



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112013017267-3 B1**



**(22) Data do Depósito: 04/01/2012**

**(45) Data de Concessão: 22/06/2021**

**(54) Título:** FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

**(51) Int.Cl.:** A61K 9/127; A61K 47/26; A61K 39/04; A61P 31/06; A61K 31/06.

**(30) Prioridade Unionista:** 04/01/2011 EP 11150072.4; 30/09/2011 EP 11183487.5.

**(73) Titular(es):** ARCHIVEL FARMA, SL.

**(72) Inventor(es):** PERE JOAN CARDONA IGLESIAS; ISABEL AMAT RIERA; BLANCA REYES; ARIADNA SELGA; MERCÉ AMAT.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2012050080 de 04/01/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2012/093137 de 12/07/2012

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 04/07/2013

**(57) Resumo:** FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. A invenção se refere a formulações de lipossomas compreendendo fragmentos de uma cepa do complexo Mycobacterium tuberculosis, também se refere a uma cepa do complexo Mycobacterium tuberculosis, cujos fragmentos podem ser incorporados em configurações selecionadas da formulação de lipossomas. A invenção se refere ainda a suspensões e composições farmacêuticas compreendendo as formulações de lipossomas. Além disso, descreve o uso das formulações de lipossomas para uso em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia, em particular para uso em um método para tratar ou evitar a tuberculose, tal como na prevenção da tuberculose latente ou na profilaxia da tuberculose, opcionalmente em uma terapia de combinação. A formulação da presente invenção contém sacarose e/ou tem um tamanho médio de partícula menor do que os agentes convencionais com base em lipossomas para a terapia da tuberculose, resultando em uma maior biodisponibilidade e eficiência.

FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO E COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA

INTRODUÇÃO E ANTECEDENTES

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere a formulações de lipossomas compreendendo fragmentos de uma cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, bem como a suspensões e a composições farmacêuticas compreendendo tais formulações e à sua respectiva utilização em um método de tratamento,  
10 particularmente para o tratamento ou prevenção da tuberculose. A formulação da presente invenção contém sacarose e/ou tem um tamanho médio de partícula menor do que os agentes convencionais com base em lipossomas para a terapia da tuberculose, resultando em uma maior  
15 biodisponibilidade e eficiência.

ANTECEDENTES

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), que inclui as espécies de *Mycobacterium M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microtie* *M. africanum*. A principal  
20 característica singular do envelope celular das micobactérias é a sua parede celular espessa e cerosa. As propriedades da barreira da parede celular também contribuem para a sobrevivência intracelular do organismo, agindo como  
25 modulador direto nas reações imunológicas entre o hospedeiro e os bacilos do MTB-C. O envelope é composto por duas partes distintas, a membrana plasmática e, em torno desta, a parede. A parede celular é um esqueleto formado por uma estrutura de peptidoglicano ligada covalentemente com um polissacarídeo de  
30 cadeia ramificada, a arabinogalactana, ligados por ligações fosfodiéster. As extremidades distais das arabinogalactanas são esterificadas com ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos, com dimensões e estruturas únicas para

micobactérias.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 9.000.000 de novos casos de pessoas que manifestam a doença são registrados no mundo a cada ano e cerca de 2 milhões de pessoas morrem. Considera-se que existem mais de 2.700 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e que a cada ano surgem mais 90 a 100 milhões de novas infecções.

Várias vacinas contra a tuberculose com base em fragmentos da parede celular de cepas virulentas ou não virulentas de *Mycobacterium* estão descritas no estado da técnica. A vacina que é utilizada atualmente para o tratamento preventivo contra a tuberculose é baseada em bactérias da cepa chamada de BCG (Bacilo de Calmette-Guerin), uma variante atenuada do *M. bovis*. Sabe-se também que o adjuvante utilizado na composição da vacina pode influenciar grandemente a sua eficácia.

Micolatos de trealose, particularmente dimicolato de trealose, são os lipídios mais bioativos em extratos de *M. tuberculosis*, induzindo uma cascata pró-inflamatória que influencia a formação de granulomas. Deve-se notar que não existem dados bibliográficos sobre a quantidade destes compostos presentes na parede celular de *M. tuberculosis*. Qualquer amostra derivada desta espécie tem uma complexidade biológica elevada. Portanto, para realizar uma análise quantitativa, são necessárias etapas de purificação agressivas, complexas e longas, que resultariam em quantidades do composto purificado muito pequenas para realizar análises estruturais adicionais. Esta é a razão pela qual não existem dados publicados sobre a percentagem exata de cada composto na parede celular de *M. tuberculosis*. Vários glicolipídios são constituintes típicos de células do MTB-C, tal como a lipoarabinomanana. A lipoarabinomanana está associada com a virulência do MTB-C.

E. Ribí et al., Nature 1963, 198, páginas 1214-1215, descrevem os ensaios de imunização realizados com uma composição compreendendo fragmentos da parede celular da cepa não virulenta do Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) e óleo mineral. Tais fragmentos são obtidos por homogeneização de uma cultura da referida cepa em óleo mineral. A composição é mais eficaz do que a vacina convencional (BCG). No entanto, é descrito no mesmo artigo, que os fragmentos da parede celular não induzem qualquer resposta imunológica quando estes são obtidos por homogeneização em água e na ausência do óleo mineral.

D.P. Pal et al., Indian J. Med. Res., 1977, 65, páginas 340 a 345, descrevem uma vacina preparada com fragmentos da parede celular da cepa virulenta H37Rv e óleo mineral. Neste caso, os fragmentos da parede celular são obtidos por meio de homogeneização das células mortas em fase aquosa, e o óleo mineral é subsequentemente adicionado à composição. Também é descrito que os fragmentos da parede celular homogeneizados em fase aquosa não são imunogênicos e que a presença de óleo mineral é necessária para que a vacina seja eficaz.

G.K. Khuller et al., Folia Microbiol., 1992, 37, páginas 407 a 412, descrevem a eficácia protetora de diferentes frações da parede celular da cepa H37Ra não virulenta de *M. tuberculosis* formulado com adjuvante incompleto de Freund, que também inclui óleo mineral.

E.M. Agger et al., Scand. J. Immunol., 2002, 56, páginas 443 a 447, descrevem vacinas compreendendo fragmentos da parede celular da cepa H37Rv virulenta, que são eficazes quando incluem o surfactante catiônico brometo de dimetildioctadecil amônio com adjuvante. Também é descrito que os ensaios realizados com bacilos de *M. Tuberculosis* homogeneizados que não contêm o adjuvante mencionado não

geram níveis de resistência contra a tuberculose no modelo de rato.

I.M. Orme Vaccine, 2006, 24, páginas 2-19, que é um artigo de revisão sobre vacinas contra a tuberculose, 5 descreve que a vacina convencional com base no Bacilo Calmette-Guerin (BCG) é essencialmente ineficaz na proteção das pessoas adultas contra a tuberculose.

Indivíduos que podem se beneficiar de um tratamento ou profilaxia relacionada à tuberculose podem ser agrupados 10 nos quatro subgrupos seguintes:

I. Indivíduos que não estão expostos à doença. A vacinação profilática pode prevenir a infecção de tal indivíduo.

15 II. Indivíduos que estão expostos à doença, mas ainda não estão infectados. O teste tuberculínico de pele (TST) é negativo. A profilaxia primária pode prevenir a infecção de tais indivíduos.

20 III. Indivíduos com tuberculose latente que não estão doentes. O risco do surto da doença pode ser reduzido através da aplicação de quimioterapia. A quimioterapia também proporciona a vantagem de que estes indivíduos, basicamente, deixam de ser fontes de alto risco de infecção.

25 IV. Indivíduos que estão doentes, ou seja, que sofrem da doença, geralmente com formas primárias da doença, mas que são pouco ou não são contagiosos. A quimioterapia evita que esses indivíduos se tornem contagiosos.

Uma vez que a infecção tenha começado, o estado da técnica descreve vários tratamentos para evitar o desenvolvimento da tuberculose ativa em indivíduos 30 infectados, ou seja, indivíduos com tuberculose latente.

Por exemplo, no pedido de patente EP2196473 A1, descreve que, para o tratamento da tuberculose em indivíduos infectados, tanto aqueles que ainda não desenvolveram a

doença, bem como aqueles que já desenvolveram a doença, podem ser administrados vários fármacos, incluindo a isoniazida, durante um período que se estende por vários meses.

No pedido de patente ES 2231037 A1 é descrita a  
5 utilização de um agente imunoterápico que compreende fragmentos de células de uma cepa virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) para a preparação de um medicamento para o tratamento de tuberculose em indivíduos infectados em combinação com outros fármacos, como a  
10 isoniazida ou a rifampicina. Este pedido de patente também descreve um método para a preparação de um agente imunoterápico compreendendo fragmentos de parede celular de uma cepa de MTB-C.

Conforme descrito no documento WO 2010/031883 A1, a  
15 transmissão da infecção por tuberculose latente ocorre principalmente através da respiração de aerossóis infectados com *M. tuberculosis*. Portanto, pessoas em contato direto com pacientes que sofrem de tuberculose pulmonar e, portanto, capazes de disseminar aerossóis contaminados, tal como  
20 pessoas que vivem juntas ou têm qualquer outro tipo de contato intenso ou frequente, são considerados um grupo de risco.

Atualmente, a profilaxia primária da infecção que é administrada normalmente a indivíduos do grupo I (conforme  
25 descrito acima) é uma quimioprofilaxia primária com base na administração diária de isoniazida em uma dose de 5 mg/kg sem exceder 300 mg/dia. Este tratamento é indicado para todos os indivíduos de qualquer idade que são negativos para TST, que vivem juntos e/ou têm qualquer outro tipo de contato próximo  
30 com pessoas infectadas. Neste caso, a quimioprofilaxia precisa ser mantida durante três meses após ter cessado o contato com a fonte de infecção, ou após a fonte ter cessado de ser infecciosa. No entanto, a quimioprofilaxia pode, em

alguns casos, causar efeitos secundários indesejados, tal como descrito por Martinez *et al.*, Arch. Bronchoneumol., 2005, 41(1), páginas 27-33.

5 Medicamentos compreendendo fragmentos de uma cepa virulenta do complexo *M. tuberculosis* (MTB-C) foram descritos, por exemplo, em EP1690549 B1, EP2090318 A1 e PCT/ES2009/000436. EP2090318 A1 e PCT/ES2009/000436 descrevem composições farmacêuticas compreendendo fragmentos de uma  
10 cepa virulenta do complexo *M. tuberculosis* (MTB-C) para uso como um medicamento adequado para a prevenção profilática da tuberculose, opcionalmente em combinação com outros fármacos. Por outro lado, EP1690549 B1 descreve composições farmacêuticas apropriadas para o tratamento da tuberculose, compreendendo fragmentos de MTB-C, opcionalmente em  
15 combinação com outros fármacos.

Foi relatado no pedido de patente EP 2090318 A1 que a administração de um fármaco compreendendo um agente baseado em fragmentos de parede celular de uma cepa virulenta do MTB-C é capaz de induzir a geração de uma resposta de interferon- $\gamma$  do tipo Th1 contra antígenos específicos da *M. tuberculosis*. Tais antígenos incluem Ag85B e Ag85A, que são parte do complexo AG85, constituído por uma família de proteínas de baixo peso molecular que desempenham um papel decisivo na biossíntese da parede celular e que são  
25 produzidas em quantidades consideráveis quando a cultura bacteriana está na fase de crescimento logarítmico (log). Também foi relatado no documento EP 2090318 A1 que a vacina convencional a base do bacilo Calmette-Guerin (BCG) não gera uma resposta imunoprotetora contra antígenos do complexo  
30 AG85. A produção de interferon- $\gamma$  pelos linfócitos específicos tem um papel fundamental: permite que os macrófagos infectados interrompam o crescimento do bacilo (North & Young, Ann. Rev. Immunol., 2004, 22:599-623).

A Organização Mundial de Saúde reconheceu que o risco de desenvolver a tuberculose (TB) é estimado como sendo de 20-37 vezes maior em pessoas que vivem com o HIV do que entre aqueles sem infecção pelo HIV. Uma visão geral é dada em "Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings" Diretrizes da OMS 2011, ISBN: 978 92 4 150070 8). No entanto, a terapia preventiva com isoniazida não é uma vacina que forneça proteção duradoura de longo prazo para indivíduos HIV positivos. Pelo contrário, a isoniazida precisa ser administrada regularmente, e a resistência à isoniazida corrobora esta terapia. Desta forma, continua a haver a necessidade de tratamentos preventivos e terapêuticos mais potentes para seres humanos (soropositivos) portadores do HIV.

#### OBJETO DA INVENÇÃO

O objeto da presente invenção é o fornecimento de um agente melhorado adequado para a prevenção ou tratamento da tuberculose, tal como na profilaxia da tuberculose latente, profilaxia primária e/ou tratamento da tuberculose latente ou ativa, em seres humanos tanto HIV positivos como HIV negativos. Outro objeto é o fornecimento de uma cepa do MTB-C adequada para a preparação do agente. O processo de preparação do agente também é um objeto da presente invenção.

#### DEFINIÇÕES

"FCMtb" significa fragmentos de uma cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C).

"Tamanho de partícula" se refere, salvo indicação em contrário, ao diâmetro das partículas. Quando o tamanho das partículas não pode ser determinado exatamente, significa o tamanho aproximado das partículas.

"Diâmetro hidrodinâmico" é o tamanho médio de partícula, determinável conforme como descrito na seção de

materiais e métodos.

