sugirió que *Mycobacterium vaccae* desactivada por calor puede ser capaz de modular el equilibrio Th1/Th2. El papel de *Mycobacterium vaccae* se ha sometido a prueba en algunos ensayos clínicos con resultados positivos (Camporota *et al.*, Eur. Respir. J., 2003, 21: 287-293).

A la vista de las limitaciones de cada uno de los enfoques (1) a (3) anteriores, es necesario desarrollar nuevos compuestos y composiciones que sea probable que mejoren el estado general y que puedan usarse como agente preventivo y/o terapéutico.

Problema que va a resolverse

El objetivo de la presente invención es proporcionar un agente mejorado para la terapia y profilaxis de cuadros alérgicos incluyendo asma y rinitis en humanos y otros mamíferos.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un agente que comprende fragmentos de una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal. En realizaciones particulares, el agente está caracterizado además por al menos una de las siguientes características:

1. Los fragmentos se originan de un complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulento;
2. el agente puede obtenerse cultivando la cepa de MTB-C y, posteriormente, homogeneizando el cultivo celular en presencia de un tensioactivo preferiblemente no iónico;
3. el agente es una formulación de liposoma que comprende un agente de formación de liposoma y sacarosa;
4. el agente es una formulación de liposoma que comprende un agente de formación de liposoma y que tiene un tamaño promedio en z de las partículas de 150 nm o menos.

Aunque cada una de las características 1 a 4 anteriores pueden cumplirse solas, también pueden cumplirse una cualquiera o más de las mismas en combinación. Por tanto, por ejemplo, también en el caso de las características 1 y 2, el agente puede estar en forma de una formulación de liposoma, y también en el caso de las características 1 a 3 el tamaño promedio en z de las partículas de liposoma puede ser de 150 nm o menos. En una realización particular, el tamaño promedio en z de las partículas de liposoma puede estar en el intervalo desde 40 hasta 135 nm, más preferiblemente desde 55 hasta 125 nm, mientras que, alternativamente, la formulación de liposoma de la invención puede ser una emulsión, de tal manera que el tamaño promedio en z de las partículas puede ser inferior a 40 nm. Se prefiere que el tamaño de partícula esté distribuido uniformemente, de modo que el índice de polidispersidad de las partículas es de 0,4 o menos, preferiblemente 0,3 o menos.

Además, las partículas según cualquiera de las características 2 a 4 anteriores pueden estar caracterizadas además porque la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta. En una realización particular de la invención, la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en el NCTC en Londres.

El agente de la invención, que puede ser una formulación de liposoma, puede comprender adicionalmente un agente tensioactivo (d). El agente de la invención también puede comprender adicionalmente uno o más tensioactivos no iónicos (e). El tensioactivo no iónico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de éster de sorbitano y más preferiblemente un etoxilato de octilfenol.

Los fragmentos de MTB-C del agente de la invención también pueden ser o comprender fragmentos de pared celular.

El agente de la invención puede estar caracterizado además por uno o más de los siguientes: (i) El agente de formación de liposoma puede ser un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado,

preferiblemente lecitina, y lo más preferiblemente lecitina de soja. (ii) El agente tensioactivo se selecciona de colato, desoxicolato, colesterol y hemisuccinato de colesterol. (iii) Los fragmentos son o comprenden fragmentos de proteína de MTB-C. En una realización particular del mismo, el agente puede comprender 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, que tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),

(ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa, que tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv0934),

(iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, que tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv1866c), y

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

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

Además, al menos uno de los siguientes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, o fragmento de los mismos, puede estar presente en el agente de la invención: HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B. Además, uno o más ácidos micólicos y/o un micolato conjugado con azúcar pueden estar comprendidos en el agente, preferiblemente dimicolato de trehalosa y/o un glucolípido, preferiblemente lipoarabinomano. El agente de la invención puede contener adicionalmente una o más sales o una disolución de las mismas, y dicha sal es preferiblemente cloruro de sodio.

Particularmente en el caso en el que el agente cumple la característica 2 anterior, es decir, que puede obtenerse cultivando la cepa de MTB-C y homogeneizando el cultivo celular en presencia de un tensioactivo preferiblemente no iónico, la manera en la que puede obtenerse puede caracterizarse además de la siguiente manera: (a) cultivar la cepa de MTB-C a lo largo de un periodo igual o superior a tres semanas y, posteriormente, (b) homogeneizar el cultivo celular en presencia de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, el método mediante el cual puede obtenerse comprende además las etapas:

a. separar las células no fragmentadas y los componentes solubilizados por medio de centrifugación,

b. someter la fracción de fragmentos de pared celular a tratamiento químico o físico para inactivar las eventuales células de cepa virulenta que contiene eventualmente, y

c. secar el agente mediante liofilización.

El agente según la invención puede conservarse según cualquier método conocido en la técnica; sin embargo, para el caso de una formulación de liposoma según la invención, se prefiere que la conservación sea mediante secado por congelación.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el agente (formulación de liposoma) de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal.

En una realización particular, la respuesta alérgica que puede tratarse mediante el agente (por ejemplo, la formulación de liposoma) de la invención está mediada por IgE. La respuesta puede ser atopia. La respuesta alérgica puede ser disfunción respiratoria y/o inflamación broncoalveolar. Preferiblemente la respuesta se selecciona de asma, polinosis, rinitis y eczema. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, actualmente se cree que el asma, la polinosis, la rinitis y el eczema pueden implicar una respuesta alérgica. Sin embargo, la invención se refiere a todos los usos del agente y la composición farmacéutica descritos en el presente documento para el uso en la prevención o terapia de uno cualquiera o más de asma, polinosis, rinitis y eczema, independientemente de la cuestión de si hay una respuesta alérgica subyacente al asma, polinosis, rinitis y eczema en un individuo particular. Sin embargo, en una realización se prefiere que el asma sea asma alérgica, y que la rinitis sea rinitis alérgica. En una realización particular, el asma es asma bronquial.

La vía de administración no está particularmente limitada como tal, a menos que características del agente o la composición lo requieran. Sin embargo, se prefiere que el agente o la composición de la invención se proporcione para inyección, preferiblemente por vía subcutánea o intramuscular, o para administración sublingual, inhalada, percutánea o intradérmica. En una realización particular, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para la administración de 200 µg o menos por dosis, y preferiblemente hasta 50 µg por dosis, tal como lo más preferiblemente 25 µg por dosis.

En una realización particular, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para su uso en la prevención de la respuesta alérgica. En una realización particular alternativa, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para su uso en terapia de la respuesta alérgica.

- 5 El agente según la invención puede administrarse una o varias veces, y en el caso de prevención, se prefiere administrar al menos dos veces, preferiblemente más de dos veces. El agente o la composición farmacéutica de la invención puede proporcionarse para una administración repetida, preferiblemente en intervalos de una semana o más, y más preferiblemente de dos semanas o cuatro semanas.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de flujo que muestra el procedimiento aguas arriba del principio activo FCMtb, incluyendo los materiales y reactivos implicados en el procedimiento y controles en proceso adecuados.

- 15 Figura 2: Diagrama de flujo que muestra el procedimiento aguas abajo del principio activo FCMtb, incluyendo los materiales y reactivos implicados en el procedimiento y controles en proceso adecuados.

Figura 3: Diagrama de flujo de caracterización de proteínas.

- 20 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 marcador de peso molecular P.M. (5).

- 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. P.M. 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 ESAT-6 de Lionex. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 9, 10, 11, (lote FCMtb-52.1 en el carril 9)), patrón ESAT-6 de Lionex a diferentes concentraciones (de 4 a 8); 5d: Identificación mediante 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*. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9), patrón de HSP70 (5, 6); 5e: Identificación de antígeno de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv0934) 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 por fluorescencia usando el sistema Odyssey. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 6, 7), patrón de 38 kDa (4, 5). 5f: Identificación de antígeno Ag85B (Rv1886c) en lotes de FCMtb mediante metodología de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo específico y llevada a cabo en paralelo con patrón de Ag85B de *M. tuberculosis* de Lionex. Detección por fluorescencia usando el sistema Odyssey. Lotes de FCMtb (1, 2, 3, 5, 6, 7), patrón de Ag85B (4).

- Figura 6: Interacción de bandas de proteína indicadas de diferentes lotes de FCMtb (50 µg/carril) con suero diluido 1/8000 obtenido de ratones infectados tras inocularse dos veces con la formulación de liposoma basada en una composición de vacuna farmacéutica según esta invención, usando la metodología de inmunotransferencia de tipo Western.

- Figura 7: Análisis de lípidos. 7a: Identificación de poliaciltrehalosa (PT), 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) y diaciltrehalosa (DAT) en cepas de referencia (H37Rv (2) y NCTC 13536 (1)) y diferentes lotes de FCMtb (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 diferentes lotes de FCMtb. B: (1) Patrón de TDM (1), otros carriles diferentes lotes de FCMtb. 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 (patrón de FCMtb-51.2 6)). (B) Para ilustración/referencia, (C) lote FCMtb-47b (1) en comparación con patrón de ácido micólico (2). 7d: Identificación de LAM (referencia en el carril izquierdo, muestras derivadas de liposomas según la invención en los demás carriles).

Figura 8: Preparación de fracturación por congelación de disolución madre de concentrado de liposoma (LCS) (microscopia electrónica).

- 60 Figura 9: Diagrama de flujo del procedimiento según el modo preferido de llevar a cabo esta invención.

La figura 10 muestra un resumen esquemático del protocolo: inducción de asma, tratamiento con la FORMULACIÓN A (véase el ejemplo 11), aquellas variables que se midieron tanto en animales tratados como en controles.

- 65 Figura 11: Representación de los resultados en un gráfico de barras que presenta el promedio de todos los valores individuales.

La figura 12 muestra los efectos que tuvo la exposición a OVA sobre animales no tratados, comparando la función pulmonar y el reclutamiento de eosinófilos en animales sensibilizados frente a no sensibilizados. Como indican los datos, el procedimiento de sensibilización fue eficaz ya que aquellos animales expuestos a OVA mostraron una respuesta de vías respiratorias aumentada clara y significativa ($p < 0,001$, ANOVA de 2 factores) frente a metacolina en comparación con animales no sensibilizados (figura 12a). Además, las vías respiratorias de animales no sensibilizados contenían números muy bajos de eosinófilos, mientras que en las vías respiratorias de aquellos sensibilizados frente a OVA los inventores detectaron un aumento significativo ($p < 0,001$, prueba de la t) de eosinofilia pulmonar (figura 12b). Por tanto, el presente modelo facilita una evaluación de los posibles efectos que surgen de los tratamientos sometidos a prueba.

La figura 13 muestra la reactividad bronquial en respuesta a dosis crecientes de metacolina en 7 grupos de ratones, mientras que la figura 14 presenta los cuatro grupos de tratamiento diferentes (a, b, c y d). Con el fin de simplificar la representación de datos globales, solo se indica significación estadística en la figura 14.

En la figura 14 se muestran las curvas de dosis-respuesta normalizadas para cada animal frente a su propia respuesta en el nivel inicial. Los animales no sensibilizados tratados con BCG o FORMULACIÓN A (P) mostraron una mayor reactividad frente a animales no sensibilizados en el grupo de control no tratado (14a). Al comparar animales tratados con la vacuna de BCG, no se observaron diferencias en la reactividad bronquial entre animales sensibilizados y no sensibilizados (14b). En cuanto al tratamiento con la vacuna de FORMULACIÓN A, la administración preventiva (P) en animales sensibilizados dio como resultado una reactividad menor que la que mostraron animales no sensibilizados tratados con la misma vacuna (14c). Además, también era inferior a la reactividad observada tanto en animales sensibilizados como en aquellos tratados con BCG (14d). Al comparar con la curva de los ratones sensibilizados no tratados, la inhibición de la reactividad se vuelve muy clara ($p < 0,001$, ANOVA de 2 factores), aunque sin alcanzar los valores de reactividad de nivel inicial observados en ratones no sensibilizados. El régimen de tratamiento terapéutico disminuyó ligeramente la respuesta a metacolina comenzando a una dosis de 2,50 mg/ml, aunque nunca alcanzó significación estadística (14d).

La figura 15 representa gráficamente la significación estadística de eosinofilia entre los diferentes grupos. Para más detalles, véase el texto principal.

Definiciones

"Tamaño de partícula" se refiere, si no se especifica de otro modo, al diámetro de las partículas. Cuando el tamaño de partícula no pueda determinarse de manera exacta, se refiere al tamaño de partícula aproximado.

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

Abreviaturas

BAL	Lavado broncoalveolar
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
UFC	Unidad formadora de colonias
CpG	Dinucleótido(s) de citosina-guanina
DP	Producto terminado
DS	Principio activo
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISPOT	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de puntos
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FCMtb	Fragmentos de una cepa de complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB-C)
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IGTIP	Institut per a la Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol
IL	Interleucina
IMP	Especialidad farmacéutica en investigación
i.p.	intraperitoneal
CEP	Controles en proceso
LCS	Suspensión de concentrado de liposoma
LPS	Lipopolisacárido
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mtb-C	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCTC	Colección nacional de cultivos tipo (Londres)
OVA	Ovoalbúmina
PPD	Derivado purificado de proteína
c.s.	Cantidad suficiente

s.c.	subcutáneo
TB	Tuberculosis
Th1	Linfocito T cooperador 1
Th2	Linfocito T cooperador 2
p/v	peso/volumen
p/p	peso/peso
Form. A	Formulación A

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a un agente que comprende fragmentos de pared celular de una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal.

10 A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término "que comprende" se usa en el contexto de la presente solicitud para indicar que pueden estar presentes opcionalmente miembros adicionales además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". Sin embargo, se contempla como una 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 debe entenderse que "que comprende" tiene el significado de "que consiste en".

15 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.

20 El agente puede caracterizarse además mediante al menos una de las siguientes características:

1. Los fragmentos se originan de un complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulento;
2. el agente puede obtenerse cultivando la cepa de MTB-C y, posteriormente, homogeneizando el cultivo celular en presencia de un tensioactivo preferiblemente no iónico;
3. el agente es una formulación de liposoma que comprende fragmentos de un complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), un agente de formación de liposoma y sacarosa;
4. el agente es una formulación de liposoma que comprende fragmentos de un complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), un agente de formación de liposoma y que tiene un tamaño promedio en z de las partículas de 150 nm o menos.

35 A lo largo de la presente memoria descriptiva, "complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulento" significa una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) que es virulenta (al menos) para humanos. Se conoce que BCG (*M. bovis*), así como agentes desactivados por calor (tales como *M. vaccae* desactivado por calor, que no pertenece a MTB-C) no son virulentos para humanos inmunocompetentes. En la realización de la característica 1 anterior, los fragmentos no se originan de *M. bovis* o *M. vaccae* (inactivado por calor). En una realización particular, los fragmentos no se originan de BCG, en particular no de la cepa de BCG danesa 1331. Para evitar cualquier duda, la tuberculosis no es una respuesta alérgica. Se prefiere que, dentro de las limitaciones de esta invención, el agente proporcionado no se administre para la prevención o el tratamiento de tuberculosis.

45 El agente según la característica 2 anterior puede obtenerse particularmente mediante un método que comprende las etapas: (a) cultivar la cepa de MTB-C a lo largo de un periodo igual o superior a tres semanas y, posteriormente, (b) homogeneizar el cultivo celular en presencia de un tensioactivo no iónico.

Puede reconocerse que las características 3 y 4 anteriores tienen en común que el agente es una formulación de liposoma que comprende fragmentos de un complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) y un agente de formación de liposoma.

50 Aunque cada una de las características 1 a 4 anteriores pueden cumplirse solas, también pueden cumplirse una cualquiera o más de las mismas en combinación. Por tanto, por ejemplo, también en el caso de las características 1 y 2, el agente puede estar en forma de una formulación de liposoma, y también en el caso de las características 1 a 3 el tamaño promedio en z de las partículas de liposoma puede ser de 150 nm o menos, y así sucesivamente. Cualquier combinación de 2, 3 o todas de las características 1 a 4 es posible. Generalmente se acepta que un procedimiento de formación de liposomas genera un entorno lipídico, facilitando la solubilidad y conduciendo a una suspensión de sustancias, tales como FCMTb. Los liposomas dentro del significado de esta invención pueden ser unilaminares, multilaminares o combinaciones de los mismos.

Los fragmentos de una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) también se denominan FCMtb. FCMtb puede ser de cualquier tipo de sustancia derivada de la cepa de MTB-C, o de cualquier mezcla de cepas de MTB-C, mediante lo cual se prefieren fragmentos que son o derivan de proteínas y/o lípidos. FCMtb dentro del sentido de esta solicitud es normalmente una mezcla de diferentes antígenos proteínicos y lípidos que pueden derivarse de células de MTB-C. Los fragmentos celulares pueden obtenerse mediante 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. En una realización particular, pueden obtenerse tal como se describe en los documentos WO2008053055 y EP2090318 A1, aunque no se limitan necesariamente a una cepa virulenta, tal como se describió anteriormente.

La homogeneización puede llevarse a cabo por medio de sonicación con ultrasonidos o por medio del uso de perlas pequeñas de aproximadamente 0,1 mm de diámetro, por ejemplo, perlas de sílice o de circonia/sílice, junto con un homogeneizador mecánico. Un homogeneizador mecánico que puede usarse es, por ejemplo, el modelo BioSpec BeadBeater®. Las células de MTB-C se rompen mediante este procedimiento de homogeneización, de modo que se obtienen pequeños fragmentos celulares, que incluyen normalmente pequeños fragmentos de pared celular. En una realización particular, pueden obtenerse tal como se describe en los documentos WO2008053055 y EP2090318 A1, aunque no se limitan necesariamente a una cepa virulenta, tal como se describió anteriormente.

Una característica normalmente relevante de la preparación de los fragmentos celulares es la "destoxificación" de los fragmentos de pared celular mediante deslipidación parcial, bien conocida por el experto en la técnica, un procedimiento que permite eliminar las moléculas de tipo endotoxina, tales como lipoarabinomano. Por tanto, preferiblemente se destoxifica y pasteuriza el FCMtb, entonces la formulación de liposoma obtenida es estéril y está libre de endotoxinas. La dispersión de fragmentos celulares en tampón puede liofilizarse opcionalmente para facilitar el almacenamiento de la misma. Para ello, puede distribuirse la dispersión 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.

