

13-158421



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

13-158421

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-158421-00000-0000

Fecha: 2013-07-04 16:4:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118- 119

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

PCT- FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

22. TITULO **FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA
PARA TRATAR O PREVENIR LA TUBERCULOSIS**

CLASIFICACION
INTERNACIONAL

SOLICITANTE **ARCHIVEL FARMA. SL**

DOMICILIO **BADALONA, BARCELONA, ESPAÑA**

APODERADO **JAIIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS**

Bogotá, D.C.,



No. 13-158421-00000-0000

Fecha: 2013-07-04 16:4:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 418 119

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/EP2012/050080	Fecha 04/01/2012
	Publicación Internacional No.	WO2012/093137 A1	Fecha 12/07/2012
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
	FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA PARA TRATAR O PREVENIR LA TUBERCULOSIS		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
	ARCHIVEL FARMA, SL		[1]
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	c/ Fogars de Tordera, 61 Poligon Industrial No. TELÉFONO	
		Bonavista E-08916	
	CIUDAD	BADALONA	
	DEPARTAMENTO/ESTADO	CORREO ELECTRÓNICO	
	PAÍS DE RESIDENCIA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
	BARCELONA	ESPAÑA	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. CARDONA,	Pere Joan	ES
	2. AMAT,	Isabel	ES
	3. REYES,	Blanca	ES
	4. SELGA,	Ariadna	ES
	5. AMAT,	Mercè	ES
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
	ESPAÑA		BARCELONA c/Osona, 3 Àtic 1era E-08023
	ESPAÑA		BARCELONA c/Osona, 3 Àtic 1era E-08023
	ESPAÑA		SANT BOI DE LLOBREGAT c/Arànsers, 3 2 E-08830
	ESPAÑA		BARCELONA c/Consell de Cent, 111 4-1 E-08015
	ESPAÑA		BARCELONA c/Vic, 20 5-2 E-08006
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	DELGADO VILLEGAS	JAIME EDUARDO	C.C. 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.
	DIRECCIÓN	Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202 No. TELÉFONO 2444096	
	CIUDAD	BOGOTA D.C. CORREO ELECTRÓNICO mde@mdelaw.com	
	PAÍS	COLOMBIA No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
	OFICINA EUROPEA DE PATENTES	EP	11150072.4 04/01/2011
	OFICINA EUROPEA DE PATENTES	EP	11183487.5 30/09/2011

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
1.	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
2.			(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL		
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)			
JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS APODERADO			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica		Documentación Jurídica	
Solicitud Internacional en castellano			
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones:		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA PARA TRATAR O PREVENIR
LA TUBERCULOSIS

Introducción y técnica anterior

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona formulaciones en liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, así como suspensiones y composiciones farmacéuticas que comprenden estas formulaciones y su uso respectivo en un procedimiento de
10 tratamiento, en particular para tratar o prevenir la tuberculosis. La formulación de la presente invención contiene sacarosa y/o tiene un tamaño medio de partícula menor que los agentes convencionales basados en liposomas del tratamiento de la tuberculosis, lo que tiene como resultado una biodisponibilidad y eficiencia mayores.

15 Técnica anterior

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por los bacilos del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), que incluye las especies de *Mycobacterium M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*. El principal rasgo distintivo de la cubierta celular de las
20 micobacterias es la gruesa pared celular cerosa. Las propiedades de la pared celular de barrera también contribuyen a la supervivencia intracelular del organismo actuando como modulador directo en las reacciones inmunológicas entre el huésped y los bacilos del MTB-C. La cubierta consiste en dos partes distintas, la membrana plasmática y, a su alrededor, la pared. La pared celular
25 es un esqueleto formado por una estructura de peptidoglucano unido

covalentemente, con una cadena ramificada de polisacárido, el arabinogalactano, unido por enlaces fosfodiéster. Los extremos distales del arabinogalactano están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaños y estructuras únicos de las micobacterias.

5 De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, cada año se registran 9.000.000 casos nuevos de personas que manifiestan la enfermedad en todo el mundo, de los que aproximadamente 2.000.000 mueren. Se considera que en todo el mundo hay más de 2.700.000.000 de personas infectadas y que cada año se generan más de 90-100 millones de infecciones
10 nuevas.

En el estado de la técnica se describen varias vacunas contra la tuberculosis basadas en fragmentos de la pared celular de cepas virulentas o avirulentas de *Mycobacterium*.

La vacuna que se usa actualmente en el tratamiento preventivo contra la
15 tuberculosis se basa en bacterias de la cepa denominada BCG (bacilo de Calmette-Guerin), una variante atenuada de *M. bovis*. También se sabe que el adyuvante usado en la composición de la vacuna puede influir considerablemente sobre la eficacia de la misma.

Los micolatos de trehalosa, en particular el dimicolato de trehalosa, son
20 los lípidos más bioactivos en los extractos de *M. tuberculosis*, e inducen una cascada proinflamatoria que influye sobre la formación de granulomas. Cabe destacar que no existen datos bibliográficos sobre la cantidad de estos compuestos presente en la pared celular de *M. tuberculosis*. Cualquier muestra derivada de esta especie tiene una elevada complejidad biológica. Por tanto,
25 para realizar análisis cuantitativos se requerirían agresivas y complejas etapas

de purificación de larga duración, lo que daría lugar a cantidades del compuesto purificado demasiado bajas como para realizar otros análisis estructurales. Esta es la razón por la cual no existen datos bibliográficos sobre el porcentaje exacto de cada compuesto en la pared celular de *M. tuberculosis*.

- 5 Varios glucolípidos son constituyentes típicos de las células de MTB-C, tal como el lipoarabinomanano. El lipoarabinomanano está relacionado con la virulencia de MTB-C.

E. Ribi y col., Nature 1963, 198, páginas 1214 a 1215, describen ensayos de inmunización realizados con una composición que comprende
10 fragmentos de la pared celular de la cepa avirulenta del bacilo de Calmette Guérin (BCG) y aceite mineral. Estos fragmentos se obtienen mediante homogeneización de un cultivo de dicha cepa en aceite mineral. La composición es más eficaz que la vacuna convencional (BCG). No obstante, en el mismo artículo se describe que los fragmentos de la pared celular no inducen
15 ninguna respuesta inmunológica cuando se obtienen mediante homogeneización en agua y en ausencia del aceite mineral.

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

25 G.K. Khuiler y col., Folia Microbiol., 1992, 37, páginas 407 a 412,

describen la eficacia protectora de diferentes fracciones de la pared celular de la cepa H37Ra avirulenta de *M. tuberculosis* formulada con adyuvante incompleto de Freund, que también incluye aceite mineral.

5 E.M, Agger y col., Scand. J. Immunol., 2002, 56, páginas 443 a 447, describen vacunas que comprenden fragmentos de pared celular de la cepa H37Rv virulenta, que son eficaces cuando incluyen el tensioactivo catiónico bromuro de dimetildioctadecilamonio como adyuvante. También se describe que los ensayos realizados con bacilos homogeneizados de *M. tuberculosis* que no contienen el adyuvante mencionado no generan niveles de resistencia
10 contra la tuberculosis en el modelo de ratón.

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

15 Los individuos que se pueden beneficiar de un tratamiento o profilaxis en relación con la tuberculosis se pueden agrupar en los siguientes cuatro subgrupos:

- (I) Individuos que no han estado expuestos a la enfermedad. La vacunación profiláctica puede prevenir la infección de dicho individuo.
- 20 (II) Individuos que han estado expuestos a la enfermedad pero que todavía no están infectados. La prueba cutánea de la tuberculina (TST) es negativa. La profilaxis primaria puede prevenir la infección de estos individuos.
- (III) Individuos con tuberculosis latente que no están enfermos. El riesgo
25 de sufrir un episodio de la enfermedad se puede disminuir aplicando

quimioterapia. La quimioterapia también proporciona la ventaja de que estos individuos básicamente dejan de ser fuentes de alto riesgo de infección.

- 5 (IV) Individuos que están enfermos, es decir que sufren la enfermedad, normalmente con formas primarias de la enfermedad, pero que son poco o nada contagiosos. La quimioterapia evita que estos individuos se conviertan en contagiosos.

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

Por ejemplo, en la solicitud de patente EP2196473 A1, se describe que, para tratar la tuberculosis en individuos infectados, los que no han desarrollado todavía la enfermedad y los que ya la han desarrollado, se pueden administrar varios fármacos, incluidos isoniazida, durante un tiempo que se prolonga durante varios meses.

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

Como se indica en el documento WO 2010/031883 A1, la transmisión de la infección por tuberculosis latente se produce principalmente mediante

aerosoles de la respiración infectados con *M. tuberculosis*. Por tanto, las personas en contacto directo con pacientes que sufren tuberculosis pulmonar y, por tanto, que son capaces de diseminar aerosoles infectados, tales como personas que viven juntas o que tienen algún otro tipo de contacto intenso o
5 frecuente con ellos, se consideran un grupo de riesgo.

En la actualidad, la profilaxis primaria de la infección que normalmente se administra a los individuos del grupo I (como anteriormente) es una quimioprofilaxis primaria basada en la administración diaria de isoniazida a una dosis de 5 mg/kg son superar los 300 mg/día. Este tratamiento está indicado en
10 todos los individuos de cualquier edad con una prueba TST negativa, que viven con un enfermo y/o tienen cualquier otro tipo de contacto estrecho con individuos infectados. En este caso, la quimioprofilaxis tiene que mantenerse durante los tres meses posteriores al cese del contacto con la fuente infecciosa o después de que la fuente haya dejado de ser infecciosa. No obstante, en
15 algunos casos la quimioprofilaxis puede conllevar efectos secundarios indeseados, como describen Martínez y col., Arch. Bronchoneumol., 2005, 41(1), páginas 27-33.

En, por ejemplo, los documentos EP1690549 B1, EP2090318 A1 y PCT7ES2009/000436 se han descrito medicamentos que comprenden
20 fragmentos de una cepa virulenta del complejo *M. tuberculosis* (MTB-C). Los documentos EP2090318 A1 y PCT/ES2009/000436 divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden fragmentos de una cepa virulenta del complejo *M. tuberculosis* (MTB-C) para el uso como medicamento adecuado para la prevención profiláctica de la tuberculosis, opcionalmente en combinación con
25 otros fármacos. Por otro lado, el documento EP1690549 B1 divulga

composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento de la tuberculosis, que comprende fragmentos de MTB-C, opcionalmente en combinación con otros fármacos.

En la solicitud de patente EP 2090318 A1 se ha notificado que la
5 administración de un fármaco que comprende un agente a base de fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C es capaz de inducir una respuesta que genera interferón γ y de tipo Th1 contra antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Estos antígenos incluyen Ag85B y Ag85A, que forman parte del complejo Ag85, que consiste en una familia de proteínas de bajo peso
10 molecular que desempeñan un papel decisivo en la biosíntesis de la pared celular y que se producen en cantidades considerables cuando el cultivo bacteriano está en fase de crecimiento logarítmica (log).

En el documento EP 2090318 A1, también se ha notificado que la vacuna convencional a base del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) no genera una
15 respuesta inmunoprotectora contra los antígenos del complejo Ag85. La producción de interferón γ por linfocitos específicos tiene un papel crucial: Permite que los macrófagos infectados detengan el crecimiento de los bacilos (North & Young, Ann. Rev. Immunol., 2004, 22:599-623).

La Organización Mundial de la Salud ha reconocido que se ha estimado un
20 riesgo de desarrollar tuberculosis (TB) 20-37 veces mayor en personas que viven con VIH que entre aquellos son infección por VIH. En Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings" Guías de la OMS 2011, ISBN: 978 92 4 150070 8, se proporciona una revisión. No obstante, el tratamiento
25 preventivo con isoniazida no es una vacunación que vaya a proporcionar una

protección duradera a los individuos positivos para VIH. En su lugar, la isoniazida se tiene que administrar con regularidad y la resistencia a la isoniazida corrobora este tratamiento. Por tanto, existe la necesidad de proporcionar tratamientos terapéuticos y preventivos más potentes para sujetos

5 humanos positivos para VIH.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un agente mejorado adecuado para prevenir o tratar la tuberculosis, tal como en la profilaxis de la tuberculosis latente, la profilaxis primaria y/o el tratamiento de la tuberculosis

10 latente o activa, en sujetos humanos tanto positivos para el VIH como negativos para el VIH. Un objeto adicional es proporcionar una cepa de MTB-C adecuada para la preparación del agente. El procedimiento para preparar el agente es un objeto adicional de la presente invención.

Definiciones

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

"Tamaño de partícula" hace referencia a, si no se especifica, el diámetro de las partículas. Cuando el tamaño de la partícula no se puede determinar con exactitud, se quiere decir el tamaño aproximado de la partícula.

20 "promedio z" es el tamaño de la partícula promedio que se puede determinar como se describe en la sección de materiales y procedimientos.

Abreviaturas

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
25 UFC	Unidad formadora de colonias

	PF	Producto farmacológico
	SF	Sustancia farmacológica
	ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
	ELISPOT	Ensayo de inmunomancha ligado a enzimas
5	EMA	Agencia Europea de Medicamentos
	FCMtb	Fragmentos de células de <i>M. tuberculosis</i>
	FIM	Primero en el ser humano
	VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
	IFN- γ	Interferón gamma
10	IGTIP	Institut per a la Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol
	PEI	Producto médico en investigación
	CDP	Controles durante el proceso
	SCL	Suspensión concentrada de liposomas
15	ILTb	Infección latente de tuberculosis
	LPS	Lipopolisacárido
	Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	Mtb	Complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	NZB	New Zealand Black
20	NZW	New Zealand White
	PPD	Derivado purificado de la proteína
	c.s.	Cantidad suficiente
	TB	Tuberculosis
	TST	Prueba cutánea de la tuberculosis
25	OMS	Organización Mundial de la Salud

p/v peso/volumen

p/p peso/peso

Sumario de la invención

La invención proporciona formulaciones en liposomas que comprenden
5 fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-
C).(FCMtb) y un agente formador de liposomas. En una realización concreta, el
tamaño promedio z de las partículas, como se puede determinar mediante, por
ejemplo, dispersión de luz dinámica, es 120 nm o menor, preferentemente 110
nm o menos, más preferentemente 95 nm o menos y, lo más preferentemente,
10 80 nm o menos. En una realización alternativa, la formulación de liposomas
comprende de 1 a 20% (p/v) de sacarosa, preferentemente de 2 a 12% (p/v) de
sacarosa, más preferentemente de 3 a 8% (p/v) de sacarosa y lo más
preferentemente de 4 a 6% (p/v) de sacarosa. Es importante destacar que
mientras que cada una de estas dos realizaciones puede satisfacerse de forma
15 individual, estas realizaciones no deben verse como mutuamente excluyentes y
pueden producirse en combinación.

En una realización concreta, la formulación de liposomas descrita con
anterioridad tiene un tamaño promedio z de partícula en el intervalo de 40 a
120 nm, preferentemente de 50 a 110 nm, más preferentemente de 55 a 95 nm
20 y lo más preferentemente de 55 a 80 nm.

En una realización concreta alternativa, el tamaño promedio de partícula
de la formulación de liposomas descrita con anterioridad puede ser menor, de
modo que la formulación de liposomas sea una emulsión, es decir, en esta
realización concreta el tamaño promedio z de las partículas es,
25 preferentemente, inferior a 40 nm.

En una realización preferida de una cualquiera o más de las realizaciones descritas con anterioridad, la formulación de liposomas es una formulación de liposomas en la que el índice de polidispersión de las partículas es de 0,4 o menor, preferentemente de 0,3 o menor.

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

- 10 Además, es preferible que en cualquiera de las realizaciones descritas con anterioridad, la proporción entre (a): fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) y (b) el agente formador de liposomas está entre 0,01:1 y 1:1. preferentemente entre 0,06:1 y 0,1:1.

- 15 En una realización más preferida de cualquiera de las descritas con anterioridad, la formulación de liposomas comprende adicionalmente: (d) un agente tensioactivo. En una realización todavía más preferida, la formulación de liposomas que comprende (d) el agente tensioactivo es una formulación de liposomas en la que la proporción entre (a) y (d) está entre 0,1:1 y 10:1 (p/p), preferentemente entre 0,5:1 y 2:1 (p/p) y, más preferentemente, entre 0,6:1 y 0,8:1 (p/p).

- 20 En una realización concreta de las descritas con anterioridad, el agente formador de liposomas de la formulación de liposomas es un fosfolípido, preferentemente lecitina, más preferentemente uno seleccionado del grupo que consiste en lecitina de huevo o lecitina de soja, y, lo más preferentemente, lecitina de soja, cada uno de los cuales puede estar hidrogenado, parcialmente
25 hidrogenado o no hidrogenado.

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

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

En otra realización más preferida, la formulación de liposomas descrita con anterioridad comprende fragmentos de la cepa NCTC 13536 del MTB-C, que se depositó en 2010 en el NCTC de Londres. Esta cepa se denomina de forma sinónima 511, de modo que los nombres NCTC 13536 y 511 se pueden usar de forma intercambiable.

En una realización todavía más preferida, la formulación de liposomas descrita con anterioridad comprende al menos dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, lo más preferentemente todos los siguientes:

- (i) Un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, similar a una huella de masa de la proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),
- (ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa, similar a una huella de masa de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934),
- (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, similar a una huella de masa de la proteína Ag85 de *M. tuberculosis* (Rv 1866c), y
- (iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, similar a una huella de masa de la

proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y

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

5 En una realización todavía más preferida, la formulación de liposomas comprende un lipopolipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa, similar a una huella de masa del precursor del antígeno lipoproteico LpqH de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 3763).

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

15 En una realización más preferida, la formulación de liposomas descrita con anterioridad contiene lípidos que normalmente se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis* o derivados de los mismos, tales como productos de conjugación como lípidos conjugados con azúcar. También es preferible que comprenda uno o más ácidos micólicos, pertenecientes preferentemente a uno
20 cualquiera o más de los tipos I, III o IV. Como alternativa o además de, un micolato conjugado con azúcar, preferentemente dimicolato de trehalosa, puede estar comprendido en la formulación. Como alternativa o además de, también es preferible que en la formulación de liposomas de acuerdo con la presente invención esté presente al menos un glucolípido derivado de MTB-C y
25 un glucolípido preferido es lipoarabinomanano.

La formulación de liposomas descrita con anterioridad puede comprender adicionalmente uno o más tensioactivos, que es/son preferentemente del grupo de tensioactivos no iónicos.

En una realización preferida adicional, la formulación de liposomas de
5 acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes comprende además una o más sales o soluciones de las mismas, de modo que la sal preferida es cloruro sódico.

En una realización todavía más preferida de cualquiera de las formulaciones en liposomas descritas con anterioridad de la presente invención se liofiliza.

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

15 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposomas como se ha descrito en una cualquiera o más de las realizaciones anteriores o la suspensión como se ha descrito en una cualquiera o más de las realizaciones anteriores y un vehículo o diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, de modo que se puede usar
20 cualquier sustancia adecuada como vehículo, diluyente o excipiente.

En una realización preferida del mismo, esta composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un producto para usar en un procedimiento de tratamiento de cuerpo humano o animal mediante
25 tratamiento. Es decir, proporciona la formulación de liposomas de acuerdo con

una cualquiera o más de las realizaciones descritas con anterioridad, la suspensión de acuerdo con una cualquiera o más de las realizaciones descritas con anterioridad o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera o más de las realizaciones descritas con anterioridad, para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante tratamiento. En una realización concreta, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para inyección. En otra realización concreta, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para usar en un procedimiento de tratar o prevenir la tuberculosis. Estas realizaciones concretas se pueden satisfacer individualmente o en combinación.

En una realización más concreta, la invención proporciona la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica de acuerdo con lo que se ha descrito con anterioridad en relación con el uso de los mismos en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano mediante tratamiento, que se caracteriza además por que es para administrar al cuerpo humano a una dosis que comprende de 1 a 1.000, preferentemente de 3 a 250, más preferentemente de 4 a 80 y lo más preferentemente de aproximadamente 5, aproximadamente 25 o aproximadamente 50 μg /dosis de FCMtb.

En tres realizaciones más concretas (a) a (c), la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica de acuerdo con lo que se ha descrito anteriormente en relación con el uso de la misma en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante tratamiento es (a) para usar en un procedimiento de prevención de la tuberculosis activa en individuos con una infección latente de tuberculosis, (b) para usar en un procedimiento de

profilaxis primaria de la tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que han estado expuestos a la enfermedad pero que todavía no están infectados o (c) para usar en un procedimiento de tratamiento o prevención de la tuberculosis latente.

5 En una realización preferida de la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica anteriores para el uso de los mismos en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante tratamiento es su uso en terapia de combinación o terapia auxiliar. La terapia auxiliar es una terapia adicional o secundaria combinada con un tratamiento
10 primario que aumenta la eficacia en el tratamiento de una afección. Una realización concreta de la terapia de combinación es una en la que la terapia de combinación comprende un antibiótico, preferentemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, de modo que la ansamicina es, más preferentemente, rifampicina.

15 En una realización concreta de la presente invención, la terapia auxiliar se administra a un sujeto humano positivo para el VIH y se prefiere una única dosis de 25 µg de FCMtb.

La invención también proporciona un procedimiento para preparar cualquiera de los agentes, es decir la formulación de liposomas, la suspensión
20 o la composición farmacéutica.

La invención proporciona además la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en el NCTC de Londres.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona formulaciones en liposomas que comprenden
25 fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C)

(FCMtb) y un agente formador de liposomas.

A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término "que comprende" se usa en el contexto de la presente solicitud para indicar que otros miembros pueden estar presentes opcionalmente además de los miembros de la lista introducida por "que comprende". No obstante, se contempla como una realización específica de la presente invención que el término "que comprende" abarca la posibilidad de que no haya más miembros presentes, es decir para la finalidad de la presente realización debe entenderse "que comprende" tiene el significado de "que consiste en".

La descripción detallada divulga variantes específicas y/o preferidas de las características individuales de la invención. La presente invención también contempla como realizaciones particularmente preferidas las 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.

Está generalmente aceptado que un procedimiento de liposomación genera un entorno lipídico que facilita la solubilidad y conduce a una suspensión de sustancias, tales como FCMtb. Los liposomas dentro del significado de la presente invención pueden ser unilamelares, multilamelares o combinaciones de ambos.