ABREVIATURAS

	AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
	BCG	Bacilo Calmette-Guerin
5	CFU	Unidade formadora de colônia
	DP	Medicamento
	DS	Princípio ativo
	ELISA	Ensaio imunoenzimático
	ELISPOT	Ensaio imunoenzimático ELISPOT
10	EMEA	Agência de Medicina Europeia
	FCMtb	Fragmentos de células de <i>M. tuberculosis</i>
	FIM	Primeiro no homem
	HIV	Vírus da imunodeficiência humana
	IFN- $\gamma$	Interferon gama
15	IGTIP	Institut per a la Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (Instituto de Investigação em Ciências da Saúde Germans Trias i Pujol)
	IMP	Produto de investigação medicinal
	IPC	Controles de processo
20	LCS	Suspensão de concentrado de lipossomas
	LTBI	Infecção por tuberculose latente
	LPS	Lipopolisacarídeo
	Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	MTB-C	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
25	NZB	Negros da Nova Zelândia
	NZW	Branco da Nova Zelândia
	PPD	Derivado purificado de proteína
	q.s.	Quantidade suficiente
	TB	Tuberculose
30	TST	Teste tuberculínico de pele
	OMS	Organização Mundial de Saúde
	p/v	peso/volume
	p/p	peso/peso

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção fornece formulações de lipossomas compreendendo fragmentos de uma cepa do complexo  
5 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), (FCMtb), e um agente formador de lipossoma.

Em uma configuração particular, o diâmetro hidrodinâmico das partículas, conforme determinado, por exemplo, por dispersão dinâmica da luz, é de 120 nm ou menos,  
10 de preferência de 110 nm ou menos, mais de preferência de 95 nm ou menos, e mais de preferência ainda de 80 nm ou menos. Em uma configuração alternativa, a formulação de lipossomas compreende de 1% a 20% (p/v) de sacarose, de preferência de 2% a 12% (p/v) de sacarose, mais de preferência de 3% a 8%  
15 (p/v) de sacarose, e mais de preferência ainda de 4% a 6% (p/v) de sacarose. É importante notar que, embora cada uma destas duas configurações possa ser realizada individualmente, estas configurações não devem ser consideradas como mutuamente exclusivas e podem, assim,  
20 ocorrer em combinação.

Em uma configuração particular, a formulação de lipossomas descrita acima tem um diâmetro hidrodinâmico na faixa de 40 a 120 nm, de preferência 50 a 110 nm, mais de preferência de 55 e 95 nm, e mais de preferência ainda de 55  
25 a 80 nm.

Em uma configuração particular alternativa, o tamanho médio de partícula da formulação de lipossomas descrita acima pode ser menor, de modo que a formulação de lipossoma é uma emulsão, isto é, nesta configuração  
30 particular o diâmetro hidrodinâmico das partículas é de preferência inferior a 40 nm.

Em uma configuração preferida de qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, a formulação de

lipossomas é uma formulação de lipossomas em que o índice de polidispersibilidade das partículas é de 0,4 ou menos, de preferência de 0,3 ou menos.

5 Em uma configuração mais preferida de qualquer das configurações descritas acima, a cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) é uma cepa virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C).

10 É ainda mais preferido que, em qualquer das configurações descritas acima, a proporção de (a): fragmentos de uma cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), e (b) o agente formador de lipossoma esteja entre 0,01:1 e 1:1, de preferência entre 0,06:1 e 0,1:1.

15 Em uma configuração mais preferida de qualquer uma das descritas acima, a formulação de lipossomas compreende adicionalmente: (d) um agente de tensoativo. Em uma configuração ainda mais preferida, a formulação de lipossomas compreendendo (d) o agente tensoativo, é uma formulação de lipossomas em que a proporção entre (a) e (d) está entre 0,1:1 e 10:1 (p/p), de preferência 0,5:1 e 2:1 (p/p), e mais 20 de preferência ainda entre 0,6:1 e 0,8:1 (p/p).

25 Em uma configuração particular do descrito acima, o agente de formação de lipossomas da formulação de lipossomas é um fosfolípido, de preferência lecitina, mais de preferência uma selecionada do grupo que consiste em lecitina de ovo ou lecitina de soja, e mais de preferência ainda a lecitina de soja, cada uma das quais pode ser hidrogenada, parcialmente hidrogenada ou não hidrogenada.

30 Em uma configuração preferida da formulação de lipossomas contendo surfactante, o agente tensoativo é selecionado de colato, deoxicolato, colesterol e hemisuccinato de colesterol.

Em uma configuração mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima é uma formulação de lipossomas, em

que os fragmentos de células do MTB-C são ou compreendem fragmentos da parede celular.

Em outra configuração mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima compreende fragmentos da cepa  
5 NCTC 13536 do MTB-C, que foi depositada em 2010 na NCTC em Londres. Esta cepa também é chamada de 511, de modo que os nomes NCTC 13536 e 511 podem ser usados alternadamente.

Em uma configuração ainda mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima compreende pelo menos  
10 dois, de preferência três, mais de preferência quatro, mais de preferência ainda todas as seguintes características:

I. um primeiro polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 70 kDa, semelhante à impressão digital peptídica da proteína HSP70 do *M. tuberculosis* (Rv0350),  
15

II. um segundo polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 38 kDa, semelhante à impressão digital peptídica da proteína 38kDa do *M. tuberculosis* (Rv0934),

III. um terceiro polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 30 kDa, semelhante à impressão digital peptídica da proteína Ag85B do *M. tuberculosis* (Rv1866c), e  
20

IV. um quarto polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 10 kDa, semelhante à impressão digital peptídica da proteína CFP10 do *M. tuberculosis* (Rv3874), e

V. um quinto polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 6 kDa, semelhante à impressão digital peptídica da proteína ESAT-6 do *M. tuberculosis* (Rv3875).  
25

Em uma configuração ainda mais preferida, a formulação de lipossomas compreende um lipopolipeptídeo com um peso molecular de cerca de 19 kDa, semelhante à impressão  
30 digital peptídica do precursor do antígeno da lipoproteína de 19 kDa LpqH do *M. tuberculosis* (Rv3763).

Ainda mais de preferência, a formulação de lipossomas descrita acima é caracterizada ainda pelo fato de

que pelo menos um dos seguintes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, ou fragmento deste, está presente: HSP70, proteína 38 kDa e Ag85B. Fragmento neste sentido é qualquer parte, tal como, por exemplo, um produto de degradação, de qualquer um desses polipeptídios.

Em uma configuração mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima contém lipídios que são tipicamente encontrados em *Mycobacterium tuberculosis* ou derivados deste, tal como produtos de conjugação como lipídios conjugados com açúcar. É ainda mais preferido que estejam compreendidos um ou mais dos ácidos micólicos, de preferência pertencentes a qualquer um ou mais dos tipos I, III ou IV. Alternativamente ou adicionalmente, um micolato conjugado com açúcar, de preferência dimicolato de trealose pode estar compreendido na formulação. Alternativamente ou adicionalmente, é ainda preferido que, pelo menos um glicolipídio derivado do MTB-C esteja presente na formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção e um glicolipídio preferido é uma lipoarabinomanana.

A formulação de lipossomas descrita acima pode compreender adicionalmente um ou mais surfactantes, que é/são, de preferência, do grupo de surfactantes não iônicos.

Em outra configuração preferida, a formulação de lipossomas de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores compreende adicionalmente um ou mais sais ou solução deste, em que o sal preferido é o cloreto de sódio.

Em uma configuração ainda mais preferida de qualquer uma das acima, a formulação de lipossomas da presente invenção é liofilizada.

A invenção também fornece uma suspensão, em que a formulação de lipossomas de qualquer uma das reivindicações anteriores, é reconstituída em um solvente. Em uma configuração preferida, o solvente desta suspensão é aquoso,

e de preferência, é ou compreende soro fisiológico.

A invenção também fornece uma composição farmacêutica compreendendo a formulação de lipossomas, tal como descrita em qualquer uma ou mais das configurações  
5 acima, ou a suspensão tal como descrita em qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, e um veículo ou diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável, em que qualquer substância adequada como veículo, diluente ou excipiente pode ser usada. Em uma configuração preferida  
10 desta, esta composição farmacêutica compreende adicionalmente um adjuvante farmacêuticamente aceitável.

A invenção fornece também um produto para utilização em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia. Isto é, ela fornece a formulação de  
15 lipossomas de acordo com qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, a suspensão de acordo com qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, para utilização em um  
20 método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia. Em uma configuração particular, a invenção fornece essa formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas para injeção. Em outra configuração particular, a presente invenção fornece a formulação, suspensão ou  
25 composição farmacêutica de lipossomas para utilização em um método de tratamento ou prevenção da tuberculose. Estas configurações particulares podem ser realizadas individualmente ou em combinação.

Em uma configuração mais particular, a invenção  
30 fornece a formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas de acordo com o que é descrito acima em relação à sua utilização em um método de tratamento do corpo humano por terapia, caracterizada ainda pelo fato de ser para

administração ao corpo humano em uma dose que compreende de 1 a 1000, de preferência 3 a 250, mais de preferência de 4 a 80 e mais de preferência ainda de cerca de 5, cerca de 25 ou cerca de 50 µg/dose de FCMTb.

5           Em três configurações mais particulares (a) a (c), a formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas de acordo com o que é descrito acima em relação à sua utilização em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia é (a) para utilização em um método de  
10 prevenção de tuberculose ativa em indivíduos com uma infecção latente por tuberculose, (b) para utilização em um método de profilaxia primária da tuberculose, a fim de prevenir a infecção de indivíduos que foram expostos à doença, mas que ainda não estão infectados, ou (c) para utilização em um  
15 método de tratamento ou prevenção da tuberculose latente.

          Em uma configuração preferida da formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas acima para utilização desta em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia é a sua utilização em terapia de  
20 combinação ou terapia adjuvante. Terapia adjuvante é uma terapia adicional ou secundária combinada com um tratamento primário, que aumenta a eficácia no tratamento de uma condição. Uma configuração particular da terapia de combinação é aquela em que a terapia de combinação compreende  
25 um antibiótico, de preferência um ou mais de isoniazida e uma ansamicina, em que a ansamicina é mais de preferência a rifampicina. Em uma configuração particular da presente invenção, a terapia adjuvante é administrada a um ser humano HIV positivo, e é preferida uma dose única de 25 µg de FCMTb.

30           A invenção também fornece um processo para a preparação de qualquer um dos agentes, isto é, a formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas.

          A invenção fornece ainda a cepa NCTC 13536 do MTB-

C, depositada em 2010, na NCTC em Londres.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção fornece formulações de lipossomas que compreendem fragmentos de uma cepa (FCMtb) do complexo  
5 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C), e um agente formador de lipossoma.

Salvo expressamente especificado em contrário, o termo "compreendendo" é usado no contexto do presente pedido para indicar que mais membros podem opcionalmente estar  
10 presentes em adição aos membros da lista introduzida por "compreendendo". No entanto, é considerado como uma configuração específica da presente invenção, que o termo "compreendendo" abranja a possibilidade de mais membros não estarem presentes, isto é, para o propósito desta  
15 configuração, "compreendendo" deve ser entendido como tendo o significado de "consistindo de".

A descrição detalhada revela variantes específicas e/ou preferidas das características individuais da invenção. A presente invenção também contempla como configurações  
20 particularmente preferidas aquelas configurações que são geradas pela combinação de duas ou mais das variantes específicas e/ou preferidas descritas para duas ou mais das características da presente invenção.

É geralmente aceito que um processo de lipossomação  
25 gera um ambiente lipídico, facilitando a solubilidade e conduzindo a uma suspensão de substâncias, tal como FCMtb. Lipossomas, na acepção da presente invenção podem ser unilamelares, multilamelares ou combinações destes.

FCMtb pode ser de qualquer tipo de substância  
30 derivada da cepa do MTB-C, em que são preferidos os fragmentos derivados de proteínas e/ou lipídios. FCMtb dentro do âmbito deste pedido é tipicamente uma mistura de diferentes antígenos de proteína e lipídios de células do

MTB-C.

Os fragmentos celulares podem ser obtidos por qualquer método conhecido por especialistas na técnica adequado para fragmentar células microbianas ou bacterianas, tal como, especificamente, células do MTB-C, por exemplo, 5  
homogeneização. A homogeneização pode ser realizada por meio de sonicação com ultrassom, ou por meio da utilização de pequenas contas com cerca de 0,1 mm de diâmetro, por exemplo, 10  
contas de sílica ou zircônio/sílica, em conjunto com um homogeneizador mecânico. Um homogeneizador mecânico que pode ser usado, por exemplo, é o modelo BioSpec BeadBeater®. As células do MTB-C são quebradas por este processo de homogeneização, de modo que são obtidos pequenos fragmentos celulares, tipicamente incluindo pequenos fragmentos de 15  
parede celular. Uma característica tipicamente relevante da produção dos fragmentos de parede celular é a "desintoxicação" dos fragmentos celulares por delipidização, bem conhecido por especialistas na técnica, um processo que permite a remoção das moléculas semelhantes às endotoxinas. 20  
O FCMtb é, portanto, de preferência desintoxicado e pasteurizado e a formulação de lipossomas obtida é então estéril e livre de endotoxinas. Opcionalmente, a dispersão dos fragmentos celulares em tampão pode ser liofilizada para facilitar o seu armazenamento. Para este fim, a dispersão 25  
pode ser distribuída em frascos e liofilizada a uma temperatura entre -15° C e -120° C, tal como, por exemplo, -45° C e com vácuo, tal como entre 0,1 e 0,5 mbar.