Cuando el agente es una formulación de liposoma, los liposomas 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 en z de las partículas, tal como puede determinarse mediante dispersión de luz dinámica, es de 150 o menos, preferiblemente 135 nm o menos, más preferiblemente 125 nm o menos. (También son posibles 145 nm o menos, 140 nm o menos, 130 nm o menos, 120 nm o menos, 110 nm o menos, 100 nm o menos, 95 nm o menos, 90 nm o menos, 85 nm o menos, 80 nm o menos). En dispersión de luz dinámica el parámetro promedio en z se considera un número estable e importante que puede obtenerse mediante la técnica, y el número de tamaño que se usa preferiblemente con propósitos de control de calidad. Preferiblemente, los liposomas de la formulación según esta invención son monomodales, es decir, sólo muestran 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 microscopia electrónica de preparaciones de fracturación por congelación de la formulación de liposoma, tal como se muestra en la figura 8. Esférico significa de ese modo que para al menos el 90 % de las partículas de liposoma (en número), todos los puntos de superficie de la partícula individual tienen una distancia similar o idéntica al centro del liposoma, es decir el radio mínimo de una partícula de este tipo está relacionado con el radio máximo de la misma partícula en una razón de 0,6 o más, 0,7 o más, 0,8 o más o 0,9 o más. La formulación de liposoma según la presente invención puede comprender liposomas multilaminares o unilaminares, o una mezcla de los mismos. En línea 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 provoca en sí mismo alteración, desintegración o fusión de los liposomas o los desestabiliza físicamente de manera significativa de cualquier otro modo. Como regla general, cualquier tampón puede ser adecuado siempre que tanto la fuerza iónica como el valor de pH sean comparables a los del tampón en el que se habían formado los liposomas puede ser adecuado. Preferiblemente, se usa un tampón de composición similar o idéntica a la del tampón en el que se habían formado los liposomas.

En el caso de la realización 3 anterior, la formulación de liposoma comprende preferiblemente sacarosa a del 1 al 20 % (p/v), preferiblemente sacarosa a del 2 al 12 % (p/v), más preferiblemente sacarosa a del 3 al 8 % (p/v) y lo más preferiblemente sacarosa a del 4 al 6 % (p/v). Particularmente se prefiere sacarosa a aproximadamente el 5 %.

En una realización particular, la formulación de liposoma anteriormente descrita tiene un tamaño de partícula promedio en z en el intervalo desde 40 hasta 150 nm, preferiblemente desde 50 hasta 135 nm, y más preferiblemente desde 55 hasta 125 nm. (También son posibles 145 nm o menos, 140 nm o menos, 130 nm o menos, 120 nm o menos, 110 nm o menos, 100 nm o menos, 95 nm o menos, 90 nm o menos, 85 nm o menos, 80 nm o menos en combinación con cualquiera de los valores inferiores de la frase anterior). El tamaño de partícula promedio en z se mide de ese modo preferiblemente (y en general para los valores de tamaño a lo largo de esta memoria descriptiva) mediante dispersión de luz dinámica, tal como se describió de manera general anteriormente y en detalle en la sección "materiales y métodos".

En una realización particular alternativa, el tamaño de partícula promedio en z de la formulación de liposoma anteriormente descrita puede ser menor, de modo que la formulación de liposoma es una emulsión, es decir, en esta realización particular el tamaño promedio en z de las partículas es preferiblemente inferior a 40 nm.

Se prefiere que el tamaño de partícula esté distribuido uniformemente, de modo que el índice de polidispersidad de las partículas es de 0,4 o menos, preferiblemente 0,3 o menos.

Además, las partículas según cualquiera de las características 2 a 4 anteriores pueden estar caracterizadas además porque la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta. En una realización particular de la invención, la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) usada para la formulación según la invención es la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en el NCTC en Londres.

En una realización preferida de una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, los liposomas de la formulación según esta invención están además monodispersados, lo que significa que no se observa ninguna anchura significativa de la distribución de tamaño. Esto se somete a prueba de manera técnica mediante un bajo índice de polidispersidad (PDI) según se determina mediante dispersión de luz dinámica, tal como 0,4 o menos, preferiblemente 0,3 o menos. Por tanto, la formulación de liposoma es una formulación de liposoma 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 de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) pueden obtenerse mediante un procedimiento que comprende un procedimiento aguas arriba y un procedimiento aguas abajo. En una realización particular, pueden obtenerse tal como se describe en los documentos WO2008053055 y EP2090318 A1, aunque no se limitan necesariamente a una cepa virulenta, tal como se describió anteriormente. Con propósitos ilustrativos, aquí se describen brevemente las cinco etapas principales y en los ejemplos 2 y 3 a continuación se facilitan modos particulares de llevar a cabo el procedimiento.

Procedimiento aguas arriba (ejemplo 2):

Etapas 1: Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Etapas 2: Recogida de *Mycobacterium tuberculosis* y congelación del extracto bruto

Procedimiento aguas abajo (ejemplo 3):

Etapas 3: Fragmentación celular y deslipidación

Etapas 4: Pasteurización

Etapas 5: Secado por congelación (opcional)

En una realización más preferida de cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas, la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta. Virulento se refiere a la patogenicidad por caso y/o la capacidad de los bacilos para invadir los tejidos del huésped (humano) y para provocar enfermedad activa. 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 MTB-C según esta invención puede cultivarse mediante inoculación en medios de cultivo bien conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, agar 7H10 o 7H11 de Middlebrook, 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 o superior a tres semanas, preferiblemente comprendido entre 3 y 4 semanas. La temperatura del cultivo se mantiene preferiblemente entre 34 °C y 38 °C. Una vez 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 formación de liposoma de la formulación de liposoma es preferiblemente un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. El fosfolípido usado puede ser o comprender, por ejemplo: fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidil-inositol. El más típico es la fosfatidilcolina, que puede sintetizarse o aislarse a partir de una variedad de fuentes naturales. Preferiblemente el agente de formación de liposoma 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 otras cosas, fosfatidilcolina, y se prefiere particularmente. Lípidos típicos que también pueden estar comprendidos en la formulación, ya sea como agente de formación de liposoma en sí mismo o como componente adicional, son: fosfato de dicetilo (DCP), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG), dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoil-fosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilcolina (PC) y/o fosfatidilserina (PS), mediante lo cual el lípido respectivo puede estar hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. Los liposomas pueden formarse usando lípidos auxiliares convencionales y técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, tales como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.

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

5 En una realización más preferida de cualquiera de las descritas anteriormente, la formulación de liposoma comprende adicionalmente: (d) un agente tensioactivo. Generalmente, todos los tipos de agentes capaces de cambiar el valor de tensión superficial pueden usarse como agente tensioactivo en el sentido de esta invención, pero se excluyen compuestos que se encuentran dentro de la definición del agente de formación de liposoma facilitada anteriormente. El experto en la técnica conoce diversos tipos de agentes tensioactivos y pueden usarse en la
10 formulación de liposoma según la presente invención. Tal como conoce el experto, los agentes tensioactivos son generalmente productos químicos con una estructura polar-no polar. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, los agentes tensioactivos tienen generalmente la tendencia a ubicarse en la superficie de partículas, creando así una monocapa molecular en la interfase que reduce el valor de tensión superficial. Los agentes tensioactivos también se denominan surfactantes o agentes activos en la superficie. En una realización preferida de la formulación de
15 liposoma que contiene tensioactivo, 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 buen modo, pero no limitativo, de llevar a cabo la invención es aquel en el que los liposomas de la formulación comprenden tanto lecitina derivada de soja como colato de sodio.

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

25 El agente puede contener opcionalmente aditivos que mejoran la estabilidad, por ejemplo: vitamina E, que se cree que actúa como antioxidante de lípidos y por tanto es particularmente útil en el caso de liposomas.

En una realización más preferida, la formulación de liposoma descrita anteriormente es una formulación de liposoma en la que los fragmentos de células de MTB-C son o comprenden fragmentos de pared celular. Puede usarse
30 cualquier cepa que pertenece a MTB-C y preferiblemente cualquier cepa que pertenece a *Mycobacterium tuberculosis*. En otra realización más preferida, la formulación de liposoma descrita anteriormente comprende fragmentos de la cepa de MTB-C NCTC 13536, que se depositó en 2010 en el NCTC en Londres (ejemplo 1). Otra cepa que puede usarse, y cuyos fragmentos pueden estar por tanto comprendidos en la formulación de liposoma, se denomina H37Rv, que puede obtenerse, por ejemplo, de los Cultivos nacionales de colecciones tipo (NCTC) de
35 Londres, Gran Bretaña (número de depósito NC007416) y la usan con frecuencia los investigadores en este campo. También es posible usar más de una cepa, es decir, que la formulación de liposoma comprenda fragmentos de diversas cepas, tales como dos, tres o más de tres.

40 El agente de la invención también puede comprender adicionalmente uno o más tensioactivos no iónicos (e). El tensioactivo no iónico puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de éster de sorbitano, y más preferiblemente un etoxilato de octilfenol. Este tensioactivo también puede usarse en el caso de la característica 2 anterior.

45 Los fragmentos de MTB-C del agente de la invención también pueden ser o comprender fragmentos de pared celular.

El agente de formación de liposoma de la formulación de liposoma es preferiblemente un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. El fosfolípido usado puede ser o comprender, por ejemplo: fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. El más típico es la fosfatidilcolina, que puede sintetizarse o aislarse
50 a partir de una variedad de fuentes naturales. Preferiblemente, el agente de formación de liposoma 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 otras cosas, fosfatidilcolina, y se prefiere particularmente. Lípidos típicos que también pueden estar comprendidos en la formulación, ya sea como agente de formación de liposoma en sí mismo o como componente adicional, son: fosfato de dicetilo (DCP), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG), dioleoil-fosfatidilcolina (DOPC), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoil-fosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilcolina (PC) y/o
55 fosfatidilserina (PS), mediante lo cual el lípido respectivo puede estar hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. Los liposomas pueden formarse usando lípidos auxiliares convencionales y técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, tales como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.

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

65 En una realización más preferida de cualquiera de las descritas anteriormente, la formulación de liposoma comprende adicionalmente: (d) un agente tensioactivo. Generalmente, todos los tipos de agentes capaces de

cambiar el valor de tensión superficial pueden usarse como agente tensioactivo en el sentido de esta invención, pero se excluyen compuestos que se encuentran dentro de la definición del agente de formación de liposoma facilitada anteriormente. El experto en la técnica conoce diversos tipos de agentes tensioactivos y pueden usarse en la formulación de liposoma según la presente invención. Tal como conoce el experto, los agentes tensioactivos son generalmente productos químicos con una estructura polar-no polar. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, los agentes tensioactivos tienen generalmente la tendencia a ubicarse en la superficie de partículas, creando así una monocapa molecular en la interfase que reduce el valor de tensión superficial. Los agentes tensioactivos también se denominan surfactantes o agentes activos en la superficie. En una realización preferida de la formulación de liposoma que contiene tensioactivo, 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 buen modo, pero no limitativo, de llevar a cabo la invención es aquel en el que los liposomas de la formulación comprenden tanto lecitina derivada de soja como colato de sodio.

En una realización incluso más preferida, la formulación de liposoma que comprende (d) el agente tensioactivo es una formulación de liposoma en la que la razón entre (a) y (d) es de entre 0,05:1 y 3:5 (p/p). Pueden usarse diversos tipos de agentes de formación de liposoma, 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 liposoma descrita anteriormente es una formulación de liposoma en la que los fragmentos de células de MTB-C son o comprenden fragmentos de pared celular.

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

Teniendo en cuenta los aproximadamente 4000 supuestos antígenos de *M. tuberculosis*, es imposible analizar el principio activo para todas estas proteínas. No obstante, se ha mostrado que determinadas proteínas de MTB-C son relevantes para la respuesta inmunitaria deseada. Son cinco bandas de proteína que tienen tamaños aproximados de 6, 10, 30, 38 y 70 kDa (Renshaw, *et al.*, 2005, EMBO Journal 24(14):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 liposoma 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 según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el primer polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),

(ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el segundo polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv0934),

(iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el tercer polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv1866c), y

(iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el cuarto polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y

(v) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el quinto polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv3875).

En una realización aún más preferida de la misma, la formulación de liposoma comprende además un lipopolipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el lipopolipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de precursor de antígeno de lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* LpqH (Rv3763). La banda respectiva puede visualizarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como tinción con plata. Los

investigadores de la presente invención encontraron sorprendentemente, en modelos de animales preclínicos de infección por *M. tuberculosis* vacunados con cepa de MTB-C, que la respuesta humoral de IgG total contra este polipéptido puede ser la más alta entre todos los antígenos en la formulación.

5 En el ejemplo 4 se facilitan ejemplos de cómo pueden identificarse los polipéptidos o lipopolipéptidos.

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

10 Fragmento en este sentido es cualquier parte, tal como, por ejemplo, un producto de degradación, de cualquiera de estos polipéptidos. Son posibles diversas maneras de obtener tales fragmentos, por ejemplo, hidrólisis química o enzimática, mediante lo cual no es relevante si la fragmentación se había producido de manera intencionada o no, antes de la formación de liposoma o después. Se prefiere que el fragmento respectivo pueda asignarse a su origen respectivo, tal como, por ejemplo, mediante solapamiento 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 bacilos que se hacen crecer en condiciones de estrés de privación de nutrientes, baja cantidad de oxígeno y pH bajo. La baja cantidad de oxígeno se debe al crecimiento confluyente de las bacterias en placas que están encerradas en bolsas herméticas durante el periodo de crecimiento, que es, por ejemplo, de 21 días, lo que conduce a un entorno microaerobio. El pH bajo se explica de la siguiente manera: al comienzo del cultivo el valor de pH es de 7,0 - 6,8, y al final, después de 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 supuestamente los bacilos cultivados desarrollan características similares a las de bacilos latentes *in vivo* en LTBI (infección de tuberculosis latente). Por tanto, se espera que los antígenos presentes en FCMtb desencadenen una nueva respuesta inmunológica contra antígenos de los bacilos latentes, es decir, los denominados antígenos "estructurales", así como los asociados con respuestas al estrés.

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido que los glucolípidos micobacterianos tienen actividad inmunomoduladora, notablemente la inducción de respuestas granulomatosas y ejercen potentes efectos de tipo adyuvante. Por tanto, en una realización más preferida, la formulación de liposoma descrita anteriormente contiene lípidos que se encuentran normalmente en *Mycobacterium tuberculosis*, o derivados de los mismos, tales como productos de conjugación tales como lípidos conjugados con azúcar. Se han identificado varios componentes de lípidos inmunogénicos en muestras de *M. tuberculosis* (Brennan, Tuberculosis (Edinburgo), 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 de lípido requerirá un tratamiento tan agresivo que son difíciles de obtener datos cuantitativos o porcentajes de cada componente detectable en el extracto de MTB-C o en la formulación de liposoma, la caracterización cualitativa servirá para caracterizar una realización preferida adicional de esta invención. Según esta realización preferida adicional, están comprendidos uno o más de ácidos micólicos, preferiblemente que pertenecen a uno cualquiera o más de los tipos I, III o IV. Alternativa o adicionalmente, un micolato conjugado con azúcar, preferiblemente dimicolato de trehalosa, puede estar comprendido en la formulación. Alternativa o adicionalmente, un glucolípido lipoarabinomano (LAM) puede estar comprendido en la formulación. Además, se cree que la naturaleza multiantigénica de los fragmentos (mezcla de proteínas multiantigénica más lípidos, en vez de antígenos purificados solos) es una ventaja y por tanto el experto en la técnica puede adaptar el procedimiento de fragmentación celular para permitir la mezcla de antígenos celulares óptima.

La homogeneización de las células de MTB-C se lleva a cabo en presencia de uno o más tensioactivos, preferiblemente un tensioactivo no iónico. Por tanto, la formulación de liposoma descrita anteriormente puede comprender adicionalmente uno o más de tales tensioactivos. Un gran número de tales tensioactivos están dentro del conocimiento convencional de un experto en la técnica. Preferiblemente, el tensioactivo no iónico usado se selecciona del grupo que consiste en etoxilatos de alquifenol y etoxilatos de éster de sorbitano. Más preferiblemente, el tensioactivo 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, tensioactivos que pueden encontrarse en el mercado con el nombre 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. Pueden usarse, por ejemplo, la centrifugación a diferentes velocidades y el lavado con disolución de tampón tal como se describe en la solicitud de patente ES2231037-A1. Se obtiene un sedimento que contiene los fragmentos de pared celular tras realizar los procedimientos de purificación mencionados. Se dispersa dicho sedimento en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se somete a un tratamiento convencional para garantizar la completa inactivación de las células de MTB-C que pueden haber permanecido viables tras el procedimiento de fragmentación y purificación. 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 en autoclave o pasteurización. En el ejemplo 5 a continuación se facilitan ejemplos de caracterización de lípidos. El agente de la invención puede contener adicionalmente una o más sales o una disolución de las mismas, y dicha sal es preferiblemente cloruro de sodio.

Particularmente en el caso en el que el agente cumple la característica 2 anterior, es decir que puede obtenerse cultivando la cepa de MTB-C y homogeneizando el cultivo celular en presencia de un tensioactivo preferiblemente no iónico, el modo en el que puede obtenerse puede caracterizarse además de la siguiente manera: (a) cultivar la cepa de MTB-C a lo largo de un periodo igual o superior a tres semanas y, posteriormente, (b) homogeneizar el cultivo celular en presencia de un tensioactivo no iónico. En realizaciones preferidas, el método mediante el cual puede obtenerse comprende además las etapas:

d. separar las células no fragmentadas y los componentes solubilizados por medio de centrifugación,

e. someter la fracción de fragmentos de pared celular a tratamiento químico o físico para inactivar las eventuales células de cepa virulenta que contiene eventualmente, y

f. secar el agente mediante liofilización.

El procedimiento puede realizarse tal como se describe en el documento EP2090318 A1.

El agente según la invención puede conservarse según cualquier método conocido en la técnica; sin embargo, para el caso de una formulación de liposoma según la invención, se prefiere que la conservación sea mediante secado por congelación.

En una realización incluso más preferida de cualquiera de las anteriores, la formulación de liposoma se seca por congelación. Los liposomas pueden someterse a liofilización para así obtener el agente inmunoterapéutico en forma de liposomas liofilizados. Para ello, la dispersión puede distribuirse en viales y liofilizarse a una 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 liposoma adecuada como agente inmunoterapéutico y se almacenan preferiblemente a temperaturas muy bajas, por ejemplo, a -70 °C.

La invención también proporciona una suspensión en la que la formulación de liposoma 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. El experto en la técnica conoce bien métodos de suspensión de formulaciones de liposoma en un disolvente. Una propiedad particularmente ventajosa de la formulación según esta invención es que puede suspenderse más rápidamente que formulaciones de liposoma convencionales que comprenden fragmentos de MTB-C (véase el ejemplo 9).

Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el agente de la invención para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal, mediante lo cual el agente es o comprende el agente descrito anteriormente en cualquiera de las realizaciones descritas o combinaciones de las mismas. El alcance principal de la formulación farmacéutica/formulación galénica del principio activo es obtener una suspensión lo suficientemente eficaz y estable como para reconocerse bien por las células y que tenga el potencial de desencadenar una respuesta inmunitaria celular relevante en un cuerpo humano o animal. Para ello, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposoma, o la suspensión tal como se describió en una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El experto en la técnica conoce diversos de tales vehículos, excipientes y diluyentes y no están limitados de ningún modo por esta divulgación. En vez de eso, puede usarse cualquier sustancia adecuada como vehículo, excipiente o diluyente. En una realización preferida, esta composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable. El adyuvante debe entenderse de este modo como una sustancia comprendida en esta realización de la invención, mediante lo cual el adyuvante es una sustancia capaz de estimular el sistema inmunitario cuando se aplica a un cuerpo humano o animal en respuesta al antígeno objetivo, mediante lo cual el adyuvante no confiere en sí mismo inmunidad. Sin desear 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 de Freund incompleto (IFA) o adyuvante de Freund completo (CFA), o un halogenuro de amonio, tal como un bromuro de amonio alquilado, tal como bromuro de dimetildiocetadecil-amonio.