Los FCMtb pueden ser de cualquier tipo de sustancia derivada de la cepa de MTB-C, de modo que se prefieren los fragmentos derivados de proteínas y/o lípidos. Los FCMtb dentro del sentido de esta solicitud es, normalmente, una mezcla de diferentes antígenos proteicos y lípidos de las células del MTB-C.

Los fragmentos celulares se pueden obtener mediante cualquier

procedimiento conocido para el experto en la técnica adecuado para fragmentar células microbianas o bacterianas, tales como específicamente células del MTB-C, por ejemplo homogeneización. La homogeneización se puede llevar a cabo por medio de sonicación con ultrasonidos o por medio de uso de pequeñas perlas de un diámetro de aproximadamente 0,1 mm, por ejemplo perlas de sílice o de circonio/sílice, junto con un homogeneizador mecánico. Un homogeneizador mecánico que se puede usar es, por ejemplo, el modelo BioSpec BeadBeater®. Las células del MTB-C se rompen por medio de este proceso de homogeneización, de modo que se obtienen fragmentos celulares pequeños, que normalmente incluyen pequeños fragmentos de la pared celular. Una característica normalmente relevante de la fabricación de los fragmentos celulares es la "destoxificación" de los fragmentos de pared celular mediante deslipidación, bien conocido para el experto en la técnica, un procedimiento que permite eliminar las moléculas de tipo endotoxina. Por tanto, preferentemente, los FCMtb se destoxifican y pasteurizan, la formulación de liposomas obtenida es estéril y libre de endotoxinas. La dispersión de los fragmentos celulares en tampón puede liofilizarse opcionalmente para facilitar el almacenamiento de los mismos. Con este fin, la dispersión se puede distribuir en viales y liofilizar a una temperatura entre -15 °C y -120 °C, tal como, por ejemplo, a -45°C, y con un vacío, tal como entre 0,1 y 0,5 mbares.

Los liposomas de acuerdo con la presente invención normalmente tienen una distribución del tamaño en la que al menos un 99,9% (en número) es menor de 1 µm. En una realización concreta, el tamaño promedio $\bar{z}$ de las partículas, que se puede determinar mediante dispersión de luz dinámica, es 120 nm o menor, preferentemente 110 nm o menor, más preferentemente 95

nm o menor y, lo más preferentemente, 80 nm o menor. En la dispersión de luz dinámica, el parámetro promedio z se considera un número estable e importante que se puede obtener mediante la técnica y el número del tamaño que se usa preferentemente para los fines de control de calidad.

- 5 Preferentemente, los liposomas de la formulación de acuerdo con la presente invención son monomodales, es decir muestran únicamente un pico en las mediciones de la dispersión de la luz dinámica. Más preferentemente, los liposomas de la formulación de acuerdo con la presente invención son esféricos, como se puede analizar mediante microscopia electrónica de
- 10 preparaciones de fractura por congelación de la formulación de liposomas, como se muestra en el ejemplo 9. Por consiguiente, esférico significa que para al menos el 90% de las partículas liposomas (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 dicha partícula está
- 15 relacionado con el radio máximo de la misma partícula en una proporción de 0,6 o más, 0,7 o más, 0,8 o más o 0,9 o más. La formulación de liposomas de acuerdo con la presente invención puede comprender liposomas multilamelares o unilamelares o una mezcla de los mismos. De acuerdo con el conocimiento estándar del experto en la técnica, las mediciones de dispersión de luz
- 20 dinámica se deberán realizar en un tampón adecuado, es decir un tampón que no causa por sí mismo alteración, disgregación o fusión de los liposomas o los desestabiliza significativamente físicamente en cualquier otro modo. Como norma, cualquier tampón puede ser adecuado siempre que su fuerza iónica y el valor del pH sean comparables a los del tampón en el que se han formado los
- 25 liposomas. Preferentemente se usa un tampón de composición similar o

idéntica a la del tampón en el que se han formado los liposomas.

En una realización alternativa, la formulación de liposomas comprende adicionalmente de 1 a 20% (p/v) de sacarosa, preferentemente de 2 a 12% (p/v) de sacarosa, más preferentemente de 3 a 8% (p/v) de sacarosa y lo más
5 preferentemente de 4 a 6% (p/v) de sacarosa. Particularmente preferible es aproximadamente un 5% de sacarosa.

Cabe destacar que aunque cada una de estas realizaciones, la relacionada con un tamaño de partícula concreto y la otra relacionada con la presencia de sacarosa, se pueden satisfacer de forma individual, estas
10 realizaciones no se deben ver como mutuamente excluyentes y pueden producirse en combinación.

En una realización concreta, la formulación de liposomas descrita con anterioridad tiene un tamaño promedio z de partícula en el intervalo de 40 a 120 nm, preferentemente de 50 a 100 nm, más preferentemente de 55 a 95 nm
15 y lo más preferentemente de 55 a 80 nm. Por consiguiente, el tamaño de partícula promedio z se mide, preferentemente, mediante dispersión de luz dinámica, como se ha descrito en general con anterioridad y con detalle en la sección "Materiales y procedimientos".

En una realización concreta alternativa, el tamaño promedio z de
20 partícula de la formulación de liposomas descrita con anterioridad puede ser menor, de modo que la formulación de liposomas sea una emulsión, es decir, en esta realización concreta el tamaño promedio z de las partículas es, preferentemente, inferior a 40 nm.

En una realización preferida de una cualquiera o más de las
25 realizaciones descritas con anterioridad, los liposomas de la formulación de

acuerdo con la presente invención son además monodispersos, lo que significa que no se observa una anchura significativa de la distribución del tamaño. Esto se prueba técnicamente mediante un índice de polidispersión bajo (IPD) determinado mediante dispersión de luz dinámica, tal como 0,4 o menor, preferentemente 0,3 o menos. Por consiguiente, la formulación de liposomas es una formulación de liposomas en la que el índice de polidispersión de las partículas determinable mediante dispersión de luz dinámica es 0,4 o menor, preferentemente 0,3 o menor y, lo más preferentemente, 0,25 o menor.

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

Proceso cadena arriba (Ejemplo 2):

Etapas 1: Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

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

Proceso cadena abajo (Ejemplo 3):

Etapas 3: Fragmentación celular y deslipidación

Etapas 4: Pasteurización

Etapas 5: Deseccación por congelación (opcional)

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

- (MTB-C). Virulenta hace referencia a la patogeneidad por caso y/o a la capacidad de los bacilos para invadir los tejidos del huésped. La cepa virulenta puede ser cualquier cepa virulenta de las especies que pertenecen al MTB-C, pero se prefiere una cepa perteneciente a *M. tuberculosis*. La cepa del MTB-C
- 5 de acuerdo con la presente invención se puede cultivar mediante inoculación en medio de cultivo bien conocido por el experto en la técnica, por ejemplo agar Middlebrook 7H10 o 7H11, medio de Sautin o medio de Proskauer-Beck. El cultivo de la cepa virulenta se realiza, preferentemente, durante un periodo de tiempo prolongado, tal como, por ejemplo, un periodo igual o superior a tres
- 10 semanas, comprendido preferentemente entre 3 y 4 semanas. La temperatura del cultivo se mantiene, preferentemente, entre 34 °C y 38 °C. Una vez que termina el cultivo, las células se recogen y se aíslan usando técnicas bien conocidas en la técnica, como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.
- 15 El agente liposoma de la formulación de liposomas es, preferentemente, 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 fosfatidilcolina, que se puede sintetizar o aislar de diversas fuentes naturales. Preferentemente, el agente
- 20 formador de liposomas es o comprende lecitina, seleccionada del grupo que consiste en lecitina de huevo y lecitina de soja. La lecitina de soja es una mezcla compleja de fosfolípidos que incluye, entre otros, fosfatidilcolina, y es particularmente preferible. Lípidos típicos que pueden también estar comprendidos en la formulación, como el propio agente formador de liposomas,
- 25 o como componente adicional, son: Fosfato de dimetilo (DCP), dimiristoil

fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), dioleoil fosfatidilcolina (DOPc), dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoil fosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil dioleoil (DPPC), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilcolina (PC) y/o fosfatidilserina (PS), de modo que el lípido
5 respectivo puede estar hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado. Los liposomas se pueden formar usando lípidos auxiliares convencionales y técnicas bien conocidas por el experto en la material, tales como las descritas en la solicitud de patente ES2231037-A1.

Además, es preferible que en cualquiera de las realizaciones descritas
10 con anterioridad, la proporción entre (a): fragmentos de una cepa del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) y (b) el agente formador de liposomas está entre 0,01:1 y 1:1. preferentemente entre 0,06:1 y 0,1:1. En una realización más preferida de cualquiera de las descritas anteriormente, la formulación de liposomas comprende adicionalmente: (d) un agente
15 tensioactivo. Generalmente, todos los tipos de agentes capaces de cambiar el valor de la tensión superficial se pueden usar como agentes tensioactivos en el sentido de la invención, pero se excluyen los compuestos que entran dentro de la definición de agente formador de liposomas que se ha dado anteriormente. El experto en la técnica conoce varios tipos de agentes tensioactivos y se
20 pueden usar para la formulación de liposomas de acuerdo con la presente invención. Como conoce el experto en la técnica, los agentes tensioactivos son, en general, sustancias químicas con una estructura polar-no polar. Sin desear quedar limitado a ninguna teoría concreta, los agentes tensioactivos generalmente tienen la tendencia a localizarse en la superficie de las
25 partículas, creando de este modo una cama monomolecular sobre la interfaz

que reduce el valor de la tensión superficial. Asimismo, los agentes tensioactivos también se denominan surfactantes o agentes de superficie activa. En una realización preferida de la formulación de liposomas que contiene tensioactivo, el agente tensioactivo se selecciona de esteroides y derivados de los mismos, tales como colesterol y/o sales biliares o derivadas 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, aunque no limitante, de llevar a cabo la invención es cuando los liposomas de la formulación comprenden lecitina derivada de soja y colato sódico.

En una realización todavía más preferida, la formulación de liposomas que comprende (d) el agente tensioactivo es una formulación de liposomas en la que la proporción entre (a) y (d) está entre 0,5:1 y 3:5 (p/p). Se pueden usar varios tipos de agentes formadores de liposomas, ya que son bien conocidos para el experto en la técnica.

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

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

Se puede usar cualquier cepa perteneciente al MTBC y, preferentemente, cualquier cepa perteneciente a *Mycobacterium tuberculosis*. En otra realización más preferida, la formulación de liposomas descrita con anterioridad comprende fragmentos de la cepa NCTC 13536 del MTB-C, que

se depositó en 2010 en el NCTC de Londres (Ejemplo 1). Otra cepa que se puede usar, y cuyos fragmentos pueden estar comprendidos en la formulación de liposomas, se denomina H37Rv, que, por ejemplo, se puede obtener de la Colección Nacional de Cultivos Tipo (NCTC), Londres, Gran Bretaña (número de depósito NC007416), a menudo usada por los investigadores en este campo. También es posible usar más de una cepa, es decir que la formulación de liposomas comprenda fragmentos de varios, tal como dos, tres o más de tres cepas.

Considerando los aproximadamente supuestos 4.000 antígenos de *M. tuberculosis*, es imposible analizar la sustancia farmacológica para todas estas proteínas. No obstante, se ha demostrado que ciertas proteínas del MTB-C son relevantes para la respuesta inmunológica deseada. Estas son cinco bandas de proteínas que tienen los tamaños aproximados de 6, 10, 30, 38, and 70 kDa (Renshaw, y col., 2005, *EMBO Journal* 24, 2491-2498; Singh, et al., 2005, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(2), 354-358). Por tanto, en una realización todavía más preferida, la formulación de liposomas descrita con anterioridad comprende al menos dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, lo más preferentemente todos los siguientes:

- (i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa como se ha medido.
con electroforesis en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (SDS), en el que el primer polipéptido tienen una huella de masa similar a una huella de masa de la proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),
- (ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa medido con electroforesis en un gel de poliacrilamida

90

dodecilsulfato sódico (SDS), en el que el segundo polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv0934),

- 5 (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa medido con electroforesis en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (SDS), en el que el tercer polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de la proteína de Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv1866c), y
- 10 (iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa medido con electroforesis en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (SDS), en el que el cuarto polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de la proteína de CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv3874), y
- 15 (v) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa medido con electroforesis en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (SDS), en el que el quinto polipéptido tiene una huella de masa similar a una huella de masa de la proteína de ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv3875).

20 En una realización todavía más preferida de la misma, la formulación de liposomas comprende además un lipopolipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa medido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (SDS), en el que el lipopolipéptido tiene una huella de masa similar a la huella de masa del precursor del antígeno lipoproteico LpqH de 19 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 3763). La respectiva banda

25 se puede visualizar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como

tinción de plata. Los investigadores de la presente invención han encontrado, sorprendentemente, que este polipéptido induce una respuesta humoral total de IgG elevada, que puede ser la respuesta humoral más alta entre todos los antígenos en la formulación.

- 5 Ejemplos de cómo se pueden identificar los polipéptidos o lipopolipéptidos se proporcionan en el ejemplo 4.

Incluso más preferentemente, la formulación de liposomas descrita con anterioridad se caracteriza además por que está presente al menos uno de los antígenos siguientes de *Mycobacterium tuberculosis*, o un fragmento del mismo: HSP70, proteína de 38 kDa, Ag85B, y, más preferentemente, al menos una de HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B. En este sentido, fragmento es cualquier parte, tal como, por ejemplo, un producto de degradación, de cualquiera de estos polipéptidos. Son posibles varios modos de obtener dichos fragmentos, por ejemplo hidrólisis química o enzimática, de modo que no es relevante si la fragmentación se había producido intencionadamente o no, antes de la formación de los liposomas o después. Es preferible que el respectivo fragmento se pueda asignar a su origen respectivo, tal como, por ejemplo, mediante solapamiento sustancial en la secuencia de aminoácidos, tales como al menos 5, al menos 10, al menos 20 aminoácidos consecutivos.

- 20 Los fragmentos de acuerdo con la presente invención se obtienen, preferentemente, de bacilos cultivados en condiciones estresantes de privación de alimento, poco oxígeno y pH bajo. El oxígeno bajo se debe al crecimiento de las bacterias en placas que están encerradas en bolsas herméticas durante el periodo de crecimiento, que es, por ejemplo, 21 días, que produce un ambiente microaerobio. El pH bajo se explica del siguiente modo: Al principio del cultivo,
- 25

el valor del pH es de 7,0-6,8 y, al final, tras habitualmente 21 días de cultivo, el valor del pH es 6,4 - 6,5. En estas condiciones, el metabolismo de las bacterias es más lento, lo que conduce a un crecimiento en equilibrio. Se entiende que esto hace que los bacilos sean más resistentes al estrés. En dichas
5 condiciones, los bacilos cultivados desarrollan características similares a las de los bacilos latentes *in vivo* en ILTB (infección latente de tuberculosis). Por consiguiente, cabe esperar que los antígenos presentes en los FCMtb desencadenen una nueva respuesta inmunológica contra los antígenos de los bacilos latentes, es decir los denominados antígenos "estructurales", así como
10 los asociados a las respuestas de estrés.

Durante mucho tiempo se ha reconocido que los glucolípidos de micobacterias tienen actividad antiinmunomoduladora, notablemente la inducción de respuestas granulomatosas y que ejercen potentes efectos de tipo adyuvante. Por tanto, en una realización más preferida, la formulación de
15 liposomas descrita anteriormente contiene lípidos que normalmente se encuentran en *Mycobacterium tuberculosis*, o derivados de los mismos, tales como los productos de conjugación como lípidos conjugados con azúcar. En las muestras de *M. tuberculosis* se han identificado varios componentes lipídicos inmunogénicos (Brennan, Tuberculosis (Edinburgh), 2003, 83(1-3), 91-
20 97) y se han desarrollado métodos analíticos para su determinación (electroforesis, SDS-PAGE, cromatografía en capa fina). Aunque el aislamiento de cada componente lipídico requeriría un tratamiento agresivo tal que los datos cuantitativos o los porcentajes de cada componente detectables en el extracto de MTB-C o en la formulación de liposomas serían difíciles de obtener,
25 la caracterización cualitativa servirá para caracterizar una realización preferida

adicional de la presente invención. De acuerdo con esta realización adicional preferida, está comprendidos uno o más ácidos micólicos, pertenecientes preferentemente a uno cualquiera o más de los tipos I, III o IV. Como alternativa o además de, un micolato conjugado con azúcar, preferentemente dimicolato de trehalosa, puede estar comprendido en la formulación. Como alternativa o además de, un glucolípido lipoarabinomanano (LAM) puede estar comprendido en la formulación. Además, se cree que la naturaleza multiantigénica de los fragmentos (mezcla de proteínas multiantigénicas más lípidos, en lugar de antígenos purificados solos) es una ventaja y, por tanto, el experto en la técnica puede adaptar el proceso 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, preferentemente un tensioactivo no iónico. Por tanto, la formulación de liposomas descrita anteriormente puede comprender, adicionalmente, uno o más de estos tensioactivos. Un gran número de dichos tensioactivos está dentro del conocimiento estándar de un experto en la técnica. Preferentemente, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en etoxilatos de alquilfenol y etoxilatos de éster de sorbitán. Más preferentemente, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo de etoxilatos de octilfenol. Incluso más preferentemente, se usan etoxilatos de octilfenol con un contenido de óxido de etileno comprendido entre 7 y 8 moles, cuyos tensioactivos se pueden encontrar en el mercado con el nombre Triton X-114®. La masa homogeneizada que contiene los fragmentos de pared celular se someten a un tratamiento convencional para separar y rechazar las células no fragmentadas y los componentes solubilizados. Por

ejemplo, se puede usar centrifugación a diferentes velocidades y lavar con solución tampón como se describe en la solicitud de patente ES2231037-A1. El sedimento que contiene los fragmentos de pared celular se obtiene después de realizar los procedimientos de purificación mencionados. Dicho sedimento se dispersa en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se somete a un tratamiento convencional para garantizar la inactivación completa de las células de MTB-C que pueden haber permanecido viables después de la fragmentación y el procedimiento de 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 de autoclavado o pasteurización. Ejemplos de la caracterización de lípidos se proporcionan en el ejemplo 5 más adelante.

En una realización preferida adicional, la formulación de liposomas descrita con anterioridad comprende además una o más sales o soluciones de las mismas, de modo que la sal preferida es cloruro sódico.

En una realización todavía más preferida de cualquiera de las formulaciones en liposomas descritas con anterioridad se liofiliza. Los liposomas se pueden someter a liofilización para obtener de este modo el agente inmunoterapéutico en forma de liposomas liofilizados. Con este fin, la dispersión se puede distribuir en viales y liofilizar a una temperatura baja, 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 mbares. Los viales obtenidos tras la liofilización contienen la formulación de liposomas adecuada como agente inmunoterapéutico y, preferentemente, se almacenan a temperaturas muy bajas, por ejemplo a -70°C.

La invención también proporciona una suspensión en la que la formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes se reconstituye en un disolvente. En una realización preferida, el disolvente de esta suspensión es acuoso, más preferentemente es, o comprende, suero fisiológico. El experto en la técnica conoce bien procedimientos de suspensión de formulaciones en liposomas en un disolvente. Es una propiedad particularmente ventajosa de la formulación de acuerdo con la presente invención, se puede suspender más rápido que las formulaciones en liposomas convencionales que comprenden fragmentos de MTB-C (véase el Ejemplo 9).

10 Un objeto de la invención es proporcionar un agente que comprende fragmentos de pared celular de una cepa de MTB-C para la preparación de una composición farmacéutica, de modo que el agente es o comprende la formulación de liposomas descrita con anterioridad en cualquiera de las realizaciones descritas o combinaciones de las mismas. El principal alcance de la formulación farmacéutica/formulación galénica de la sustancia farmacológica es obtener una suspensión eficaz y suficientemente estable como para ser bien reconocida por las células y que tenga el potencial de desencadenar una respuesta inmunitaria celular relevante en un cuerpo humano o animal. Con este fin, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la formulación de liposomas o la suspensión como se describe en una cualquiera o más de las realizaciones descritas con anterioridad, y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. El experto en la técnica conoce varios de estos vehículos, excipientes y diluyentes y no están limitados de ningún modo por la presente divulgación. En su lugar, se puede usar cualquier sustancia adecuada como vehículo, excipiente o diluyente. En

24

una realización preferida, esta composición farmacéutica comprende adicionalmente un adyuvante farmaceuticamente aceptable. Por consiguiente, se debe entender que el adyuvante es una sustancia comprendida en esta realización de la invención, de modo que el adyuvante es una sustancia capaz
5 de estimular el sistema inmunológico cuando se aplica a un cuerpo humano o animal en respuesta al antígeno diana, de modo que el adyuvante no confiere por sí mismo inmunidad. Sin desear estar limitado a cualquier sustancia adyuvante concreta, las realizaciones preferidas son en las que el adyuvante es una sal de aluminio, tal como cloruro de aluminio, o un aceite mineral o una
10 composición que comprende aceite mineral, tal como adyuvante incompleto de Freund (IFA) o adyuvante completo de Freund (CFA), o un halogenuro de amonio, tal como un bromuro de amonio alquilado, tal como bromuro de dimetildioctadecilamonio.

La invención también proporciona un producto para usar en un
15 procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. Es decir, proporciona la formulación de liposomas de acuerdo con una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente, la suspensión acuerdo con una cualquiera o más de las realizaciones descritas anteriormente o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera o más de las
20 realizaciones descritas anteriormente para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

El fármaco se puede administrar en una mucosa, por ejemplo mucosa ocular, intranasal, oral, gástrica, intestinal, vaginal, o la mucosa del tracto urinario, o por vía parenteral, por ejemplo subcutánea, intradérmica,
25 intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Se prefiere la administración

parenteral. En una realización concreta, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para inyección.

En otra realización concreta, la invención proporciona esta formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para usar en un procedimiento de tratar o prevenir la tuberculosis. Estas realizaciones concretas se pueden satisfacer individualmente o en combinación. Los inventores del presente estudio han descubierto que la formulación de acuerdo con la presente invención conduce a una mayor respuesta inmunológica celular y también controla el proceso de reinfección constante que, de otro modo, se puede producir en la infección latente de tuberculosis, reforzando la inmunidad contra los bacilos en crecimiento e induciendo inmunidad contra los bacilos que no están en replicación.