Os lipossomas de acordo com a presente invenção geralmente têm uma distribuição de tamanho em que pelo menos 30  
99,9% (em número) são menores do que 1 µm. Em uma configuração particular, o diâmetro hidrodinâmico das partículas, tal como determinável por dispersão dinâmica da luz, é de 120 nm ou menos, de preferência de 110 nm ou menos,

mais de preferência de 95 nm ou menos, e mais de preferência ainda de 80 nm ou menos. Na dispersão dinâmica da luz o parâmetro de diâmetro hidrodinâmico é considerado um número estável e importante obtido pela técnica, e é o número de tamanho que é utilizado de preferência para fins de controle de qualidade. De preferência, os lipossomas da formulação de acordo com esta invenção são monomodais, isto é, eles apresentam um único pico nas medições de dispersão dinâmica da luz. Mais de preferência, os lipossomas da formulação de acordo com esta invenção são esféricos, como pode ser testado por microscopia eletrônica de preparações por crio-fratura da formulação de lipossomas, como mostrado no Exemplo 9. Esférica, significa que pelo menos para 90% das partículas de lipossomas (por número), todos os pontos da superfície da partícula individual têm uma distância similar ou idêntica ao centro do lipossoma, isto é, o raio mínimo de tal partícula se relaciona ao raio máximo da mesma partícula em uma proporção de 0,6 ou mais, 0,7 ou mais, 0,8 ou mais ou 0,9 ou mais. A formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção pode compreender lipossomas unilamelares ou multilamelares, ou uma mistura destes. De acordo com o conhecimento padrão de especialistas na técnica, as medições de dispersão dinâmica da luz devem ser realizadas em um tampão adequado, isto é, um tampão que por si só não cause perturbações, desintegração ou fusão dos lipossomas ou que os desestabilize significativamente fisicamente de qualquer outra forma. Como regra geral, qualquer tampão pode ser adequado, desde que tanto a força iônica, como o valor de pH sejam comparáveis ao tampão no qual os lipossomas foram formados. De preferência, é usado um tampão de composição semelhante ou idêntica ao tampão no qual os lipossomas foram formados.

Em uma configuração alternativa, a formulação de

lipossomas compreende adicionalmente 1% a 20% (p/v) de sacarose, de preferência 2% a 12% (p/v) de sacarose, mais de preferência 3% a 8% (p/v) de sacarose, e mais de preferência ainda 4% a 6% (p/v) de sacarose. São particularmente preferidos aproximadamente 5% de sacarose.

É importante notar que, enquanto cada uma destas configurações relativas, tanto a relativa a um tamanho de partícula particular, como a outra relativa à presença de sacarose, podem ser realizadas individualmente, estas configurações não devem ser consideradas mutuamente exclusivas e podem muito bem ser executadas em combinação.

Em uma configuração particular, a formulação de lipossomas descrita acima tem partículas com um diâmetro hidrodinâmico na faixa de 40 a 120 nm, de preferência de 50 a 100 nm, mais de preferência entre 55 e 95 nm, e mais de preferência ainda de 55 a 80 nm. O diâmetro hidrodinâmico das partículas é, assim, de preferência, medido por difusão dinâmica da luz, conforme descrito de maneira geral acima e em detalhes na seção "Materiais e Métodos".

Em uma configuração particular alternativa, o diâmetro hidrodinâmico das partículas da formulação de lipossomas descrita acima pode ser menor, de modo que a formulação de lipossomas é uma emulsão, isto é, nesta configuração particular o diâmetro hidrodinâmico das partículas é de preferência inferior a 40 nm.

Em uma configuração preferida de qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, os lipossomas da formulação de acordo com esta invenção são, além disso, monodispersos, o que significa que não é observada nenhuma largura significativa na distribuição de tamanho. Isto é tecnicamente testado por um índice de polidispersibilidade baixo (PDI), conforme determinado por dispersão dinâmica da luz, tal como 0,4 ou menos, de preferência 0,3 ou menos.

Conseqüentemente, a formulação de lipossomas é uma formulação de lipossomas em que o índice de polidispersibilidade das partículas conforme determinado por dispersão dinâmica da luz é de 0,4 ou menos, de preferência 0,3 ou menos, e mais de preferência 0,25 ou menos.

Os fragmentos da cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) podem ser obtidos por um processo que compreende um processo a montante (processo "upstream") e um processo a jusante (processo "downstream"). Para fins ilustrativos, as cinco etapas principais são brevemente descritas aqui e configurações particulares do processo são descritas nos Exemplos 2 e 3 abaixo.

Processo a montante (Exemplo 2):

Etapas 1: Cultura de *Mycobacterium tuberculosis*

Etapas 2: Colheita de *Mycobacterium tuberculosis* e congelamento do extrato bruto

Processo a jusante (Exemplo 3):

Etapas 3: Fragmentação celular e delipidização

Etapas 4: Pasteurização

Etapas 5: Liofilização (opcional)

Em uma configuração mais preferida de qualquer das configurações descritas acima, a cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) é uma cepa virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C). Virulento se refere à patogenicidade por caso e/ou a capacidade do bacilo em invadir os tecidos do hospedeiro. A cepa virulenta pode ser qualquer cepa virulenta de qualquer uma das espécies pertencentes ao MTB-C, mas é preferida uma cepa que pertence ao *M. tuberculosis*. A cepa de MTB-C de acordo com a invenção pode ser cultivada por inoculação em meios de cultura bem conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, Middlebrook 7H10 ou agar 7H11, meio de Sauton ou meio de Proskauer-Beck. A cultura da cepa virulenta é realizada, de

preferência, durante um período de tempo prolongado, tal como, por exemplo, um período igual ou superior a três semanas, de preferência compreendido entre 3 e 4 semanas. A temperatura da cultura de preferência é mantida entre 34° C e 38° C. Uma vez que termina a cultura, as células são colhidas e isoladas utilizando técnicas bem conhecidas no estado da técnica, tal como as descritas no pedido de patente ES2231037-A1.

O agente de lipossoma da formulação de lipossomas é de preferência um fosfolipídio hidrogenado, parcialmente hidrogenado ou não hidrogenado. O fosfolipídio utilizado pode ser ou compreender, por exemplo: fosfatidilcolina, fosfatidilserina e fosfatidil-inositol. O mais típico é a fosfatidilcolina, que pode ser sintetizada ou isolada a partir de uma variedade de fontes naturais. De preferência, o agente de formação de lipossomas é ou compreende lecitina, selecionada do grupo constituído por lecitina de ovo e lecitina de soja. A lecitina de soja é uma mistura complexa de fosfolipídios incluindo, entre outros, a fosfatidilcolina, e é particularmente preferida. Lipídios típicos que também podem estar compreendidos na formulação quer como agente de formação de lipossomas em si, ou como outro componente, são: dicetil-fosfato (DCP), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), dioleoil fosfatidilcolina (DOPc), dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), dioleoil fosfatidilserina (DOPS), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilcolina (PC) e/ou fosfatidilserina (PS), onde o respectivo lipídeo pode ser hidrogenado, parcialmente hidrogenado ou não hidrogenado. Os lipossomas podem ser formados usando lipídios auxiliares convencionais econômicos e técnicas bem conhecidas por especialistas na técnica, tal como as descritas no pedido de patente ES2231037-A1.

É ainda preferido que, em qualquer das configurações descritas acima, a proporção de (a): fragmentos de uma cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) e (b) o agente formador de lipossoma esteja na faixa entre 5 0,01:1 e 1:1, de preferência entre 0,06:1 e 0,1:1. Em uma configuração mais preferida de qualquer um das descritas acima, a formulação de lipossomas compreende adicionalmente: (d) um agente tensoativo. Geralmente, todos os tipos de agentes capazes de alterar o valor da tensão superficial 10 podem ser utilizados como agente tensoativo no escopo da presente invenção, mas são excluídos os compostos que se enquadram na definição de agente formador de lipossomas descrita acima. Vários tipos de agentes tensoativos são conhecidos por especialistas na técnica e podem ser 15 utilizados na formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção. Como é sabido por um especialista na técnica, os agentes tensoativos são geralmente produtos químicos com uma estrutura polar-apolar. Sem querer estar limitado a qualquer teoria em particular, os agentes 20 tensoativos geralmente têm a tendência de se situar na superfície das partículas, criando assim uma camada monomolecular na interface, que reduz o valor da tensão superficial. Os agentes tensoativos também são referidos como surfactantes ou agentes ativos de superfície. Em uma 25 configuração preferida da formulação de lipossomas contendo surfactante, o agente tensoativo é selecionado de esteróis e derivados destes, tal como colesterol e/ou sais de biliar ou derivados destes, tal como colato. Configurações particularmente preferidas são aquelas em que o agente 30 tensoativo é selecionado dentre colato, deoxicolato, colesterol e hemissuccinato de colesterol. Um bom modo, porém não limitante de realização da invenção é aquele em que os lipossomas da formulação compreendem tanto lecitina derivada

de soja como colato de sódio.

Em uma configuração ainda mais preferida, a formulação de lipossomas compreendendo (d) o agente tensoativo, é uma formulação de lipossomas, em que a  
5 proporção entre (a) e (d) está entre 0,05:1 e 3:05 (p/p). Podem ser utilizados vários tipos de agentes formadores de lipossomas, como é bem conhecido por especialistas na técnica.

10 Opcionalmente, os lipossomas podem conter aditivos para melhorar a sua estabilidade, por exemplo: vitamina E, que se acredita atua como um antioxidante lipídico.

Em uma configuração mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima é uma formulação de lipossomas em que os fragmentos de células do MTB-C são ou compreendem  
15 fragmentos de parede celular.

Pode ser utilizada qualquer cepa pertencente ao MTB-C, e de preferência qualquer cepa pertencente ao *Mycobacterium tuberculosis*. Em outra configuração mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima  
20 compreende fragmentos da cepa NCTC 13536 do MTB-C, que foi depositada em 2010 na NCTC, em Londres (Exemplo 1). Outra cepa que pode ser utilizada e cujos fragmentos podem, portanto, estar compreendidos na formulação de lipossomas, é chamada de H37Rv, que pode ser obtida, por exemplo, na  
25 National Collection of Type Cultures (NCTC), Londres, Reino Unido (número de depósito NC007416) e é frequentemente usada por pesquisadores neste campo. Também é possível que seja utilizada mais do que uma cepa, ou seja, que a formulação de lipossomas compreenda fragmentos de várias, tal como duas,  
30 três ou mais de três cepas.

Considerando-se os cerca de 4000 antígenos putativos do *M. tuberculosis*, é impossível analisar o composto ativo para todas estas proteínas. No entanto,

algumas proteínas do MTB-C mostraram-se relevantes para a resposta imunológica desejada. Estas são cinco bandas de proteínas que têm tamanhos aproximados de 6, 10, 30, 38 e 70 kDa (Renshaw, et al., 2005, EMBO Journal 24, 2491 -2498; Singh, et al., 2005, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12(2), 354-358). Portanto, em uma configuração ainda mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima compreende pelo menos dois, de preferência três, mais de preferência quatro, e ainda mais de preferência todas as seguintes características:

10 i. um primeiro polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 70 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o primeiro polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à impressão digital peptídica da proteína HSP70 do *M. tuberculosis* (Rv0350),

15 ii. um segundo polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 38 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o segundo polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à impressão digital peptídica da proteína 38kDa do *M. tuberculosis* (Rv0934),

20 iii. um terceiro polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 30 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o terceiro polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à impressão digital peptídica da proteína Ag85B do *M. tuberculosis* (Rv1866c ), e

25 iv. um quarto polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 10 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o quarto polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à impressão digital peptídica da proteína CFP10 do *M. tuberculosis* (Rv3874), e

v. um quinto polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 6 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o quinto polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à impressão digital peptídica da proteína ESAT-6 do *M. tuberculosis* (Rv3875).

Em uma configuração ainda mais preferida, a formulação de lipossomas compreende ainda um lipopolipeptídeo com um peso molecular de aproximadamente 19 kDa, conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o lipopolipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à impressão digital peptídica do precursor do antígeno da lipoproteína de 19 kDa LpqH do *M. tuberculosis* (Rv3763). A respectiva banda pode ser visualizada por meio de métodos conhecidos na técnica, tal como a coloração com prata. Os pesquisadores da presente invenção descobriram, surpreendentemente, que este polipeptídeo induz uma resposta humoral IgG total elevada, que pode ser a resposta humoral mais alta entre todos os antígenos na formulação.

Exemplos de como os polipeptídios ou lipopolipeptídios podem ser identificados são apresentados no Exemplo 4.

Ainda mais de preferência, a formulação de lipossomas descrita acima é caracterizada ainda pelo fato de que pelo menos um dos seguintes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, ou fragmentos destes, está presente: HSP70, proteína 38 kDa e Ag85B, e mais de preferência, pelo menos um de HSP70, proteína de 38 kDa e Ag85B. Fragmento, neste sentido, é qualquer parte, tal como, por exemplo, um produto de degradação, de qualquer um desses polipeptídios. Existem várias maneiras de obtenção de tais fragmentos, por exemplo, hidrólise química ou enzimática, em que não é relevante se a

fragmentação ocorreu propositadamente ou não, antes ou depois da formação do lipossoma. É preferido que o respectivo fragmento possa ser atribuído à sua respectiva origem, tal como, por exemplo, por sobreposição substancial na sequência de aminoácidos, tal como pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20 aminoácidos consecutivos.