Un agente particular de la invención para el tratamiento de la invención lo desarrolla ARCHIVEL FARMA (España) y se denomina Formulación A. Su preparación se describe en la sección "modo preferido de llevar a cabo la invención".

Estas aplicaciones están respaldadas por los resultados que han obtenido los inventores en un modelo de ratón de asma inducida por alergia, tal como se detalla a continuación en los ejemplos. En resumen, se sensibilizaron ratones a ovalbúmina (OVA) mediante inyección intraperitoneal con OVA seguido por exposición local a antígeno nebulizado (i.n.). Se dividieron los ratones sensibilizados en grupos (no tratados y aquellos tratados con la vacuna de prueba, BCG (control positivo) o vehículo) todos con administración por vía subcutánea (s.c.). Los inventores también establecieron grupos de control de los tratamientos mencionados en ratones no sensibilizados. La

reactividad bronquial aumentada en respuesta a metacolina, así como la presencia de eosinófilos peribronquiales en los animales expuestos a OVA (pero no tratados), indicaron que el proceso alérgico se indujo de manera eficaz. La vacunación con BCG redujo, casi en la mitad, los niveles de inflamación (no significativo) y la hipersensibilidad bronquial (sin revertir a niveles iniciales). La administración de la vacuna de FORMULACIÓN A como medida preventiva redujo en gran medida la eosinofilia pulmonar y revirtió casi hasta niveles de hiperreactividad bronquial de nivel inicial. El uso de la vacuna de FORMULACIÓN A como agente terapéutico redujo significativamente la inflamación broncoalveolar, al tiempo que se observó una tendencia hacia una hipersensibilidad bronquial reducida en respuesta al antígeno OVA. Basándose en estos resultados, los inventores concluyen que cuando se administra la vacuna de FORMULACIÓN A 3 veces antes de la fase de exposición, tiene un efecto claramente beneficioso sobre las vías respiratorias de ratones expuestos a OVA, mientras que su administración terapéutica reduce claramente la inflamación y tiene un efecto leve sobre la hipersensibilidad bronquial.

En una realización particular, la respuesta alérgica que puede tratarse mediante el agente (formulación de liposoma) de la invención está mediada por IgE. Las IgE son inmunoglobulinas asociadas con alergia secretadas por linfocitos B, y la conmutación de linfocitos B hacia la producción de IgE se induce normalmente por citocinas de Th2. Por tanto, en un aspecto de la invención es deseable que no se produzca una conmutación de isotipo aumentada hacia IgE y/o que no se desencadene una respuesta de Th2.

La respuesta puede ser atopía. La respuesta alérgica puede ser disfunción respiratoria y/o inflamación broncoalveolar. Preferiblemente, la respuesta se selecciona de asma, polinosis, rinitis y eczema. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, actualmente se cree que el asma, la polinosis, la rinitis y el eczema pueden implicar una respuesta alérgica. Sin embargo, la invención se refiere a todos los usos del agente y la composición farmacéutica descritos en el presente documento para el uso en la prevención o terapia de uno cualquiera o más de asma, polinosis y eczema, independientemente de la cuestión de si hay una respuesta alérgica subyacente al asma, polinosis, rinitis y eczema en un individuo particular. Sin embargo, en una realización se prefiere que el asma sea asma alérgica. En una realización particular, el asma es asma bronquial. El agente de la presente invención también es para el tratamiento o la prevención de alergias múltiples. Las alergias múltiples es una afección en la que se producen conjuntamente múltiples reacciones alérgicas, tales como dos cualesquiera o más de las siguientes asma, eczema y rinitis alérgica. La rinitis es una irritación/inflamación de la membrana mucosa dentro de la nariz. Síntomas de la rinitis son congestión nasal, rinorrea y goteo posnasal. La clase más común de rinitis es rinitis alérgica, puede provocar síntomas adicionales, tales como estornudos y picor nasal, tos, fatiga.

La vía de administración no está particularmente limitada como tal, a menos que las características del agente o la composición lo requieran. El fármaco puede administrarse en una mucosa, por ejemplo, mucosa ocular, intranasal, bucal, gástrica, intestinal, vaginal o de las vías urinarias, o de manera parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, percutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal o mediante inhalación. La administración parenteral puede preferirse en algunas realizaciones. En una realización particular, la invención proporciona esta formulación de liposoma, suspensión o composición farmacéutica para inyección. Se prefiere que el agente o la composición de la invención se proporcione para inyección, preferiblemente por vía subcutánea o intramuscular, o para administración sublingual o para administración por inhalación.

La dosis adecuada de la formulación de liposoma, suspensión o composición farmacéutica según lo que se describió anteriormente con respecto al 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 administración al cuerpo humano. En una realización preferida de la misma, esto se produce a una dosis que comprende de 1 a 1000, preferiblemente de 3 a 250. En una realización particular, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para la administración de 200 µg o menos por dosis, y de manera preferible de aproximadamente 5 a 50 µg de FCMtb por dosis, tal como lo más preferiblemente 25 µg de FCMtb por dosis.

En una realización particular, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para su uso en la prevención de la respuesta alérgica. La medicina preventiva o el cuidado preventivo se refieren a una medida tomada para prevenir enfermedades, en vez de curarlas o tratar sus síntomas. El cuidado preventivo puede incluir exámenes y pruebas de exploración adaptadas a la edad, salud e historia familiar de un individuo. Puede administrarse un tratamiento profiláctico. La profilaxis es cualquier procedimiento cuyo propósito es prevenir, en vez de tratar o curar, una enfermedad. Las medidas profilácticas pueden subdividirse en profilaxis primaria (para prevenir el desarrollo de una enfermedad) y profilaxis secundaria (mediante lo cual la enfermedad ya se ha desarrollado y se protege al paciente frente al empeoramiento de este proceso). Algunas veces, la prevención se subdivide en prevención universal, prevención selectiva y prevención indicada. La prevención universal implica a toda la población (nación, comunidad local, escuela, distrito) y tiene el objetivo de prevenir el cuadro clínico. Se pretende someter a todos los individuos al tratamiento. La prevención selectiva implica grupos cuyo riesgo de desarrollar una reacción alérgica tal como asma alérgica está por encima del promedio. Los grupos pueden distinguirse por rasgos tales como edad (por ejemplo, niños) o historia familiar. La prevención indicada implica un procedimiento de exploración y tiene el objetivo de identificar individuos que muestren signos tempranos de la reacción alérgica. La invención cubre todos los tipos de prevención/terapia, aunque en algunas realizaciones de la misma puede seleccionarse un subconjunto.

En una realización particular alternativa, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para su uso en terapia de la respuesta alérgica. La terapia o el cuidado curativo es generalmente el tratamiento de un individuo que muestra síntomas de la reacción alérgica. Por tanto, el cuidado curativo difiere del cuidado preventivo, cuyo objetivo es prevenir la aparición del cuadro clínico, y del cuidado paliativo, que se centra en reducir la intensidad de síntomas de la enfermedad, tales como dolor.

Los inventores han proporcionado evidencias (véanse los ejemplos) de que el agente de la prevención es altamente eficaz con propósitos tanto terapéuticos como preventivos.

El agente según la invención puede administrarse una o varias veces, y en el caso de prevención, se prefiere administrar al menos dos veces, preferiblemente más de dos veces. El agente o la composición farmacéutica de la invención puede proporcionarse para su administración repetida, preferiblemente en intervalos de una semana o más, y más preferiblemente de dos semanas o cuatro semanas.

En una realización particular, el agente o la composición farmacéutica de la invención es para su administración a individuos que padecen o son propensos al desarrollo de la reacción alérgica respectiva, incluyendo asma y/o para individuos que tienen una predisposición respectiva o se sospecha que tienen una predisposición respectiva. Los individuos que se sospecha que tienen una predisposición respectiva pueden ser, por ejemplo, miembros de la familia, particularmente niños, de familias en las que se conocen reacciones alérgicas, tales como de uno o ambos progenitores o de hermanos (mayores). El objetivo de cualquier familia propensa a alergias es prevenir el desarrollo de alergias en sus hijos. Para ello, el agente de la presente invención puede administrarse como medida preventiva.

La presente divulgación proporciona además la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en el NCTC en Londres. La cepa tiene un bajo polimorfismo genético. Por tanto, el agente que comprende fragmentos de NCTC 13536 tiene la ventaja de una reproducibilidad muy alta debido al bajo polimorfismo genético.

Modo preferido de llevar a cabo la invención

En una realización particular, se prefiere que la Formulación A tal como se describe en el presente documento sea un agente particular que va a usarse según la invención. La Formulación A se caracteriza de la siguiente manera. Cuando la dosis es de 50 µg de FCMtb, las cantidades/sustancias facilitadas en la tabla 1 están presentes en un vial de la formulación:

COMPONENTES	UNIDADES POR VIAL	FUNCIÓN
PRINCIPIO ACTIVO		
FCMtb	66,7 mg	Inmunógeno
Componentes adicionales		
Sacarosa	20.000,0 mg	Sustancia de carga (secado por congelación) y crioprotector
Lecitina de soja ¹	845,8 mg	Agente de formación de liposoma
Colato de sodio	92,0 mg	Tensioactivo
Cloruro de sodio ²	20,8 mg	Disolvente
Caracterización de partículas		
Tamaño de partícula promedio en 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.

Una formulación de liposoma compuesta por lecitina de soja (agente de formación de liposoma) altamente enriquecida con fosfatidilcolina (94,0 % (p/p)) y colato de sodio (agente tensioactivo) ha mostrado ser 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 liposoma es la proporción de los componentes que constituyen el liposoma. Tras someter a prueba diferentes razones de FCMtb/componente de lípido, se estableció que una razón muy buena 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 liposoma se veía potenciada por la presencia de sales en la fase acuosa. Por tanto, se incluye cloruro de sodio en esta formulación particular.

Parámetro	Criterios de aceptación	Métodos de prueba
Aspecto	Polvo de blanco a blanquecino	Inspección visual
Morfología de la torta	De plano a casi plano y	Inspección visual

		homogéneo	
Uniformidad de dosificación	Uniformidad de masa (mg/vial)	21,02 ± 15 %	Pesado, método interno
	Media de masa (mg/vial)	Masa ± 5 %	Pesado, método interno
Contenido en agua (%)		≤ 3 %	Ensayo coulombimétrico de Karl Fischer, Ph. Eur. 2.5.12 (USP <921>)
Contenido en proteína total de FCMtb		90-140 µg/mg de FCMtb	Ensayo de BCA, Ph. Eur. 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 en z (nm) (Índice de polidispersidad ¹)	75 ± 20 (≤ 0,310)	Dispersión de luz dinámica Ph. Eur. 2.9.31
Potencia inmunogénica en modelo murino con infección por <i>M. tuberculosis</i>	Unidades formadoras de puntos de IFN-γ específico de antígeno	PPD 3-12 Razón de SFU/10 ⁶ células con respecto al valor basal (Valor basal en SFU/10 ⁶ células)	ELISpot
Perfil de proteínas	SDS-PAGE	Positivo para las 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	Ph. Eur. 2.6.1 (USP <71>)
Endotoxinas bacterianas (UI/dosis)		≤ 10 UI/vial	Ph. Eur. 2.6.14 método D (USP <85>)

Tabla 2: Producto terminado (FCMtb) a 50 µg/dosis, medido tras la reconstitución de la composición de liposoma liofilizada

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

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

10

La tabla 3 muestra la concentración de cada componente por vial tras la reconstitución a 50 µg/dosis.

Componentes	Concentración por ml
PRINCIPIO ACTIVO	
FCMtb	166,7 mg/ml
EXCIPIENTES	
Sacarosa	50 000,0 µg/ml
Lecitina de soja	2114,4 mg /ml
Colato de sodio	230,0 mg /ml
Cloruro de sodio	52,1 mg /ml

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

15

Se prefiere que esta formulación se administre para la prevención o terapia de una respuesta alérgica, incluyendo asma y rinitis.

Material y métodos

20

Para evaluar *in vivo* el posible beneficio terapéutico del agente según la presente invención, se administró el agente FORMULACIÓN A, producido por ARCHIVEL FARMA, en dos protocolos diferentes para el tratamiento de problemas respiratorios mediados por alergia en ratones.

25 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.

30

b) Patrón de albúmina: Este patrón, usado para la determinación del contenido en proteína, está compuesto por 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 comercialmente disponible (Sigma) para la identificación de TDM de lotes de FCMtb.

d) Ácidos micólicos de patrón de *Mycobacterium tuberculosis*: Se usa un ácido micólico comercialmente disponible (Sigma) para la identificación de ácido micólico de lotes de FCMtb.

e) Marcador de peso molecular: Se usa un marcador de peso molecular comercialmente disponible denominado patrón previamente teñido 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 Ph. Eur. 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 coulombimétricos de Karl Fisher y sigue las indicaciones generales de la Ph. Eur., método 2.5.12, y USP <921> *Determinación de agua*.

c) Determinación del contenido en proteína total

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

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

La prueba se realiza según la Ph. Eur., método 2.2.31 y USP <726>; la detección de proteínas en el gel se realiza mediante una tinción con Coomassie adaptada o mediante tinción con plata. *Muestras de prueba*: FCMtb reconstituido 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.

Antígenos purificados
Proteína HSP70 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv0350)
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> (Rv3763)
Proteína CFP10 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3874)
Proteína ESAT6 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3875)

Tabla 4: Antígenos de referencia

Para la tinción con Coomassie, se usa la 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 mediante inmunotransferencia de tipo Western, se separan proteínas mediante SDS-PAGE según métodos convencionales conocidos en la técnica y después se transfieren de manera electroforética sobre una membrana de PVDF para la 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 de *M. tuberculosis* (70 kDa), proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (30 kDa)) y anticuerpos monoclonales específicos anti-HSP70, anti-38kDa y anti-Ag85B de Lionex.

e) Identificación de ácidos micólicos

Se examinan ácidos micólicos en FCMtb mediante CCF de una dimensión, siguiendo la Ph. Eur., método 2.2.27. *Muestras de prueba*: FCMtb liofilizado, 40 mg. *Disoluciones de referencia*: patrón de ácido micólico (Sigma). *Procedimiento*:

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

b) Esterificación de ácido micólico: Se añaden 2 ml de metanol:tolueno:ácido sulfúrico (30:15:1; vol/vol) a cada tubo y se logra la esterificación durante la noche. Después, 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 (20 x 20 cm) (Merck). Se realiza la separación cromatográfica en un tanque saturado con una fase móvil (éter etílico:n-hexano (15:85, vol/vol)) tres veces. Después, se deja secar la placa al aire.

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

Se determinan los ácidos micólicos en muestras de FCMtb mediante comparación con punto de patrón comercial de ácido micólico. Se expresan los resultados como datos cualitativos (presencia (positivo)/ausencia (negativo) de ácido micólico evaluado).

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 después se incuba durante la noche. Se seca la fracción sobrenadante bajo flujo de nitrógeno y se pesa. Finalmente, se resuspenden muestras secadas 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 (20 x 20 cm)) (Merck). La separación cromatográfica se realiza en un tanque saturado con una fase móvil (cloroformo:metanol:agua (60:12:1; vol /vol). Después, se deja secar la placa al aire.

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

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

g) *Identificación de lipoarabinomano (LAM)*: Para el análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de LAM, se separan los compuestos mediante SDS-PAGE según métodos convencionales y después se transfieren de manera electroforética a una membrana de nitrocelulosa para su inmunodetección usando anticuerpo específico CS35. La interacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante incubación con un anti-anticuerpo (IgG de cabra anti-ratón IR Dye 800 CW) 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 si no se menciona explícitamente la esterilidad para cualquier etapa dada que requiera la misma. La prueba de esterilidad se evalúa tal como se describe en la Ph. Eur. 2.6.1 (USP <71>).

i) Inactivación de micobacterias

La inactivación de micobacterias se evalúa según la Ph. Eur. 2.6.2.

j) Endotoxinas bacterianas

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

Fragmentación de los bacilos

Se piensa que la elección de fragmentación de los bacilos permite una presentación óptima de antígenos celulares, particularmente antígenos de pared celular. La fragmentación del FCMtb se determina mediante metodologías tanto de dispersión de luz dinámica (tal como se describe a continuación) como de difracción láser.

La difracción láser permite medir la fragmentación en un intervalo de entre 0,04 µm y 2000 µm. El ensayo se lleva a

cabo en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona, España. Instrumento: Coulter LS 13320 equipado con un módulo de líquido universal (ULM). Disolvente: agua purificada / aceite mineral. Resultados: representados gráficamente como un histograma, que expresa la frecuencia relativa del número de partículas (%) delante del diámetro de partícula (0,04 µm - 2000 µm).

Determinación de tamaño de partícula promedio en z y del índice de polidispersidad

El tamaño de partícula promedio tal como se describe en este documento se determina mediante dispersión de luz dinámica (DLS), que se basa en el concepto físico del movimiento browniano de 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 traslacional

k = constante de Boltzmann

T = temperatura absoluta

η = viscosidad

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

En medidas 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 fluctúa la intensidad de luz dispersada 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 en disminuir; por otro lado, si están midiéndose partículas pequeñas, dado que se mueven rápidamente, la intensidad de luz dispersada fluctúa rápidamente, y la correlación de señal disminuye más rápidamente.

Según esta invención, las partículas se miden preferiblemente con el siguiente instrumento: Zetasizer nano zs (Malvern Instruments), usando agua purificada / aceite mineral como disolventes.

Si no se indica lo contrario, el instrumento se usa según las instrucciones del fabricante, y el ajuste y la calibración, si son aplicables, también se realizan 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 acumuladores", según se define en la norma ISO13321, parte 8. La función de correlación ajusta resultados en una única curva exponencial que permite el cálculo de los siguientes parámetros:

- El tamaño medio, o diámetro promedio en 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 de tamaño de partícula.