La dosis adecuada de la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica de acuerdo con lo que se ha descrito anteriormente en relación con el uso de la misma en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia depende de varios parámetros, incluido el procedimiento de administración y el sujeto a tratar. En una realización preferida es para la administración al cuerpo humano. En una realización preferida de la misma, esto se produce en una dosis que comprende de 1 a 1.000, preferentemente de 3 a 250, más preferentemente de 4 a 80, y, lo más preferentemente, de aproximadamente 5, aproximadamente 25 o aproximadamente 50 μg /dosis de FCMtb. Particularmente preferida es una dosis de 25 μg .

En tres realizaciones más concretas (a) a (c), la formulación de liposomas,

suspensión o composición farmacéutica de acuerdo con lo descrito anteriormente en relación con el uso de la misma en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante tratamiento es (a) para usar en un procedimiento de prevención de la tuberculosis activa en individuos con una infección latente de tuberculosis. En una realización más particular alternativa, (b) para usar en un procedimiento de profilaxis primaria de tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que han estado expuestos a la enfermedad, pero que todavía no están infectados o (c) para usar en un procedimiento de tratar o prevenir la tuberculosis latente.

10 La formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para el uso de la misma en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia se puede administrar en forma de una única dosis o varias dosis como dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco, por medio de la repetición a ciertos intervalos de tiempo. Preferentemente se administran dos
15 dosis separadas por un periodo comprendido entre 2 y 5 semanas, preferentemente entre 3 y 4 semanas.

Los ejemplos 8, 10 y 12 son ejemplos de cómo la formulación de liposomas de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar a sujetos humanos o animales.

20 Una realización preferida de la sustancia anterior es la formulación de liposomas, suspensión o composición farmacéutica para usar en terapia de combinación o auxiliar. Los practicantes médicos usan con frecuencia la terapia auxiliar para obtener tasas de curación mejores o una respuesta más rápida al tratamiento primario. Una terapia de combinación o auxiliar implica el uso de
25 más de un medicamento para tratar el cuerpo humano o animal mediante

terapia. Una primera realización concreta de una terapia de combinación es una en la que la terapia de combinación comprende un antibiótico, preferentemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, de modo que la ansamicina es, más preferentemente, rifampicina. Una segunda realización
 5 concreta de la misma es en la que la terapia de combinación comprende otras vacunas profilácticas contra la tuberculosis, tales como las mencionadas en S.H.E. Kaufmann, Nature Rev, Immunol., 2006, 6, páginas 699-704, tales como, por ejemplo, la vacuna con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacunas en subunidad o vacunas BCG recombinantes. La primera y la segunda
 10 realización particulares se pueden combinar.

En la terapia de combinación o la terapia auxiliar, la administración de estas dos (o más) sustancias puede ser simultánea o puede realizarse en dos (o más) inoculaciones separadas en el tiempo. El periodo entre las inoculaciones puede ser incluso de varios años. En el caso de una terapia de
 15 combinación, las inoculaciones separadas en el tiempo, preferentemente primero se administra una vacuna profiláctica contra la tuberculosis y el fármaco que comprende los fragmentos de pared celular de una cepa virulenta de MTB-C, que actúa como agente de reestimulación (refuerzo) de la vacuna inoculada inicialmente, se administra después. En una realización, solo se
 20 administra una única dosis al sujeto humano y esta dosis es, preferentemente, 25 µg de FCMtb.

Como alternativa, varias estrategias o tipos de tratamiento o cuidados diferentes se usan de forma simultáneamente en terapia auxiliar. En una realización concreta de la presente invención, la terapia auxiliar se administra a
 25 un sujeto humano con un sistema inmunológico alterado, tal como un individuo

que sufre VIH o cualquier individuo por otro lado propenso a la infección de tuberculosis y/o que necesite tal tratamiento. La isoniazida también se puede administrar en la terapia auxiliar. Además, la terapia auxiliar puede comprender la administración de cualquier fármaco o combinación de fármacos para tratar el sistema inmunológico alterado, tal como para tratar la infección por VIH. Los fármacos típicos para tratar las infecciones por VIH son fármacos antiretrovirales y se puede encontrar una revisión no limitante en: 'Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents

Recommendations for a public health approach: 2010 revision", Autores; Organización Mundial de la Salud, ISBN: 9789241599764,

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

Si un individuo se va a considerar positivo para el VIH o no (es decir, negativo para el VIH) se puede analizar mediante cualquier prueba que permita la detección de la presencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus que produce el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en un fluido corporal del individuo que se va a analizar, en el que el fluido corporal es normalmente uno cualquiera seleccionado de suero, saliva u orina. Dichas pruebas pueden detectar anticuerpos, antígenos o ARN. En Chou y col., Ann. intern. Med. 2005 Jul 5; 143(1):55-73 se proporciona una revisión de pruebas de detección selectiva adecuadas.

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

Una única dosis de 25 µg de FCMtb también fue potente cuando se administró a un sujeto humano negativo para el VIH. Los presentes inventores mostraron que esto es particularmente útil en sujetos que sufren tuberculosis latente (Ejemplo 12). Por tanto, una única dosis de 25 µg de FCMtb a
5 administrar a un individuo positivo para VIH o negativo para VIH es una realización preferida de la invención.

La invención también proporciona un procedimiento de fabricación que se caracteriza por que es adecuado para obtener una formulación de liposomas de acuerdo con una cualquiera o más de las realizaciones descritas
10 anteriormente, así como de una suspensión o composición farmacéutica que comprende la misma. Un ejemplo no limitante del mismo se da como el Ejemplo 11 más adelante.

La invención proporciona además la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en el NCTC de Londres. La cepa tiene un polimorfismo genético bajo. Por tanto, las formulaciones que comprende fragmentos de la
15 NCTC 13536 tienen la ventaja de una reproducibilidad muy alta por el polimorfismo genético bajo.

Modo preferido de llevar a cabo la invención

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

COMPONENTES	UNIDAD POR VIAL	FUNCION
SUSTANCIA FARMACOLOGICA		
FCMtb	66,7 µg	Inmunógeno
Componentes adicionales		
Sacarosa	20.000 µg	Carga de sustancia (dsecación por congelación) y crioprotector
Lecitina de soja ¹	845,8 µg	Agente formador de liposomas
Colato sódico	92,0 µg	Tensioactivo
Cloruro sódico ²	20,8 µg	Disolvente
Caracterización de partícula		
Tamaño de partícula promedio z	75 +/- 20 nm	
Indice de polidispersión	≤ 0,350	

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

²Añadido como solución de NaCl al 0,9% **Tabla 1.**

Para la aplicación de 25 µg/dosis o 5 µg/dosis se preparan otros viales, en los que todos los valores numéricos mostrados en la Tabla 1, a excepción de la sacarosa, se deben dividir por el factor de 2 o 10, respectivamente. El contenido de sacarosa en las formulaciones (50 µg, 25 µg y 5 µg) siempre es 20.000 µg de unidad/vial.

Una formulación de liposomas hecha de lecitina de soja (agente formador de liposomas) altamente enriquecida con fosfatidilcolina (94,0% (p/p)) y colato sódico (agente tensioactivo) ha mostrado ser adecuada para garantizar mayor solubilidad de la sustancia farmacológica durante la fabricación, sí como en la suspensión reconstituida. Un parámetro importante para la estabilidad de los FCMtb en la formulación de liposomas es la proporción de los componentes que constituyen el liposoma. Después de probar diferentes proporciones del

componente de FCMtb/lípidos, se estableció que una muy buena proporción era aproximadamente 0,03:0,2:0,7 FCMtb:colato sódico:lecitina de soja, p/p/p). También se observó que la formación de liposomas estaba potenciada por la presencia de sales en la fase acuosa.

5 Por tanto, en esta formulación particular se incluye cloruro sódico.

Parámetro			Criterios de aceptación	Procedimientos de ensayo
Aspecto			Polvo blanco o blancuzco	Inspección visual
Morfología de la torta			Plano o casi plano y homogéneo	Inspección visual
Uniformidad de la dosis	Uniformidad de masa (mg/vial)		21,02 ±15%	Pesar, procedimiento interno
	Masa media (mg/vial)		Masa ± 5%	Pesar, procedimiento interno
Contenido en agua (%)			≤3%	Ensayo colorimétrico de Karl Fischer Capítulo 2.5.12 de la Ph. Eur. (USP<921>)
Contenido en proteínas totales de los FCMtb			90-140 µg/mg de FCMtb	Ensayo BCA, capítulo 2.5.33 de la Ph. Eur. (USP<1057>)
Tiempo hasta la(s) reconstitución(es)			Bien reconstituido ≤ 10s	Inspección visual
pH			7-8	Potenciometría, capítulo 2.2.3 de la Ph.Eur. (USP<791>)
Tamaño de partícula	Promedio z (nm) (índice de polidispersidad ¹)		75+20 (≤ 0,310)	Dispersión de luz dinámica, capítulo 2.9.31 de la Ph. Eur.
Potencia inmunogénica en el modelo M. Tuberculosis murino infectado por	IFN-γ específico de antígeno Unidades formadoras de manchas	PPD	3-12 Proporción UFS /10 ⁶ células con respecto al valor basal (valor basal en UFS /10 ⁶ células)	ELISpot

Perfil de proteínas	SDS-PAGE	Positiva para las bandas: 70,38,30, 10,6 kDa	Electroforesis mediante SDS-PAGE
	Transferencia de tipo Western	Positivo para HSP70 (Rv0350), 38 kDa (Rv0934), Ag85B (Rv1886c)	Transferencia de tipo Western
Esterilidad		Estéril	Capítulo 2.6.1 de la Ph. Eur. (USP<71>)
Endotoxinas bacterianas (UI/dosis)		≤10 UI/vial	Procedimiento D, capítulo 2.6.14 de la Ph. Eur., (USP<85>)

Tabla 2: Producto farmacéutico (FCMtb), medido tras la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada

En un modo preferido, la invención se lleva a cabo de un modo tal que la formulación de liposomas de acuerdo con la presente invención tiene las propiedades de acuerdo con la Tabla 2.

Para administrar a sujetos vivos, el vial se puede reconstituir con 0,4 ml de agua para inyectables, para dar una suspensión que contiene 166,7 µg/ml de FCMtb.

La Tabla 3 muestra la concentración de cada componente por vial tras la reconstitución a 50 µg/dosis. Para la aplicación de 25 µg/dosis o 5 µg/dosis se usan otros viales, de modo que de acuerdo con lo que se ha indicado anteriormente sobre la Tabla 1, todos los valores numéricos mostrados en la Tabla 3, a excepción de la sacarosa, se deben dividir por el factor de 2 o 10, respectivamente. El contenido de sacarosa en las formulaciones (50 µg, 25 µg y 5 µg) siempre es 50.000 µg /ml.

Componentes	Concentración por ml
SUSTANCIA FARMACOLOGICA	
FCMtb	166,7 µg/ml
EXCIPIENTES	
Sacarosa	50.000,0 µg/ml
Lecitina de soja	2.114,4 µg/ml

Colato sódico	230,0 µg /ml
Cloruro sódico	52,1 µg/ml

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

Materiales y procedimientos

Materiales de referencia

- 5
- 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 los lotes de FCMtb.
- 10
- b) Patrón de albúmina: Este patrón, usado para la determinación del contenido proteico, está compuesto por albúmina bovina en 0,9% de solución salina (2 mg/ml), conservada en azida sódica (fabricante: Pierce).
- 15
- c) 6,6'-dimicolato de trehalosa del patrón de *Mycobacterium tuberculosis* (TDM): Se usa el TDM disponible comercialmente (Sigma) para la identificación de TDM de los lotes de FCMtb.
- d) Ácidos micólicos del patrón de *Mycobacterium tuberculosis*
Se usa un ácido micótico disponible (Sigma) para la identificación de ácido micótico de los lotes de FCMtb.
- 20
- e) Marcador de peso molecular: Se usa un marcador de peso molecular disponible comercialmente denominado SeeBlue® Plus pre-stained Standard" (Invitrogen)

Determinación de parámetros

a) pH

El pH de la suspensión reconstituida de FCMtb (20 mg/ml) se determina

mediante potenciómetro de acuerdo con el capítulo 2.2.3. de la Ph. Eur. y USP<791>.

b) *Contenido en agua*

5 El ensayo para la determinación de agua residual de los FCMtb liofilizados se lleva a cabo usando el equipo colorimétrico de Karl Fisher, y sigue las indicaciones generales del procedimiento del capítulo 2.5.12 de la Ph. Eur. y la USP <921> *Determinación de agua*.

c) *Determinación del contenido de proteínas totales*

10 El ensayo para la determinación del contenido en proteínas totales de los FCMtb se lleva a cabo usando un kit comercial (kit BCA, Pierce) y siguiendo el procedimiento 4 del capítulo 2.5.33 de la Ph. Eur. (ácido bicinchrónico o ensayo BCA) y la USP <1057>.

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

15 El ensayo se realiza de acuerdo con el procedimiento del capítulo 2.2.31 de la Ph. Eur. y la USP <726>; la detección de proteínas en el gel se realiza mediante una tinción de Coomassie adaptada o tinción de plata. *Muestras de ensayo:* Reconstituir FCMtb en agua purificada a una concentración de 40 o 20 mg/ml. *Soluciones de referencia:* marcador del peso molecular, antígenos purificados, patrón de referencia de los FCMtb

20

Antígenos purificados
Proteína HSP70 de M. tuberculosis (Rv 0350)
Proteína 38 kDa de M. tuberculosis (Rv 0934)
Proteína Ag85B de M. tuberculosis (Rv 1886c)
Proteína 19 kDa de M. tuberculosis (Rv 3763)

Proteína CFP10 de M. tuberculosis (Rv 3874)
Proteína ESAT6 de M. tuberculosis (Rv 3875)

Tabla 4: Antígenos de referencia

Para la tinción de Coomassie se usa solución de reactivo de tinción con azul Gel-Code (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la tinción de plata, se usa el kit PROTSIL 1 de Invitrogen se usa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis de transferencia de tipo western, las proteínas se separan mediante SDS-PAGE de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica y después se transfieren electroforéticamente a una membrana de PVDF para inmunodetección usando anticuerpos monoclonales específicos. La interacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante incubación con un anti-anticuerpo que desencadena una reacción quimioluminiscente. Se usan los 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

Los ácidos micólicos en FCMtb se examinan mediante TLC unidimensional siguiendo el procedimiento del capítulo 2.2.27 de la Ph. Eur. Muestras de ensayo: FCMtb liofilizados, 40 mg. Soluciones de referencia: Patrón de ácido micótico (Sigma). Procedimiento:

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

- b) Esterificación de ácido micótico: 1 ml de metanol: tolueno: ácido sulfúrico (30:15:1; vol/vol) se añaden a cada tubo y la esterificación se consigue durante la noche. Después se añaden 4 ml de n-hexano. Se seca en flujo de nitrógeno y se resuspende con 500 µl de hexano.
 - 5 c) TLC: Se aplican 10 µl de cada muestra sobre una línea paralela al borde de la placa (gel de sílice 6. (20 x 20 cm) (Merck). La separación cromatográfica se realiza en un tanque saturado con una fase móvil (éter etílico:n-hexano (15:85, vol/vol)) tres veces. Después se deja secar la placa al aire.
 - 10 d) Los ácidos micólicos se revelan rociando las placas con una solución de ácido fosfomolibdico en etanol de 96° y calor a 120°C durante 10 minutos.
- Los ácidos micólicos en las muestras de FCMtb se determinan mediante comparación con una mancha convencional comercial de ácido micótico. Los
- 15 resultados se expresan en forma de datos cualitativos (presencia (positivo)/ausencia (negativo) de ácido micótico evaluado.
- f) *Identificación de 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM):* Muestras de ensayo: FCMtb liofilizados, 40 mg. Soluciones de referencia: Patrón de TDM (Sigma). Procedimientos
- 20 (i) Procedimiento de extracción: La muestra se extrae con cloroformo:metanol (1:1; vol/vol) y después se incuba durante la noche. La fracción sobrenadante se seca en flujo de nitrógeno y se pesa. Por último, las muestras desecadas se resuspenden en cloroformo a una concentración final de 40 mg/ml.
- 25 (ii) TLC: Se aplican 10 µl de cada muestra sobre 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.

5 (iii) Detección: El TDM se revela rociando las placas con una solución de Antgona a 1% en ácido sulfúrico y calor a 120°C durante 5 minutos.

(iv) Identificación: El TDM en las muestras de FCMtb se determina por comparación con TDM comercial, que se usa para generar una mancha convencional. Los resultados se expresan en forma de
10 datos cualitativos, es decir presencia (positivo)/ausencia (negativo) del TDM evaluado.

g) *Identificación de lipoarabinomano (LAM)*: para el análisis de transferencia de tipo western del LAM, los compuestos se separan mediante SDS-PAGE de acuerdo con procedimientos convencionales y después se transfieren
15 electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetección usando el anticuerpo específico CS35. La interacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante incubación con un anti-anticuerpo (IgG de cabra antiratón Pigmento IR 800 CW) que desencadena una reacción fluorescente.

h) *Esterilidad*

20 Todos los procedimientos que requieren esterilidad, de acuerdo con el experto en la técnica, se llevan a cabo en condiciones estériles; esto también se aplica cuando la esterilidad no se menciona explícitamente para ninguna etapa dada que la requiera. El ensayo de esterilidad se evalúa como se prescribe en el capítulo 2.6.1 de la Ph. Eur. (USP <71>).

25 i) *Inactivación de micobacterias*

La inactivación de las micobacterias se evalúa de acuerdo con el capítulo 2.6.2 de la Ph. Eur.

j) *Endotoxinas bacterianas*

El ensayo de endotoxinas bacterianas (ensayo LAL, lisado de amebocitos de Limulus) se realiza de acuerdo con las indicaciones generales del procedimiento del capítulo 2.6.14 de la Ph. Eur., siguiendo el Procedimiento D (procedimiento cinético cromogénico) así como de la USP <85>.

Fragmentación de los bacilos

Se cree que la elección de fragmentación de los bacilos permite la presentación óptima de antígenos celulares, particularmente antígenos de la pared celular. La fragmentación de FCMtb se determina por tanto metodologías de dispersión de luz dinámica (como se describe más adelante) como de difracción láser.

La difracción láser permite medir la fragmentación en un intervalo 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 como un histograma, que expresa la frecuencia relativa del número de partículas (%) frente al diámetro de partícula (0,04 μm - 2000 μm),

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

El tamaño de partícula promedio como se describe en este documento se determina por dispersión de luz dinámica (DLD), que se basa en el concepto físico del movimiento browniano de partículas, definido en la ecuación de

Stokes-Einstein:

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

en la que:

$d(H)$ = diámetro hidrodinámico

5

D = coeficiente de difusión translacional

k = constante de Boltzman

T = temperatura absoluta

η = viscosidad

10 Sin desear limitarse a teoría particular alguna, 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 más grande es la partícula, más lento será el movimiento browniano.

15 En las mediciones de dispersión de luz dinámica, la muestra que contiene las partículas a medir se ilumina con una fuente de luz monocromática, preferentemente un láser, y se analiza en una función de correlación cómo la intensidad de la luz dispersada fluctúa con el tiempo. Si, por ejemplo, están midiéndose partículas grandes, como se mueven lentamente, la intensidad de la luz dispersada fluctúa lentamente, y la
20 correlación necesita mucho tiempo para descomponerse; por otra parte, si están midiéndose partículas pequeñas, como se mueven rápidamente, la intensidad de luz dispersada fluctúa rápidamente, y la correlación de señal se descompone más rápidamente.

Según la presente invención, las partículas se miden preferentemente
25 con el siguiente instrumento: Zetasizer nano zs (Malvern Instruments), usando

agua purificada / aceite mineral como disolventes.

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

5 El tamaño se calcula a partir de la función de correlación usando diversos algoritmos. En el presente caso se aplica el 'análisis acumulado', como se define en ISO13321 Parte 8. Los ajustes de la función de correlación producen una única curva exponencial que permite el cálculo de los siguientes parámetros:

- 10 - 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 del tamaño de partícula.

Los resultados se presentan normalmente como un histograma que
15 expresa la frecuencia relativa del número de partículas (%) con respecto al diámetro de partícula que puede ser cualquier diámetro que esté comprendido en el intervalo de 1 nm a 3 μm .

Pruebas de potencia

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

- a) Modelo murino infectado por *M. tuberculosis in vivo* vacunado con una dosis única: El diseño experimental consiste en: Día 0: Infección
25 subcutánea en el abdomen inferior de ratones con la cepa de Mtb H37Rv

- Pasteur (4×10^4 UFC). Día 14: Tratamiento quimioproláctico de los animales con una dosis oral única de rifapentina (25 mg/kg) e isoniazida (10 mg/kg), conduciendo así a un efecto antibiótico de 1 semana. Día 21: Vacunación con una dosis única de vacuna/placebo y/o H₂O subcutáneamente en el cuello. Todas las muestras se obtienen y se analizan para ratones individuales. Cada experimento incluye: un grupo basal de ratones infectados más placebo y el grupo experimental de ratones infectados más vacunación. Los grupos consisten en 6-7 animales, y los experimentos se realizan por duplicado. Día 28: Los animales se anestesian con isoflurano.
- 5
- 10
- b) Modelo murino infectado por *M. tuberculosis in vivo* vacunado con dos dosis: El diseño experimental consiste en: Día 0: Infección subcutánea en el abdomen inferior de ratones con la cepa de Mtb H37Rv Pasteur (4×10^4 UFC). Día 14 Tratamiento quimioproláctico de los animales con una dosis oral única de rifapentina (25 mg/kg) e isoniazida (10 mg/kg), conduciendo así a un efecto antibiótico de 1 semana. Día 21 Vacunación con una primera dosis de vacuna/placebo y/o H₂O subcutáneamente en el cuello. Día 36: Vacunación con una segunda dosis de vacuna/placebo y/o H₂O subcutáneamente en el cuello. Todas las muestras se obtienen y se analizan para ratones individuales. Cada experimento incluye: un grupo basal de ratones infectados más placebo y el grupo experimental de ratones infectados más vacunación. Los grupos consisten en 6-7 animales, y los experimentos se realizan por duplicado. Día 42 Los animales se anestesian con isoflurano.
- 15
- 20
- 25
- Para tanto a) como b) anteriormente, tras el sacrificio, el análisis *ex vivo*

del parámetro unidades formadoras de manchas (SFU) de interferón- γ por ELISPOT se realiza usando suspensiones de células del bazo para respuesta inmunitaria celular.