Os fragmentos de acordo com a presente invenção são obtidos de preferência a partir de bacilos cultivados em condições de stress de fome, baixo teor de oxigênio e baixo pH. O baixo teor de oxigênio é devido ao crescimento das bactérias em placas que são fechadas em sacos herméticos durante o período de crescimento, que é de, por exemplo, 21 dias, o que leva a um ambiente microaerobiótico. O pH baixo é explicado a seguir: no início da cultura o valor do pH é de 7,0 - 6,8 e no final, tipicamente depois de 21 dias de cultura, o valor do pH é de 6,4 - 6,5. Nestas condições, o metabolismo das bactérias é mais lento, o que leva a um crescimento estacionário. Entende-se que isto torna os bacilos mais resistentes ao stress. Nestas condições, os bacilos cultivados desenvolvem características semelhantes às do bacilo latente *in vivo* na LTBI (infecção por tuberculose latente). Desta forma, espera-se que os antígenos presentes nos FCMtb desencadeiem uma nova resposta imunológica contra os antígenos dos bacilos latentes, isto é, os chamados antígenos "estruturais", bem como os associados às respostas ao stress.

Glicolipídios micobacterianos são conhecidos há muito tempo por terem atividade imunomoduladora, em particular a indução de respostas granulomatosas e por exercerem potentes efeitos semelhantes a adjuvante. Portanto, em uma configuração mais preferida, a formulação de lipossomas descrita acima contém lipídios que são tipicamente encontrados em *Mycobacterium tuberculosis*, ou derivados

destes, tal como produtos de conjugação como lipídios conjugados com açúcares. Vários componentes lipídicos imunogênicos foram identificados nas amostras de *M. tuberculosis* (Brennan, Tuberculosis (Edimburgo), 2003, 83(1-3), 91-97) e foram desenvolvidos métodos analíticos para a sua determinação (eletroforese, SDS-PAGE, cromatografia de camada fina (ou delgada)). Embora o isolamento de cada componente lipídico fosse exigir um tratamento agressivo de tal forma que dados quantitativos ou as percentagens de cada componente detectável no extrato do MTB-C, ou na formulação de lipossomas seriam difíceis de obter, a caracterização qualitativa deve servir para caracterizar outra configuração preferida da presente invenção. De acordo com esta outra configuração preferida, é compreendido um ou mais dos ácidos micóticos, de preferência pertencente a qualquer um ou mais dos tipos I, III ou IV. Alternativamente ou adicionalmente, um micolato conjugado com açúcar, de preferência um dimicolato de trealose pode estar incluído na formulação. Alternativamente ou adicionalmente, um glicolipídio lipoarabinomanana (LAM) pode estar incluído na formulação. Além disso, acredita-se ser uma vantagem a natureza multiantigênica dos fragmentos (mistura de proteínas multiantigênicas mais lipídios, em vez de antígenos purificados apenas) e, portanto, o processo de fragmentação celular pode ser adaptado por especialistas na técnica de modo a permitir uma mistura de antígeno celular ideal.

A homogeneização das células do MTB-C, é realizada na presença de um ou mais agentes tensoativos, de preferência um surfactante não iônico. Consequentemente, a formulação de lipossomas descrita acima pode compreender adicionalmente um ou mais de tais surfactantes. Um especialista na técnica com conhecimento normal conhece um grande número de tais surfactantes. De preferência, o tensoativo não iônico

utilizado é selecionado do grupo que consiste em etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de ésteres de sorbitano. Mais de preferência, o surfactante não iônico é selecionado do grupo de etoxilatos de octilfenol. Ainda mais de preferência, são  
5 usados os etoxilatos de octilfenol com um teor de óxido de etileno compreendido entre 7 e 8 mols, cujos surfactantes podem ser encontrados no mercado com o nome de Triton X-114®. A massa homogeneizada contendo os fragmentos da parede celular é submetida a um tratamento convencional para separar  
10 e rejeitar as células não fragmentadas e os componentes solubilizados. Pode ser utilizada a centrifugação a diferentes velocidades e a lavagem com uma solução tampão, tal como descrito no pedido de patente ES2231 037-A1, por exemplo. O sedimento contendo os fragmentos da parede celular  
15 é obtido após a realização dos processos de purificação mencionados. Tal sedimento é disperso em tampão salino tamponado com fosfato (PBS) e é submetido a um tratamento convencional para assegurar a inativação completa das células do MTB-C que possam ter permanecido viáveis após o processo  
20 de fragmentação e purificação. O tratamento mencionado pode ser um processo químico, por exemplo, por meio de tratamento com formaldeído, ou um processo físico, por exemplo, por meio de autoclave ou tratamento de pasteurização. Exemplos de caracterização de lipídios são apresentados no Exemplo 5  
25 abaixo.

Em outra configuração preferida, a formulação de lipossomas descrita acima compreende adicionalmente um ou mais sais ou solução(ões) destes, em que o sal preferido é o cloreto de sódio.

30 Em outra configuração ainda mais preferida de qualquer uma das acima, a formulação de lipossomas é liofilizada. Os lipossomas podem ser submetidos a liofilização para obter assim o agente imunoterápico na forma

de lipossomas liofilizados. Para esse fim, a dispersão pode ser distribuída em frascos e liofilizada a uma temperatura baixa, tal como entre  $-15^{\circ}$  C e  $-120^{\circ}$  C, tal como, por exemplo,  $-45^{\circ}$  C e com vácuo tal como entre 0,1 e 0,5 mbar. Os  
5 frascos obtidos após liofilização contêm a formulação de lipossomas adequada como agente imunoterapêutico e são armazenados, de preferência, a temperaturas muito baixas, por exemplo, a  $-70^{\circ}$  C.

A invenção também fornece uma suspensão, em que a  
10 formulação de lipossomas de qualquer uma das reivindicações anteriores é reconstituída em um solvente, em uma configuração preferida o solvente desta suspensão é aquoso, mais de preferência é ou compreende soro fisiológico. Métodos para a suspensão de formulações de lipossomas em um solvente  
15 são bem conhecidos por especialistas na técnica. É uma propriedade particularmente vantajosa da formulação de acordo com a presente invenção o fato desta poder ser suspensa mais rápido do que formulações convencionais de lipossomas que compreendem fragmentos do MTB-C (ver Exemplo 9).

Um objeto da invenção é o fornecimento de um agente  
20 compreendendo fragmentos da parede celular de uma cepa do MTB-C para a preparação de uma composição farmacêutica, em que o agente é ou compreende a formulação de lipossomas descrita acima em qualquer uma das configurações descritas ou  
25 suas combinações. O escopo principal da formulação farmacêutica/formulação galênica da substância ativa (princípio ativo) é a obtenção de uma suspensão suficientemente eficaz e estável para ser bem reconhecida pelas células e que tem o potencial de provocar uma resposta  
30 imunológica celular relevante em um corpo humano ou animal. Para esse fim, a invenção também fornece uma composição farmacêutica compreendendo a formulação de lipossomas, ou a suspensão conforme descrita em qualquer uma ou mais das

configurações descritas acima, e um veículo, excipiente ou diluente farmacêuticamente aceitável. Vários destes veículos, excipientes e diluentes são conhecidos por especialistas na técnica e eles não são, de modo algum limitados, por esta  
5 descrição. Ao contrário, qualquer substância adequada como veículo, excipiente ou diluente pode ser utilizada. Em uma configuração preferida, esta composição farmacêutica compreende adicionalmente um adjuvante farmacêuticamente aceitável. Adjuvante deve ser entendido aqui como uma  
10 substância compreendida nesta configuração da invenção, em que o adjuvante é uma substância capaz de estimular o sistema imunológico quando aplicada a um corpo humano ou animal, em resposta ao antígeno alvo, em que o adjuvante propriamente dito não confere imunidade. Sem querer estar limitado a  
15 qualquer substância adjuvante em particular, configurações preferidas são aquelas em que o adjuvante é um sal de alumínio, tal como cloreto de alumínio, ou um óleo mineral ou uma composição compreendendo óleo mineral, tal como o adjuvante de Freund incompleto (IFA) ou adjuvante de Freund  
20 completo (CFA) ou um halogeneto de amônio, tal como um brometo de amônio alquilado, tal como brometo de dimetil octadecil-amônio.

A invenção também fornece um produto para utilização em um método de tratamento do corpo humano ou  
25 animal por terapia. Isto é, ela fornece a formulação de lipossomas de acordo com qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, a suspensão de acordo com qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, ou a composição farmacêutica de acordo com qualquer uma ou mais  
30 das configurações descritas acima para utilização em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

O fármaco pode ser administrado em uma mucosa, por exemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, intestinal,

vaginal ou mucosa do trato urinário, ou por via parenteral, por exemplo, por via subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa ou intraperitoneal. É preferida a administração parenteral, em uma configuração particular, a invenção  
5 fornece essa formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas para injeção.

Em outra configuração particular, a invenção fornece a formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas para utilização em um método de tratamento ou  
10 prevenção da tuberculose. Estas configurações particulares podem ser executadas individualmente ou em combinação. Os inventores do presente estudo constataram que a formulação de acordo com a presente invenção conduz a um aumento da resposta imunológica celular e também controla o processo de  
15 reinfecção constante que, de outro modo, pode ocorrer na infecção por tuberculose latente, ao aumentar a imunidade contra bacilos em crescimento e induzir a imunidade contra o bacilo não replicante.

A dose apropriada da formulação, suspensão ou  
20 composição farmacêutica de lipossomas de acordo com o que é descrito acima em relação à sua utilização em um método de tratamento do corpo humano por terapia depende de vários parâmetros, incluindo o modo de administração e com o indivíduo a ser tratado. Em uma configuração preferida, esta  
25 é para administração ao organismo humano. Em uma configuração preferida da mesma, isto ocorre em uma dose que compreende 1 a 1000, de preferência 3 a 250, mais de preferência de 4 a 80 e ainda mais de preferência cerca de 5, cerca de 25 ou cerca de 50 µg/dose FCMtb. Uma dose de 25 µg é particularmente  
30 preferida.

Em três configurações mais particulares (a) a (c), a formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas de acordo com o que é descrito acima em relação à

sua utilização em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia é (a) para utilização em um método de prevenção da tuberculose ativa em indivíduos com uma infecção por tuberculose latente. Em uma configuração alternativa mais particular, (b) para utilização em um método de profilaxia primária da tuberculose para prevenir a infecção de indivíduos que foram expostos à doença, mas que ainda não estão infectados ou (c) para utilização em um método de tratamento ou prevenção da tuberculose latente.

10 A formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas para a utilização em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia pode ser administrada na forma de uma dose única ou de várias doses, tal como duas, três, quatro, cinco ou mais do que cinco doses, por meio da  
15 repetição em intervalos de tempo determinados. De preferência, são administradas duas doses separadas por um período compreendido entre 2 e 5 semanas, de preferência entre 3 e 4 semanas.

Os Exemplos 8, 10 e 12 são exemplos de como a  
20 formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção pode ser aplicada a seres humanos ou animais.

Uma configuração preferida da substância acima é a formulação, suspensão ou composição farmacêutica de lipossomas para utilização em terapia de combinação ou  
25 adjuvante. Os médicos usam a terapia adjuvante com frequência para obter melhores taxas de cura ou uma resposta mais rápida ao tratamento primário. Uma terapia de combinação ou terapia adjuvante envolve a utilização de mais de um medicamento para o tratamento do corpo humano ou animal por terapia. Uma  
30 primeira configuração particular de uma terapia de combinação é aquela em que a terapia de combinação compreende um antibiótico, de preferência um ou mais de isoniazida e uma ansamicina, em que a ansamicina é mais de preferência a

rifampicina. Uma segunda configuração particular desta é tal que a terapia de combinação compreende outras vacinas profiláticas contra a tuberculose, tal como as mencionadas na S.H.E. Kaufmann, Nature Rev. Immunol., 2006, 6, páginas 699-704, tal como por exemplo, a vacina do bacilo de Calmette-Guerin (BCG), vacinas de subunidades ou vacinas de BCG recombinante. A primeira e a segunda configuração particulares podem ser combinadas.

Na terapia de combinação ou terapia adjuvante, a administração destas duas (ou mais) substâncias pode ser simultânea ou pode ser feita em duas (ou mais) inoculações separadas ao longo de um período de tempo. O período entre a inoculação pode ser de vários anos. No caso de uma terapia de combinação, as inoculações separadas ao longo do tempo, é administrada em primeiro lugar, de preferência, uma vacina profilática contra a tuberculose, e o fármaco compreendendo fragmentos da parede celular de uma cepa virulenta do MTB-C, que atua como um agente reestimulante (ampliador) da vacina inoculada inicialmente, é administrada subsequentemente. Em uma configuração, é administrada apenas uma única dose ao sujeito humano, e esta dose é de preferência de 25 µg de FCMtb.

Alternativamente, várias estratégias diferentes de tratamento ou tipos ou cuidados são empregados simultaneamente em terapia adjuvante. Em uma configuração particular da presente invenção, a terapia adjuvante é administrada a um sujeito humano com o sistema imunológico deficiente, tal como um indivíduo que sofre de HIV, ou qualquer indivíduo de outra forma propenso à infecção por tuberculose e/ou com necessidade de tal terapia. Também pode ser administrada a isoniazida na terapia adjuvante. Além disso, a terapia adjuvante pode compreender a administração de qualquer fármaco ou combinação de fármacos para o

tratamento do sistema imunológico deficiente, tal como para o tratamento da infecção por HIV. Fármacos típicos para tratar infecções por HIV são fármacos antiretrovirais, e uma visão geral não limitante pode ser encontrada em: "Antiretroviral therapy for HIV infection in adults and adolescents; recommendations for a public health approach: 2010 revision", autores: OMS - organização Mundial de Saúde, ISBN: 9789241599764.

Assim, os presentes inventores forneceram uma solução para a necessidade de fornecer proteção eficaz contra a tuberculose, tal como a vacinação de seres humanos HIV positivos.