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

Inducción de asma en ratones y administración de compuestos

Con el fin de sensibilizar los ratones, a ratones BALB/c hembra (de 8 semanas de edad al comienzo del experimento) se les inyectaron i.p. 20 µg de OVA (calidad V) + 2 mg de alumbre en los días 0 y 14 del estudio. Durante la fase de exposición todos los animales (incluyendo los no sensibilizados) se expusieron (días 28-30) mediante nebulización a una disolución de OVA al 1 %. A un grupo de ratones sensibilizados con OVA se les administró FORMULACIÓN A como medida preventiva/Formulación A P (p representa preventivo), y a otro como agente terapéutico (Formulación A T (T representa terapéutico)), recibiendo ambos 200 µg/dosis. Como control

positivo los inventores usaron ratones sensibilizados tratados con la cepa de BCG danesa 1331 de Pfizer, por vía subcutánea a 150 µg/dosis en el día -31. Como control negativo a ratones sensibilizados se les administró un placebo (el vehículo de la vacuna de FORMULACIÓN A). También se incluyeron dos grupos no sensibilizados, tratados cada uno o bien con la vacuna de control (BCG) o bien con la vacuna de prueba (FORMULACIÓN A), estableciendo por tanto las siguientes 7 condiciones / grupos experimentales:

Grupo 1 (control): ratones no sensibilizados tratados con el vehículo (n = 8)

Grupo 2 (control -): ratones sensibilizados tratados con el vehículo (n = 8)

Grupo 3 (control de BCG): ratones no sensibilizados tratados con la vacuna de BCG en el día -31 (n = 8)

Grupo 4 (control +): ratones sensibilizados tratados con la vacuna de BCG en el día -31 (n = 8)

Grupo 5 (control de FORMULACIÓN A®): ratones no sensibilizados tratados con FORMULACIÓN A (preventivo) (n = 8)

Grupo 6 (prueba): ratones sensibilizados tratados con FORMULACIÓN A (preventivo) (n = 8)

Grupo 7 (prueba): ratones sensibilizados tratados con FORMULACIÓN A (terapéutico) (n = 8)

Las vacunas y el placebo los suministraron los inventores en viales individuales. Estos viales se reconstituyeron justo antes de la administración diaria en una campana de flujo laminar. Todas las dosis de vacuna y placebos se administraron por vía subcutánea en la parte dorsal en los puntos de tiempo mostrados en la figura 10.

Toma de muestras y evaluaciones de parámetros de las vías respiratorias

Debido al gran número de animales implicados, el experimento se llevó a cabo en 4 rondas, solapándose temporalmente cada una con la anterior a la misma, y realizándose cada una de manera idéntica según los protocolos para la inducción de asma y el tratamiento. Se monitorizaron los animales a lo largo de todo el experimento y se tomaron muestras para su análisis posterior.

Monitoreo de ratones

Los inventores registraron el peso de todos los ratones desde el primer día de administración (-31) y continuaron semanalmente hasta el día del sacrificio. Los ratones en cada régimen de tratamiento se evaluaron cuidadosamente usando un protocolo normalizado que incluía monitorización del comportamiento y observación del pelo y las membranas mucosas.

Determinación de la funcionalidad pulmonar

Se midió el grado de reactividad en 8 ratones de cada grupo. Los inventores examinaron la reactividad de las vías respiratorias en todos los ratones 24 horas tras la última exposición con OVA (día 31) evaluando el grado de reactividad bronquial frente a metacolina mediante pletismografía invasiva (Fine Pointe, Buxco Europe Ltd, R.U.). Se determinó la resistencia pulmonar en animales sometidos a traqueotomía (tras sedación y anestesia) como medición de la respuesta de las vías respiratorias frente a estímulos broncoconstrictores.

Evaluación de la inflamación, lavado broncoalveolar (BAL)

Tras evaluar la funcionalidad pulmonar, se sacrificaron todos los animales todavía anestesiados mediante desangrado. A esto le siguió un lavado broncoalveolar (BAL) con el fin de recoger células y moléculas del árbol traqueobronquial. Se realizó el BAL mediante inyección endotraqueal repetida de 0,3 ml de PBS + FCS al 2 %. Se tomó una alícuota del líquido aspirado y se contaron las células totales con el fin de evaluar el grado de inflamación. Se centrifugó el líquido de BAL restante, colocándose las células en un dispositivo Cytospin para llevar a cabo un recuento diferencial usando tinción Diff-Quick y almacenándose los sobrenadantes para su análisis posterior.

Toma de muestras

Además, se recogieron muestras de pulmón y de suero y se almacenaron a -80 °C para la posterior identificación de proteínas de interés mediante ELISA. Al mismo tiempo, se refrigeraron muestras de sangre durante la noche y se tomaron alícuotas de suero y se almacenaron a -20 °C.

Ejemplos

A continuación, se ilustra la invención mediante ejemplos. Los ejemplos son con propósitos ilustrativos y no deben entenderse de ningún modo como limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* NCTC 13536

El material de partida para la producción de FCMtb es un inóculo de la cepa NCTC 13536, denominada a modo de sinónimo 511 o *Mycobacterium tuberculosis* NCTC 13536, una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada a partir de un paciente inmunocompetente con diagnóstico de tuberculosis pulmonar en Barcelona, España. Se depositó en 2010 en el NCTC en Londres, que es una organización depositaria oficial según el tratado de Budapest. La cepa se ha depositado adicionalmente en la colección de cepas del Servicio de microbiología del Hospital de Sant Pau, Barcelona, España.

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

Ejemplo 2: Procedimiento aguas arriba para la producción de células de MTB-C

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

(1) Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

La producción de FCMtb comienza con la siembra de 0,2 ml de un WSL en una placa de agar 7H11 y la incubación a 37 ± 1 °C durante 15 ± 2 días. Después, se transfieren colonias a un tubo que contiene unas pocas perlas de vidrio. Tras mezclarse, se añaden aproximadamente 5 ml de agua para inyección (WFI) para obtener una suspensión bacteriana. En este punto, se realizan un recuento de placas viables y una prueba de esterilidad. Se siembran aproximadamente 100 placas de agar 7H11 de Middlebrook 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 proceso se realiza de la siguiente manera:

Las pruebas de esterilidad tienen el objetivo de garantizar la ausencia de hongos y bacterias distintos de micobacterias. Las pruebas se llevan a cabo mediante inoculación directa, siguiendo las condiciones descritas en la Ph. Eur. 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 la Ph. Eur. 2.6.2). 7H11 se basa en medio 7H10 añadiendo un gramo de hidrolizado pancreático de caseína con el fin de potenciar el crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

(2) Recogida de *Mycobacterium tuberculosis* y congelación de extracto 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 una prueba de esterilidad. Después, se recoge el crecimiento bacteriano de las placas de agar y se transfiere a un tubo estéril. Se pesa el extracto bruto obtenido (20-22 g). Se mantiene la mezcla a -80 ± 5 °C.

Ejemplo 3: Procedimiento aguas abajo para la producción de liposomas obtenidos a partir del extracto bruto

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

(3) Fragmentación celular y deslipidación

Se descongela el extracto bruto congelado (ejemplo 2) a 37 ± 1 °C y después se añade tampón de PBS estéril con Triton-X114 al 4 % (p/p) (pH 7,0 -7,5) a 4 °C. Tras mezclar, posteriormente se transfiere a un recipiente de policarbonato estéril que contiene perlas de sílice/circonia estériles. Después, se lleva a cabo la fragmentación celular en un dispositivo Beadbeater aplicando el siguiente método de fragmentación: 3 ciclos, que consisten cada uno en 5 periodos de activación/desactivación más 10 minutos de descanso. Una vez terminado el procedimiento, se

separa la fracción fragmentada celular de las perlas mediante lavados posteriores (agitación y sedimentación repetidas) en tampón de PBS estéril con Triton-X114 al 4 % (pH 7 - 7,5). Después 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 eliminar la fracción citosólica y para obtener una suspensión enriquecida en fragmentos celulares, se realiza una centrifugación a alta velocidad dos veces a 20 000 g aproximadamente durante 60 minutos, a 4 °C. Tras la primera centrifugación, se descarta el sobrenadante amarillento (rico en proteínas y lípidos solubles) y se resuspende el sedimento en PBS y se centrifuga adicionalmente en las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de eso, el aspecto del sobrenadante descartado debe ser transparente e incoloro. Finalmente, se resuspende el sedimento obtenido en un volumen final de 50 - 60 ml de PBS (suspensión de FCMtb).

(4) Pasteurización

Después se pasteuriza la suspensión de FCMtb a 65 ± 2 °C durante 60 min. Una vez terminada la pasteurización se determina el pH del FCMtb pasteurizado mediante papel de tornasol. Se considera aceptable en el intervalo de pH 6,5 - 7,5. Se rellenan viales estériles y despirogenados con 0,5 ml de la suspensión de producto y se realizan CEP sobre la esterilidad y la inactivación de micobacterias. Finalmente, se congelan los viales rellenos a -80 ± 5 °C. Una vez sometido el material 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 relleno posterior.

(5) Secado por congelación

Después se liofilizan todos los viales que contienen el producto congelado a una temperatura de aproximadamente -45 °C a 30 °C y a una presión de 0,310 mbar durante aproximadamente 18 horas (0,5 ml de volumen por vial). Usando técnicas asépticas y bajo atmósfera de N₂, se tapan los viales y se etiquetan. Después se almacena el principio activo acondicionado a -20 °C $\pm$ 5 °C durante hasta 12 meses.

Ejemplo 4: Caracterización de proteínas

La figura 3 facilita 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 proteína como representativas para la evaluación del perfil de proteínas: proteína HSP70 (Rv0350), proteína de 38 kDa (Rv0934), (Rv1866c), 19 kDa proteína (Rv3763), proteína CFP10 (Rv3874) y proteína ESAT-6 (Rv3875).

A. Determinación del contenido en proteína total: Se cuantifican los niveles de proteína total en FCMtb mediante metodología de ácido bicinconínico (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 con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE): Se muestra el perfil de proteínas del principio activo FCMtb determinado mediante comparación con antígenos de referencia a partir de *Mycobacterium tuberculosis* correspondientes 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 P.M. (5) (véase la figura 4). La determinación del perfil de proteínas de principio activo FCMtb y la identificación de bandas (aproximadamente 70 kDa, 38 kDa, 30 kDa, 10 kDa y 6 kDa) se llevan a cabo mediante tinción con 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 6: 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 basó en el procedimiento descrito por Delmas *et al.*, 1997, Glycobiology 7(6), 811-7. La cromatografía de capa fina (CCF) fue el método usado para analizar el contenido de lípidos y glicolípidos presentes en FCMtb. Específicamente, se han identificado poliaciltrehalosa (PT), dimicolato de trehalosa (TDM), diaciltrehalosa (DAT),

fosfatidilinositolmanósidos (PIM) y otros fosfolípidos, así como dimicocerosatos de ftiocerol (PDIM) y ácidos micólicos mediante cromatografía de capa fina (CCF) tanto en las cepas de referencia H37rv y NCTC 13536, así como en diferentes lotes de FCMtb. Véase la figura 7a. El contenido de 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) se analiza mediante CCF en el sobrenadante. Se lleva a cabo la determinación de ácidos micólicos 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 está en línea con el conocimiento científico actual y permite una caracterización convencional de los lípidos inmunogénicos conocidos hasta ahora. Se compararon FCMtb con la fracción de lípidos de células completas de las cepas NCTC 13536 y H37Rv de *M. tuberculosis* y patrón comercial de TDM (véanse las figuras 7a y 7b). En conjunto, se mostró que el contenido en lípidos concordaba en diferentes lotes de liposomas que comprendían FCMtb según esta invención. La figura 7d muestra la identificación de LAM.

Ejemplo 7: Caracterización de material celular fragmentado

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

Se investigaron niveles de ADN residual tras la extracción con una mezcla de fenol/cloroformo 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 sistematicidad del procedimiento de producción del principio activo se muestra mediante un perfil de lípidos y de proteínas que es reproducible para diferentes lotes de FCMtb.

Ejemplo 8: Efecto de sacarosa

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

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos mediante medición tras reconstitución de la composición de liposoma liofilizada y tras las pruebas según los parámetros de especificación de liberación de lote actuales.

Parámetro		Criterios de aceptación		FCMtb formulado en una suspensión de liposoma		
				Sin excipiente	Sacarosa al 5%	Glicina al 1,5%
				FCMtb formulado en una suspensión de liposoma		
Aspecto		Polvo de blanco a blanquecino		ND	Cumple	Cumple
Morfología de la torta		De plano a casi plano y homogéneo		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	promedio en z (nm) Pdf^(a)	75 ± 20 (≤ 0,250)		370 ⁽¹⁾ (0,492)	66 (0,215)	504 ⁽¹⁾ (0,569)
Potencia inmunogénica en modelo murino con infección por <i>M. tuberculosis</i>	Unidades formadoras de puntos de IFN-γ específico de antígeno	PPD	3-12 Razón de SFU/10 ⁶ células con respecto al valor basal (Valor basal en SFU/10 ⁶ células)	3,6 (183)	5,1 (183)	2,8 (183)
		Ag85B (30 kDa)	5-20 Razón de SFU/10 ⁶ células con respecto al valor basal (Valor basal en SFU/10 ⁶ células)	5,5 (73)	9,6 (73)	5,4 (73)

^(a) Índice de polidispersidad

⁽¹⁾ Presencia de agregados de liposomas

ND = no determinado

Tabla 5: Resultados de especificaciones para 3 formulaciones diferentes, medidas tras la reconstitución de la

composición de liposoma liofilizada.

Los investigadores de este estudio encontraron sorprendentemente que la formulación con 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 de liposomas (tamaño de partícula, promedio en z) mostrada con la formulación que comprende sacarosa en comparación con las otras dos formulaciones. Un análisis mediante dispersión de luz dinámica mostró un promedio en z de 75 ± 20 nm (índice de polidispersidad $\leq 0,350$) de los liposomas que contienen sacarosa. La microscopia electrónica de preparaciones de fracturación por congelación de la formulación de liposoma que contiene sacarosa muestra una mezcla de liposomas multilaminares y unilaminares con tamaños de entre 40 y 100 nm (figura 8).

Debido a este parámetro mejorado junto con los niveles menores de contenido en agua observados (≤ 2 %) para la formulación con sacarosa al 5 %, se esperan resultados de estabilidad mejorados para esta formulación. De hecho, esto sucede así.

Ejemplo 9: Procedimiento de fabricación de la formulación de liposoma liofilizada (FORMULACIÓN A)

En las figuras 9a y 11b se muestra una realización del procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposoma según la presente invención. En resumen, comprende las siguientes etapas 1 a 5.

(1) Preparación de los componentes de disolución madre de LCS

Se disuelve lecitina de soja de disolución madre de LCS en etanol (1:1; p/p) y se disuelve colato de sodio en agua (1:5; p/p). Se esterilizan las disoluciones por filtración. Tras mezclar la disolución de lecitina de sodio y la disolución de colato de sodio, se añade FCMtb liofilizado (ejemplo 1) con agitación. Las razones de los componentes son 0,03:0,2:0,7 (FCMtb:colato de sodio:lecitina de soja; p/p/p).

(2) Preparación de disolución madre de LCS

Se transfiere la fase acuosa a una mezcladora de acero inoxidable esterilizada. Se añade la fase lipídica de (1), que contiene lecitina de soja, colato de sodio y FCMtb, en una razón de 0,7:0,3 (fase acuosa:fase lipídica, p/p). Se mezclan las fases a 2200 rad/s durante 3 min para la homogeneización y formación de liposoma. Tras la homogeneización, se transfiere la disolución madre de LCS a otro recipiente y se deja reposar durante al menos 5 minutos. Se realiza un CEP sobre el tamaño de partícula en la disolución madre de LCS.

(3) Dilución de disolución madre de LCS, formulación final de suspensión de liposoma

Se prepara una disolución de sacarosa al 10 % (p/p) y se esteriliza. Se mezcla la disolución de sacarosa con agua y disolución madre de LCS en las proporciones adecuadas para obtener la disolución madre de suspensión de liposoma (LS) final constituida por 21 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 proceso.

(4) Relleno

Se rellenan viales con 0,4 ml de LS (con agitación continua) y se cierran parcialmente para su congelación y liofilización.

(5) Liofilización, acondicionamiento y etiquetado

Se congelan los viales a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que avanza la liofilización. Se realiza el procedimiento de liofilización en el intervalo de temperatura de $-45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0,150 mbar. El procedimiento dura 24 horas. Al final de la liofilización, se tapan completamente los viales en atmósfera de N_2 , se encapsulan, se etiquetan y se almacenan a $5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ejemplo 10: Modelo de ratón

Los inventores emplearon un modelo de ratón de asma inducida por alergia. Véanse también las tablas en el apéndice para resultados detallados individuales en modelos de ratón.

Se sensibilizaron ratones a ovoalbúmina (OVA) mediante inyección intraperitoneal con OVA seguida por exposición local a antígeno nebulizado (i.n.). Se dividieron los ratones sensibilizados en grupos (no tratados y aquellos tratados con la vacuna de prueba o con BCG (control positivo)) todos con administración por vía subcutánea (s.c.). Los inventores también establecieron grupos de control de los tratamientos mencionados en ratones no sensibilizados. La reactividad bronquial aumentada en respuesta a metacolina, así como la presencia de eosinófilos peribronquiales en aquellos animales expuestos a OVA (pero no tratados), indicaron que el proceso alérgico se indujo de manera

eficaz. La vacunación con BCG redujo, casi en la mitad, los niveles de inflamación (no significativo) y la hipersensibilidad bronquial (sin revertir a niveles iniciales). La administración de la vacuna de FORMULACIÓN A, un agente según la presente invención, como medida preventiva redujo en gran medida la eosinofilia pulmonar y revirtió casi hasta niveles de hiperreactividad bronquial de nivel inicial. El uso de la vacuna de FORMULACIÓN A como agente terapéutico redujo significativamente la inflamación broncoalveolar, al tiempo que se observó una tendencia hacia una hipersensibilidad bronquial reducida en respuesta al antígeno OVA. Basándose en estos resultados, los inventores concluyeron que cuando se administra la vacuna de FORMULACIÓN A antes de la fase de exposición, tal como 3 veces antes de la fase de exposición, tiene un efecto claramente beneficioso sobre las vías respiratorias de ratones expuestos a OVA, mientras que su administración terapéutica reduce claramente la inflamación y tiene un efecto leve sobre la hipersensibilidad bronquial.

La monitorización de ratones individuales (membranas mucosas, pelo y comportamiento) no reveló ningún efecto adverso atribuible a la vacuna de FORMULACIÓN A, excepto por un granuloma que apareció en el sitio de la inyección en el plazo de días desde la vacunación. El estado general de los ratones era normal y equivalente en todos los grupos, tratados y no tratados, ya estuvieran sensibilizados a OVA o no. La figura 11 muestra un aumento sistemático y casi uniforme en el peso promedio de ratones de los 7 grupos a lo largo de todo el periodo de experimento. (Véanse los datos individuales y las medias $\pm$ EEM de pesos relevantes en la sección de apéndice).

De manera inesperada, un ratón del grupo de control no sensibilizado en el régimen de placebo (grupo 1) se encontró muerto en la jaula en el día -21. La autopsia realizada en el departamento de patología reveló autólisis de moderada a intensa dependiendo de la zona, exudado ventro/inguinal subcutáneo denso y purulento y esplenomegalia, lo cual sugería una muerte resultante de una infección de mordedura o herida en la zona ventro/inguinal. Los inventores procedieron a reemplazar el ratón por otro de la misma cepa y origen que era una semana mayor y al que no se le había administrado ningún fármaco ni se había sometido a ninguna manipulación previa.

Ejemplo 11: Efectos de los tratamientos sobre las vías respiratorias

Se midió el reclutamiento de células inflamatorias en el árbol traqueobronquial realizando recuentos de células diferenciales y de células inflamatorias totales. Véanse también las tablas en el apéndice para resultados detallados individuales en modelos de ratón.