Determinación de la potencia inmunogénica en el modelo murino sano de *M. tuberculosis*. Ratones C57BL/6 hembra de 6-7-semanas de edad libres de patógenos específicos se proporcionan por Harlan Iberica (España). Modelo murino sano de *M. tuberculosis in vivo* vacunado con dos dosis. El diseño experimental consiste en: Día 0 Vacunación con una primera dosis de vacuna según el modo preferido de llevar a cabo la presente invención, o placebo y/o H₂O subcutáneamente en el cuello. Día 21 Vacunación con una segunda dosis de vacuna/placebo y/o H₂O subcutáneamente en el cuello. Todas las muestras se obtienen y se analizan para ratones individuales, Cada experimento incluye: un grupo basal de ratones sanos más placebo y el grupo experimental de ratones sanos más vacunación. Día 28 Los animales se anestesian con isoflurano. Después del sacrificio, el análisis de anticuerpos IgGs por ELISA se realiza usando suero de ratón para respuesta inmunitaria humoral.

Diagnóstico de tuberculosis

Los procedimientos para diagnosticar tuberculosis son muy conocidos para el experto. La prueba de QuantiFERON y TST son conocidas por proporcionar resultados fidedignos y pueden usarse solas o en combinación para clasificar sujetos para su idoneidad a someterse a una terapia con el producto de la presente invención. QuantiFERON, también conocida como QFT, es una prueba comercialmente disponible para infección por tuberculosis o tuberculosis latente, fabricada por Cellestis Limited, Chadstone, Melbourne, Victoria, Australia. QFT es un ensayo de liberación de interferón- γ (IGRA)

usado en el diagnóstico de tuberculosis. Se usa según las instrucciones del fabricante. La prueba de Mantoux (también conocida como la prueba de cribado de Mantoux, prueba de sensibilidad a tuberculina (prueba TST), prueba de Pirquet o prueba de PPD para derivado de proteína purificado) es una
5 herramienta de diagnóstico para tuberculosis. Una visión general de ambas pruebas puede encontrarse en Franken y col., Clin Vaccine Immunol 2007, abril; 14(4): 477-480.

Ejemplos:

Los ejemplos a continuación se facilitan para proveer al experto en la
10 materia de un modo y explicación factible de algunas realizaciones específicas de la invención. Estos ejemplos tienen un fin ilustrativo y ni mucho menos pretenden limitar el alcance de la invención de ningún modo.

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

El material de partida para la producción de FCMtb es un inóculo de la
15 cepa NCTC 13536, llamado sinónimamente 511 o NCTC 13536 de *Mycobacterium tuberculosis*, una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada de un paciente inmunocompetente diagnosticado con tuberculosis pulmonar en Barcelona, España. Se depositó en 2010 en la NCTC en Londres, que es una organización de depósito oficial según el Tratado de Budapest. La cepa se ha
20 depositado adicionalmente por la colección de cepas del Servicio de Microbiología del Hospital de Sant Pau, Barcelona, España,

Se han realizado dos pases de la cepa original en los años 1995 y 1996, respectivamente. LSM PB#1 se corresponde con el segundo pase de la cepa original de NCTC 13536 de *M. tuberculosis*, que se realizó en octubre de 1996
25 dando 100 viales (viales de vidrio estéril de 3 ml) guardados a -70 ± 5 °C. La

cepa tiene un bajo polimorfismo genético, como se ha identificado mediante procedimientos convencionales en la materia.

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

Un diagrama de flujo de este procedimiento se facilita en la Figura 1. El material de partida para la producción de FCMtb es un inóculo de la cepa NCTC 13536 de *Mycobacterium tuberculosis* (Ejemplo 1). Con el fin de garantizar el suministro continuo de este material de partida, preferentemente se usa un sistema de lotes. De ahí, un lote de semillas de trabajo (LST) derivado de un lote de semillas maestro (LSM) se usa para la producción de FCMtb. NCTC 13536 de *Mycobacterium tuberculosis* (Ejemplo 1) se cultiva durante 3 - 5 semanas en medio Löwenstein-Jensen. El crecimiento bacteriano se sub-cultiva entonces en medio Proskauer Beck a 37 ± 2 °C con agitación a 100 ± 5 rpm. Una vez se logra la máxima concentración bacteriana (por inspección visual), se inicia y se incuba un subcultivo en medio Proskauer Beck. Cuando se logra una concentración bacteriana similar se toman pequeñas alícuotas. El recuento bacteriano viable se determina por el número de unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas en medio de agar de Middlebrook después de la incubación a 37 ± 2 °C durante 3 - 4 semanas. El recuento bacteriano debe ser $2 - 5 \times 10^7$ UFC/ml.

(1) Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

La producción de FCMtb empieza con la siembra de 0,2 ml de un LST en una placa de agar 7H11 e incubación a 37 ± 1 °C durante 15 ± 2 días. Entonces, las colonias se transfieren a un tubo que contiene algunas perlas de vidrio. Después de la mezcla se añaden aproximadamente 5 ml de agua para inyección (API) para obtener una suspensión bacteriana. En este momento se

realiza un recuento de placas viables y una prueba de esterilidad. Aproximadamente 100 placas de agar 7H11 de Middlebrook se siembran con *M. tuberculosis* usando hisopos empapados con la suspensión bacteriana para obtener cultivos confluentes. Las placas se incuban a 37 ± 1 °C durante 21 ± 2 días.

La prueba de esterilidad como control en el procedimiento se realiza del siguiente modo:

La prueba de esterilidad tiene como objetivo garantizar la ausencia de hongos y bacterias distintos de *Mycobacteria*. Las pruebas se llevan a cabo por inoculación directa, siguiendo las condiciones descritas en Ph. Eur 2.6.1 para la prueba de esterilidad. Las muestras probadas deben ser estériles. Se usa medio 7H11 en lugar de 7H10 (como se ha mencionado en Ph. Eur. 2.6.2). 7H11 se basa en medio 7H10 añadiendo un gramo de digesto pancreático de caseína con el fin de potenciar el crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

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

Después del periodo de incubación, la pureza del cultivo bacteriano se controla por una inspección visual de las placas de agar y el rendimiento de una prueba de esterilidad. Entonces, el cultivo bacteriano se recoge de placas de agar y se transfiere a un tubo estéril. El extracto en bruto obtenido se pesa (20-22 g). La mezcla se mantiene a -80 °C $\pm$ 5 °C.

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

Un diagrama de flujo de este procedimiento se facilita en la Figura 2.

(3) Fragmentación y deslipidación de células

El extracto en bruto congelado (Ejemplo 2) se descongela a 37 ± 1 °C y luego se añade tampón PBS estéril con 4% (peso/peso) de Triton-X114 (pH 7,0 - 7,5) a 4 °C. Después de la mezcla, se transfiere posteriormente a un
5 recipiente de policarbonato estéril que contiene perlas de sílice/circonia estériles. Entonces, la fragmentación de células se lleva a cabo en un Beadbeater aplicando el siguiente procedimiento de fragmentación: 3 ciclos, consistiendo cada uno en 5 periodos de ENCENDIDO/APAGADO más 10 minutos de descanso. Una vez ha terminado el procedimiento, la fracción
10 fragmentada celular se separa de las perlas por lavados posteriores (agitación y sedimentación repetida) en tampón PBS estéril con 4% de Triton-X114 (pH 7 - 7,5). Una alícuota de la suspensión lavada de la fracción fragmentada celular se recoge entonces para el control de pH y continúa una centrifugación final a 845 g a 4 °C durante 30 minutos.

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

(4) Pasteurización

25 La suspensión de FCMtb se pasteuriza entonces a 65 ± 2 °C durante 60

min. Una vez ha terminado la pasteurización, el pH del FCMtb pasteurizado se determina por papel tornasol. Se considera aceptable en el intervalo de pH 6,5 - 7,5. Viales estériles y despirogenados se envasan con 0,5 ml de la suspensión del producto y se realizan IPC sobre la esterilidad e inactivación de micobacterias. Finalmente, los viales envasados se congelan a -80 ± 5 °C. Una vez el material se ha sometido a pasteurización, se segregará físicamente del material sin tratar, es decir, los espacios usados antes de las pasteurizaciones se separan claramente de aquellos usados durante el posterior procedimiento de envasado.

10 (5) Liofilización

Todos los viales que contienen el producto congelado se liofilizan luego a aproximadamente -45 °C a 30 °C de temperatura y a $0,310$ mbar ($0,310$ hPa) de presión durante aproximadamente 18 horas (0,5 ml de volumen por vial). Usando técnicas asépticas y bajo atmósfera de N_2 , los viales se tapan y se etiquetan. El principio activo envasado se almacena entonces a $-20^\circ \pm 5$ °C durante hasta 12 meses.

Ejemplo 4: Caracterización de proteínas

La Figura 3 facilita una visión general de la estrategia de caracterización en términos del perfil de proteínas.

20 Basándose en la bibliografía (Andersen P., 1997, Scand J. Immunol.; 45(2): 115-31; Geisel y col., 2005, J. Immunol.; 174(8):5007-15; Stewart y col. 2005, Infect. Immun., 73(10):6831-7, Wang y col., 2007, J. Mol. Biol., 366(2):375-81), 6 bandas de proteína se seleccionaron como representativas para la evaluación del perfil de proteínas: proteína HSP70 (Rv 0350), proteína
25 de 38 kDa (Rv 0934), (Rv 1866c), proteína de 19 kDa (Rv 3763), proteína

h⁰²

CFP10 (Rv 3874) y proteína ESAT-6 (Rv 3875).

- A. Determinación del contenido de proteína total: Los niveles de proteína total en FCMtb se cuantifican por metodología con ácido bicinconínico (BCA). La proteína total representa aproximadamente el 10% (peso/peso) 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.
- 5
- B. Identificación del perfil de proteínas por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE): El perfil de proteínas del principio activo FCMtb se determinó comparando con antígenos de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* correspondientes a ESAT6 (6 kDa) (7); se muestran CFP10 (10 kDa) (6); Ag85B (30 kDa) (1); 38kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4) además del marcador de peso molecular MW (5) (véase la Figura 4). La determinación del perfil de proteínas del principio activo FCMtb e identificación de bandas (aproximadamente 70 kDa, 38 kDa, 30 kDa, 10 kDa y 6 kDa) se lleva a cabo por tinción con Coomassie. La identificación de la banda de 19 kDa (lipopolipéptido) se lleva a cabo por tinción con plata.
- 10
- 15
- C. Identificación del perfil de proteínas por transferencia Western con anticuerpos monoclonales específicos: El perfil de proteínas del principio activo FCMtb se determina por los patrones obtenidos usando análisis de transferencia Western con anticuerpos monoclonales (mAb): Anti-HSP70 (70 kDa, Fig. 5c), anti-38kDa (Fig. 5d), anti-Ag85B (30 kDa, Fig. 5e).
- 20
- 25
- FCMtb-52.1 es el lote de referencia para FCMtb según el modo preferido

de llevar a cabo la presente invención.

Ejemplo 6: Caracterización de lípidos

La caracterización del perfil de lípidos de FCMtb consiste en un procedimiento de fraccionamiento basado en extracción con
5 cloroformo:metanol (1:1). El procedimiento de fraccionamiento llevado a cabo en estos estudios se ha basado en el procedimiento descrito por Delmas y col., 1997, *Glycobiology* 7(6), 811-7. La cromatografía en capa fina (CCF) ha sido el procedimiento usado para analizar el contenido de lípidos y glucolípidos presentes en FCMtb. Específicamente, se han identificado poliaciltrehalosa
10 (PT), dimicolato de trehalosa (TDM), diaciltrehalosa (DAT), fosfatidilinositolmanósidos (PIM) y otros fosfolípidos, además de dimicocerosatos de ftiocerol (PDIM) y ácidos micólicos, por cromatografía en capa fina (CCF) tanto en las cepas de referencia H37rv como NCTC 13536, además de en diferentes lotes de FCMtb. Véase la Figura 7a. El contenido de
15 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) se analiza por CCF en el sobrenadante. La determinación de ácidos micólicos se realiza en el sedimento, tras un procedimiento 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 presente conocimiento científico y permite una
20 caracterización estándar de los lípidos inmunogénicos conocidos hasta la fecha. FCMtb se ha comparado con la fracción de lípidos de la célula completa de cepas NCTC 13536 y H37Rv de *M. tuberculosis* y el patrón comercial TDM (véase la Figura 7a y 7b). En general, se ha mostrado que el contenido de lípidos es coherente en diferentes lotes de liposomas que comprenden FCMtb
25 según la presente invención. La Figura 7d muestra la identificación de LAM.

Ejemplo 6: Caracterización de material celular fragmentado

Resultados preliminares usando ambas metodologías muestran que el tamaño de fragmentos de FCMtb es principalmente inferior a 1 μm (99% < 1 μm), que es corroborado por microscopía electrónica de FCMtb: el tamaño de fragmentos oscila principalmente de 100 a 300 nm.

Se han investigado niveles de ADN residual después de la extracción con una mezcla de fenol/cloroformo por absorbancia a 260 nm (límite de detección: 0,2 μg de ADN/mg de FCMtb). Resultados típicos obtenidos hasta la fecha son inferiores a 15 μg de ADN/mg de FCMtb.

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

Ejemplo 7: Inmunización de ratones y visualización de actividad biológica

Interacción de bandas de proteína de FCMtb con suero inmune de ratón: Usando metodología de transferencia Western ha sido posible visualizar bandas de proteína de FCMtb que interaccionan con anticuerpos IgG presentes en suero obtenido de ratones infectados inoculados dos veces con la vacuna basada en la formulación de liposomas según la presente invención. Esto se considera que es un indicador para la actividad biológica (Figura 6).

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

La actividad biológica de la vacuna se estudia en un modelo *in vivo* evaluando la potencia inmunogénica de FCMtb sin liposomas (reconstituido con agua para inyección, API) y con FCMtb en la formulación de liposomas según el mejor modo de llevar a cabo la presente invención (5% de sacarosa, véase

anteriormente) (Figura 8). Estos resultados muestran las ventajas de la formulación de liposomas con sacarosa.

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

Ejemplo 9: Efecto de sacarosa

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

Los resultados obtenidos por la medición después de la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada y después de probar según los presentes parámetros de la especificación para la autorización de lotes se presentan en la Tabla 5.

Parámetro	Criterios de aceptación	FCMtb formulado en una suspensión de liposomas		
		Sin excipiente	Sacarosa 5%	Glicina 1,5%
		FCMtb formulado en una suspensión liposómica		
Aspecto	Polvo de blanco a blanquecino	ND	Cumple	Cumple
Morfología de la torta	Plana a casi plana y homogénea	ND	Cumple	Cumple
Contenido de 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) Pdl ^(a)	75 ± 20 (≤ 0,250)		370 ⁽¹⁾ (0,492)	66 (0,215)	504 ⁽¹⁾ (0,569)
Potencia inmunogénica en el modelo murino infectado por M. tuberculosis	IFN-γ específico para antígeno	PPD	3 - 12 Relación 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)
	Unidades formadoras de manchas	Ag85B (30 KDa)	5 - 20 Relación 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 liposómicos

ND = no determinado

Tabla 5: Resultados de las especificaciones para 3 formulaciones diferentes, medidas después de la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada.

Los investigadores de este estudio encontraron sorprendentemente que la formulación al 5% de sacarosa proporciona la ventaja de mejores resultados fisicoquímicos, tales como contenido de agua o tiempo para reconstitución, respectivamente. Pero el hecho más crucial es la importante reducción en la agregación liposómica (tamaño de partícula, promedio en z) mostrada con la formulación que comprende sacarosa en comparación con las otras dos formulaciones. El análisis por dispersión de luz dinámica ha mostrado un promedio en z de 75 ± 20 nm (índice de polidispersidad ≤ 0,350) de los

liposomas que contienen sacarosa. La microscopía electrónica de preparaciones que se fracturan por congelación de la formulación de liposomas que contiene sacarosa muestra una mezcla de liposomas multilaminares y unilaminares con tamaños entre 40 y 100 nm (Figura 9).

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

Ejemplo 10: Propiedades biológicas de la formulación que comprende sacarosa

- La formulación según la Tabla 3 se usó para estudios biológicos. La respuesta inmunitaria celular desencadenada por la inoculación de vacuna según el modo preferido de llevar a cabo la presente invención (única inoculación) en un modelo murino infectado por *Mycobacterium tuberculosis* puede medirse por ELISPOT, los resultados se facilitan en la Tabla 6.

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

ND: No determinado.

Tabla 6: Respuesta celular después de la inoculación en ratones.

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

Se hizo específicamente una comparación entre los datos de potencia inmunogénica obtenidos con la formulación sin sacarosa frente a la formulación que contiene sacarosa como excipiente principal. Los resultados obtenidos indican claramente que la respuesta inmunitaria celular provocada por una dosis de 50 µg de FCMtb de la formulación con sacarosa es aproximadamente

1,5 veces superior a la obtenida con una dosis idéntica de la formulación sin sacarosa en un modelo de vacunación única. Estos mayores niveles de respuesta inmunitaria celular se obtienen en ambas pruebas de potencia: la realizada para las especificaciones de autorización de lotes (un modelo de una
 5 única vacunación) y la prueba adicional incluida para el ejercicio de comparabilidad (modelo vacunado dos veces). Además, en ambas pruebas de potencia, la respuesta inmunitaria celular provocada por la dosis de 50 μ g de FCMtb de la formulación con sacarosa muestra niveles similares a aquellos obtenidos con los 200 μ g de FCMtb de la formulación libre de sacarosa. Los
 10 resultados, medidos después de la reconstitución de la composición de liposomas liofilizada, se facilitan en la Figura 10a y 10b. La formulación que comprende sacarosa muestra una reducción significativa de la agregación liposómica. Se cree que esto es el motivo para el aumento de la inmunogenicidad. La respuesta inmunitaria celular alcanzada con una dosis de
 15 50 μ g de la nueva formulación es casi comparable a la observada con una dosis de 200 μ g obtenida con la formulación libre de sacarosa. Se conoce en el campo que la respuesta celular se considera que es la respuesta relevante (North RJ, Jung YJ (2004). Annu. Rev. Immunol. 22; 599-623).

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

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

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

Se disuelve lecitina de soja a granel de LCS en etanol (1:1; peso/peso) y se disuelve colato de sodio en agua (1:5; peso/peso). Las disoluciones se esterilizan por filtración. Después de mezclar la disolución de lecitina de sodio y la disolución de colato de sodio se añade FCMtb liofilizado (Ejemplo 1) tras la
5 agitación. Las relaciones de los componentes son 0,03:0,2:0,7 (FCMtb:colato de sodio:lecitina de soja; peso/peso/peso).

(2) Preparación a granel de LCS

La fase acuosa de se transfiere a una mezcladora de acero inoxidable esterilizada. La fase de lípidos de (1), que contiene lecitina de soja, colato de
10 sodio y FCMtb, se añade en una relación 0,7:0,3 (fase acuosa:fase de lípido, peso/peso). Las fases se mezclan a 2200 rads/s durante 3 min para la homogeneización y formación de liposomas. Después de la homogeneización, la LCS a granel se transfiere a otro recipiente y se deja reposar durante al menos 5 minutos. Se realiza un IPC sobre el tamaño de partícula sobre la LCS
15 a granel.

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

Se prepara y se esteriliza una disolución al 10% (peso/peso) de sacarosa. La disolución de sacarosa se mezcla con agua y LCS a granel en las proporciones adecuadas para conseguir la suspensión de liposomas (LS) final
20 a granel constituida por 21 mg de LCS/ml en disolución al 5% de sacarosa. Se prueba el pH, esterilidad y tamaño de partícula como controles en el procedimiento.

(4) Envasado

Los viales se envasan con 0,4 ml de LS (bajo agitación continua) y se
25 cierran parcialmente para congelación y liofilización.

(5) Liofilización, empaquetamiento y etiquetado

Los viales se congelan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que continúe la liofilización. El procedimiento de liofilización se realiza en el intervalo de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura y 0,150 mbar (0,150 hPa). El procedimiento dura durante 24 horas.

- 5 Al final de la liofilización, los viales se tapan completamente 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 12: La terapia adyuvante contra ITBL requerirá solo una única inyección de 25 μg de FCMtb

- 10 Se estableció un ensayo clínico aleatorizado de doble ciego de fase II para evaluar 3 dosis de FCMtb (5, 25, 50 μg , cada una preparada como se describe en el modo preferido de llevar a cabo la presente invención) y placebo en 96 sujetos VIH positivos (VIH+) y VIH negativos (VIH-) con infección por tuberculosis latente (ITBL) (TST+ y QuantiFERON+) que se asignaron aleatoriamente en grupos de $n=12$ por brazo después de recibir tratamiento de 15 1 mes de isoniazida. Los sujetos se inocularon dos veces con FCMtb (5, 25, 50 μg , cada uno preparado como se describe en el modo preferido de llevar a cabo la presente invención), inmediatamente seguido de quimioterapia con isoniazida y 4 semanas separadas.

- 20 Perfil inmunológico: FCMtb (5, 25, 50 μg , cada uno preparado como se describe en el modo preferido de llevar a cabo la presente invención) provocó una respuesta poli-antigénica con forma de campana contra antígenos secretados (ESAT-6, Ag85B) y estructurales (16 kDa, 38 kDa) que se estimularon en todas las dosis (Figuras 12 y 13). FCMtb (5, 25, 50 μg , cada uno preparado como se describe en el modo preferido de llevar a cabo la presente invención) también provocó una respuesta de memoria a largo plazo (la prueba 25

de la OMS) a las mayores dosis, compatible con un efecto profiláctico. Sorprendentemente, aunque respuestas globalmente inmunitarias fueron más intensas en VIH- que en VIH+, la única inoculación de 25 µg de FCMtb (5, 25, 50 µg, cada uno preparado como se describe en el modo preferido de llevar a cabo la presente invención) provocó la mejor respuesta inmunitaria en ambas poblaciones (Figuras 12 y 13).

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

 Figura 3: Diagrama de flujo de caracterización de proteínas.

 Figura 4: Identificación de antígenos por 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); 38 kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4) además de marcador de peso molecular MW (5).