A possibilidade de um indivíduo ser considerado HIV positivo ou não (isto é, HIV negativo) pode ser testada por qualquer teste que permita a detecção da presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus que provoca a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), em um fluido corporal do indivíduo a ser testado, em que o fluido corporal é tipicamente qualquer um selecionado de soro, saliva ou urina. Tais ensaios podem detectar anticorpos, antígenos, ou RNA. Uma visão geral dos testes de avaliação adequados é dada em Chou *et al.*, Ann. Intern. Med. Chem., 05 de julho de 2005, 143(1):55-73.

Os inventores da presente invenção descobriram, surpreendentemente, que uma única dose de 25 µg de FCMtb administrada a um sujeito humano HIV positivo proporciona uma resposta mais forte.

Uma única dose de 25 µg de FCMtb também foi potente quando administrada a um sujeito humano soronegativo. Os presentes inventores mostraram que isto é particularmente útil em pacientes que sofrem de tuberculose latente (Exemplo 12). Assim, uma dose única de 25 µg de FCMtb a ser administrada a um indivíduo HIV positivo ou HIV negativo é

uma configuração preferida da invenção.

A invenção também fornece um método de fabricação, caracterizado pelo fato deste ser adequado para a obtenção de uma formulação de lipossomas de acordo com qualquer uma ou mais das configurações descritas acima, bem como de uma suspensão ou uma composição farmacêutica compreendendo a mesma. Um exemplo não limitativo desta é dado no Exemplo 11 abaixo.

A invenção fornece ainda a cepa NCTC 13536 do MTB-C, depositada em 2010, na NCTC em Londres. A cepa tem um polimorfismo genético baixo. Portanto, as formulações compreendendo os fragmentos da NCTC 13536 têm a vantagem de reprodutibilidade muito alta devido ao polimorfismo genético baixo.

Modo preferido de realizar a invenção

É preferido que sejam utilizadas doses específicas de 50 µg de FCMtb/dose ou 25µg FCMtb/dose ou 5 µg FCMtb/dose. Por exemplo, quando a dose é de 50 µg FCMtb, as quantidades/substâncias indicadas na Tabela 1 estão presentes em um frasco da formulação:

COMPONENTES	UNIDADE POR FRASCO	FUNÇÃO
<b>PRINCÍPIO ATIVO</b>		
FCMtb	66,7 µg	Imunogênica
<b>OUTROS COMPONENTES</b>		
Sacarose	20.000,0 µg	Carga (liofilização) e protetor criogênico
Lecitina de soja <sup>1</sup>	845,8 µg	Agente formador de lipossomas
Colato de sódio	92,0 µg	Tensoativo
Cloreto de sódio <sup>2</sup>	<b>20,8 µg</b>	Solvente
<b>CARACTERIZAÇÃO DA PARTÍCULA</b>		
Diâmetro hidrodinâmico	75+/- 20 nm	
Índice de polidispersibilidade	≤ 0,350	

<sup>1</sup> Contendo fosfatidilcolina (94,0% (p/p)).

<sup>2</sup> Adicionado como Solução de NaCl a 0,9%.

5

## Tabela 1

Para aplicações de 25 µg/dose ou 5 µg/dose, foram preparados outros frascos, onde todos os valores numéricos apresentados na Tabela 1, exceto a sacarose - devem ser divididos pelo fator de 2 ou 10, respectivamente. O conteúdo de sacarose nas formulações (50 µg, 25 µg e 5 µg) é sempre de 20.000 µg unidade/frasco.

Uma formulação de lipossomas feita de lecitina de soja (agente formador de lipossomas) altamente enriquecida com fosfatidilcolina (94.0% (p/p)) e colato de sódio (agente tensoativo) mostrou ser adequada para garantir uma maior solubilidade do princípio ativo durante a fabricação, assim como na suspensão reconstituída. Um parâmetro importante para a estabilidade do FCMTb na formulação de lipossomas é a proporção dos componentes que constituem o lipossoma. Depois de testar diferentes proporções de FCMTb/componente lipídico, foi estabelecido que uma boa proporção é de aproximadamente 0,03:0.2:0.7 (FCMTb:colato de sódio:lecitina de soja, p/p/p). Foi constatado ainda que a formação de lipossomas foi amplificada pela presença de sais na fase aquosa. Assim, o cloreto de sódio está incluído nesta formulação particular.

PARÂMETRO		CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO	MÉTODOS DE ENSAIO
Aparência		Pó branco a quase branco	Inspeção visual
Morfologia do sedimento		Plano a quase plano e homogêneo	Inspeção visual
Uniformidade da	Uniformidade de massa (mg/frasco)	21,02 ± 15%	Pesagem, método próprio

25

dosagem		Média mássica (mg/frasco)	Massa $\pm$ 5%	Pesagem, método próprio
Teor de água			$\leq$ 3%	Ensaio colorimétrico de Karl-Fischer, Ph.Eur.2.5.12 (USP <921>)
Teor de proteína total do FCMtb			90 -140 $\mu$ g/mg de FCM-tb	Ensaio BCA, Ph.Eur. 2.5.33 (USP <1057>)
Tempo de reconstituição (s)			Bem reconstituído em $\leq$ 10s	Inspeção visual
pH			7-8	Potenciometria, Ph.Eur. 2.2.3
Tamanho da partícula			75 $\pm$ 20 ( $\leq$ 0,310)	Difusão dinâmica da luz Ph.Eur. 2.9.31
Potência imunogênica em modelos murinos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	Unidades de formação de manchas/ colônias IFN- $\gamma$ antígeno - específicas	PPD	3 - 12 Razão SFU/10 <sup>6</sup> células com relação ao valor basal (Valor basal em SFU/10 <sup>6</sup> células)	ELISpot
Perfil proteico	SDS-PAGE		Positivo para bandas: 70, 38, 30, 10, 6 kDa	Eletroforese por SDS-PAGE
	Western-blot		Positivo para HSP70 (Rv0350), 38kDa (Rv0934), Ag85B (Rv1886c)	Western-blot
Esterilidade			Estéril	Ph.Eur.2.6.1 (USP <71>)
Endotoxinas bacterianas (IU/dose)			$\leq$ 10IU/frasco	Ph.Eur.2.6.14 método D (USP <85>)

Tabela 2: Princípio ativo (FCMtb), medido após a reconstituição da composição de lipossomas liofilizada

Uma configuração preferida da invenção é realizada de modo que a formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção tem as propriedades de acordo com a Tabela 2.

5 Para administração a sujeitos vivos, o frasco pode ser reconstituído com 0,4 ml de água para injeções, para fornecer uma suspensão contendo 166,7 µg/ml de FCMtb.

A Tabela 3 mostra a concentração de cada componente por frasco após reconstituição a 50µg/dose. Para 25 µg/dose ou 5 µg/dose de aplicação, foram usados outros frascos, de modo que, em consonância com o que foi dito acima sobre a Tabela 1, todos os valores numéricos apresentados na Tabela 3 - exceto sacarose - devem ser divididos pelo fator 2 ou 10, respectivamente. O conteúdo de sacarose nas formulações (50  
10 µg, 25 µg e 5 µg) é sempre de 50.000 µg/ml.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO POR ML
<b>PRINCÍPIO ATIVO</b>	
FCMtb	166,7 µg/ml
<b>EXCIPIENTES</b>	
Sacarose	50.000,0 µg/ml
Lecitina de soja	2.114,4 µg/ml
Colato de sódio	203,0 µg/ml
Cloreto de sódio	52,1 µg/ml

Tabela 3: Concentração dos componentes após reconstituição em 0,4 ml de água para injeção

#### MATERIAIS E MÉTODOS

20 Materiais de Referência

a) Anticorpos monoclonais: São utilizados anticorpos monoclonais específicos (anti-HSP70, anti-38kDa, anti-Ag85B, (da Lionex Diagnostic GmbH, Braunschweig, Alemanha)) para a identificação do perfil proteico dos lotes

de FCMtb.

b) Albumina Padrão: este padrão, utilizado para a determinação do teor de proteínas, é composto de albumina bovina em solução salina a 0,9% (2 mg/ml), conservada em azida de sódio (fabricante: Pierce).

c) 6,6'-dimicolato de trealose de padrão de *Mycobacterium tuberculosis* (TDM): TDM comercialmente disponível (Sigma) é utilizado para a identificação de TDM em lotes de FCMtb.

d) Ácidos micólicos de padrão de *Mycobacterium tuberculosis*.

Um ácido micólico comercialmente disponível (Sigma) é utilizado para a identificação de ácidos micólicos de lotes de FCMtb.

e) Marcador de peso molecular: é usado um marcador de peso molecular comercialmente disponível chamado "SeeBlue® Plus pre-Stained Standard" (Invitrogen).

Determinação de parâmetros

a) pH

O pH da suspensão reconstituída de FCMtb (20mg/ml) é determinado por potenciometria de acordo com a Ph. Eur. 2.2.3 (Farmacopéia Européia) e USP <791>.

b) Teor de água

O teste para a determinação da água residual do FCMtb liofilizado é realizado utilizando equipamento colorimétrico Karl Fisher e segue as indicações gerais da Ph. Eur. método 2.5.12 e USP <921> *determinação de água*.

c) Determinação do teor de proteína total

O teste para a determinação do teor total de proteínas do FCMtb é realizado utilizando um kit comercial (kit BCA, Pierce) e seguindo a Ph. Eur. método 2.5.33, método 4 (ácido bicinonínico ou ensaio BCA) e USP <1057>.

d) Identificação do perfil de proteínas por

eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

O teste é realizado de acordo com a Ph. Eur., método 2.2.31 e USP <726>; a detecção de proteínas no gel é realizada por uma coloração com Coomassie adaptada ou por coloração com prata. Amostras de teste: reconstituir o FCMtb em água purificada a 40 ou 20mg/ml de concentração. Soluções de referência: marcador de peso molecular, antígenos purificados, padrão de referência de FCMtb.

Antígenos purificados
Proteína HSP70 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv0350)
Proteína 38 kDa de <i>M. tuberculosis</i> (Rv0934)
Proteína Ag85B de <i>M. tuberculosis</i> (Rv1886c)
Proteína 19 kDa de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3763)
Proteína CFP10 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3874)
Proteína ESAT6 de <i>M. tuberculosis</i> (Rv3875)

10

Tabela 4: Antígenos de referência

Para a coloração por Coomassie, é utilizada uma solução do reagente Gel-Code Blue Stain (Pierce) de acordo com as instruções do fabricante. Para a coloração com prata, é utilizado o PROTSIL1 Kit da Invitrogen de acordo com as instruções do fabricante. Para a análise Western Blot, as proteínas são separadas por SDS-PAGE de acordo com métodos convencionais conhecidos na técnica e, em seguida, transferidas eletroforicamente para uma membrana de PVDF para a imunodetecção utilizando anticorpos monoclonais específicos. A interação antígeno-anticorpo é visualizada por incubação com um antianticorpo que desencadeia uma reação de quimioluminescência. São utilizados antígenos fornecidos pela Lionex (Braunschweig, Alemanha) (proteína HSP70 de *M. tuberculosis* (70 kDa), proteína 38 kDa de *M. tuberculosis*, proteína Ag85B de *M. tuberculosis* (30 kDa), e anticorpos

25

monoclonais específicos anti-HSP70, anti-38kDa e anti-Ag85B da Lionex.

e) Identificação de ácidos micólicos

Os ácidos micólicos no FCMtb são examinados por TLC unidimensional, seguindo a Ph. Eur., método 2.2.27. Amostras de teste: FCMtb liofilizado, 40 mg. Soluções de referência: padrão de ácido micólico (Sigma). Procedimento:

a) Processo de Extração: A amostra é extraída com clorofórmio:metanol (1:1) e, em seguida, incubada durante a noite. A fração sobrenadante é eliminada.

b) Esterificação dos ácidos micólicos: 2 ml de metanol:tolueno:ácido sulfúrico (30:15:1, v/v) são adicionados a cada tubo e a esterificação é obtida durante a noite. Em seguida, são adicionados 4 ml de n-hexano. A amostra é seca sob um fluxo de nitrogênio e é ressuspensa com 500 µl hexano.

c) TLC: 10 µl de cada amostra são aplicados a uma linha paralela à borda da placa (sílica gel 60 (20x20 cm) (Merck)). A separação cromatográfica é realizada em um tanque saturado com uma fase móvel (éter etílico: n-hexano (15:85, v/v)) por três vezes. Em seguida, o placa é deixada secar ao ar.

d) Os ácidos micólicos são revelados por pulverização das placas com uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol a 96° e aquecimento a 120° C durante 10 min.