Recuentos diferenciales de células de BAL

Para medir la inflamación global, se midió el número total de células que se habían acumulado en el BAL y se realizó el recuento diferencial de células inflamatorias (300 células teñidas con Diff-Quick en un dispositivo Cytospin) en un momento posterior. Los datos combinados se presentan en la figura 15, que muestra en células/ml los números de eosinófilos, macrófagos, linfocitos y neutrófilos presentes por ml de BAL. Tal como se indica en la figura 15, se observó una eosinofilia intensa en aquellos animales expuestos a OVA, lo cual es un rasgo característico de procesos inflamatorios de origen alérgico. La eosinofilia era un 43,58 % inferior en el grupo de animales que recibieron la vacuna de BCG, aunque esto no alcanzó una significación estadística ($p = 0,08$). En paralelo con su impacto sobre la reactividad bronquial, la vacuna de FORMULACIÓN A ayudó claramente a frenar el grado de eosinofilia, produciendo una reducción del 61,19 % con el régimen terapéutico (T) y del 75,81 % con el régimen preventivo (P) (ambos $p < 0,005$, prueba de la t de Student). Además de aliviar claramente la eosinofilia, la vacuna de FORMULACIÓN A también ayudó a mitigar el aumento en linfocitos, aunque esto sólo alcanzó significación estadística en el caso de T ($p < 0,05$, prueba de la t de Student), permaneciendo constante en el caso de P ($p = 0,09$, prueba de la t de Student).

Conclusiones

Basándose en los resultados de este proyecto (véanse los ejemplos) puede concluirse que la administración del agente descrito en el presente documento, tal como FORMULACIÓN A, atenúa significativamente la hipersensibilidad de las vías respiratorias, eosinofilia y linfocitosis en las vías respiratorias de ratones expuestos a OVA. En las condiciones de experimento usadas su eficacia supera en todos los parámetros evaluados a la vacuna comercial de Pfizer de cepa de BCG danesa 1331. El régimen terapéutico reduce la eosinofilia pulmonar y parece disminuir la hiperreactividad (aunque no de manera significativa). En comparación con la vacuna comercial de Pfizer de cepa de BCG danesa 1331, la vacuna de Formulación A fue superior en cuanto a la atenuación de la eosinofilia pulmonar.

Apéndice:

Datos para todas las variables medidas

Tabla 6. Peso respectivo (g) de cada ratón

ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
----	-----	-----	-----	----	---	---	----	----	----	----

ES 2 670 493 T3

1	18,72	18,88	19,12	19,06	20,17	19,96	20,62	21,42	21,42	21,79
2	19,44	18,57	19,5	20,7	21,27	21,9	21,25	22,83	22,07	23,02
3	18,41	17,19	17,98	18,57	18,99	20,16	19,6	20,06	19,81	20,85
4	18,45	19,24	19,39	20,36	21,36	21,28	21,54	22,69	21,77	23,19
5	19,47	19,04	20,3	20,74	20,4	20,61	21,1	21,96	22,25	22,43
6	19,24	19,65	19,2	20,8	20,82	21,12	20,73	21,18	20,8	21,61
7	19,09	20	19,57	20,38	20,99	21,17	21,28	22,14	22,3	22,66
8			22,63	22,48	23,39	23,34	25,35	24,47	24,61	24,99
Media	18,97	18,94	19,71	20,39	20,92	21,19	21,43	22,09	21,88	22,57
EEM	0,169	0,343	0,475	0,419	0,443	0,379	0,598	0,463	0,491	0,442
ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
9	18,93	18,77	18,74	19,04	20,67	20,71	20,42	21,68	21,58	22,15
10	19,6	18,88	19,1	19,73	20,99	21,42	21,77	21,18	21,18	22,69
11	20,02	19,73	20,04	20,9	21,02	21,12	21,41	22	22,31	23,36
12	18,96	18,87	20,02	20,46	21,39	21,56	22,11	21	21,25	22,15
13	17,77	18,06	18,77	19,6	20,02	20,49	20,83	20,96	20,52	20,99
14	17,72	19,17	18,96	19,66	19,63	19,95	20,11	20,37	20,19	22,47
15	17,53	18,13	18,27	18,36	19,54	19,68	19,74	20,31	20,33	21,29
16	18,92	19,01	19,72	19,96	20,54	21,05	22,5	22,29	22,11	23,27
Media	18,68	18,83	19,2	19,71	20,48	20,75	21,11	21,22	21,18	22,3
EEM	0,325	0,191	0,231	0,278	0,24	0,239	0,351	0,255	0,282	0,3
ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
17	18,33	18,73	18,56	18,99	19,61	19,9	20,75	21,14	21,22	21,6
18	19,61	19,47	19,85	20,49	21,13	21,62	22,02	21,72	21,52	22,54
19	19,16	19,34	19,71	20,8	21,8	22,08	22,48	22,11	22,28	23,8
20	18,95	19,53	19,97	21,1	21,68	22,28	22,44	21,69	22,17	23,62
21	18,31	17,13	18,9	20,4	20,3	20,42	20,68	20,66	20,89	21,78
22	19,37	19,83	19,95	21,2	21,27	20,71	21,4	21,56	21,83	23,26
23	19,83	19,3	19,5	19,24	20,01	19,89	20,39	20,01	21,3	21,36
24	17,55	16,8	17,01	17,45	19,2	19,59	19,3	19,28	19,27	19,9
Media	18,89	18,77	19,18	19,96	20,63	20,81	21,18	21,02	21,31	22,23
EEM	0,272	0,409	0,359	0,459	0,346	0,372	0,392	0,344	0,337	0,469
ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
25	18,71	18,88	19,4	19,57	20,69	20,22	21,16	21,09	21,66	22,38
26	18,3	18,9	19,28	19,71	20,34	20,86	21,7	21,75	21,17	23,35
27	21,27	20,79	20,34	20,62	21,6	22,12	22,22	22,68	22,6	23,86
28	20,91	20,38	20,43	21,3	21,71	22,25	22,74	21,58	22,6	23,83
29	18,02	17,68	18,1	19,2	19,34	20	20,13	20,35	20,18	20,79
30	17,85	18,25	18,5	19,9	19,81	20,36	20,95	20,65	20,87	21,37
31	19,42	19,8	19,81	20,3	21,58	21,29	20,95	21,62	21,64	22,53
32	18,16	18,53	18,72	19,39	19,87	20,59	20,35	20,48	21,96	21,98
Media	19,08	19,15	19,32	20	20,62	20,96	21,28	21,28	21,59	22,51
EEM	0,472	0,381	0,3	0,248	0,328	0,302	0,317	0,278	0,295	0,397
ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
33	18,42	18,64	19,34	19,63	20,68	20,68	20,22	20,16	20,63	21,7
34	20,14	20,35	20,68	21,51	22,17	22,11	22,06	23,1	22,34	23,65
35	20,65	20,76	21,04	21,9	22,2	22,9	22,4	22,5	23,03	23,99
36	19,37	19,73	20,03	20,03	21,38	21,42	22,14	22,43	22,44	23,38
37	19,04	18,91	19,28	20,6	20,54	21,02	20,8	21,67	21,72	22,76
38	19,23	19,99	20,43	21,17	20,71	21,48	21,16	21,6	21,43	23,81
39	18	19	19,55	19,59	20,45	20,5	20,15	20,76	20,9	22,35
40	18,64	19,08	18,85	19,27	21,3	20,9	22,1	22,6	22,68	22,58
Media	19,19	19,56	19,9	20,46	21,18	21,38	21,38	21,85	21,9	23,03
EEM	0,311	0,27	0,272	0,347	0,25	0,283	0,323	0,354	0,306	0,285
ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
41	18,71	18,54	18,75	18,88	19,38	19,51	20,01	20,56	21,19	22,03
42	18,8	19,47	19,85	20,49	21,03	21,45	21,25	21,94	21,65	22,94
43	18,88	18,79	19,58	20,5	21,24	21,25	21,84	21,81	22,84	23,93
44	17,8	17,88	18,95	18,99	19,73	21,4	21,39	20,79	21,3	21,11
45	19,18	19,98	20,16	20,18	20,31	20,95	21,12	21,31	22,05	22,48
46	18,12	18,71	18,53	19,46	19,85	20,46	20,72	20,96	20,8	23
47	19,06	18,76	19,84	22,25	21,87	21,28	21,71	22,66	22,36	22,99
48	19,03	19,38	19,25	20,1	20,79	21,21	22,08	21,52	22,02	24

Media	18,7	18,94	19,36	20,11	20,53	20,94	21,27	21,44	21,78	22,81
EEM	0,172	0,229	0,207	0,38	0,302	0,233	0,235	0,244	0,237	0,337
ID	-31	-21	-14	-7	0	7	14	21	28	31
49	19,26	18,78	19,55	19,59	20,1	21	20,8	21,02	21,04	21,73
50	18,61	18,95	18,8	19,41	20,4	20,3	20,58	21,62	21,73	22,69
51	19,53	18,75	19,05	19,38	19,65	21,39	20,66	21,08	20,91	22,48
52	19,28	19,66	19,82	19,45	20,09	19,83	19,8	22,09	20,38	20,85
53	19,14	19,15	19,33	20,16	21,02	20,9	21,95	20,09	21,95	22,03
54	18,72	19,36	19,55	20,17	21,86	22,39	22,4	22,22	22,12	23,16
55	19,4	19,88	20,14	20,8	21,6	21,48	21,58	21,5	21,97	23,39
56	18,82	17,98	17,95	18,26	19,13	19,65	20,51	19,8	20,2	21,7
Media	19,1	19,06	19,27	19,65	20,48	20,87	21,04	21,18	21,29	22,25
EEM	0,119	0,211	0,24	0,266	0,335	0,324	0,305	0,309	0,267	0,298

Tabla 7. Mediciones de curva de respuesta de RL (%) tras la administración de metacolina, indicando el 100 % la respuesta de nivel inicial de cada animal

5 RI (%)

NS, vehículo	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
1	118,43	131,34	132,35	130,24	131,20	128,26	135,64
2	131,56	143,87	164,19	159,04	163,17	163,12	171,09
3	115,04	124,55	140,42	149,96	150,90	154,81	157,01
4	126,74	158,81	205,26	202,11	236,54	230,00	240,59
5	141,56	166,45	176,68	189,07	177,78	180,28	186,48
6	110,66	145,91	171,89	167,32	158,36	160,71	159,57
7	110,37	110,55	110,73	109,07	111,01	113,30	119,83
8	135,97	152,16	143,86	147,44	151,21	145,80	136,84
Media	123,79	141,71	155,67	156,78	160,02	159,53	163,38
EEM	4,21	6,56	10,50	10,63	13,08	12,49	13,35

OVA, veh.	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
9	106,86	146,71	171,29	162,44	181,44	194,87	254,44
10	119,43	125,96	193,79	197,44	199,27	224,99	233,58
11	122,53	241,41	252,50	314,73	353,16	328,97	347,92
12	129,22	304,31	340,14	289,46	345,92	445,23	597,87
13	130,91	193,30	223,68	254,45	258,39	272,47	275,50
14	135,49	151,47	166,99	392,55	478,27	480,22	409,83
15	124,92	142,11	215,72	199,42	294,69	248,12	319,51
16	126,79	129,46	138,57	149,23	166,47	177,93	223,34
Media	124,52	179,34	212,84	244,97	284,70	296,60	332,75
EEM	3,08	22,45	22,20	29,59	37,47	39,94	43,88

NS, BCG	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
17	146,66	162,48	154,77	160,04	161,29	161,04	147,63
18	136,70	165,00	160,13	145,98	152,23	164,46	161,56
19	130,02	155,93	167,91	191,58	203,82	186,27	246,22
20	153,91	182,18	203,31	240,48	238,37	234,70	224,65
21	133,25	137,28	162,11	178,48	191,91	199,33	205,70
22	136,78	149,59	195,96	282,79	292,65	292,72	301,94
23	118,33	131,98	137,02	142,47	145,38	148,28	155,10
24	126,74	137,82	162,24	204,57	207,56	229,82	283,77
Media	135,30	152,78	167,93	193,30	199,15	202,08	215,82
EEM	3,95	6,01	7,67	17,17	17,40	17,06	20,88

OVA, BCG	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
25	108,03	138,21	183,32	202,26	202,73	182,79	185,49
26	118,25	257,81	206,97	216,36	212,99	204,10	206,23
27	134,80	222,02	236,12	280,32	280,29	283,06	282,43
28	115,15	114,03	118,00	120,39	121,71	142,98	186,51
29	115,43	129,98	150,67	180,26	171,38	174,01	185,08
30	126,05	125,12	129,19	151,90	275,44	344,08	364,32
31	129,02	136,77	267,38	261,84	330,42	461,90	371,06

32	109,68	128,89	146,11	149,87	168,38	173,64	217,46
Media	119,55	156,60	179,72	195,40	220,42	245,82	249,82
EEM	3,36	18,68	18,88	19,79	24,62	38,82	28,08

NS, FORMULACIÓN A, P	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
33	125,58	144,20	168,15	186,86	175,24	176,33	177,47
34	146,51	169,00	260,52	250,91	252,07	246,81	249,22
35	140,23	142,84	148,36	161,59	199,77	204,06	212,82
36	126,99	155,93	160,95	177,39	186,67	176,74	196,50
NS, FORMULACIÓN A, P	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
33	125,58	144,20	168,15	186,86	175,24	176,33	177,47
34	146,51	169,00	260,52	250,91	252,07	246,81	249,22
35	140,23	142,84	148,36	161,59	199,77	204,06	212,82
36	126,99	155,93	160,95	177,39	186,67	176,74	196,50

OVA, FORMULACIÓN A, P	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
41	105,56	127,62	153,09	152,64	155,79	155,05	141,78
42	127,83	146,48	149,40	150,02	157,59	158,28	167,28
43	132,88	171,37	178,22	185,08	192,45	276,23	295,46
44	106,69	156,07	185,86	200,16	190,12	206,75	217,86
45	112,65	146,94	195,29	209,32	233,57	222,81	239,62
46	131,19	157,88	183,77	191,72	195,83	204,58	218,59
47	103,71	118,27	129,55	137,52	146,41	151,73	159,29
48	143,41	152,30	154,25	178,90	188,66	188,85	221,45
Media	120,49	147,12	166,18	175,67	182,55	195,53	207,67
EEM	5,35	6,01	8,05	9,19	10,02	14,91	17,65

OVA, FORMULACIÓN A, T	PBS	0,625	1,25	2,5	5,00	10,00	20,00
49	132,93	162,46	160,75	163,44	159,13	160,92	156,80
50	186,62	219,08	214,06	233,51	222,61	221,68	212,96
51	138,92	205,77	243,49	261,02	266,60	276,19	280,05
52	125,73	155,11	170,70	189,33	211,72	321,32	271,59
53	111,64	147,12	208,05	235,99	249,64	280,12	274,40
54	131,74	213,92	241,73	236,14	240,46	214,20	216,79
55	110,04	108,98	133,52	145,54	142,20	151,71	178,89
56	142,13	315,65	405,81	421,56	438,06	518,91	459,26
Media	134,97	191,01	222,26	235,82	241,30	268,13	256,34
EEM	8,45	22,29	29,61	30,09	31,97	41,41	33,18

5 Tabla 8. Recuentos de células inflamatorias individuales

	NS	OVA	NS, BCG	OVA, BCG	NS, Form. A, P	OVA, Form. A, P	OVA, Form. A, T
	425 000	520 000	540 000	370 000	260 000	275 000	370 000
	245 000	615 000	355 000	605 000	300 000	450 000	355 000
	245 000	440 000	495 000	345 000	335 000	395 000	480 000
	295 000	375 000	260 000	240 000	205 000	310 000	210 000
	255 000	280 000	165 000	295 000	275 000	315 000	225 000
	215 000	330 000	105 000	275 000	260 000	245 000	400 000
	255 000	430 000	210 000	205 000	250 000	390 000	275 000
	105 000	575 000	315 000	160 000	265 000	255 000	280 000
Media	255 000	445 625	305 625	311 875	268 750	329 375	324 375
EEM	31 282,13	41 623,71	54 210,55	48 494,64	13 354,71	26 295,67	32 820,36

Tabla 9. Recuentos de células diferenciales individuales (% , BAL)

NS				OVA			
eos.	macro.	neutro.	linf.	eos.	macro.	neutro.	linf.
0,00	95,65	3,62	0,72	20,67	61,00	10,00	8,33
0,00	92,31	2,68	5,02	14,05	62,21	6,35	17,39
2,35	77,93	11,27	8,45	51,99	27,56	9,66	10,80
0,65	87,91	3,59	7,84	54,88	30,64	6,06	8,42
0,33	80,67	11,67	7,33	17,63	54,17	14,10	14,10

Media EEM	0,31	92,50	1,88	5,31	57,00	19,67	2,67	20,67
	4,73	71,62	14,53	9,12	43,52	24,58	8,97	22,92
	3,54	80,30	9,60	6,57	52,00	22,00	6,00	20,00
	1,49	84,86	7,35	6,30	38,97	37,73	7,98	15,33
	0,64	2,99	1,74	0,94	6,48	6,42	1,22	2,03

NS, BCG				OVA, BCG			
eos.	macro.	neutro.	linf.	eos.	macro.	neutro.	linf.
0,32	91,75	2,54	5,40	18,33	65,33	3,00	13,33
0,00	94,83	1,72	3,45	40,86	33,89	8,97	16,28
0,99	92,11	5,26	1,64	48,85	30,82	8,52	11,80
3,40	84,35	8,84	3,40	18,24	53,82	13,24	14,71
0,66	88,82	5,26	5,26	25,81	55,81	8,39	10,00
2,33	63,67	12,33	21,67	14,20	67,19	4,42	14,20
4,00	71,00	12,67	12,33	38,55	27,41	6,93	27,11
4,04	64,31	6,40	25,25	25,82	72,13	0,41	1,64
1,97	81,35	6,88	9,80	28,83	50,80	6,73	13,63
0,60	4,59	1,45	3,20	4,42	6,27	1,42	2,50

NS, RUTI, P				OVA, Form. A, P				OVA, Form. A, T			
eos.	macro.	neutro.	linf.	eos.	macro.	neutro.	linf.	eos.	macro.	neutro.	linf.
1,59	72,73	9,77	15,91	2,86	85,71	3,49	7,94	18,06	60,54	7,69	13,71
0,29	85,00	9,12	5,59	0,48	83,73	8,13	7,66	7,80	74,24	10,17	7,80
1,02	75,09	9,90	13,99	23,91	49,69	11,49	14,91	6,25	83,04	3,57	7,14
0,00	88,22	7,74	4,04	35,18	43,97	6,51	14,33	38,74	31,79	17,55	11,92
0,34	60,20	30,95	8,50	6,21	81,05	2,29	10,46	43,67	36,67	5,00	14,67
0,67	82,67	4,00	12,67	2,97	69,80	9,90	17,33	20,38	57,96	8,92	12,74
0,00	86,89	3,28	9,84	0,00	80,55	3,41	16,04	14,05	62,21	6,35	17,39
0,00	72,67	8,00	19,33	34,02	24,74	14,78	26,46	35,88	26,58	21,26	16,28
0,49	77,93	10,35	11,23	13,20	64,91	7,50	14,39	23,10	54,13	10,06	12,71
0,20	3,37	3,07	1,84	5,39	8,02	1,56	2,15	5,11	7,231	2,20	1,30