 Figura 5: Caracterización de proteínas. Figura 5a: Perfil de proteínas; perfil de proteínas del 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 de tinción con Coomassie. MW en kDa. 5b: Identificación de la banda de 19 kDa, SDS-PAGE

- seguido de tinción con plata, 5c: Perfil de proteínas; identificación de bandas (10 kDa y 6 kDa) en los lotes de FCMtb indicados por SDS-PAGE y metodología de tinción con plata llevada a cabo en paralelo con el patrón ESAT-6 de Lionex. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 9, 10, 11 (lote FCMtb-5 52.1 en el carril 9)), patrón ESAT-6 de Lionex a diferentes concentraciones (4 a 8); 5d: Transferencia Western. Identificación del antígeno HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv 0350) en lotes de FCMtb por transferencia Western usando anticuerpos específicos 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: 10 Identificación de antígeno 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934) en lotes de FCMtb por metodología de transferencia Western usando un anticuerpo específico y llevada a cabo en paralelo con patrón de 38 kDa de *M. tuberculosis* de Lionex. Detección de fluorescencia usando el sistema Odyssey. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 6, 7), patrón de 38 kDa (4, 5). 5f: 15 Identificación del antígeno Ag85B (Rv 1886c) en lotes de FCMtb por metodología de transferencia Western usando un anticuerpo específico y llevado a cabo en paralelo con patrón de Ag85B de *M. tuberculosis* de Lionex. Detección de fluorescencia usando el sistema de Odyssey. Lotes de FCMtb (1, 2, 3, 5, 6, 7), patrón de Ag85B (4).
- 20 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 después de inocularse dos veces con la composición de vacuna farmacéutica basada en la formulación de liposomas según la presente invención, usando metodología de transferencia Western.
- 25 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) por metodología de CCF. 7b: Identificación de 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) en lotes de FCMtb por metodología de CCF. Los paneles (A) y (B) representan dos ensayos independientes. (A) patrón de TDM (11) y (12), otros carriles diferentes de lotes de FCMtb. B: (1) Patrón de TDM (1), otros carriles de diferentes lotes de FCMtb, 7c: Patrón de ácidos micólicos I, III y IV en lotes de FCMtb por 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 restantes carriles).

Figura 8: Comparación de inmunopotencia celular de FCMtb resuspendido con agua para inyección (API) frente a FCMtb formulado con liposomas (vacuna RUTI etiquetada, lote 10a), a la misma dosis (50 µg/dosis),

Figura 9: Preparación de fractura por congelación de concentrado liposómico (LCS) a granel (microscopía electrónica).

Figura 10: a: Respuesta inmunitaria celular por lote probada con las dos formulaciones de vacuna en una prueba de potencia (una vacunación), b: como en a, pero dos vacunaciones. "Formulación II": que comprende 5% (peso/peso) de sacarosa, según la Tabla 1 de este documento. "Formulación I": como la formulación II, excepto que no está presente sacarosa, µg se refiere a µg de FCMtb/dosis. 85B: Ag85B.

Figura 11: Diagrama de flujo del procedimiento según el modo preferido

de llevar a cabo la presente invención.

Figura 12: Perfil inmunológico de 1 inoculación de 25 µg de RUTI como se describe en el Ejemplo 12.

Figura 13: Inmunogenicidad (VIH- y VIH+) como se describe en el
5 Ejemplo 12.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de liposomas que comprende:
 - (a) fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-
5 C),
 - (b) un agente formador de liposomas,
1 al 20% (peso/volumen) de sacarosa, preferentemente 2 al 12%
(peso/volumen) de sacarosa, más preferentemente 3 al 8%
(peso/volumen) de sacarosa, y lo más preferentemente 4 al 6%
10 (peso/volumen) de sacarosa, en la que el tamaño promedio en z de las
partículas es 120 nm o menos.
2. La formulación de liposomas según la reivindicación 1, en la que el tamaño
promedio en z de las partículas está en el intervalo de 40 a 110 nm, más
15 preferentemente de 55 a 95 nm.
3. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
en la que la formulación de liposomas es una emulsión, y en la que el tamaño
promedio en z de las partículas es preferentemente inferior a 40 nm.
20
4. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones
precedentes, en la que el índice de polidispersidad de las partículas es 0,4 o
menos, preferentemente 0,3.
- 25 5. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones

precedentes, en la que la cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta, y preferentemente la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en la NCTC en Londres.

5

6. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente

(d) un agente tensioactivo

y/o

10 (e) uno o más tensioactivos no iónicos.

7. La formulación de liposomas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los fragmentos de células de MTB-C son o comprenden fragmentos de la pared celular.

15

8. La formulación de liposomas según la reivindicación 6, en la que la relación entre (a) y (d) es entre 0,05:1 y 1:5 (peso/peso).

9. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el agente formador de liposomas es un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado, preferentemente lecitina, y lo más preferentemente lecitina de soja.

20

10. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el agente tensioactivo está seleccionado de quelato, desoxicolato,

25

colesterol y hemisuccinato de colesterol.

11. La formulación de liposomas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los fragmentos de células de MTB-C son o comprenden
5 fragmentos de la pared celular.

12. La formulación de liposomas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende fragmentos de la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en la NCTC en Londres.

10

13. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, y lo más preferentemente todos de los siguientes:

(i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente
15 70 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el primer polipéptido tiene una huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv0350),

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

25 (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente

5
K

30 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el tercer polipéptido tiene una huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv 1866c), y

5 (iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el cuarto polipéptido tiene una huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv 3874), y

10 (i) un quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el quinto polipéptido tiene una huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv 3875).

15

14. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que está presente al menos uno de los siguientes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, o fragmento del mismo: HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B.

20

15. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o más ácidos micólicos y/o un micolato conjugado con azúcar, preferentemente dimicolato de trehalosa y/o un glucolípido, preferentemente lipoarabinomanano.

25

16. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente uno o más tensioactivos no iónicos.
- 5 17. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene adicionalmente una o más sales o una disolución de las mismas, por lo que la sal es preferentemente cloruro sódico.
- 10 18. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación de liposomas está liofilizada.
- 15 19. Una suspensión, en la que la formulación de liposomas de cualquiera de las reivindicaciones precedentes se reconstituye en un disolvente, en la que el disolvente es preferentemente acuosa, y más preferentemente es o comprende suero fisiológico.
- 20 20. Una composición farmacéutica que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 o la suspensión según la reivindicación 19, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 25 21. La formulación de liposomas según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 18, la suspensión según la reivindicación 19 o la composición farmacéutica según la reivindicación 20 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

27

22. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 21 para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de tuberculosis.
- 5 23. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 22, seleccionada de lo siguiente:
- (a) para su uso en un procedimiento de prevención de tuberculosis activa en individuos con una infección por tuberculosis latente;
 - 10 (b) para su uso en un procedimiento de profilaxis primaria de tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que se habían expuesto a la enfermedad, pero todavía no están infectados, o
 - (c) para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de tuberculosis latente.
- 15 24. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 para administración al cuerpo humano en una dosis que comprende 1 a 1000, preferentemente 3 a 250, más preferentemente 4 a 80, y lo más preferentemente aproximadamente 5, aproximadamente 25 o aproximadamente 50 μg /dosis de FCMtb.
- 20 25. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 para administración al cuerpo humano en una dosis de inoculación única de 25 μg de FCMtb.
- 25 26. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas

según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25 para su uso en terapia de combinación, que comprende preferentemente un antibiótico, más preferentemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, por lo que la ansamicina es lo más preferentemente rifampicina.

5

27. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas de la reivindicación 125 para su uso en terapia adyuvante.

10

28. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 27 para administración en terapia adyuvante a un sujeto humano VIH positivo.

15

29. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 25 para administración a un sujeto humano VIH negativo.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

recibidas por la Oficina Internacional el 19 de abril de 2012 (19/04/2012)

1. Una formulación de liposomas que comprende:
 - 5 (a) fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C),
 - (b) un agente formador de liposomas,
 - (c) 1 al 20% (peso/volumen) sacarosa, preferentemente 2 al 12%
10 (peso/volumen) de sacarosa, más preferentemente 3 al 8%
(peso/volumen) de sacarosa, y lo más preferentemente 4 al 6%
(peso/volumen) de sacarosa,
en la que el tamaño promedio en z de las partículas es 120 nm o menos.
2. La formulación de liposomas según la reivindicación 1, en la que el tamaño
15 promedio en z de las partículas está en el intervalo de 40 a 110 nm, más preferentemente de 55 a 95 nm.
3. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
en la que la formulación de liposomas es una emulsión, y en la que el tamaño
20 promedio en z de las partículas es preferentemente inferior a 40 nm.
4. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones
precedentes, en la que el índice de polidispersidad de las partículas es 0,4 o
menos, preferentemente 0,3.

5. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) es una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) virulenta, y preferentemente la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en la
- 5 NCTC en Londres.
6. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente
- (d) un agente tensioactivo
- 10 y/o
- (e) uno o más tensioactivos no iónicos.
7. La formulación de liposomas según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los fragmentos de células de MTB-C son o comprenden
- 15 fragmentos de la pared celular.
8. La formulación de liposomas según la reivindicación 6, en la que la relación entre (a) y (d) es entre 0,05:1 y 1:5 (peso/peso).
- 20 9. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el agente formador de liposomas es un fosfolípido hidrogenado, parcialmente hidrogenado o no hidrogenado, preferentemente lecitina, y lo más preferentemente lecitina de soja.
- 25 10. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8,

en la que el agente tensioactivo está seleccionado de colato, desoxicolato, colesterol y hemisuccinato de colesterol.

11. La formulación de liposomas según una cualquiera de las reivindicaciones
5 precedentes, que comprende fragmentos de la cepa de MTB-C NCTC 13536, depositada en 2010 en la NCTC en Londres.

12. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones
10 precedentes, que comprende al menos dos, preferentemente tres, más preferentemente cuatro, y lo más preferentemente todos de los siguientes:

- (i) un primer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el primer polipéptido tiene una
15 huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv 0350),
- (ii) un segundo polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el segundo
20 polipéptido tiene una huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934),
- (iii) un tercer polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el tercer polipéptido tiene una
25 huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la

proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (Rv 1866c), y

(iv) un cuarto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el cuarto polipéptido tiene una
5 huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína CFP10 de *M. tuberculosis* (Rv 3874), y

(i) quinto polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kDa como se mide tras electroforesis sobre un gel de dodecilsulfato de sodio (SDS)-poliacrilamida, en la que el quinto polipéptido tiene una
10 huella dactilar de la masa similar a una huella dactilar de la masa de la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Rv 3875).

13. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que está presente al menos uno de los siguientes antígenos
15 de *Mycobacterium tuberculosis*, o fragmento del mismo: HSP70, proteína de 38 kDa y Ag85B.

14. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende uno o más ácidos micólicos y/o un micolato
20 conjugado con azúcar, preferentemente dimicolato de trehalosa y/o un glucolípido, preferentemente lipoarabinomanano.

15. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente uno o más tensioactivos no
25 iónicos.

83

16. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene adicionalmente una o más sales o una disolución de la misma, por lo que la sal es preferentemente cloruro sódico.
- 5 17. La formulación de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación de liposomas está liofilizada.
18. Una suspensión, en la que la formulación de liposomas de cualquiera de las reivindicaciones precedentes se reconstituye en un disolvente, en la que el
10 disolvente es preferentemente acuosa, y más preferentemente es o comprende suero fisiológico.
19. Una composición farmacéutica que comprende la formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o la suspensión según la
15 reivindicación 18, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
20. La formulación de liposomas según una cualquiera o más de las reivindicaciones 1 a 17, la suspensión según la reivindicación 18 o la
20 composición farmacéutica según la reivindicación 19 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
21. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 20 para su uso en un procedimiento de tratamiento o
25 prevención de tuberculosis.

22. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 21, seleccionada de lo siguiente:

- a) para su uso en un procedimiento de prevención de tuberculosis activa en individuos con una infección por tuberculosis latente;
- 5 b) para su uso en un procedimiento de profilaxis primaria de tuberculosis con el fin de prevenir la infección de individuos que se habían expuesto a la enfermedad, pero todavía no están infectados, o
- c) para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de tuberculosis latente.

10

23. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 para administración al cuerpo humano en una dosis que comprende 1 a 1000, preferentemente 3 a 250, más preferentemente 4 a 80, y lo más preferentemente aproximadamente 5, 15 aproximadamente 25 o aproximadamente 50 μg /dosis de FCMtb.

24. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 para administración al cuerpo humano en una dosis de inoculación única de 25 pg de FCMtb.

20

25. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24 para su uso en terapia de combinación, que preferentemente comprende un antibiótico, más preferentemente uno o más de isoniazida y una ansamicina, por lo que la 25 ansamicina es lo más preferentemente rifampicina.



26. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas de la reivindicación 24 para su uso en terapia adyuvante.

5 27. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 26 para administración en terapia adyuvante a un sujeto humano VIH positivo.

10 28. La formulación, suspensión o composición farmacéutica de liposomas según la reivindicación 24 para administración a un sujeto humano VIH negativo.

RESUMEN

FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA PARA TRATAR O PREVENIR TUBERCULOSIS

5

La invención proporciona formulaciones de liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, también proporciona una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, fragmentos de la cual pueden incorporarse en realizaciones seleccionadas de la formulación de liposomas. La invención proporciona además suspensiones y composiciones farmacéuticas que comprenden las formulaciones de liposomas. Además, desvela el uso de las formulaciones de liposomas para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia, en particular para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de tuberculosis, tal como en la prevención de tuberculosis latente o en la prevención de tuberculosis, opcionalmente en terapia de combinación. La formulación de la presente invención contiene sacarosa y/o tiene un menor tamaño de partícula promedio que los agentes basados en liposomas convencionales de la terapia contra la tuberculosis, produciendo mayor biodisponibilidad y eficiencia.

10
15
20

Figuras:

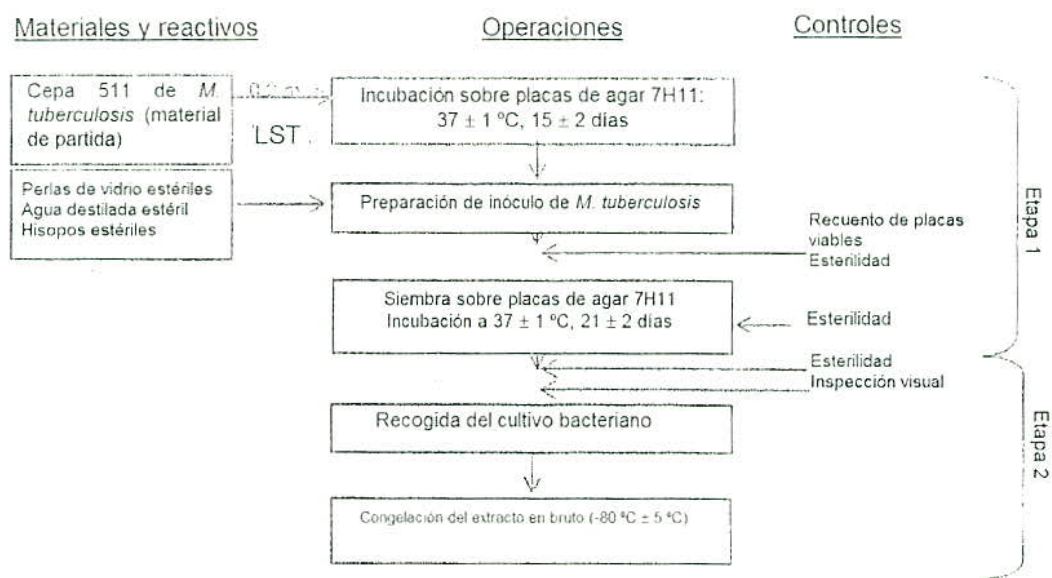


Figura 1

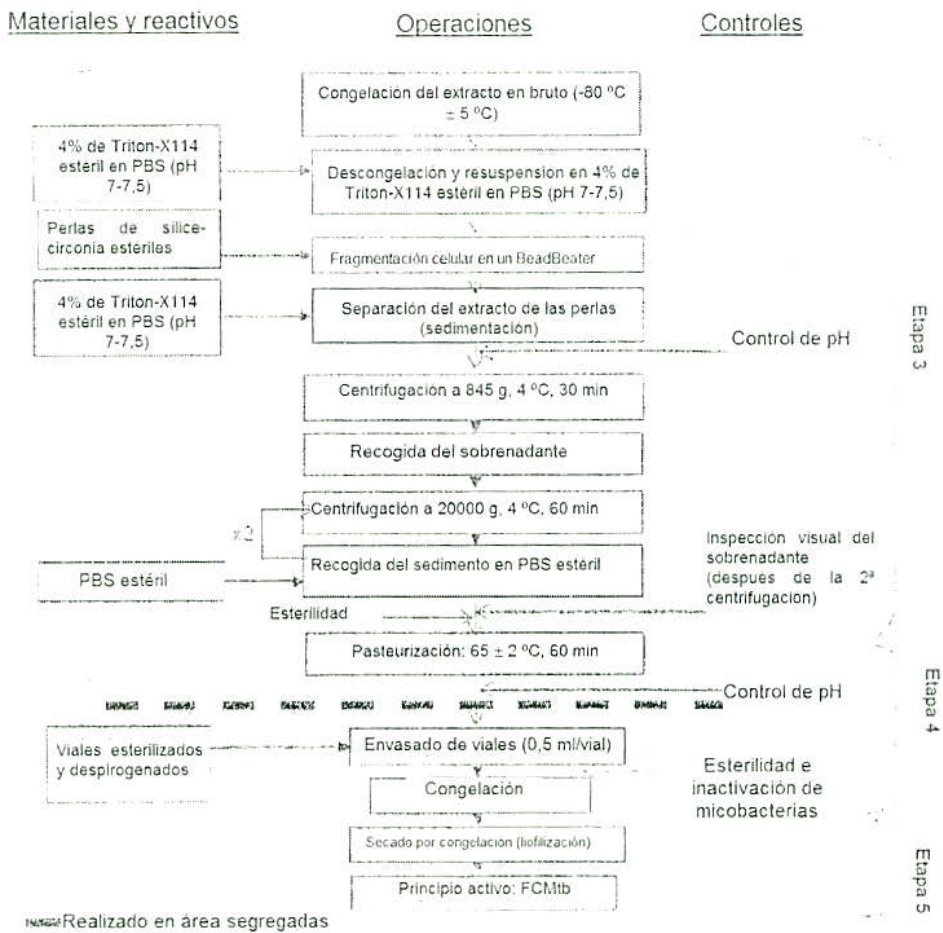


Figura 2

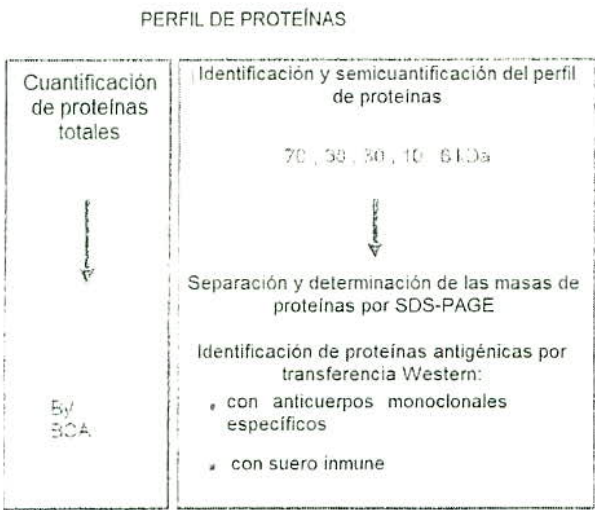


Figura 3

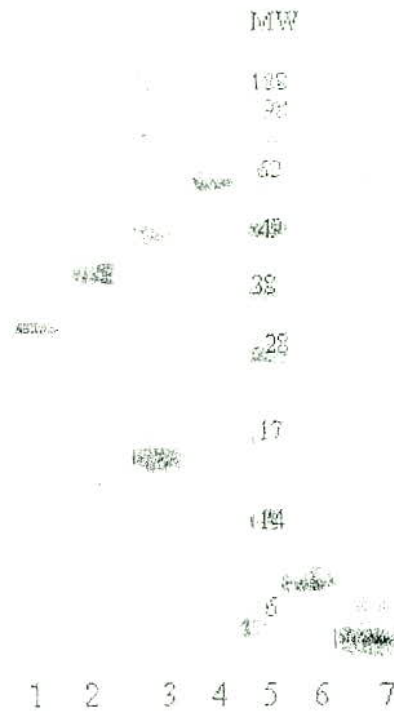


Figura 4

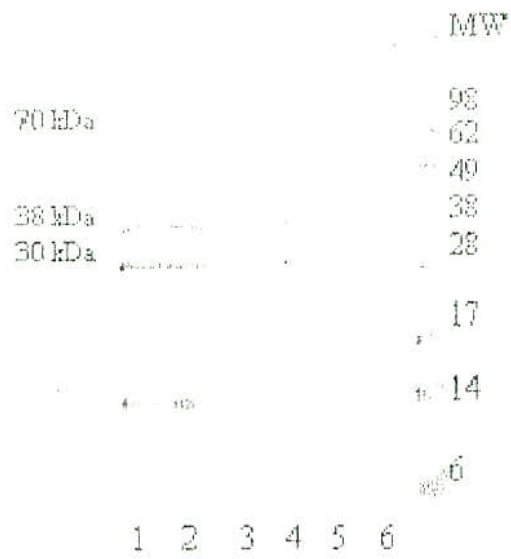


Figura 5a

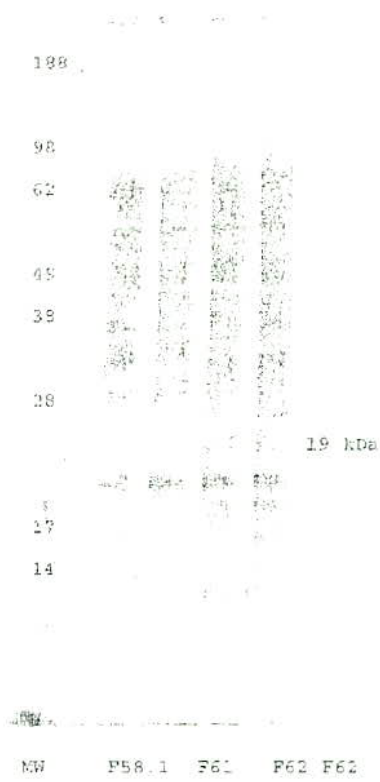


Figura 5b

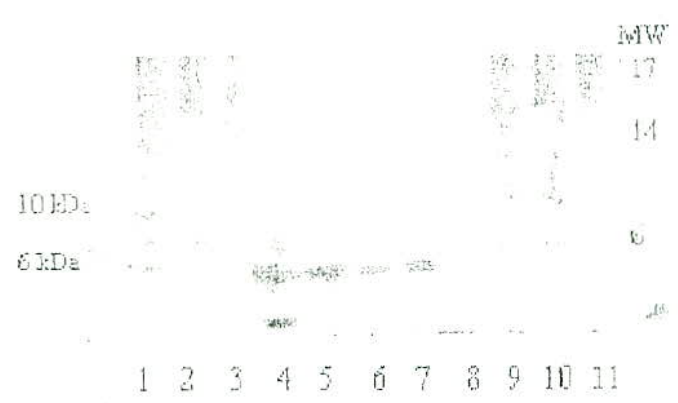


Figura 5c



Figura 5d

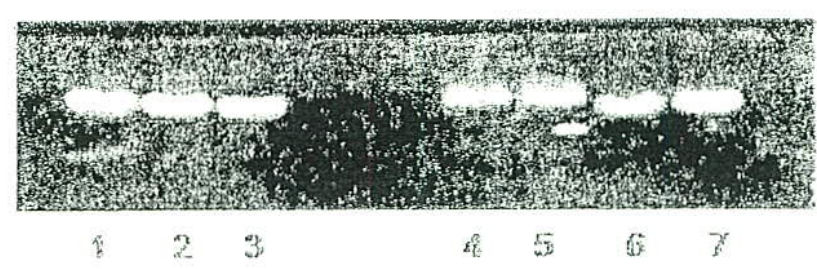


Figura 5e

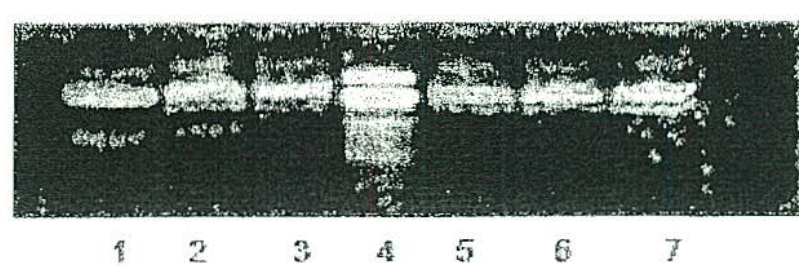


Figura 5f

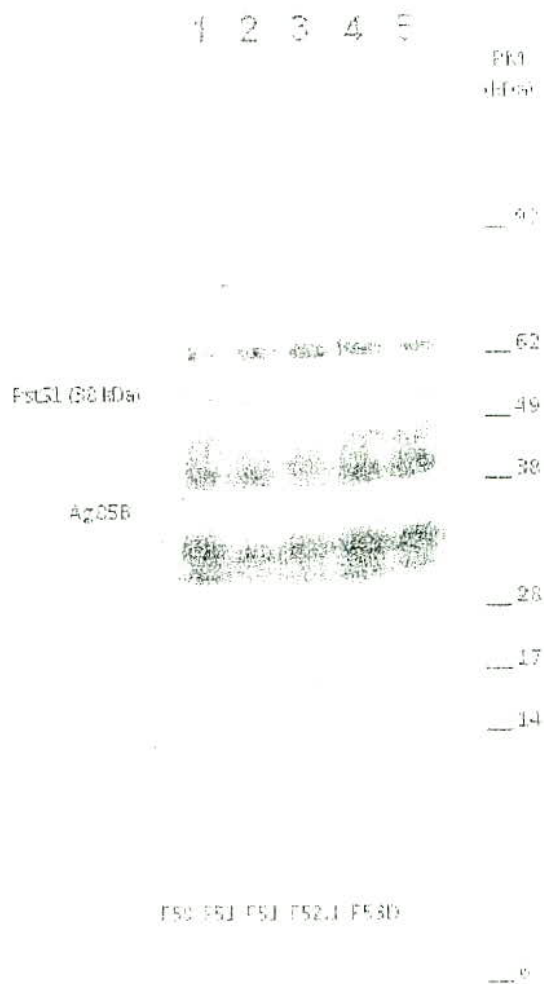


Figura 6

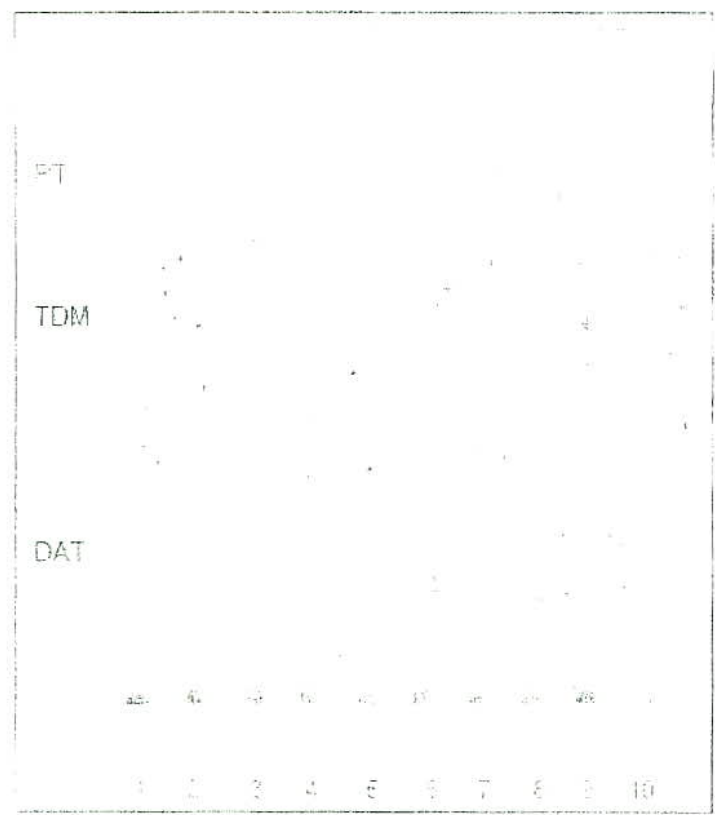


Figura 7a

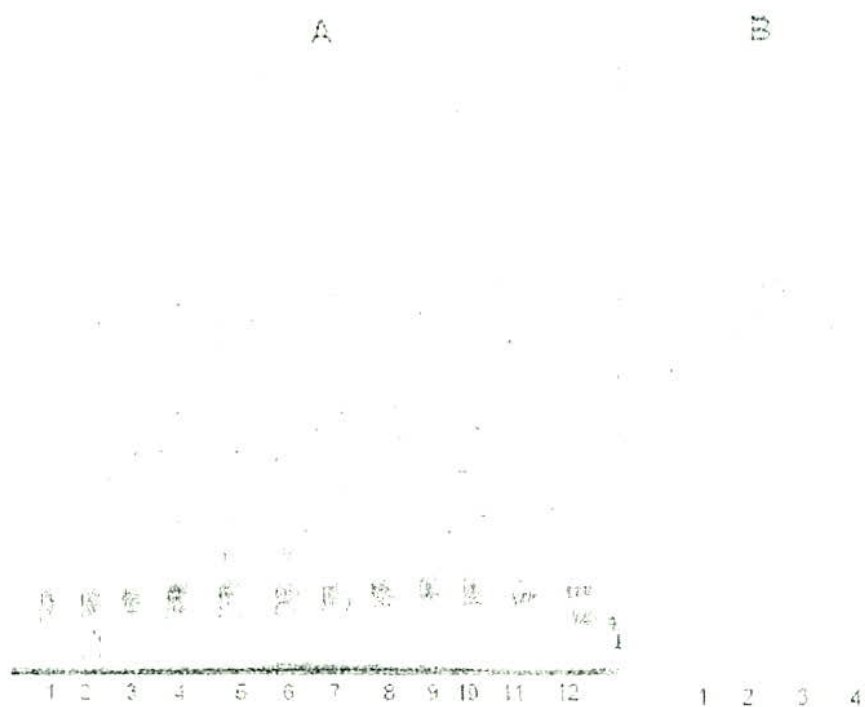
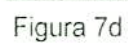


Figura 7b

A B C



Figura 7c



RELACIÓN (SFU/10⁵ células) / mediana basal

Vacunación → Diluida con API Vacuna RUTI, lote a10 Vacuna RUTI, lote a11

$p < 0.05$

RELACIÓN
(SFU/10⁶ células) / mediana basal

Vacunación Diluida con API Vacuna RUT1, lote a10

$p=0.05$

Figura 8



Figura 9

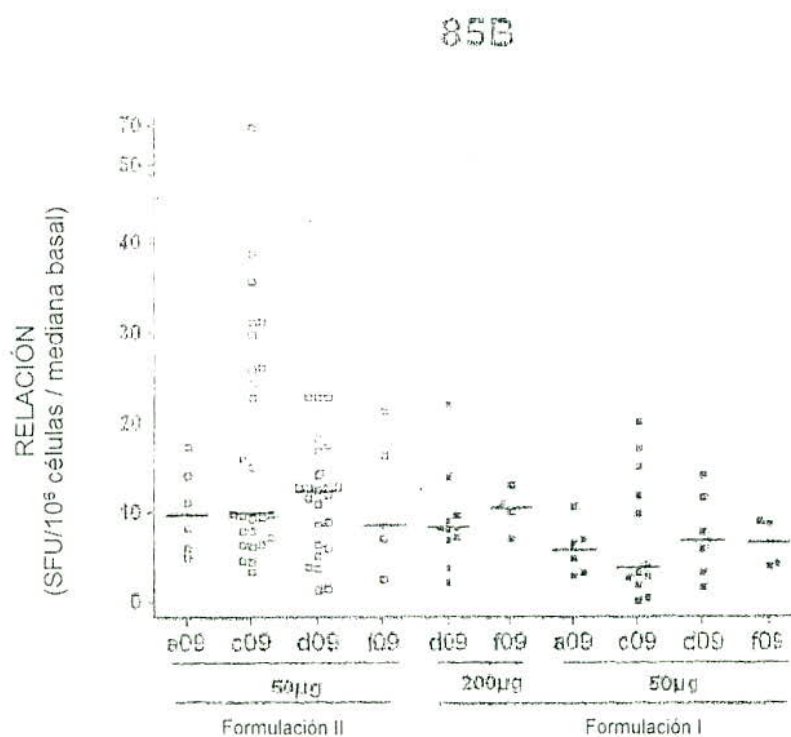
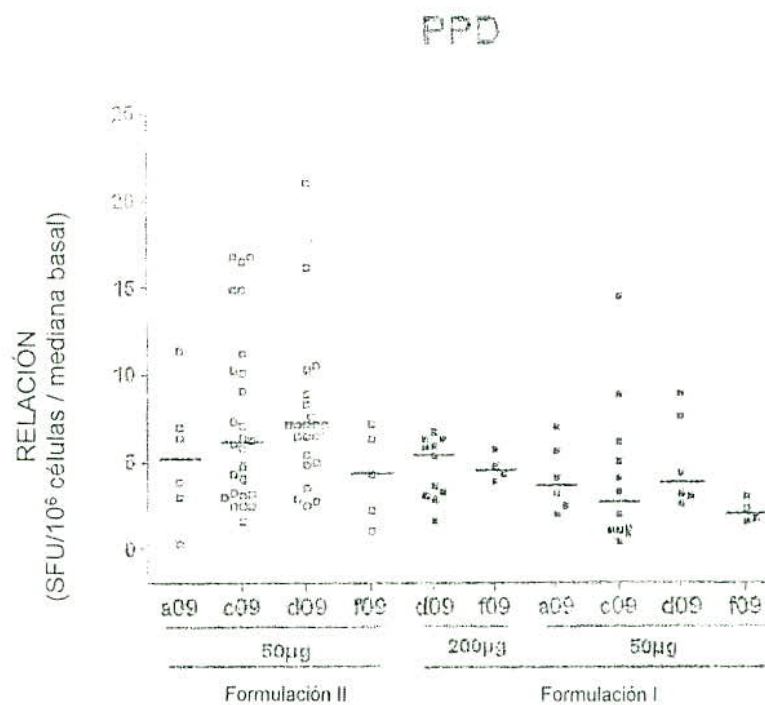


Figura 10a

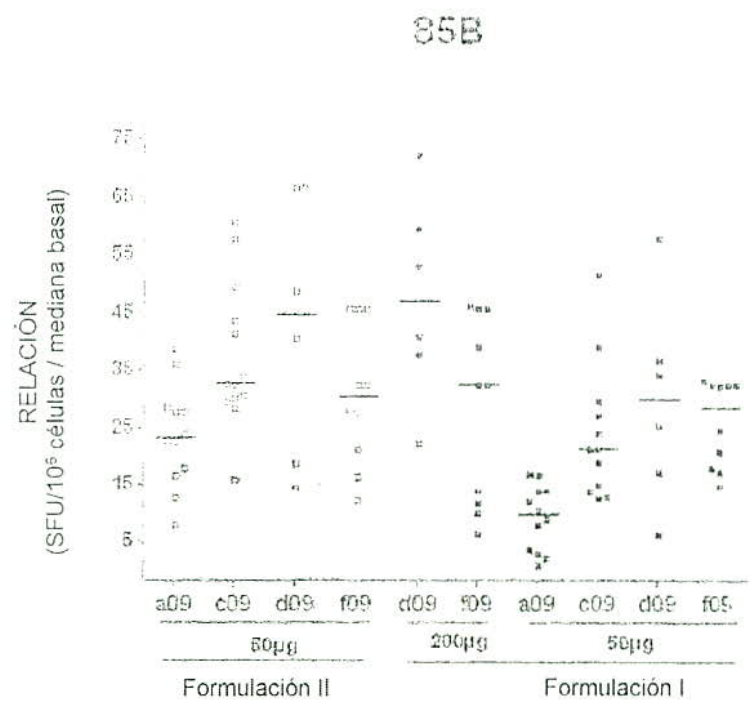
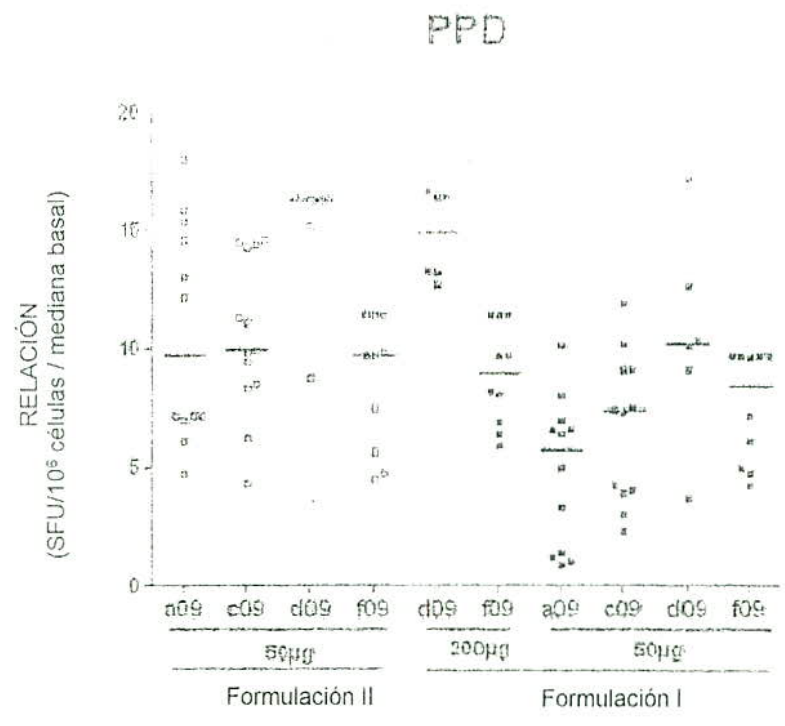


Figura 10b

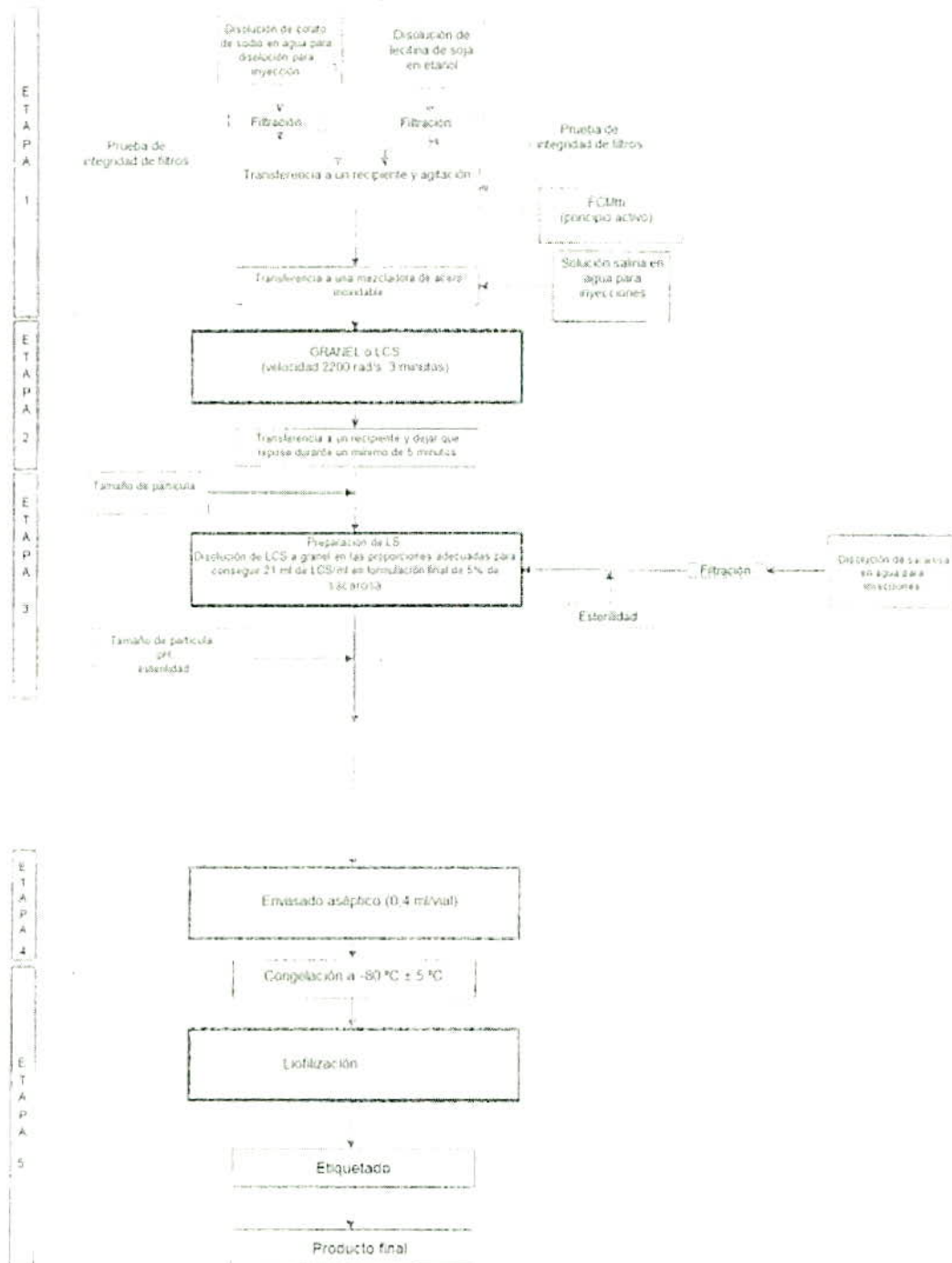


Figura 11

100

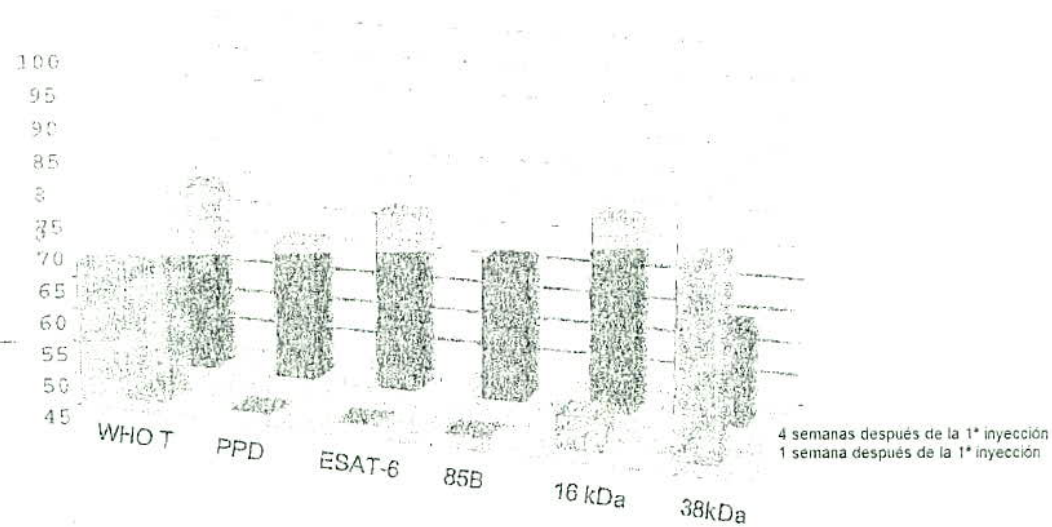


Figura 12

001

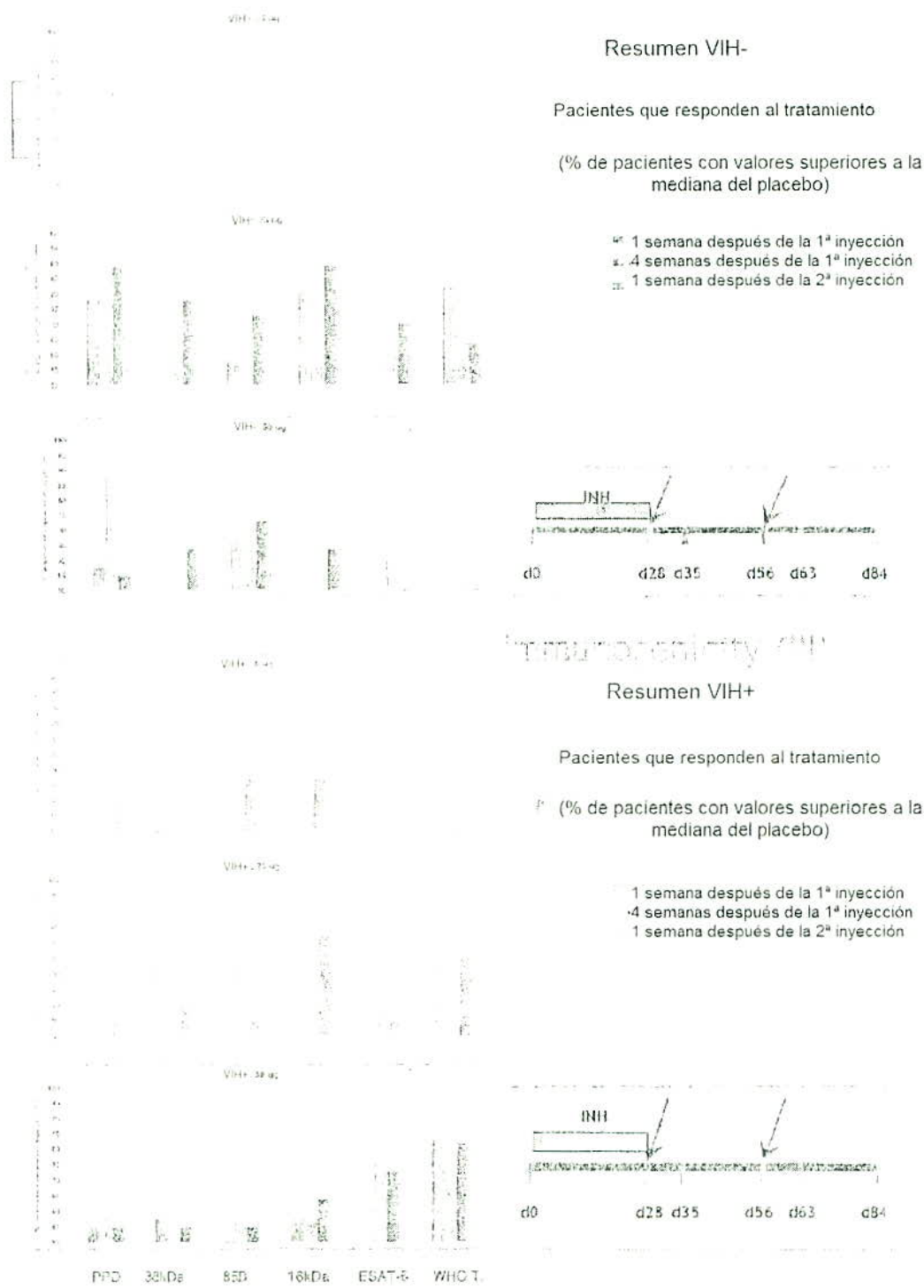


Figura 13

Figures:

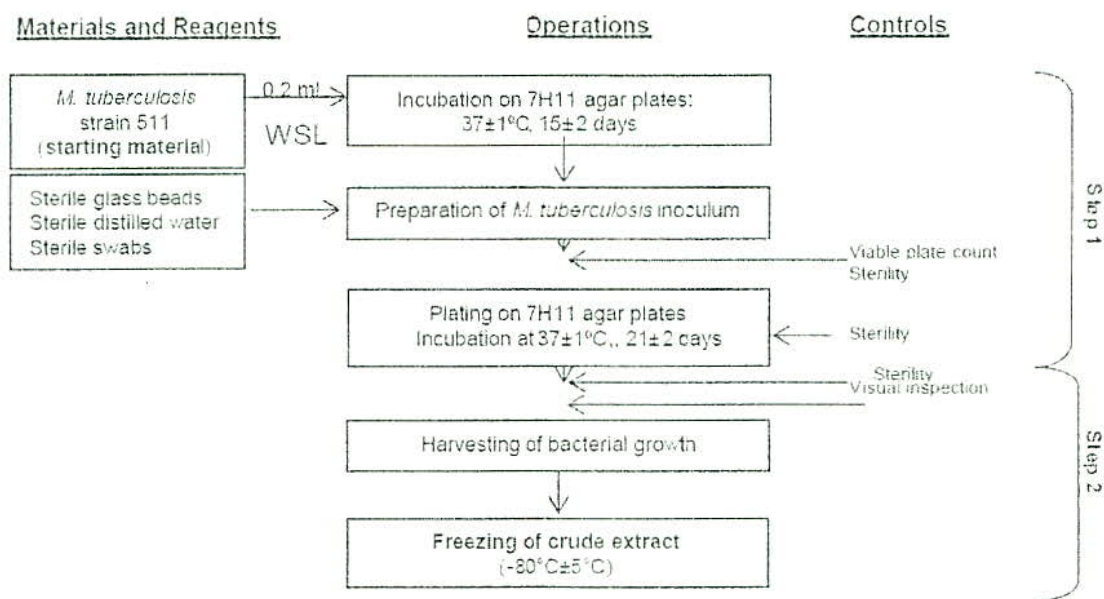


Figure 1

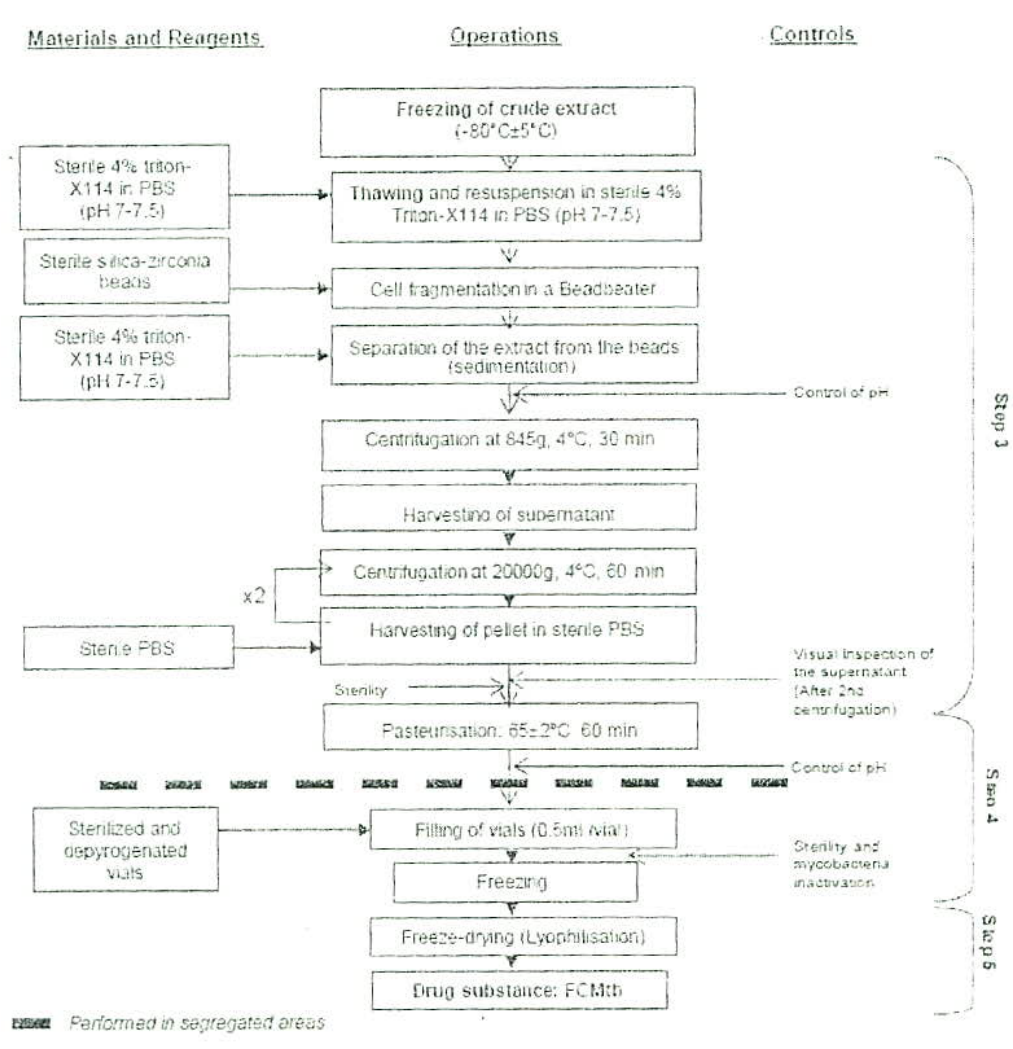


Figure 2

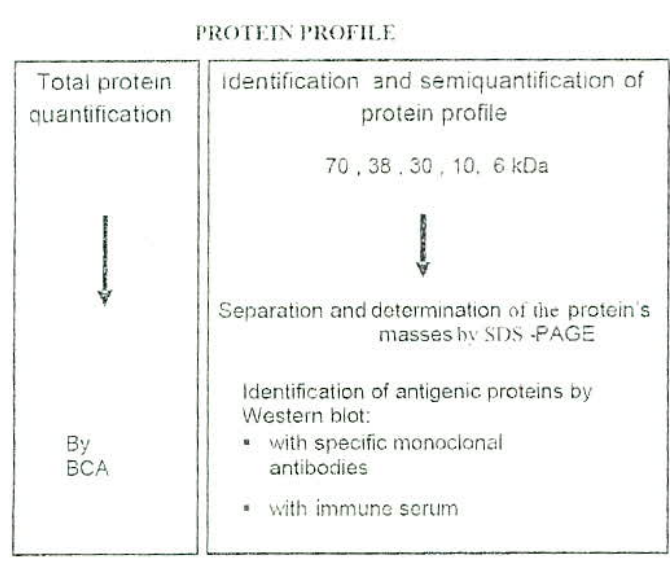


Figure 3

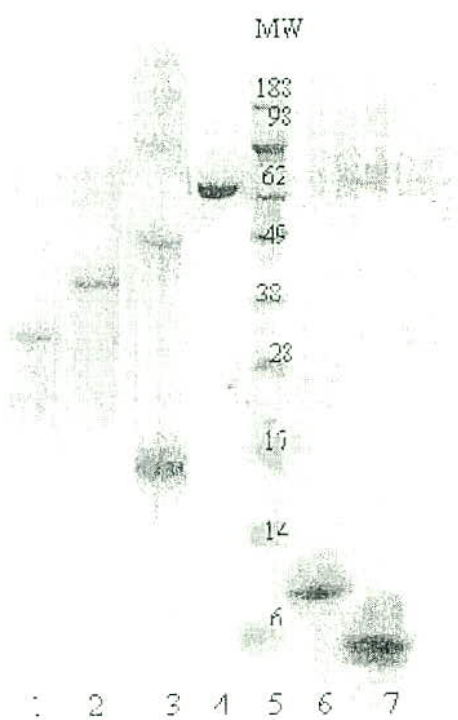


Figure 4

4/13

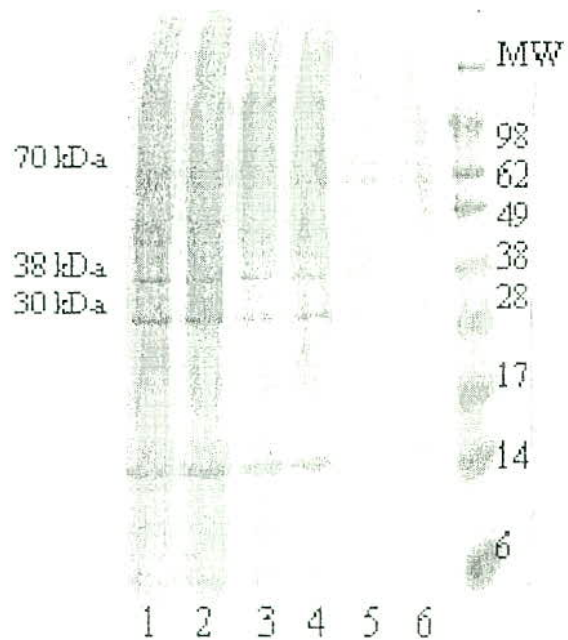


Figure 5a

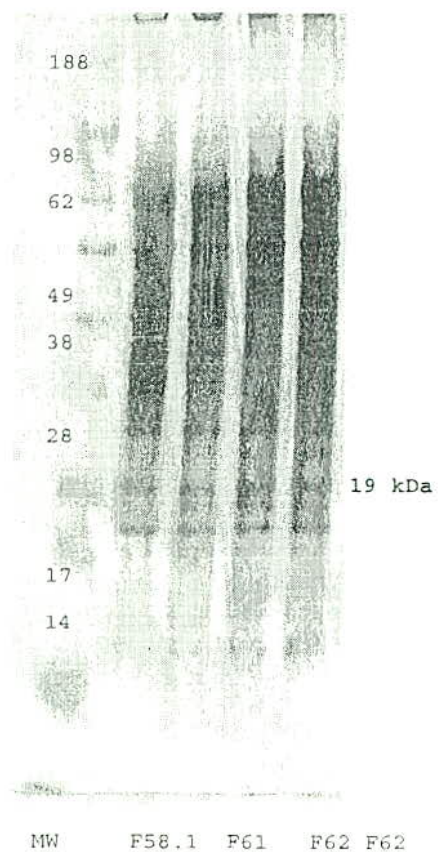


Figure 5b

5/13

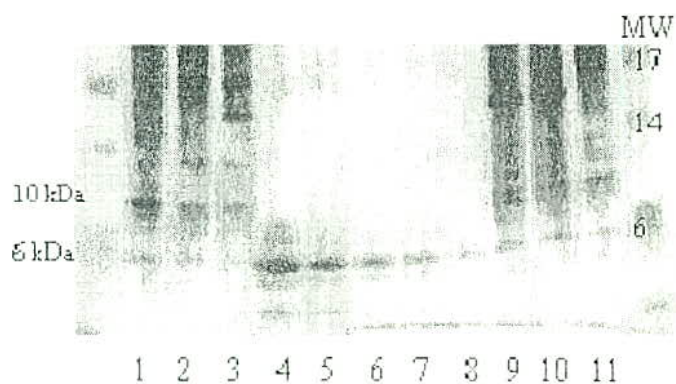


Figure 5c

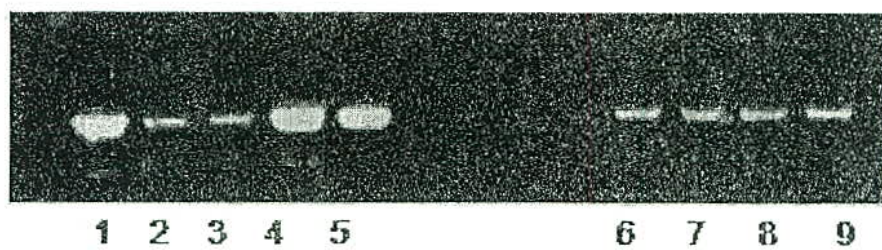


Figure 5d

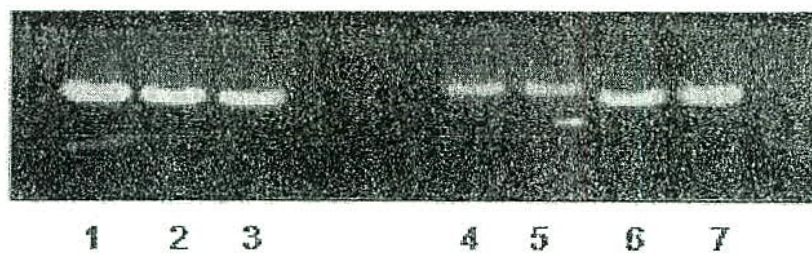


Figure 5e

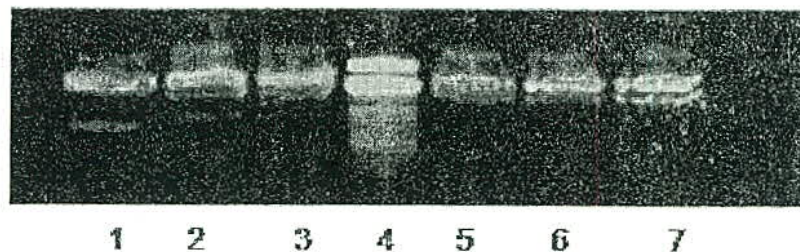


Figure 5f

107

6/13

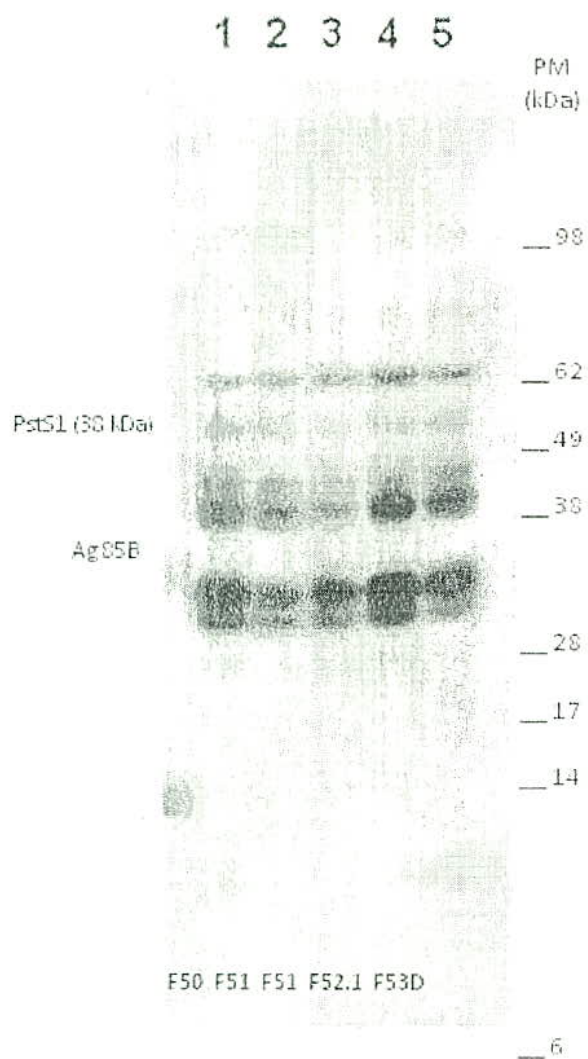


Figure 6

68

7/13

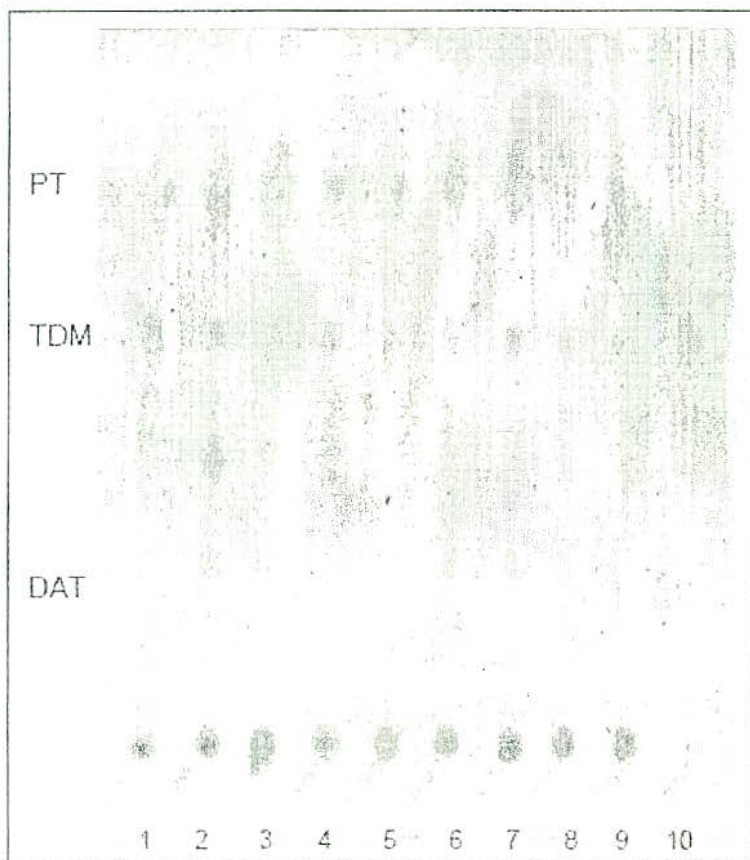


Figure 7a

8/13

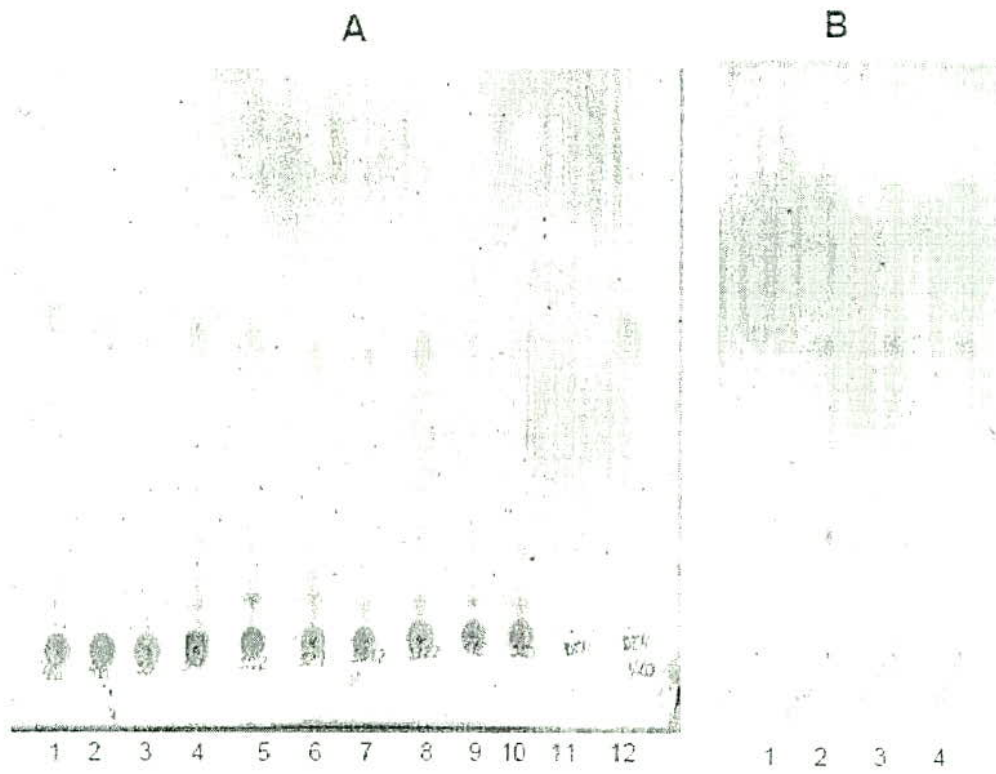


Figure 7b

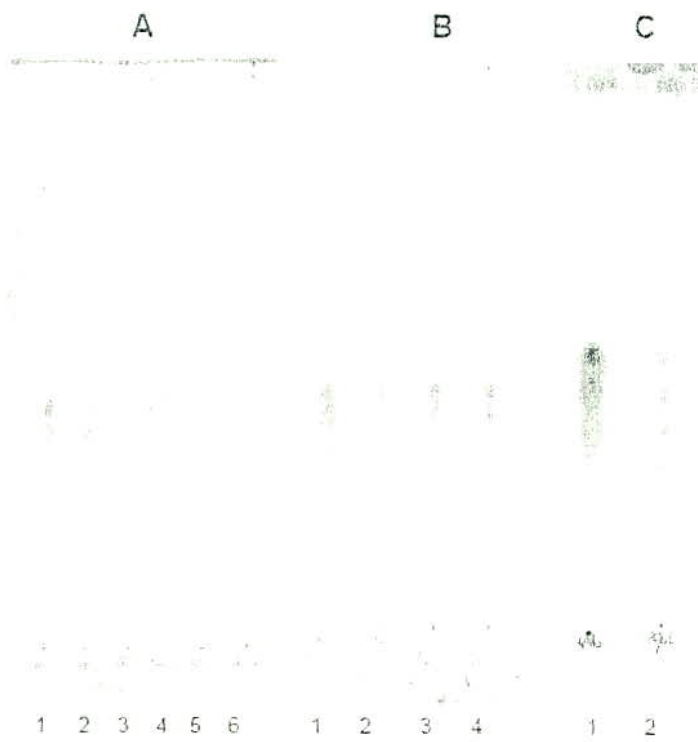


Figure 7c

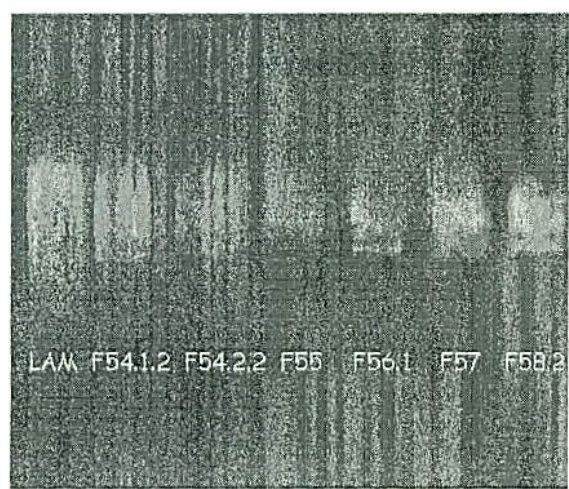


Figure 7d

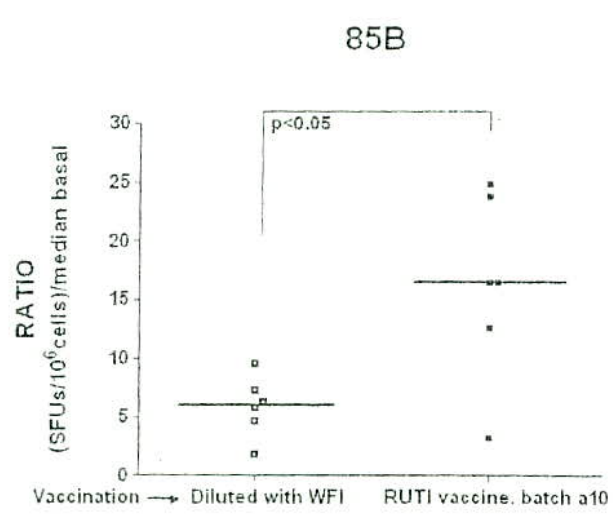
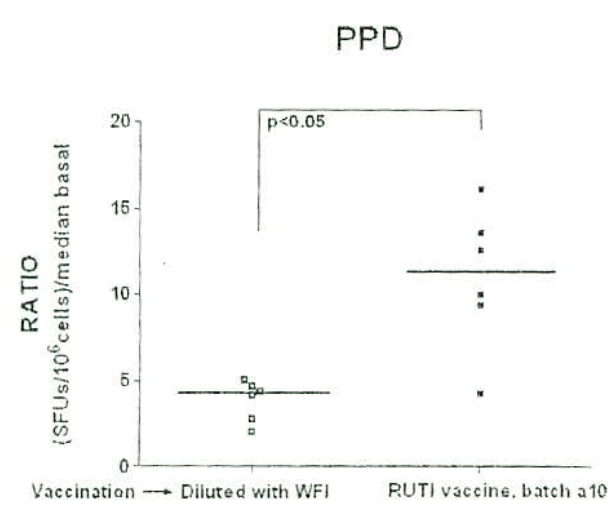


Figure 8

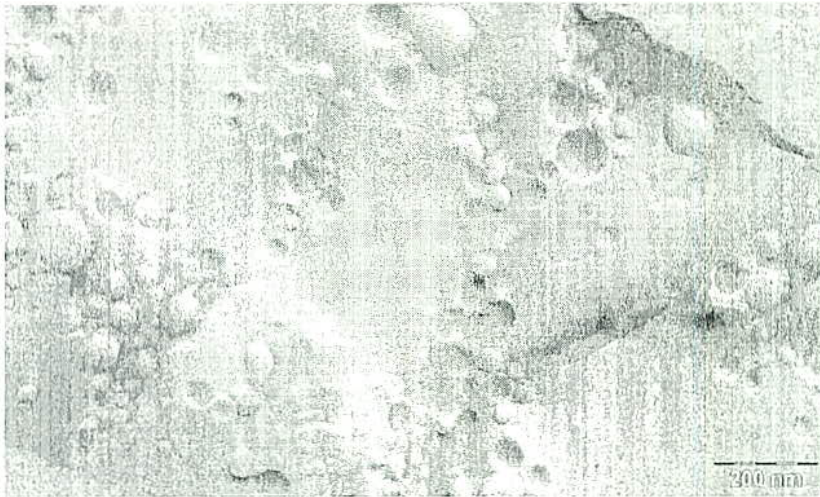


Figure 9

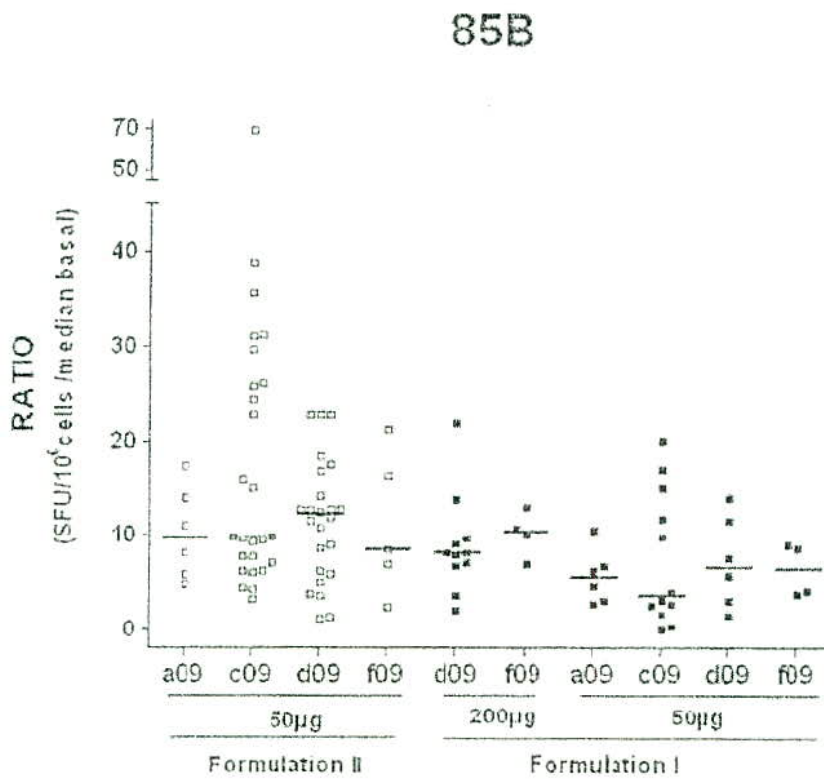
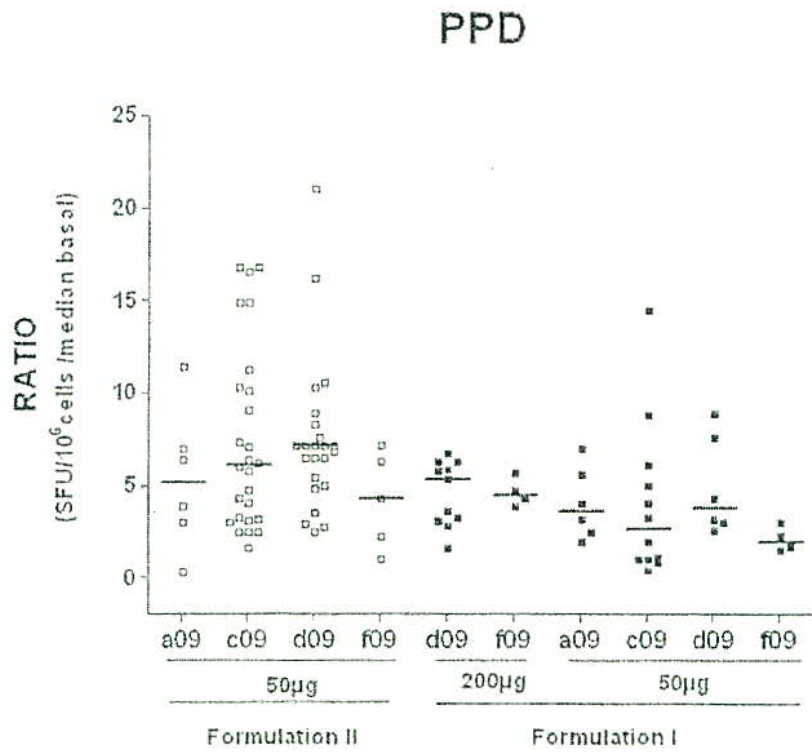
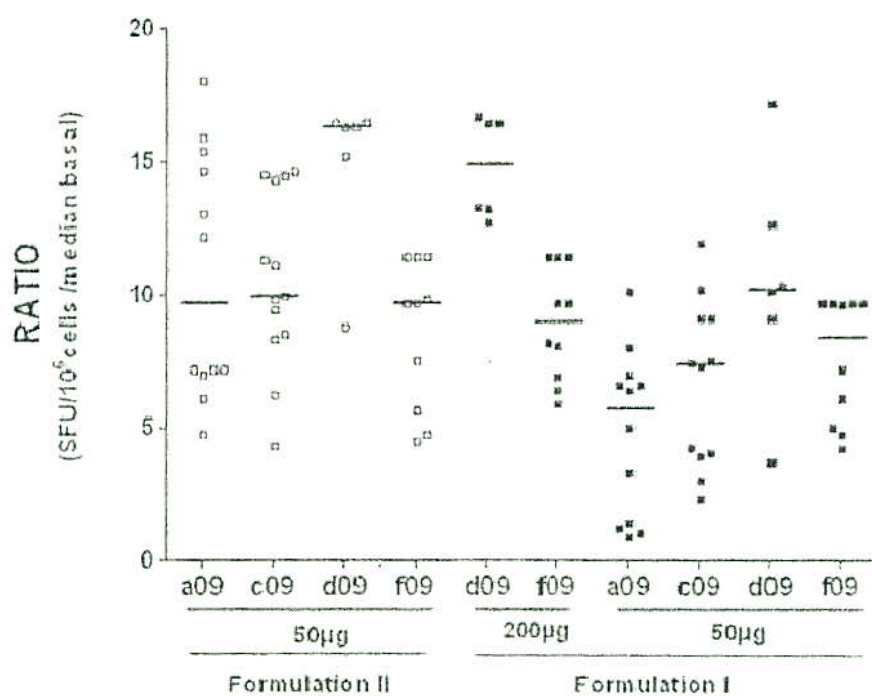


Figure 10a

12/13

PPD



85B

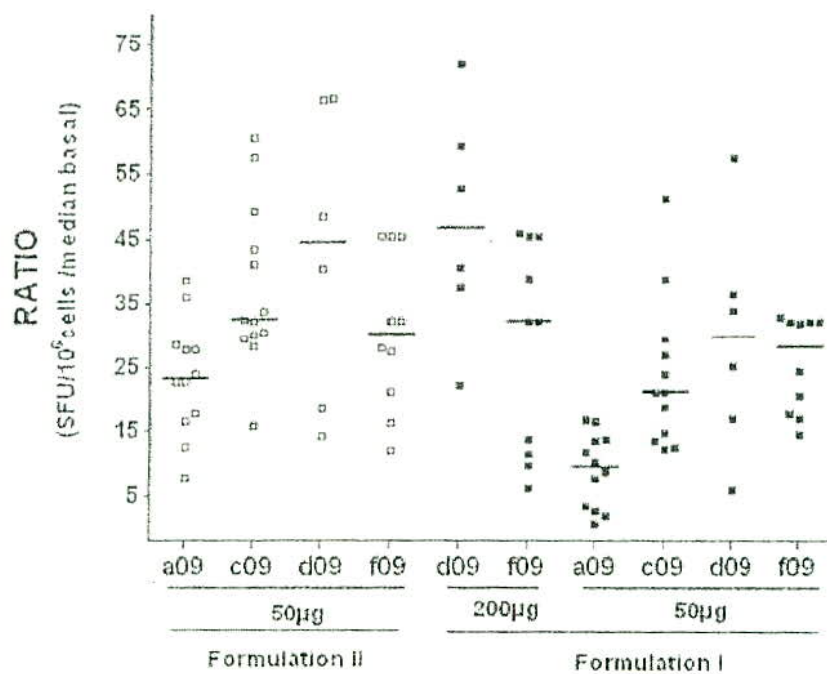


Figure 10b

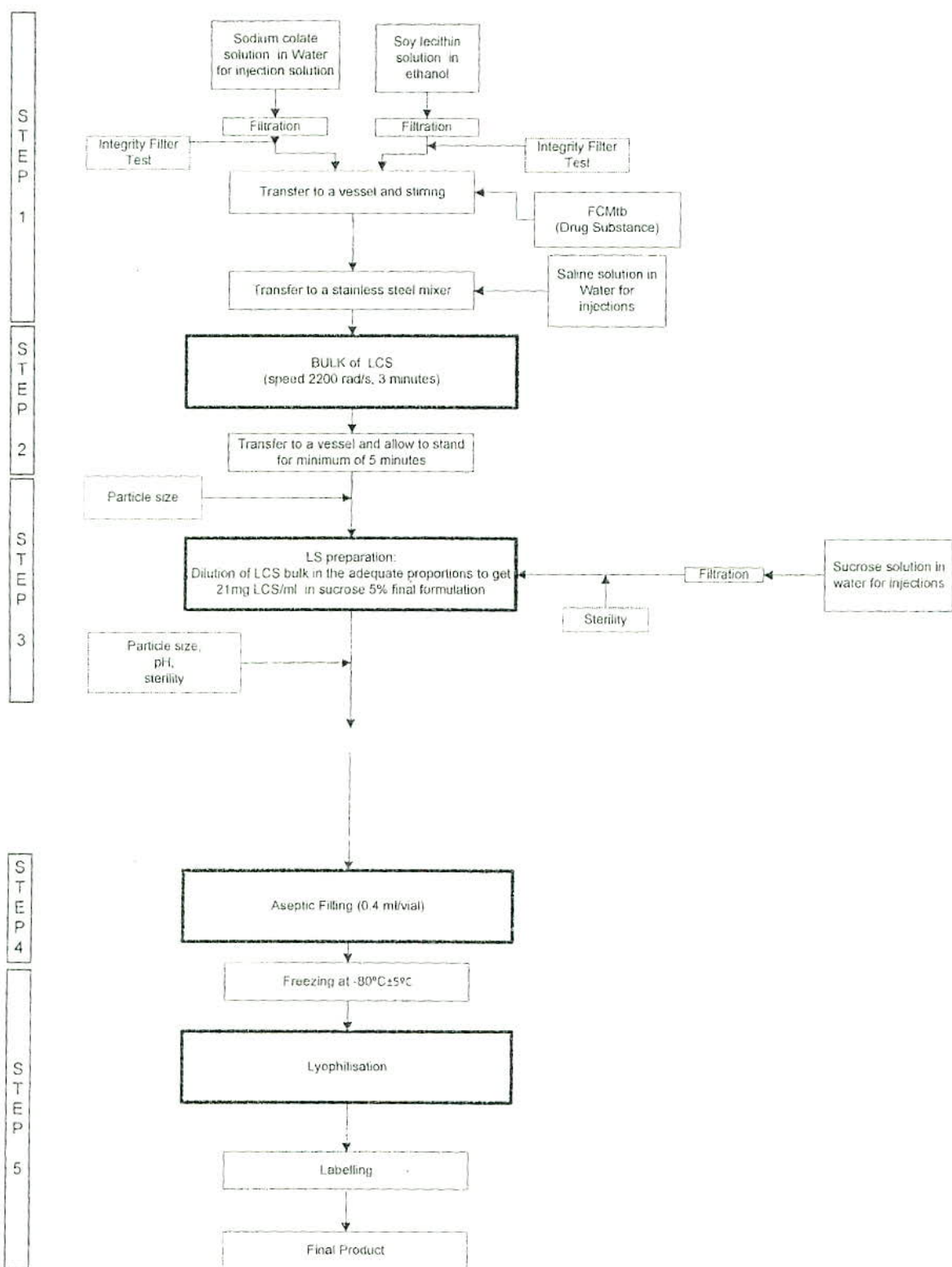


Figure 11

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

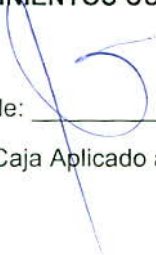
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0066153
		Bogotá D.C., Julio 04 de 2013 - 10:35:46

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA NI 800.020.909

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	49899	23/05/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	49900	23/05/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	49901	23/05/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	49902	23/05/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	49903	23/05/2013		90.000.00
RECIBO DE CA	999999999	49904	23/05/2013		90.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
18 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	540.000.00
			<u>\$540.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. Pc710P20121050080

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-158421- -00000-0000

Fecha: 2013-07-04 16:4:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 118

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea. 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 4 de 2013 - 10:35:46

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0057144

Bogotá D.C., Junio 12 de 2013 - 12:15:47

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA

NI 800.020.909

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532921281	12/06/2013	6.170.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-158421- -00000-0000

Fecha: 2013-07-04 16:4:11

Tra. 11 PATENTE IYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVAS CRE

Eve: 378 FASE NACIONAL I

Folios: 118

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 12 de 2013 - 12:15:50

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:			
(22) Fecha de solicitud:			
(51) Clasificación Internacional :			
(71) Solicitante(s) ARCHIVEL FARMA, SL			
(72) Inventor(es): CARDONA, Pere Joan; AMAT, Isabel; REYES, Blanca; SELGA, Ariadna; AMAT, Mercè			
(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País
	11150072.4	04/01/2011	EP
	11183487.5	30/09/2011	EP
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 04/08/2013		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 12/07/2012	