Os ácidos micólicos das amostras de FCMtb são determinados por comparação com padrão comercial de ácido micólico. Os resultados são expressos como dados qualitativos de presença (positivo)/ausência (negativo) do ácido micólico avaliado.

f) Identificação de 6,6'-dimicolato de trealose (TDM): Amostras de teste: FCMtb liofilizado, 40 mg. Soluções

de referência: padrão TDM (Sigma). Procedimentos:

i. Processo de extração: a amostra é extraída com clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e em seguida é incubada durante a noite. A fração sobrenadante é seca sob um fluxo de nitrogênio e é pesada. Finalmente, as amostras secas são ressuspensas em clorofórmio a 40 mg/ml de concentração final.

ii. TLC: 10 µl de cada amostra são aplicados sobre uma linha paralela à borda da placa (gel de sílica 60 (20x20 cm) (Merck). A separação cromatográfica é realizada em um tanque saturado com uma fase móvel (clorofórmio:metanol:água (60:12:1, v/v)). Em seguida, a placa é deixada secar ao ar.

iii. Detecção: O TDM é revelado por pulverização das placas com uma solução de antrona a 1% em ácido sulfúrico e aquecimento a 120° C durante 5 minutos.

iv. Identificação: o TDM nas amostras de FCMTb é determinado por comparação com o TDM comercial que é utilizado para gerar um padrão de mancha. Os resultados são expressos como dados qualitativos, isto é, a presença (positivo)/ausência (negativo) do TDM avaliado.

g) Identificação de lipoarabinomanana (LAM): para o teste de Western-blot de LAM, os compostos são separados por SDS-PAGE de acordo com métodos padrão, e então transferidos eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose para a imunodetecção usando o anticorpo específico CS35. A interação antígeno-anticorpo é visualizada pela incubação com um antianticorpo (anticorpo secundário IRDye 800CW IgG de cabra anti-rato) que desencadeia uma reação fluorescente.

h) Esterilidade

Todos os processos que requerem a esterilidade, de acordo com o conhecimento do especialista na técnica, são realizados em condições estéreis; isto também se aplica se a esterilidade não é mencionada explicitamente para qualquer

dada etapa que requeira a mesma. O teste de esterilidade é avaliado conforme previsto na Ph. Eur. 2.6.1 (USP <71>).

i) Inativação da Micobactéria

A inativação das micobactérias é avaliada de acordo com a Ph. Eur. 2.6.2.

j) Endotoxinas bacterianas

O teste para endotoxinas bacterianas (teste LAL, Limulus Amoebocyte Lysate) é realizado de acordo com as indicações gerais da Ph. Eur., método 2.6.14, seguindo o método D (método cinético cromogênico), bem como o USP<85>.

Fragmentação dos bacilos

A escolha da fragmentação dos bacilos é feita de modo a permitir uma apresentação ideal de antígenos celulares, particularmente antígenos da parede celular. A fragmentação do FCMtb é determinada tanto por dispersão dinâmica da luz (como descrito abaixo) como por metodologias de difração de laser.

A difração de laser permite a medição da fragmentação em uma faixa entre 0,04  $\mu\text{m}$  e 2000  $\mu\text{m}$ . O ensaio é realizado pelos Servicios Científico-Técnicos de la Unversitat de Barcelona, Espanha. Instrumento: Coulter LS 13320 equipado com um Universal Liquid Module (ULM). Solvente: água purificada/óleo mineral. Resultados: representados como um histograma expressando a frequência relativa do número de partículas (%) em relação ao diâmetro da partícula (0,04  $\mu\text{m}$  - 2000  $\mu\text{m}$ ).

Determinação do diâmetro hidrodinâmico da partícula e do índice de polidispersibilidade

O tamanho médio da partícula, tal como descrito no presente documento, é determinado pela dispersão dinâmica da luz (DLS), que se baseia no conceito físico do movimento browniano das partículas, definido na equação de Stokes-Einstein:

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

Onde:

$d(H)$  = diâmetro hidrodinâmico

$D$  = coeficiente de difusão transicional

5  $k$  = constante de Boltzmann

$T$  = temperatura absoluta

$\eta$  = viscosidade

Sem querer estar limitado a qualquer teoria em particular, a equação de Stokes-Einstein estabelece que as  
10 partículas em suspensão em um meio líquido estão em movimento constante e aleatório, com uma velocidade que depende do seu tamanho: quanto maior for a partícula, mais lento será o movimento Browniano.

Em medições de dispersão dinâmica da luz, a amostra  
15 contendo as partículas a serem medidas é iluminada com uma fonte de luz monocromática, de preferência um laser, e analisada em uma função de correlação de como a intensidade da luz dispersa varia com o tempo. Se, por exemplo, estiverem sendo medidas partículas de grandes dimensões, que se movem  
20 lentamente, a intensidade da luz dispersa varia lentamente, e a correlação demora muito tempo para decair; por outro lado, se estiverem sendo medidas partículas pequenas, visto que estas se movem rapidamente, a intensidade da luz dispersa varia rapidamente, e a correlação de sinal decai mais  
25 rapidamente.

De acordo com esta invenção, as partículas são medidas de preferência com o seguinte aparelho: Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), utilizando água purificada/óleo mineral, como solventes.

30 Salvo indicação em contrário, o instrumento é usado de acordo com as instruções do fabricante, e os ajustes e calibração, se aplicável, também são de acordo com as

instruções do fabricante.

O tamanho é calculado a partir da função de correlação utilizando vários algoritmos. No presente caso, é aplicada a "análise de cumulantes", conforme definida na norma ISO 13321, Parte 8. A função de correlação encaixa os resultados em uma única curva exponencial que permite o cálculo dos seguintes parâmetros:

- O tamanho médio, ou o diâmetro hidrodinâmico da distribuição de partículas. Este o tamanho médio é a média da intensidade.

- O índice de polidispersibilidade (PDI), isto é, correspondente à largura da distribuição do tamanho das partículas.

Os resultados são tipicamente representados como um histograma, expressando a frequência relativa do número de partículas (%) em relação ao diâmetro das partículas que pode ser qualquer diâmetro compreendido no intervalo de 1 nm a 3  $\mu\text{m}$ .

#### Testes de potência

Camundongos C57BU6 fêmeas com 6-7 semanas de idade, isentos de patógenos específicos são fornecidos por Harlan Iberica (Espanha). Amostra de teste: a formulação da tabela 3 e placebo (formulação da vacina sem o componente/substância ativa).

a) Modelos murinos infectados com *M. tuberculosis in vivo*, vacinados com uma única dose: O esquema experimental consiste em: Dia 0: infecção subcutânea no abdômen inferior de camundongos com a cepa H37Rv Pasteur de Mtb ( $4 \times 10^4$  CFUs). Dia 14: tratamento quimioprolático dos animais com uma única dose oral de rifapentina (25mg/kg) e isoniazida (10mg/kg), levando assim a um efeito antibiótico de 1 semana. Dia 21; vacinação com uma única dose de vacina/placebo e/ou

H<sub>2</sub>O subcutaneamente no pescoço. Todas as amostras são obtidas e analisadas para camundongos individuais. Cada experimento inclui: um grupo basal de camundongos infectados e placebo e o grupo experimental de camundongos infectados mais vacinação. Os grupos consistem em 6-7 animais, e as experiências são realizadas em duplicata. Dia 28: Os animais são anestesiados com isofluorano.

b) Modelos murinos infectados com *M. tuberculosis in vivo*, vacinados com duas doses: O esquema experimental consiste em: Dia 0: infecção subcutânea no abdômen inferior de camundongos com a cepa H37Rv Pasteur de Mtb (4x10<sup>4</sup> CFUs). Dia 14 tratamento quimioprolifático dos animais com uma única dose oral de rifapentina (25mg/kg) e isoniazida (10mg/kg), levando assim a um efeito antibiótico de 1 semana. Dia 21: vacinação com a primeira dose de vacina/placebo e/ou H<sub>2</sub>O subcutaneamente no pescoço. Dia 36: vacinação com uma segunda dose de vacina/placebo e/ou H<sub>2</sub>O subcutaneamente no pescoço. Todas as amostras são obtidas e analisadas para camundongos individuais. Cada experimento inclui: um grupo basal de camundongos infectados mais placebo e o grupo experimental de camundongos infectados mais vacinação. Os grupos consistem em 6-7 animais, e as experiências são realizadas em duplicata. Dia 42: os animais são anestesiados com isofluorano.

Para ambos a) e b) acima, após o sacrifício, a análise *ex vivo* do parâmetro de unidades formadoras de manchas (SFU - spot forming units) de interferon- $\gamma$  por ELISPOT é realizada utilizando suspensões de células do baço para a resposta imunológica celular.

Determinação da potência imunogênica em modelos murinos saudáveis de *M. tuberculosis*. Camundongos fêmeas C57BL/6 com 6-7 semanas de idade, isentos de patógenos específicos, foram fornecidos por Harlan Iberica (Espanha). Modelos murino saudáveis de *M. tuberculosis in vivo* vacinados

com duas doses. O esquema experimental consiste em: Dia 0: vacinação com uma primeira dose de vacina de acordo com o modo preferido de realização desta invenção, ou placebo e/ou H<sub>2</sub>O subcutaneamente no pescoço. Dia 21: vacinação com uma  
5 segunda dose de vacina/placebo e/ou H<sub>2</sub>O subcutaneamente no pescoço. Todas as amostras são obtidas e analisadas para camundongos individuais. Cada experimento inclui: um grupo basal de camundongos saudáveis mais placebo e o grupo experimental de camundongos saudáveis mais vacinação. Dia 28:  
10 os animais são anestesiados com isofluorano. Após o sacrifício, a análise dos anticorpos IgG por ELISA é realizada utilizando soro de camundongo para resposta imunológica humoral.

#### Diagnóstico de tuberculose

15 Os métodos para diagnóstico da tuberculose são bem conhecidos por especialistas na técnica. O teste Quantiferon e o teste TST são conhecidos por fornecer resultados confiáveis e podem ser utilizados isoladamente ou em combinação para categorizar pacientes com relação à sua  
20 adequação para serem submetidos à terapia com o produto da presente invenção. QuantiFERON, também conhecido como QFT, é um teste disponível comercialmente para a infecção por tuberculose ou tuberculose latente, fabricado pela Cellestis Limited, Chadstone, Melbourne, Victoria, Austrália. O QFT é  
25 um ensaio de liberação de interferon- $\gamma$  (IGRA) utilizado no diagnóstico da tuberculose. É usado de acordo com as instruções do fabricante. O teste de Mantoux (também conhecido como o teste de triagem de Mantoux, Teste de Sensibilidade Tuberculínica, (teste TST), teste de Pirquet,  
30 ou teste PPD para Derivados de Proteína Purificada) é uma ferramenta para diagnóstico da tuberculose. Uma visão geral de ambos os testes pode ser encontrada em Franken et al., Clin. Vaccine Immunol. de abril de 2007; 14(4): 477-480.

### Exemplos

Os Exemplos a seguir são dados para fornecer ao especialista na técnica um modo prático e uma explicação de algumas configurações específicas da presente invenção. Estes 5 exemplos têm finalidade ilustrativa e, de forma alguma, pretendem limitar o âmbito da invenção de qualquer maneira.

Exemplo 1: Isolamento da cepa NCTC 13536 de *Mycobacterium tuberculosis*

A matéria-prima para a produção de FCMTb é um 10 inóculo da cepa NCTC 13536, também chamada de 511 ou *Mycobacterium tuberculosis* NCTC 13536, uma cepa de *Mycobacterium tuberculosis* isolada de um paciente imunocompetente diagnosticado com tuberculose pulmonar em Barcelona, Espanha. Foi depositada em 2010 na NCTC, em 15 Londres, que é uma organização depositária oficial de acordo com o Tratado de Budapeste. A cepa foi adicionalmente depositada pela coleção de cepas do Serviço de Microbiologia do Hospital de Sant Pau, em Barcelona, na Espanha.

Duas passagens da cepa/linhagem original foram 20 realizadas nos anos de 1995 e 1996, respectivamente. MSL PB#1 corresponde à segunda passagem da cepa original de *M. tuberculosis* NCTC 13536, que foi realizada em outubro de 1996, resultando em 100 frascos (frascos de vidro de 3 ml estéreis), armazenados a  $-70^{\circ} \pm 5^{\circ}$  C. A cepa tem um baixo 25 polimorfismo genético, conforme como identificado por métodos padrão do estado da técnica.

Exemplo 2: Processo a montante para a produção de células de MTB-C

Um fluxograma do processo é apresentado na Figura 30 1. A matéria-prima para a produção do FCMTb é um inóculo da cepa NCTC 13536 de *Mycobacterium tuberculosis* (Exemplo 1). Para assegurar a continuidade do fornecimento desta matéria-prima, é usado de preferência um sistema de lote de sementes.

Assim, um lote de sementes de trabalho (WSL) derivado de um lote de sementes mestre (MSL) é utilizado para a produção de FCMTb. O *Mycobacterium tuberculosis* NCTC 13536 (Exemplo 1) é cultivado durante 3-5 semanas em meio de Löwenstein-Jensen. O crescimento bacteriano é então subcultivado em meio Proskauer Beck a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  com agitação a  $100 \pm 5 \text{ rpm}$ . Uma vez que a concentração bacteriana máxima (por inspeção visual) é alcançada, é iniciada uma subcultura em meio Proskauer Beck e incubada. Quando uma concentração bacteriana semelhante é alcançada, são tomadas pequenas alíquotas. A contagem de bactérias viáveis é determinada pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC), obtidas em meio de Agar Middlebrook após a incubação a  $37^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$  durante 3 a 4 semanas. A contagem de bactérias deve ser  $2-5 \times 10^7 \text{ CFUs/ml}$ .

15 (1) Cultura de *Mycobacterium tuberculosis*

A produção de FCMTb começa com a semeadura de 0,2 ml de uma WSL em uma placa de Agar 7H11 e incubação a  $37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $15 \pm 2$  dias. Em seguida, as colônias são transferidas para um tubo contendo algumas contas de vidro. Depois da mistura, são adicionados cerca de 5 ml de água para injeção (WFI) para se obter uma suspensão bacteriana. Neste ponto, são realizados um teste de contagem de placas viáveis e um teste de esterilidade. Cerca de 100 placas de Agar Middlebrook 7H11 são inoculadas com *M. tuberculosis* usando hastes com algodão embebidas com a suspensão bacteriana para obter culturas confluentes. As placas são incubadas a  $37^\circ \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $21 \pm 2$  dias.