Tabla 10. Resultados individuales de los recuentos de células diferenciales de BAL (células/ml)

5

NS				OVA			
eos.	macro.	neutro.	linf.	eos.	macro.	neutro.	linf.
0,00	406 521,74	15 398,55	3079,71	107 466,67	317 200,00	52 000,00	43 333,33
0,00	226 153,85	655,18	12 290,97	86 387,96	382 575,25	39 080,27	106 956,52
5751,17	190 938,97	27 605,63	20 704,23	228 750,00	121 250,00	42 500,00	47 500,00
1928,10	259 330,07	10 604,58	23 137,25	205 808,08	114 898,99	22 727,27	31 565,66
850,00	205 700,00	29 750,00	18 700,00	49 358,97	151 666,67	39 487,18	39 437,18
671,88	198 875,00	4031,25	11 421,88	188 100,00	64 900,00	8800,00	68 200,00
12 060,81	182 635,14	37 043,92	23 260,14	187 142,86	105 714,29	38 571,43	98 571,43
3712,12	84 318,18	10 075,76	6893,94	299 000,00	126 500,00	34 500,00	115 000,00
3121,76	219 309,12	17 633,11	14 936,01	169 001,82	173 088,15	34 708,27	68 826,76
1459,25	32 091,46	4314,20	2701,14	29 106,93	39 999,89	4689,31	11 820,78

NS, BCG				OVA, BCG			
eos.	macro.	neutro.	linf.	eos.	macro.	neutro.	linf.
1714,29	495 428,57	13 714,29	29 142,86	67 833,33	241 733,33	11 100,00	49 333,33
0,00	336 637,93	6120,69	12 241,38	247 225,91	205 016,61	54 269,10	93 488,37
4884,87	455 921,05	26 052,63	8141,45	168 540,98	106 327,87	29 409,84	40 721,31
8843,54	219 319,73	22 993,20	8843,54	43 764,71	129 176,47	31 764,71	35 294,12
1085,53	146 546,05	8684,21	8684,21	76 129,03	164 629,03	24 741,94	29 500,00
2450,00	66 850,00	12 950,00	22 750,00	39 037,85	184 779,18	12 145,11	39 037,85
8400,00	149 100,00	26 600,00	25 900,00	79 036,14	56 189,76	14 201,81	55 572,29
12 727,27	202 575,76	20 151,52	79 545,45	41 311,48	115 409,84	655,74	2622,95
5013,19	259 047,39	17 158,32	24 406,11	95 359,93	150 407,76	22 286,03	43 821,28
1601,77	54 626,61	2785,39	8419,42	26 243,44	21 213,97	5871,74	9603,35

ES 2 670 493 T3

NS, Form. A, P				OVA, Form. A, P				OVA, Form. A, T			
macro.	neutro.	linfo.	eqs.	macro.	neutro.	linfo.	eqs.	macro.	neutro.	linfo.	eqs.
39 090,91	25 409,09	41 363,64	7857,14	235 714,29	9603,17	21 825,40	66 822,74	223 979,93	28 461,54	50 735,79	11 472,59
55 000,00	27 352,94	16 764,71	2153,11	376 794,26	36 602,87	34 449,76	27 677,97	263 542,37	36 101,69	27 677,97	10 537,35
51 535,84	33 157,00	46 877,13	94 456,52	196 273,29	45 388,20	58 881,99	30 000,00	398 571,43	17 142,86	34 285,71	5675,15
30 841,75	15 875,42	8282,83	109 055,37	136 319,22	20 195,44	44 429,97	81 357,62	66 754,97	36 854,30	25 033,11	5675,15
35 561,22	85 119,05	23 384,35	19 558,82	255 294,12	7205,88	32 941,18	98 250,00	82 500,00	11 250,00	33 000,00	10 537,35
14 933,33	10 400,00	32 933,33	7277,23	171 014,85	24 257,43	42 450,50	81 528,66	231 847,13	35 668,79	50 955,41	10 537,35
17 213,11	8196,72	24 590,16	0,00	314 129,69	13 310,58	62 559,73	38 628,76	171 070,23	17 474,92	47 826,09	10 537,35
92 566,67	21 200,00	51 233,33	86 752,58	63 092,78	37 680,41	67 474,23	100 465,12	74 418,60	59 534,88	45 581,40	10 537,35
08342,85	28 338,78	30 678,69	40 888,85	218 579,06	24 280,50	45 626,59	65 591,36	189 085,58	30 311,12	39 386,93	10 537,35
11 472,59	8650,53	5327,80	16 619,59	35 230,40	5037,23	5675,15	10 537,35	40 592,19	5451,07	3737,27	10 537,35

REIVINDICACIONES

1. Un agente, que es una formulación de liposoma que comprende:
 - 5 (a) fragmentos de pared celular de una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C),
 - (b) un agente de formación de liposoma, y
 - 10 (c) sacarosa a del 1 al 20 %para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal.
2. Un agente, que es una formulación de liposoma que comprende:
 - 15 (a) fragmentos de pared celular de una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C),
 - (b) un agente de formación de liposoma, y
 - 20 en el que el tamaño promedio en z de las partículas es de 150 nm o menos, según se determina mediante dispersión de luz dinámica, para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal.
3. El agente para su uso según la reivindicación 1, en el que el tamaño promedio en z de las partículas de liposoma es de 150 nm o menos, o en el que la formulación de liposoma es una emulsión, y en el que el tamaño promedio en z de las partículas es inferior a 40 nm, en el que el tamaño promedio en z se determina mediante dispersión de luz dinámica.
4. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el índice de polidispersidad de las partículas es de 0,4 o menos.
5. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta.
- 35 6. El agente para su uso según la reivindicación 5, en el que la cepa de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en el NCTC en Londres.
7. El agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente
 - 40 (a) un agente tensioactivo y/o
 - (b) uno o más tensioactivos no iónicos.
- 45 8. El agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente de formación de liposoma es un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado.
9. El agente para su uso según la reivindicación 8, en el que el agente de formación de liposoma es lecitina.
- 50 10. Agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos dos de los siguientes:
 - 55 (i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el primer polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),
 - 60 (ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el segundo polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv0934),
 - 65 (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el tercer polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv1866c), y

(iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el cuarto polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y

(v) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa según se mide tras electroforesis sobre un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en el que el quinto polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv3875).

11. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende uno o más ácidos micólicos y/o un micolato conjugado con azúcar y/o que contiene adicionalmente una o más sales o una disolución de las mismas.

12. El agente para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la formulación de liposoma está secada por congelación.

13. Una composición farmacéutica que comprende el agente según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en la prevención o terapia de una respuesta alérgica de un humano o animal.

14. El agente para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la respuesta alérgica está mediada por IgE y/o en el que la respuesta es atopia y/o en el que la respuesta alérgica es disfunción respiratoria y/o inflamación broncoalveolar y/o en el que la respuesta se selecciona de asma, polinosis, rinitis y eczema.

15. El agente para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la respuesta es asma.

16. El agente para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para inyección o para administración sublingual o para administración mediante inhalación.

17. El agente para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la administración de 5-200 µg por dosis y/o en el que el agente se administra al menos dos veces y/o en el que el agente o la composición farmacéutica es para su administración repetida.

18. El agente para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en la prevención y/o terapia de la respuesta alérgica de un humano o animal.