Fecha de presentación de la solicitud: 04/01/2012		No. Publicación: WO2012/093137 A1	
No. de solicitud PCT/EP2012/050080			

(54) Título **FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA PARA TRATAR O PREVENIR LA TUBERCULOSIS**

(57) Resumen: Formulaciones de liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, también proporciona una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, fragmentos de la cual pueden incorporarse en realizaciones seleccionadas de la formulación de liposomas. La invención proporciona además suspensiones y composiciones farmacéuticas que comprenden las formulaciones de liposomas. Además, desvela el uso de las formulaciones de liposomas para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o **CONTINUA AL RESPALDO**



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante (s)

ARCHIVEL FARMA, SL

(72) Inventor(es):

CARDONA, Pere Joan; AMAT, Isabel; REYES, Blanca; SELGA, Ariadna; AMAT, Mercè

(74) Apoderado:

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		11150072.4		04/01/2012		EP
		11183487.5		30/09/2012		EP

(85) Fecha inicio fase nacional:

04/08/2013

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 04/01/2012

No. de solicitud PCT/EP2012/050080

(87)

Publicación internacional

Fecha: 12/07/2012 (dd/mm/aa)

N° publicación: WO2012/093137 A1

(54) Título

FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA PARA TRATAR O PREVENIR LA TUBERCULOSIS

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:		(51) Int Cl: (71) Solicitante (s) ARCHIVEL FARMA, SL	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	11150072.4	04/01/2011	EP
	11183487.5	30/09/2011	EP
		(72) Inventor(es) CARDONA, Pere Joan AMAT, Isabel REYES, Blanca SELGA, Ariadna AMAT, Mercè	
		(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:		04/08/2013	
Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		(87) Publicación Internacional	
Fecha de presentación de la solicitud		Fecha: Fecha (dd/mm/aa)	
No. de solicitud: PCT/EP2012/050080		12/07/2012	
		N° publicación: WO2012/093137 A1	
(54) Titulo: FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ADECUADA PARA TRATAR O PREVENIR LA TUBERCULOSIS			

Resumen

Formulaciones de liposomas que comprenden fragmentos de una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, también proporciona una cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, fragmentos de la cual pueden incorporarse en realizaciones seleccionadas de la formulación de liposomas. La invención proporciona además suspensiones y composiciones farmacéuticas que comprenden las formulaciones de liposomas. Además, desvela el uso de las formulaciones de liposomas para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia, en particular para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de tuberculosis, tal como en la prevención de tuberculosis latente o en la prevención de tuberculosis, opcionalmente en terapia de combinación. La formulación de la presente invención contiene sacarosa y/o tiene un menor tamaño de partícula promedio que los agentes basados en liposomas convencionales de la terapia contra la tuberculosis, produciendo mayor biodisponibilidad y eficiencia.

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-158421- -00000-0000

Fecha: 2013-07-04 16:4:11

Dep. 2020 DIR.NUEVASCRE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 118 119

PI02-F08 (2009-11-18)