O teste de esterilidade para controle do processo é realizado conforme a seguir:

30 O teste de esterilidade é destinado a assegurar a ausência de fungos e bactérias que não sejam Mycobacteria. Os testes são realizados por inoculação direta, seguindo as condições descritas na Ph. Eur. 2.6.1 para o teste de

esterilidade. As amostras testadas devem ser estéreis. É utilizado o meio 7H11 em vez do 7H10 (como é mencionado na Ph. Eur. 2.6.2.). O meio 7H11 se baseia no meio 7H10 com a adição de um grama de digesto pancreático de caseína, a fim de aumentar o crescimento de cepas de *M. tuberculosis*.

(2) Colheita de *Mycobacterium tuberculosis* e congelamento do extrato bruto

Após o período de incubação, a pureza da cultura bacteriana é controlada por uma inspeção visual das placas de agar e o desempenho em um teste de esterilidade. Em seguida, o crescimento bacteriano é recolhido das placas de agar e transferido para um tubo estéril. O extrato bruto obtido é pesado (20-22 g). A mistura é mantida a  $-80^{\circ} \text{C} \pm 5^{\circ} \text{C}$ .

Exemplo 3: Processo a jusante para a produção de lipossomas obtido do extrato bruto

Um fluxograma do processo é apresentado na Figura 2.

(3) Fragmentação celular e delipidização

O extrato bruto congelado (Exemplo 2) é descongelado a  $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$  e, em seguida, é adicionado tampão de PBS estéril com 4% (p/p) de Triton X114 (pH 7,0 - 7,5) a  $4^{\circ} \text{C}$ . Após a mistura, este é subsequentemente transferido para um recipiente estéril de policarbonato contendo sílica estéril/contas de zircônia. Em seguida, é realizada a fragmentação celular em um Beadbeater pela aplicação do seguinte método de fragmentação: 3 ciclos, cada um consistindo em 5 períodos de ON/OFF, mais 10 minutos de intervalo. Uma vez que o processo tenha terminado, a fração celular fragmentada é separada das contas por lavagens subsequentes (agitação e sedimentação repetidas) em tampão de PBS estéril com 4% de triton-X114, (pH 7-7,5). Uma alíquota da suspensão lavada da fração celular fragmentada é então coletada para o controle do pH e tem seguimento uma

centrifugação final a 845 g a 4° C durante 30 minutos.

Para remover a fração citosólica e para obter uma suspensão rica em fragmentos celulares, é realizada uma centrifugação a alta velocidade por duas vezes a aprox. 20000 g durante 60 minutos, a 4° C. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante amarelado (rico em proteínas solúveis e lipídios) é descartado e o sedimento (grânulos) é ressuspenso em PBS e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas acima. Depois disso, a aparência do sobrenadante deve ser clara e incolor. Finalmente, o sedimento obtido é ressuspenso em um volume final de 50 - 60 ml de PBS (suspensão de FCMtb).

#### (4) Pasteurização

A suspensão de FCMtb é, então, pasteurizada a 65° ± 2° C durante 60 min. Uma vez que a pasteurização é encerrada o pH do FCMtb pasteurizado é determinado por papel de tornassol. Um pH na faixa de 6,5 - 7,5 é considerado aceitável. Frascos estéreis e despirogenados são cheios com 0,5 ml da suspensão de produto e são realizados IPCs sobre esterilidade e inativação de *Mycobacteria*. Por fim, os frascos cheios são congelados a -80 ± 5° C. Uma vez que o material é submetido à pasteurização, ele é separado fisicamente dos materiais não tratados, isto é, os espaços/locais utilizados antes da pasteurização são claramente separados daqueles usados durante o processo de enchimento subsequente.

#### (5) Liofilização

Todos os frascos contendo o produto congelado são então liofilizados a cerca -45° C até 30° C de temperatura e 0,310 mbar de pressão durante cerca de 18 horas (0,5 ml de volume por frasco). Utilizando técnicas assépticas e em atmosfera de N<sub>2</sub>, os frascos são tapados e etiquetados. A substância ativa (fármaco) embalada é então armazenada a -20°

C ± 5° C por até 2 meses.

#### Exemplo 4: Caracterização da proteína

A Figura 3 apresenta uma visão geral da estratégia de caracterização em termos do perfil proteico.

5 Com base na literatura (Andersen, P., 1997, Scand. J. Immunol., 45(2): 15-31; Geisel et al., 2005, J. Immunol.; 174(8):5007-15; Stewart et al., 2005, Infect. Immun., 73(10): 6.831 -7, Wang et al., 2007, J. Mol. Biol., 366(2):375-81), foram escolhidas 6 bandas proteicas como sendo  
10 representativas para avaliação do perfil proteico: proteína HSP70 (Rv0350), proteína 38 kDa (Rv 0934), (Rv 1866c) , proteína 19 kDa (Rv 3763), proteína CFP10 (Rv3874) e proteína ESAT-6 (Rv3875).

A. Determinação do teor de proteína total: os  
15 níveis de proteína total no FCMtb são quantificados pelo método do ácido bicinconínico (BCA). A proteína total representa cerca de 10% (p/p) do teor de FCMtb. Os padrões de referência FCMtb-0429-16e FCMtb-52.1 contêm 167 µg de proteína/mg de FCMtb e 115 µg de proteína mg de FCMtb,  
20 respectivamente.

B. Identificação de perfil de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE): O perfil proteico do princípio ativo FCMtb determinado por comparação com os antígenos de referência do  
25 *Mycobacterium tuberculosis*, correspondendo ao ESAT6 (6 kDa) (7); CFP10 (10 kDa) (6), Ag85B (30 kDa) (1); 38kDa (2); HSP70 (70 kDa) (4), bem como o marcador de peso molecular MW (5), são apresentados (ver Figura 4). A determinação do perfil proteico do princípio ativo (substância medicamentosa) FCMtb  
30 e a identificação das bandas (de aproximadamente 70 kDa, 38 kDa, 30 kDa, 10 kDa e 6 kDa) é feita por coloração por Coomassie. A identificação da banda de 19 kDa (lipopolipeptídeo) é realizada por coloração por prata.

C. Identificação do perfil de proteína pelo ensaio de Western-blot com anticorpos monoclonais específicos: O perfil proteico do princípio ativo FCMtb é determinado pelos padrões obtidos utilizando análises de Western-blot com anticorpos monoclonais (mAb): Anti-HSP70 (70 kDa, Fig. 5c), anti-38kDa (Fig. 5d), anti-Ag85B (30 kDa, Fig. 5e).

FCMtb-52.1 é o lote de referência para FCMtb de acordo com o modo preferido de realização da presente invenção.

#### Exemplo 6: Caracterização Lipídica

A caracterização do perfil lipídico do FCMtb consiste em um processo de fracionamento com base em extração por clorofórmio:metanol (1:1). O processo de fracionamento realizado nestes estudos foi baseado no procedimento descrito por Delmas *et al.*, 1997, *Glycobiology* 7(6), 811-7. Cromatografia em camada fina (TLC) tem sido o método utilizado para analisar o teor de lipídios e glicolipídios presentes no FCMtb. Especificamente, poliaciltrealose (PT), dimicolato de trealose (TDM), dialciltrealose (DAT), fosfatidilinositol-manosídeo (PIMS) e outros fosfolipídios, bem como ftiocerol dimicocerosatos (PDIM) e ácidos micólicos foram identificados por cromatografia em camada fina (TLC), tanto nas cepas de referência H37Rv e NCTC 13536, como em diferentes lotes de FCMtb. Ver Figura 7a. O teor de 6,6'-dimicolato de trealose (TDM) é analisado por TLC no sobrenadante. A determinação dos ácidos micólicos é realizada nos sedimentos, seguindo um método de TLC. Embora não sejam conhecidos dados quantitativos para o perfil lipídico do MTB-C, o perfil lipídico qualitativo estabelecido nos estudos está de acordo com o conhecimento científico atual e permite uma caracterização padrão dos lipídios imunogênicos conhecidos até agora. FCMtb foram comparados com a fração

lipídica da célula inteira das cepas NCTC 13536 e H37Rv de *M. tuberculosis* e TDM de padrão comercial (ver Figura 7a e 7b). Em geral, o teor de lipídios se mostrou consistente em diferentes lotes de lipossomas compreendendo FCMtb de acordo com a presente invenção. A Figura 7d apresenta a identificação de LAM.

Exemplo 6: Caracterização do material celular fragmentado

Os resultados preliminares utilizando ambas as metodologias mostram que o tamanho de fragmentos do FCMtb é principalmente inferior a 1  $\mu\text{m}$  (99% < 1  $\mu\text{m}$ ), o que é confirmado por microscopia eletrônica do FCMtb: o tamanho do fragmento varia, principalmente, de 100 a 300 nm.

Os níveis de DNA residual após extração com uma mistura de fenol/clorofórmio foram investigados por absorvância a 260 nm (limite de detecção: 0,2  $\mu\text{g}$  de DNA/mg de FCMtb). Os resultados típicos obtidos até agora estão abaixo de 15  $\mu\text{g}$  DNA/mg FCMtb.

A consistência do processo de produção do composto ativo é mostrada por um perfil lipídico e proteico que é reproduzível para diferentes lotes do FCMtb.

Exemplo 7: Imunização de camundongos e visualização da atividade biológica

Interação de bandas de proteína de FCMtb com soro imunizante de camundongo: Utilizando a metodologia Western-blot foi possível visualizar as bandas de proteínas do FCMtb que interagem com os anticorpos IgG presentes no soro obtido de camundongos infectados inoculados duas vezes com a vacina à base da formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção. Este é considerado como um indicador para a atividade biológica (Figura 6).

Exemplo 8: Atividade *in vivo* de uma formulação de lipossomas compreendendo FCMtb

A atividade biológica da vacina é estudada em um modelo *in vivo*, avaliando a potência imunogênica do FCMtb sem lipossomas (reconstituído com água para injeção, WFI) e com FCMtb na formulação de lipossomas de acordo com a melhor maneira de realização da presente invenção (5% de sacarose, ver acima) (Figura 8). Estes resultados demonstram as vantagens da formulação de lipossomas com sacarose.

Os estados de agregação ou fusão dos lipossomas são parâmetros que demonstraram ter um impacto significativo sobre a atividade biológica da vacina. Por conseguinte, os investigadores da presente invenção realizaram um controle exaustivo do tamanho de partícula e do índice de polidispersibilidade durante a fabricação e na liberação dos lotes de vacinas.

Exemplo 9: Efeito da sacarose

Em um teste inicial, um dos seguintes excipientes (a) 1,5% de glicina e (b) de 5% de sacarose, respectivamente, foram opcionalmente incorporados em uma formulação de lipossomas compreendendo fragmentos da cepa NCTC 13536 do MTB-C. Subsequentemente, foi realizada uma avaliação comparativa das propriedades físico-químicas e da atividade biológica associada a ambas as formulações.

Os resultados obtidos pela medição após a reconstituição da composição de lipossomas liofilizada e depois do teste de acordo com os parâmetros de especificação de lotes atuais são apresentados na Tabela 5.

Parâmetro	Critério de aceitação	FCMtb formulado em uma suspensão de lipossomas		
		Sem excipiente	Sacarose a 5%	Glicina 1,5%
Aparência	Pó branco a quase branco	ND	Está de acordo	Está de acordo

Morfologia do sedimento		Plano a quase plano e homogêneo		ND	Está de acordo	Está de acordo
Teor de água (%)		≤ 3%		ND	1,4	3
Tempo de reconstituição (s)		Bem reconstituído em ≤ 10s		ND	5	12
pH		7 - 8		8,1	7,4	7
Tamanho da partícula	Diâmetro hidrodinâmico (nm) Pdl <sup>(a)</sup>	75 ± 20 (≤ 0,250)		370 <sup>(1)</sup> (0,492)	66 (0,215)	504 <sup>(1)</sup> (0,569)
Potência Imunogênica em modelo murino infectado com <i>M. tuberculosis</i>	Unidade formadoras de colônias IFN-γ antígeno-específicas	PPD	3 - 12 Razão SFU/10 <sup>6</sup> células com relação ao valor basal (valor basal em SFU/10 <sup>6</sup> células)	3,6 (183)	5,1 (183)	2,8 (183)
		Ag85 B (30 kDa)	5-20 Razão SFU/10 <sup>6</sup> células com relação ao valor basal (valor basal em SFU/10 <sup>6</sup> células)	5,5 (73)	9,6 (73)	5,4 (73)

<sup>(a)</sup> Índice de polidispersibilidade

<sup>(1)</sup> Presença de agregados lipossômicos

ND = não determinado

Tabela 5: Resultados das especificações para 3 formulações diferentes, medidos após a reconstituição da composição de lipossoma liofilizada.

5 Os investigadores deste estudo descobriram, surpreendentemente, que uma formulação com 5% de sacarose proporciona a vantagem de melhores resultados físico-químicos, tal como teor de água ou tempo de reconstituição, respectivamente. Mas o fato mais importante é a redução  
10 significativa da agregação de lipossomas (tamanho das partículas, diâmetro hidrodinâmico) apresentada na formulação contendo sacarose em comparação com as outras duas formulações. A análise por dispersão dinâmica da luz apresentou um diâmetro hidrodinâmico de  $75 \pm 20$  nm (índice de  
15 polidispersão  $< 0,350$ ) para os lipossomas contendo sacarose. A microscopia eletrônica de preparações crio-fraturadas de lipossomas contendo sacarose mostra uma mistura de lipossomas multilamelares e unilamelares com tamanhos entre 40 e 100 nm (Figura 9).