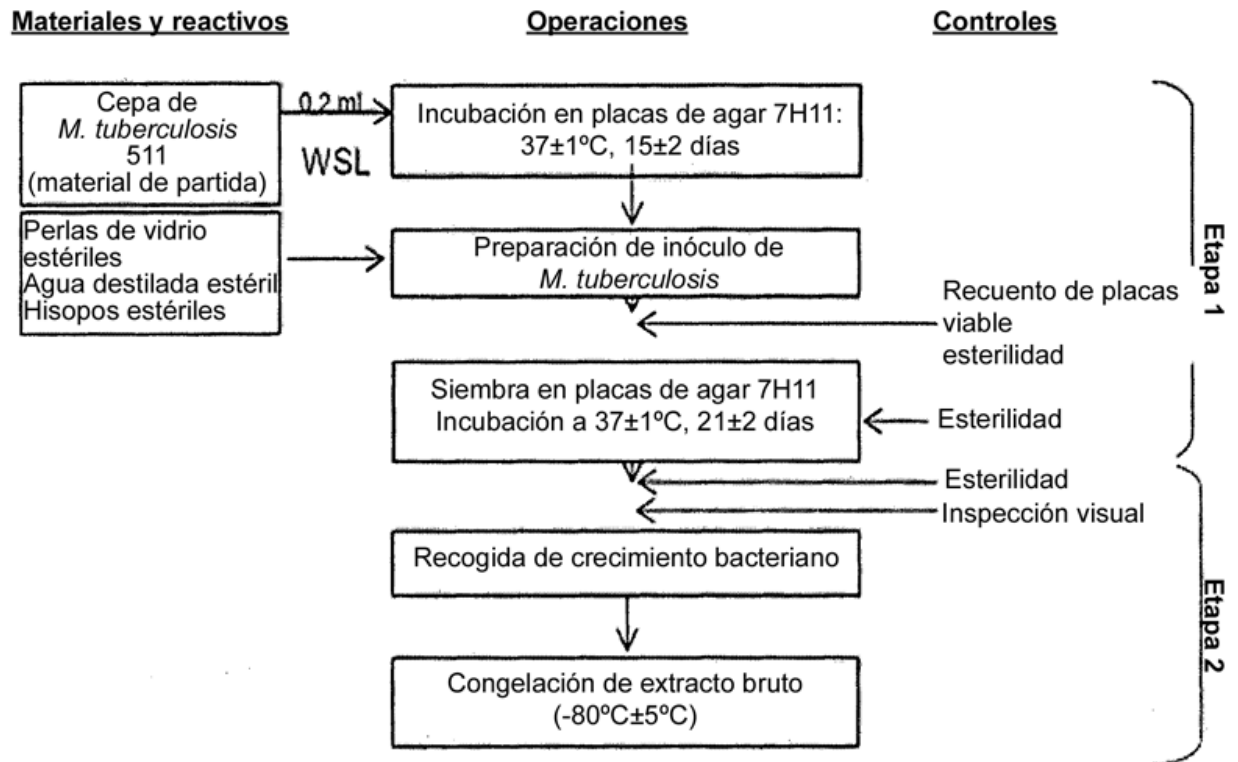


Figura 1

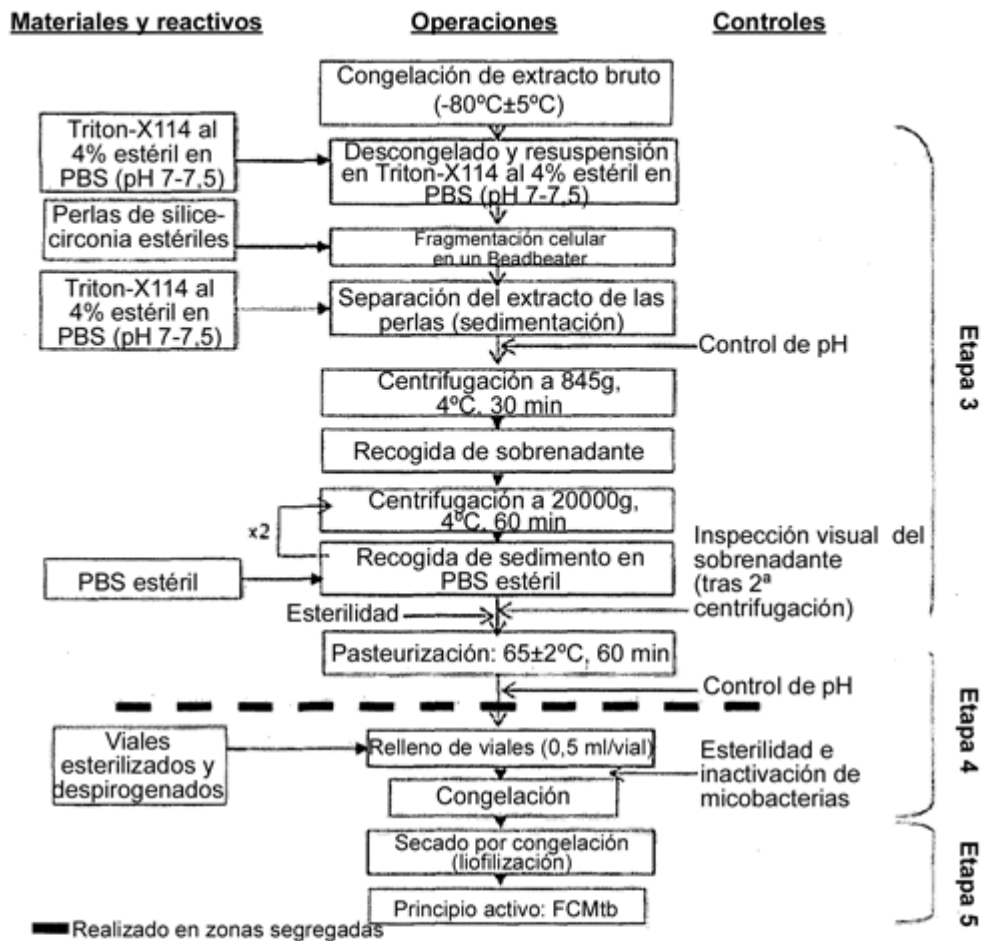


Figura 2

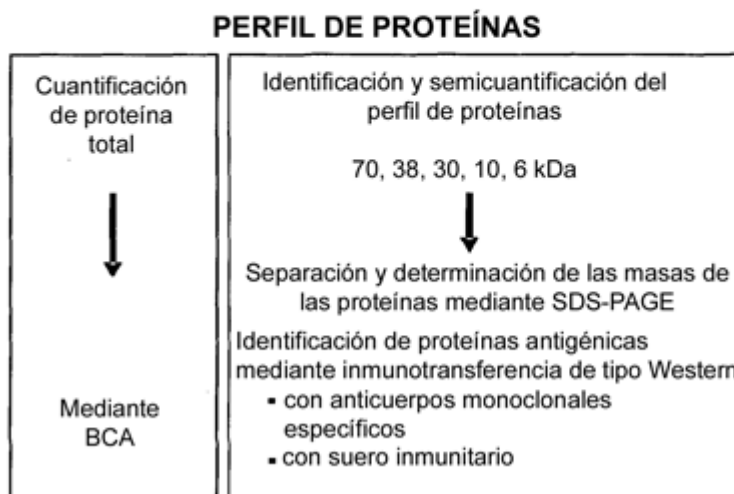


Figura 3

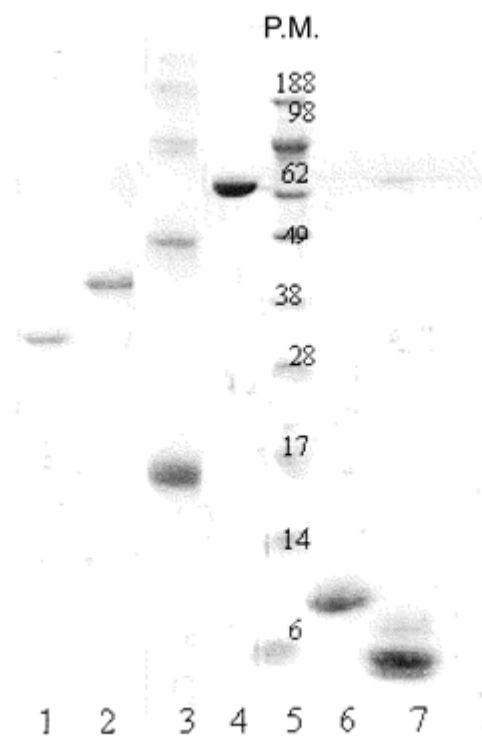


Figura 4

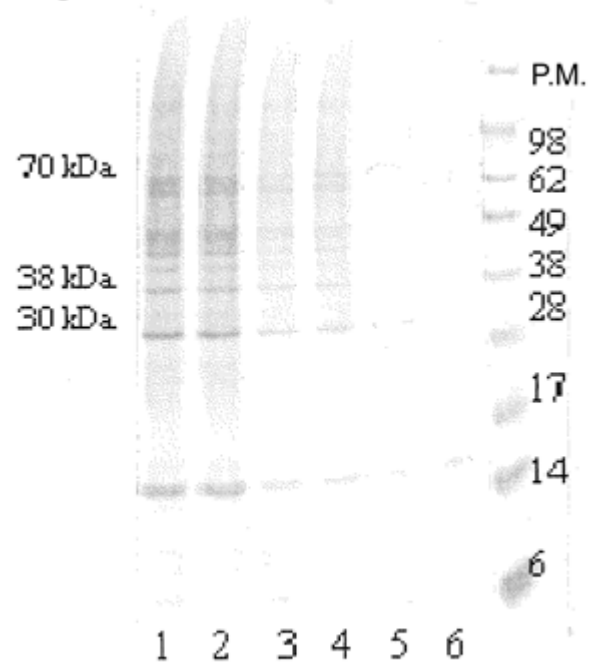


Figura 5a

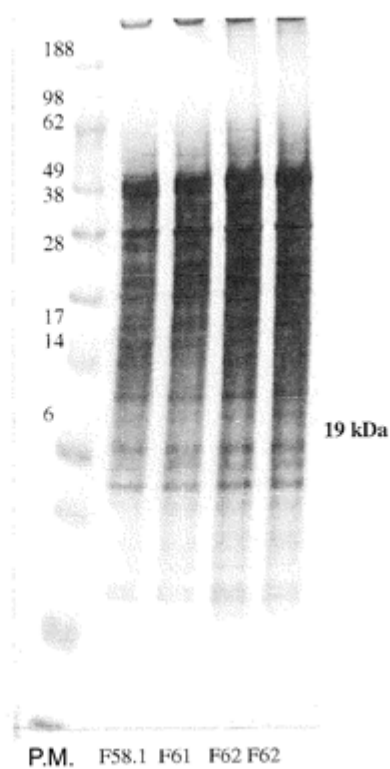


Figura 5b

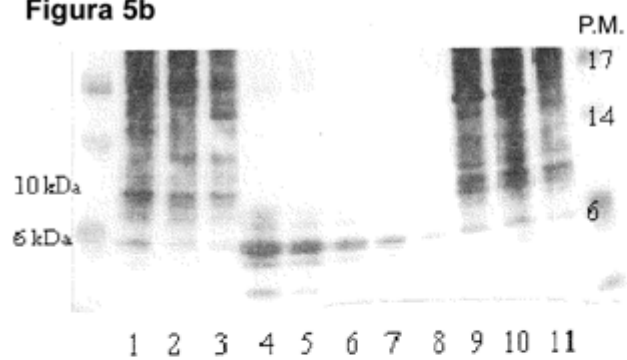


Figura 5c

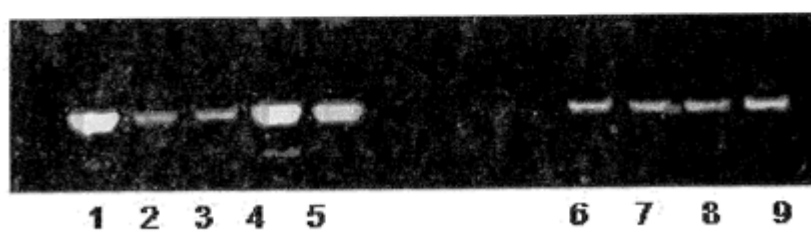


Figura 5d

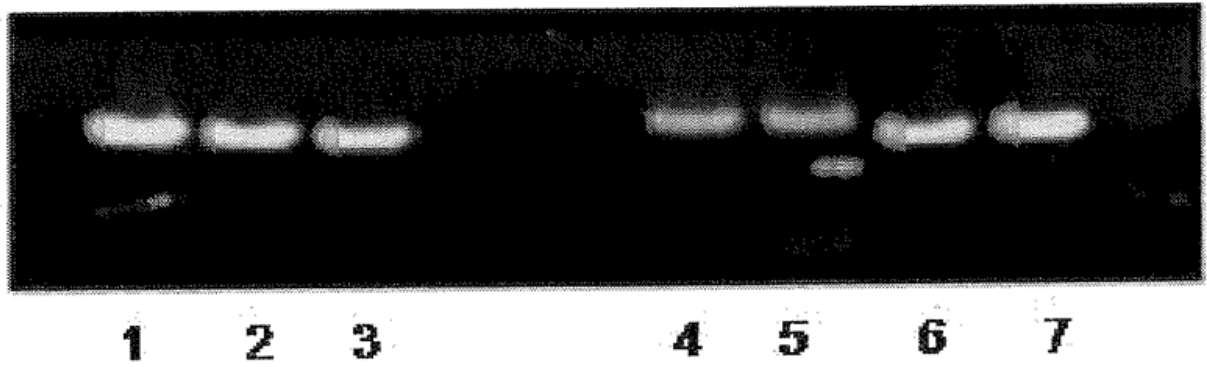


Figura 5e

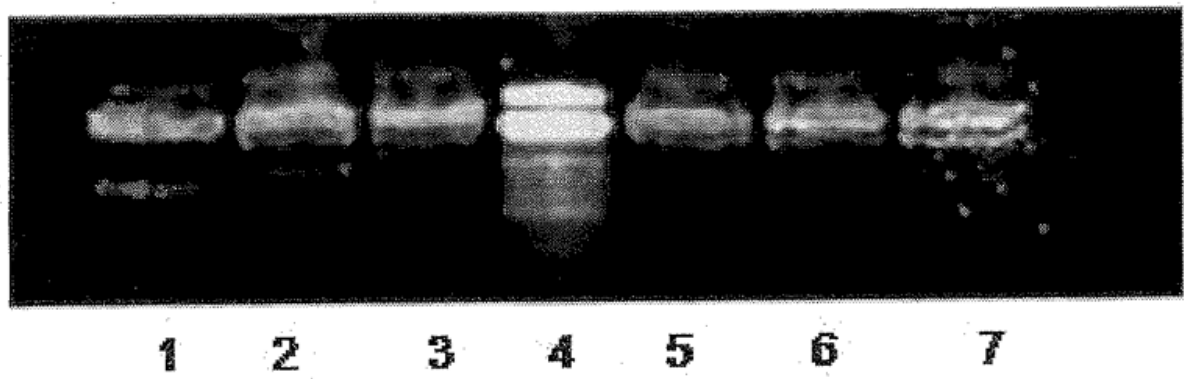


Figura 5f

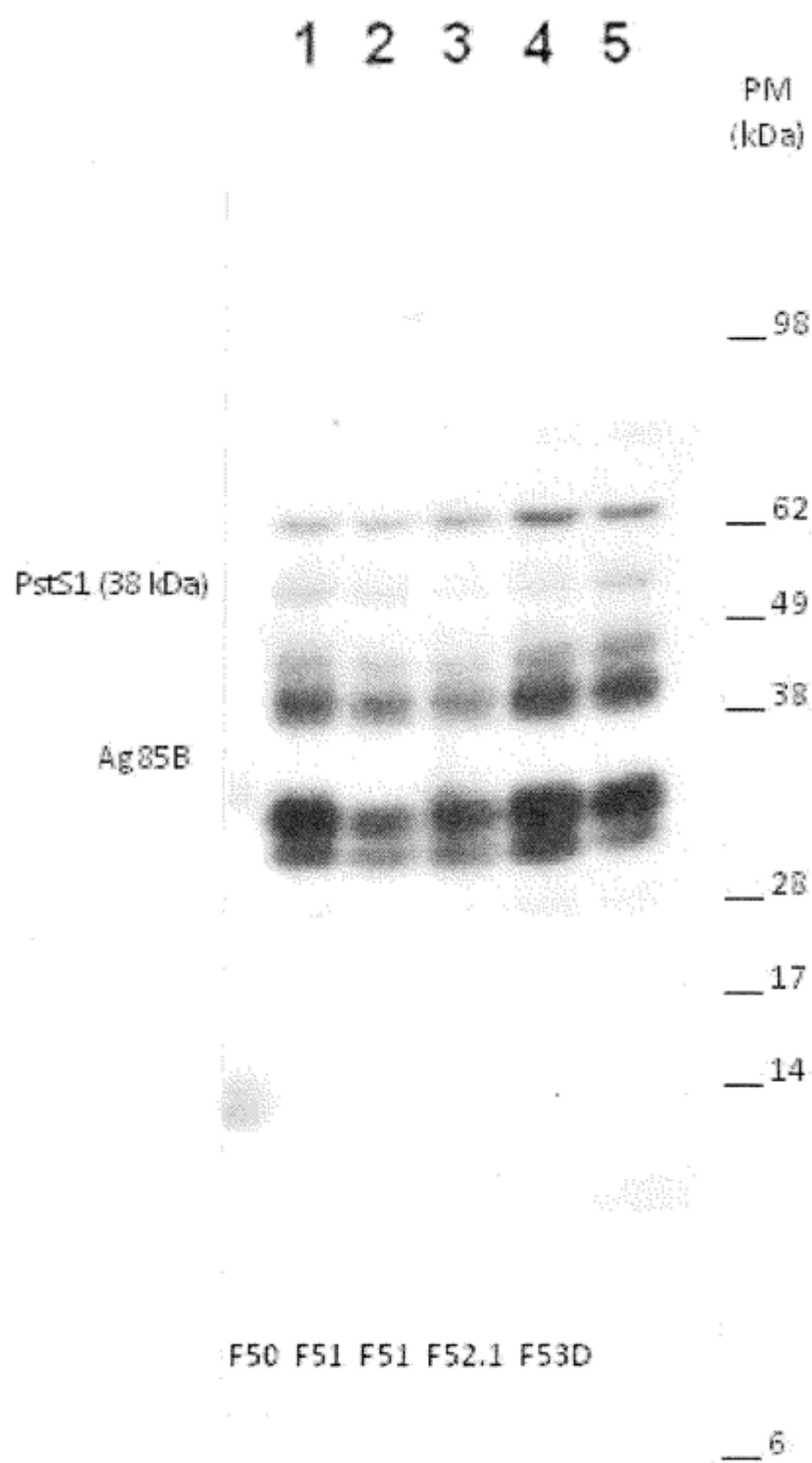


Figura 6

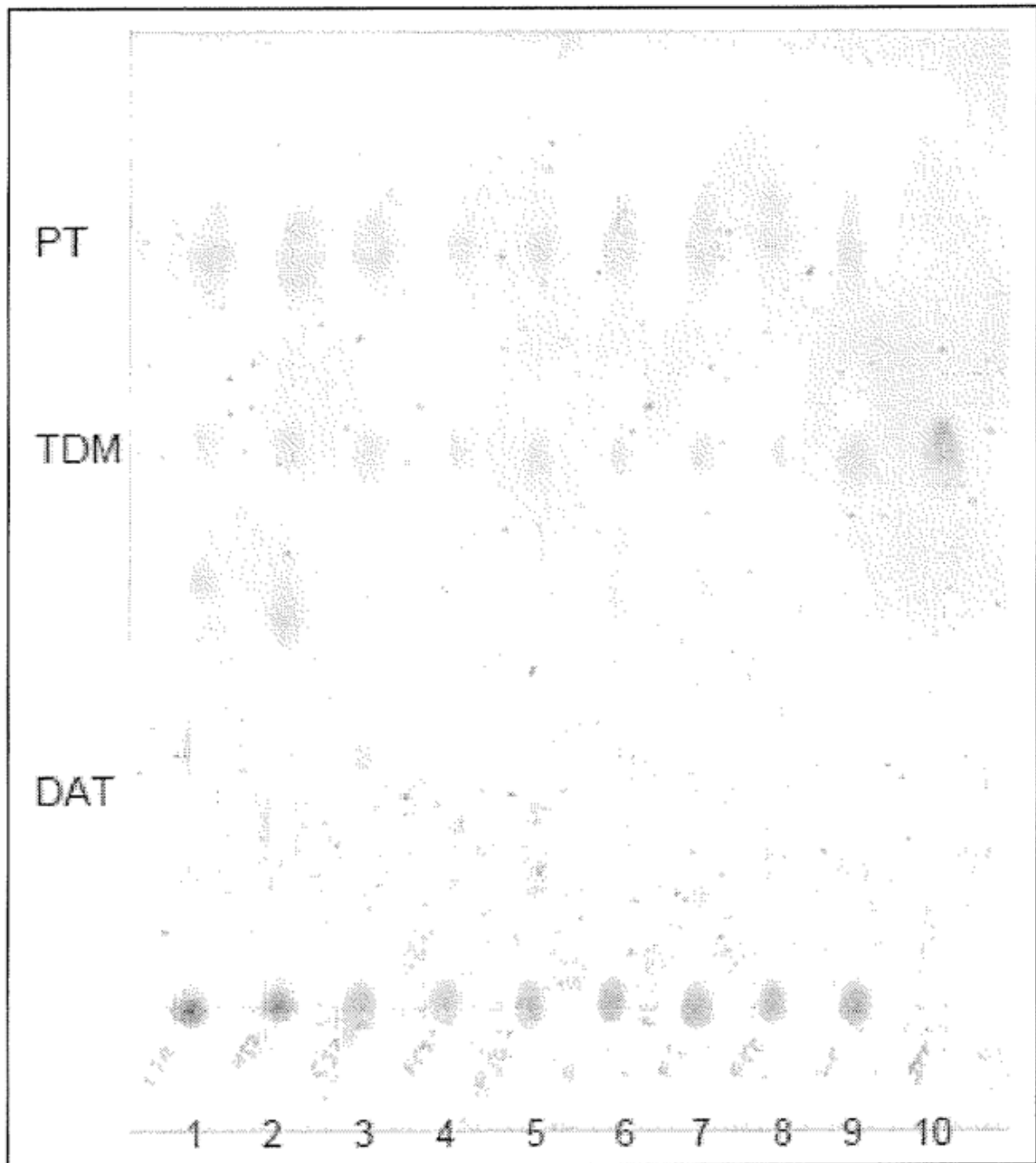


Figura 7a

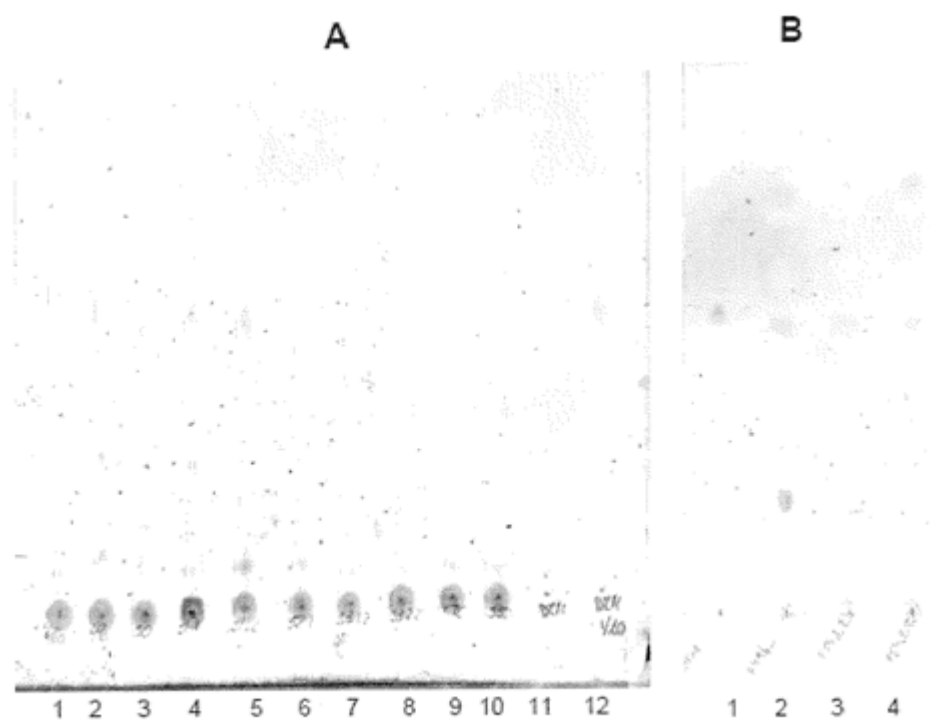


Figura 7b

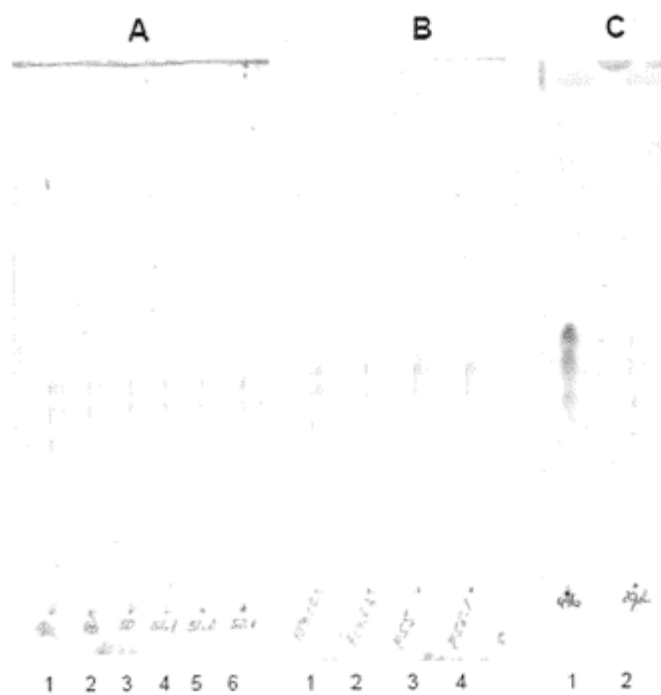


Figura 7c

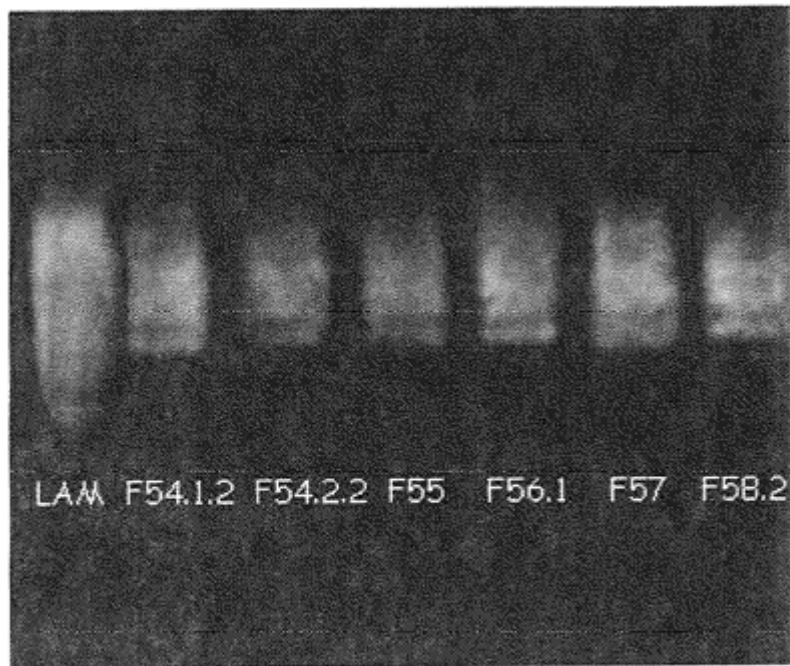


Figura 7d

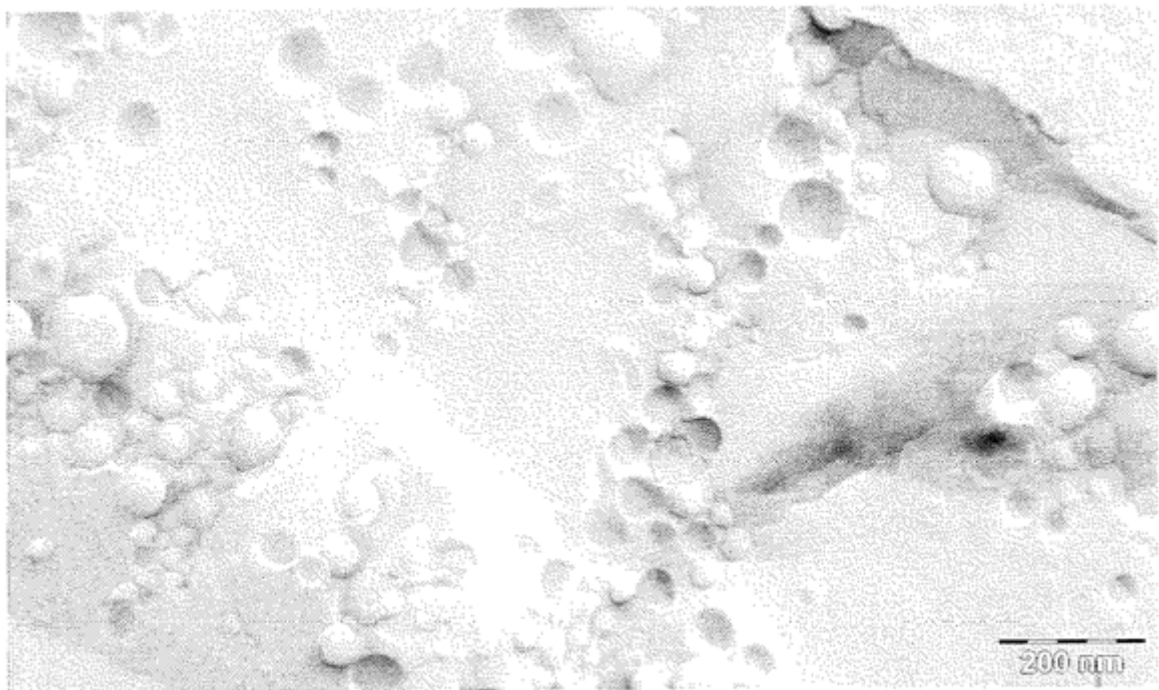


Figura 8

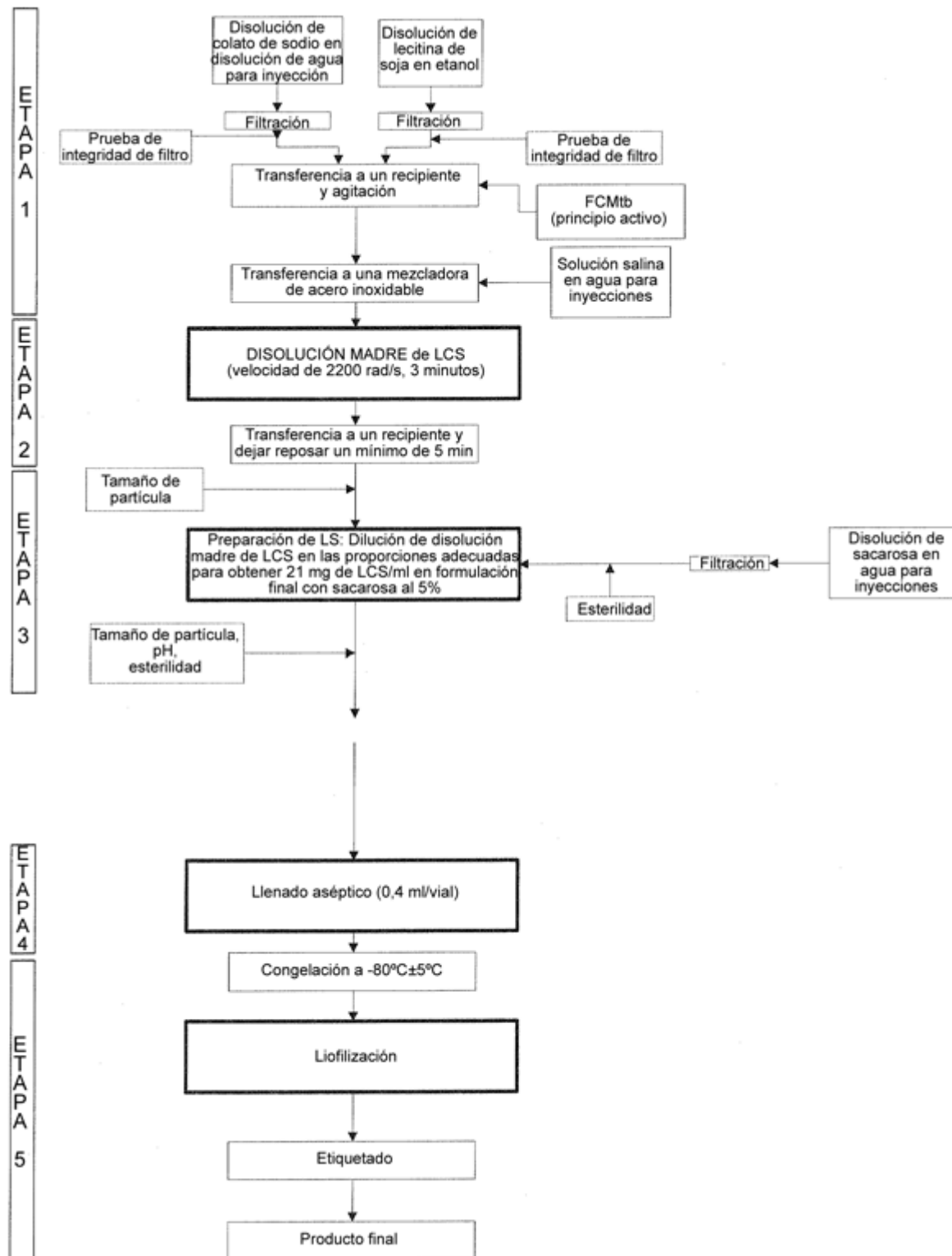


Figura 9

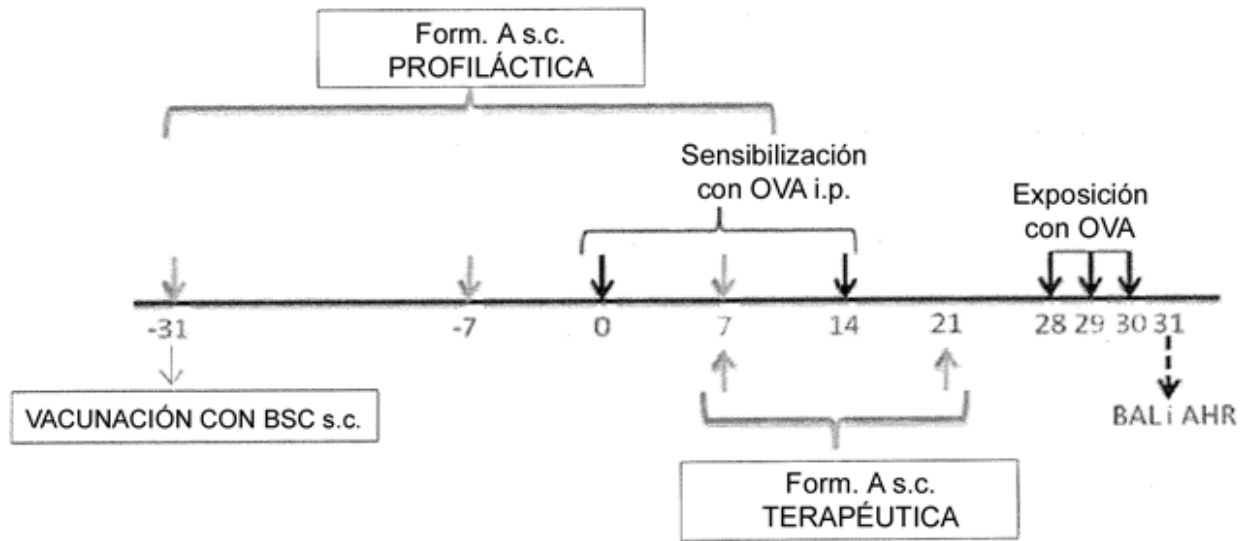


Figura 10

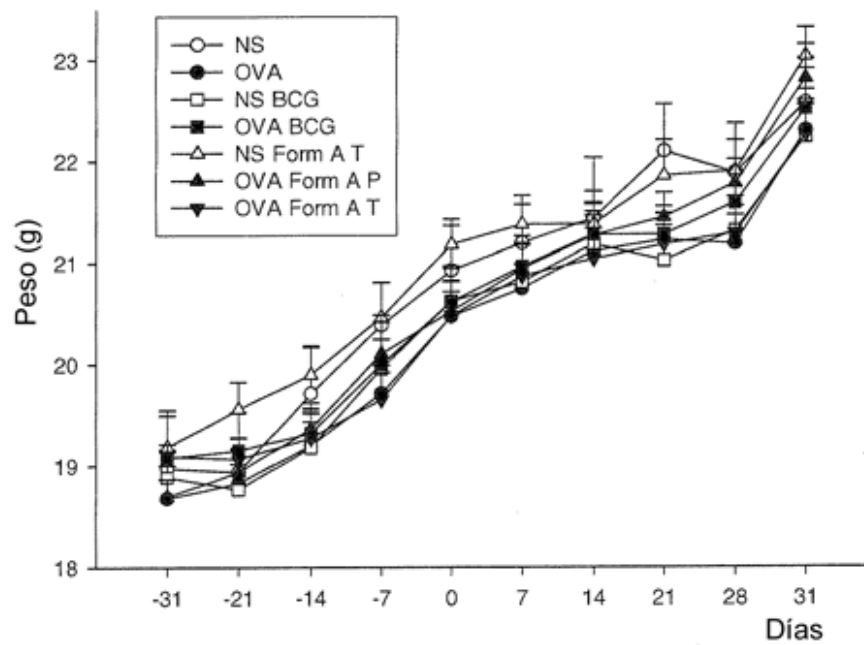


Figura 11

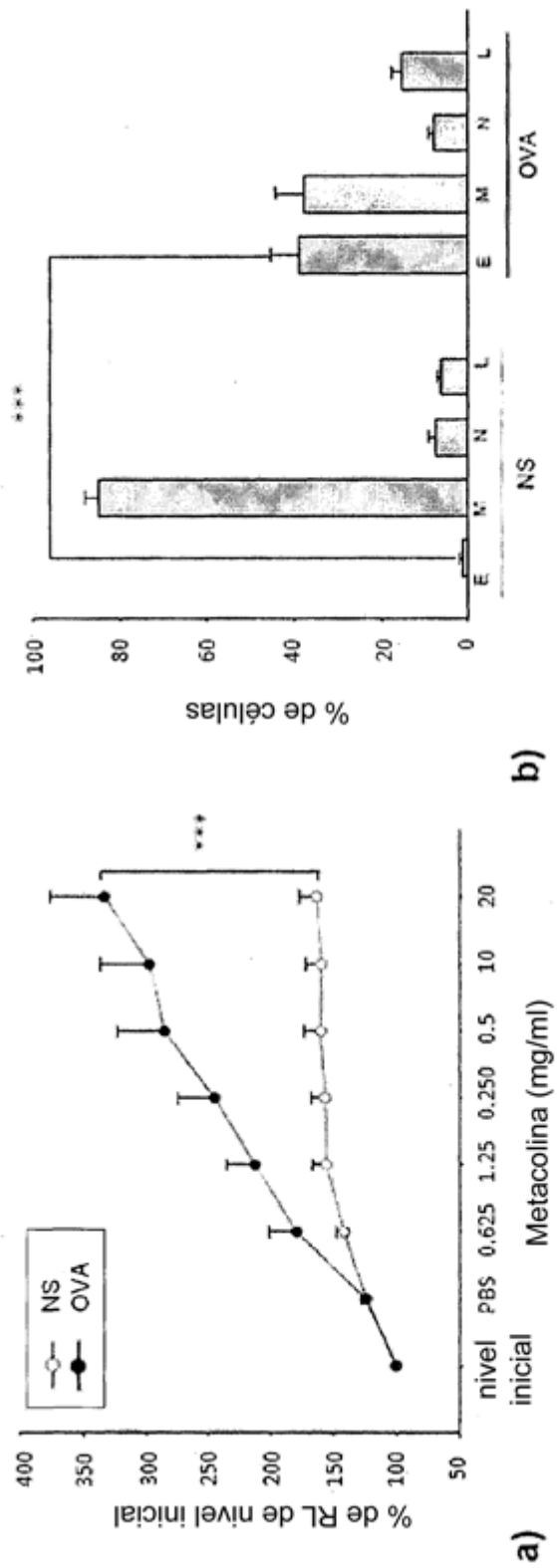


Figura 12

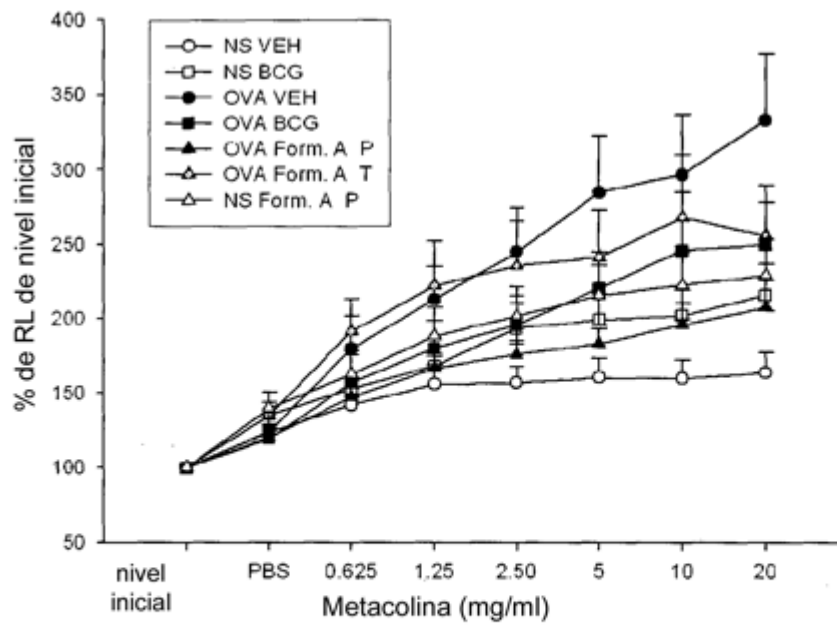


Figura 13

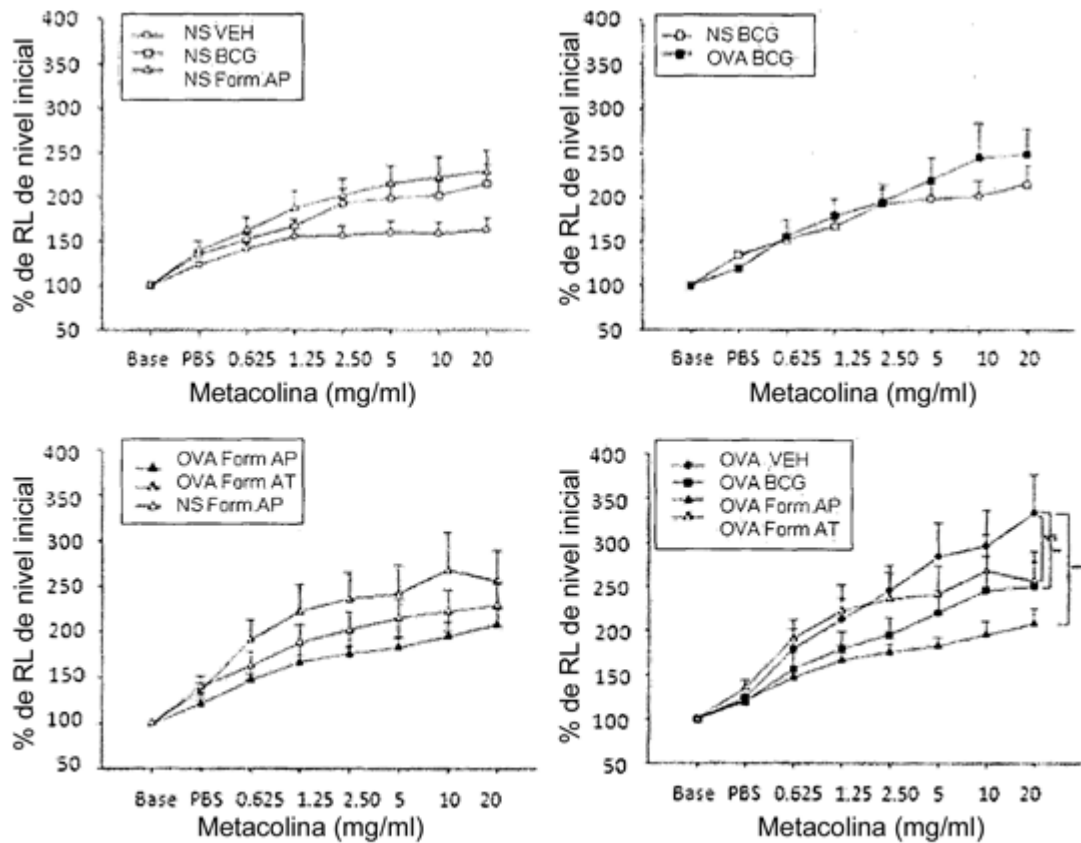


Figura 14

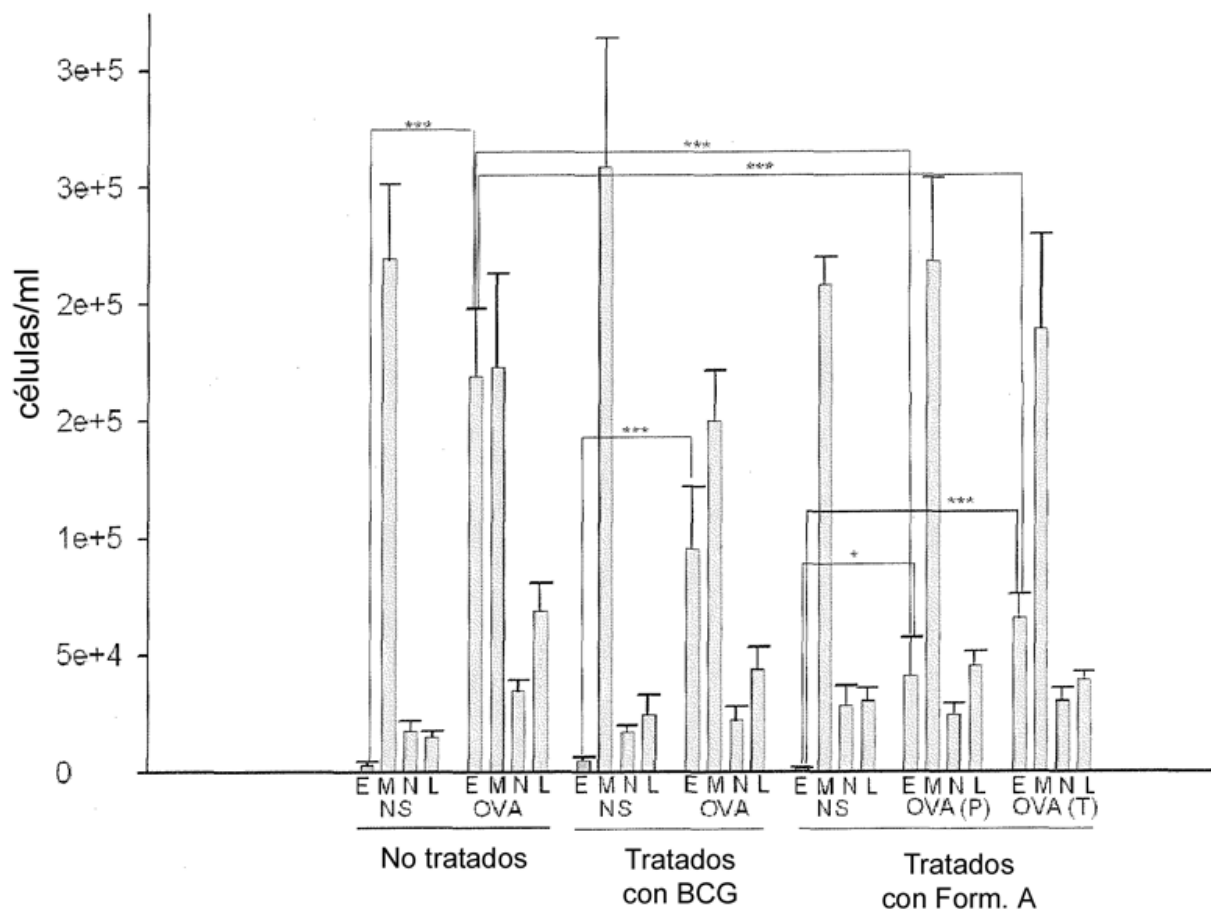


Figura 15