20 Devido a este parâmetro melhorado em conjunto com os menores teores de água observados ( $\leq 2\%$ ) para a formulação de sacarose a 5%, são esperados melhores resultados de estabilidade para esta formulação. Este é realmente o caso. Dados dos investigadores do presente estudo de lotes  
25 experimentais formulados com um 1,5% de glicina armazenado em temperatura ambiente por 3 meses indicaram uma perda drástica da atividade biológica para PPD (potência imunogênica). Em contraste, a atividade biológica de PPD permanece basicamente inalterada quando a formulação compreendendo sacarose a 5% é  
30 estudada após 3 meses de armazenamento à temperatura ambiente. Assim, a sacarose também proporciona a vantagem de uma melhor manutenção da atividade biológica.

Exemplo 10: Propriedades biológicas da formulação

compreendendo sacarose

A formulação de acordo com a Tabela 3 foi utilizada para estudos biológicos. A resposta imunológica celular desencadeada pela inoculação da vacina de acordo com a configuração preferida de realização da presente invenção (inoculação única) em um modelo murino infectado por *Mycobacterium tuberculosis* pode ser medido por ELISPOT e os resultados são apresentados na Tabela 6.

PARÂMETRO		LOTE (50 µg/dose, 166,7 µg/ml)			
		a09	c09	d09	e09
Unidades formadoras de manchas IFN-γ antígeno-específico (SFU)	PPD Razão SFU/106 células com relação ao valor basal (Valor basal: SFU/10 <sup>6</sup> células)	5,1  (Basal: 183 SFU/10 <sup>6</sup> células)	6,3  (Basal: 98 SFU/10 <sup>6</sup> células)	7,2  (Basal: 164 SFU/10 <sup>6</sup> células)	6,5  (Basal: 164 SFU/10 <sup>6</sup> células)
	Ag85B Razão SFU/106 células com relação ao valor basal (Valor basal: SFU/10 <sup>6</sup> células)	9,6  (Basal: 72 SFU/10 <sup>6</sup> células)	9,9  (Basal: 44 SFU/10 <sup>6</sup> células)	11,9  (Basal: 90 SFU/10 <sup>6</sup> células)	12,3  (Basal: 88 SFU/10 <sup>6</sup> células)

ND: não determinado.

10 Tabela 6: Resposta celular após a inoculação em camundongos

A inoculação da vacina baseada na formulação de lipossomas leva a um aumento significativo da resposta imunológica celular *in vivo*, em comparação com os valores basais de animais infectados quando é utilizado o ensaio ELISPOT para a determinação dos níveis de resposta. A proporção em relação à resposta basal é de 4 a 8 vezes maior para PPD e 8 a 14 vezes maior para Ag85B. A vacina baseada na formulação de lipossomas também é capaz de induzir uma

resposta humoral poliantigênica, que tem um efeito protetor, especialmente quando existe uma elevada difusão da infecção (Guirado *et al.*, 2006, *Microbes Infect.* 8, 1252-1259).

Foi feita uma comparação específica entre os dados da potência imunogênica obtida com a formulação sem sacarose versus a formulação que contém sacarose como excipiente principal. Os resultados obtidos indicam claramente que a resposta imunológica celular induzida por uma dose de 50 µg de FCMtb da formulação de sacarose é cerca de 1,5 vezes maior do que a obtida com uma dose idêntica da formulação sem sacarose em um modelo de vacinação única. Estes níveis mais elevados de resposta imunológica celular são obtidos em ambos os testes de potência: o realizado para as especificações de liberação de lotes (modelo de vacinação única) eo teste adicional incluído para exercício de comparabilidade (modelo vacinado duas vezes). Além disso, em ambos os testes de potência, a resposta imunológica celular induzida por uma dose de 50 µg de FCMtb da formulação com sacarose apresenta níveis semelhantes aos obtidos com 200 µg de FCMtb da formulação sem sacarose. Os resultados, medidos após a reconstituição da composição de lipossomas liofilizada, são apresentados na Figura 10a e 10b. A formulação compreendendo sacarose apresenta uma redução significativa da agregação de lipossomas. Acredita-se que esta seja a razão para o aumento da imunogenicidade. A resposta imunológica celular conseguida com uma dose de 50 µg da nova formulação é quase comparável à observada com uma dose de 200 µg obtida com a formulação sem sacarose. É sabido neste campo, que a resposta celular é considerada como sendo a resposta relevante (North RJ, Jung YJ (2004), *Annu. Rev. Immunol.* 22:599-623).

Exemplo 11: Processo de fabricação da formulação de lipossomas liofilizada

Uma configuração do processo de fabricação de uma

composição farmacêutica compreendendo a formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção é apresentada na Figura 11a e 11b. Resumidamente, esta compreende as seguintes etapas 1 a 5.

5 (1) Preparação dos componentes brutos da LCS

Lecitina de soja bruta da LCS é dissolvida em etanol (1:1; p/p) e colato de sódio é dissolvido em água (1:5; p/p). As soluções são esterilizadas por filtração. Após mistura das soluções de lecitina de sódio e de colato de  
10 sódio, é adicionado FCMtb liofilizado (Exemplo 1) com agitação. As proporções dos componentes são 0,03:0,2:0,7 (FCMtb: colato de sódio:lecitina de soja; p/p/p).

2) Preparação da LCS bruta

A fase aquosa é transferida para um misturador de  
15 aço inoxidável esterilizado. A fase lipídica de (1), contendo lecitina de soja, colato de sódio e FCMtb, é adicionada em uma proporção de 0,7:0,3 (fase aquosa:fase lipídica, p/p). As fases são misturadas a 2200 rad/s durante 3 minutos para a homogeneização e a formação de lipossomas. Após a  
20 homogeneização, a LCS bruta é transferida para outro recipiente e deixada repousar durante pelo menos 5 minutos. É realizado um IPC dos tamanhos das partículas na LCS bruta.

(3) Diluição da LCS bruta, formulação final da suspensão de lipossomas

25 Uma solução a 10% (p/p) de sacarose é preparada e esterilizada. A solução de sacarose é misturada com água e LCS bruta nas proporções adequadas para obter a suspensão de lipossomas final (LS) constituída por 21 mg de LCS/ml em solução de sacarose a 5%. O pH, a esterilidade e o tamanho  
30 das partículas são testados como controles de processo.

(4) Enchimento

Os frascos são cheios com 0,4 ml de LS (com agitação contínua) e parcialmente fechados para congelamento

e liofilização.

(5) Liofilização, embalagem e rotulagem

Os frascos são congelados a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  até ocorrer a liofilização. O processo de liofilização é realizado na faixa de  $-45^{\circ}\text{C}$  a  $25^{\circ}\text{C}$  de temperatura e 0,150 mbar. O processo dura 24 horas. No final da liofilização os frascos são totalmente tapados em atmosfera de  $\text{N}_2$ , encapsulados, rotulados e armazenados a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Exemplo 12: Terapia adjuvante contra a LTBI necessita de apenas uma única dose de 25  $\mu\text{g}$  de FCMtb

Um estudo clínico duplo cego randomizado de fase II foi estabelecido para avaliar 3 doses de FCMtb (5, 25, 50  $\mu\text{g}$ , cada uma preparada conforme descrito na configuração preferida de realização desta invenção) e placebo em 96 indivíduos positivos para HIV (HIV +) e negativos para HIV (HIV-) com infecção por tuberculose latente (LTBI) (TST+ e Quantiferon+) que foram distribuídos aleatoriamente em grupos de  $n = 12$  por braço de tratamento, após receberem um tratamento de isoniazida durante 1 mês. Os indivíduos foram inoculados duas vezes com FCMtb (5, 25, 50  $\mu\text{g}$ , cada um preparado conforme descrito na configuração preferida de realização desta invenção), imediatamente em seguida a quimioterapia com isoniazida e com 4 semanas de intervalo.

Perfil imunológico: FCMtb (5, 25, 50  $\mu\text{g}$ , cada uma preparada conforme descrito na configuração preferida de realização desta invenção) produziu uma resposta poliantigênica em forma de sino contra antígenos secretados (ESAT-6, Ag85B) e estruturais (16 kDa 38 kDa) que foi estimulada em todas as doses (Figuras 12 e 13). FCMtb (5, 25 e 50  $\mu\text{g}$ , cada uma preparada conforme descrito na configuração preferida de realização desta invenção) também induziu uma resposta de memória de longo prazo (teste da OMS) nas doses mais elevadas, compatível com um efeito profilático.

Surpreendentemente, embora as respostas imunológicas globais tenham sido mais intensas em indivíduos HIV- do em indivíduos HIV+, a inoculação única de 25 µg de FCMtb (5, 25, 50 µg cada uma preparada conforme descrito na configuração preferida de  
5 realização desta invenção) produziu a melhor resposta imunológica em ambas as populações (Figuras 12 e 13).

Conclusão: Uma inoculação única de 25 µg é a melhor escolha para terapia adjuvante contra a LTBI em indivíduos HIV negativos e HIV positivos.

10 Breve descrição das figuras

Figura 1: Fluxograma apresentando o processo a montante do composto ativo FCMtb, incluindo os materiais e reagentes envolvidos no processo e controles de processo adequados.

15 Figura 2: Fluxograma apresentando processo a jusante do composto ativo FCMtb, incluindo os materiais e reagentes envolvidos no processo e controles de processo adequados.

20 Figura 3: Fluxograma de caracterização de proteínas.

Figura 4: Identificação de antígenos por SDS-PAGE e pelo método de coloração por Azul de Coomassie. São apresentados os antígenos de referência ESAT6 (6 kDa) (7); CFP10 (10 kDa) (6); Ag85B (30 kDa) (1); 38kDa (2), HSP70 (70  
25 kDa) (4), bem como o marcador de peso molecular MW (5).

Figura 5: Caracterização de proteínas. Figura 5a: perfil de proteínas; perfil de proteínas do padrão de referência FCMtb-52.1 (1 a 6) em concentrações finais de 15,6 µg FCMtb/ml (1, 2), 6,25 µg FCMtb/ml (3, 4) e 1,56 µg  
30 FCMtb/ml (5, 6), SDS-PAGE seguido por coloração com Coomassie. MW em kDa. Figura 5b: identificação da banda de 19 kDa, SDS-PAGE seguida de coloração por prata.

Figura 5c: Perfil de proteína: identificação das

bandas (10 kDa e 6 kDa) nos lotes de FCMtb indicados pela metodologia de SDS-PAGE e coloração por prata realizadas em paralelo com o padrão ESAT-6 da Lionex. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 9, 10, 11, (lote FCMtb-52.1 na banda 9)), padrão ESAT-6 da Lionex em diferentes concentrações (4 a 8);  
5 Figura 5d: identificação por Western-Blot do antígeno HSP70 de *M. tuberculosis* (Rv 0350) em lotes de FCMtb por Western-blot utilizando anticorpos específicos paralelos ao padrão HSP70 de *M. tuberculosis*. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9), padrão de HSP70 (5, 6);  
10 Figura 5e: Identificação do antígeno 38 kDa de *M. tuberculosis* (Rv 0934) em lotes de FCMtb pelo método de Western-blot usando um anticorpo específico e realizado em paralelo com padrão 38 kDa de *M. tuberculosis* da Lionex. A detecção da fluorescência foi utilizando o Sistema Odyssey. Diferentes lotes de FCMtb (1, 2, 3, 6, &), padrão 38 kDa (4, 5).  
15 Figura 5f: Identificação do antígeno Ag85B (Rv 1886c) em lotes de FCMtb pelo método de Western-blot utilizando um anticorpo específico e realizado em paralelo com o padrão Ag85B de *M. tuberculosis* da Lionex. A detecção da fluorescência foi feita utilizando o Sistema Odyssey. Lotes de FCMtb (1, 2, 3, 5, 6, 7), padrão Ag85B (4).  
20

Figura 6: interação de bandas de proteínas indicadas de diferentes lotes de FCMtb (50 µg/faixa) com 1/8000 de soro diluído obtido de camundongos infectados depois de serem inoculados duas vezes com a composição de vacina farmacêutica baseada na formulação de lipossomas de acordo com a presente invenção, utilizando a metodologia Western-blot.  
25

Figura 7: análise lipídica. Figura 7a: Identificação de poliaciltrealose (PT), trealose 6,6'-dimicolato (TDM) e diaciltrealose (DAT) em cepas de referência (H37Rv (2) e NCTC 13536 (1) e diferentes lotes de FCMtb (3-9), e padrão de TDM (10) pelo método de TLC. Figura  
30

7b: Identificação de trealose 6,6'-dimicolato (TDM) em lotes de FCMtb pela metodologia de TLC. Os painéis (A) e (B) representam dois ensaios independentes. (A) padrão TDM (11) e (12), outras faixas diferentes lotes FCMtb B:. (1) padrão TDM (1), outras pistas diferentes lotes de FCMtb. Figura 7c: padrão de ácidos micólicos I, II w IV em lotes de FCMtb por metodologia de TLC. Os painéis (A), (B) e (C) representam três ensaios independentes. (A) lotes de FCMtb (1-6 (padrão FCMtb-51.2 6)). (B) para ilustração/referência. (C) lote de FCMtb-10 47b (1) comparado com padrão de ácido micólico (2). Figura 7d: identificação de LAM (referência na faixa esquerda, as amostras derivadas de lipossomas de acordo com a invenção nas faixas restantes).

Figura 8: Comparação da potência imunológica celular de FCMtb ressuspensos com água para injeção (WFI) versus FCMtb formulado com lipossomas (rotuladas vacina RUTI, lote 10a), n mesma dose (50 µg/dose).

Figura 9: preparação por crio-fratura de concentrado de lipossomas (LCS) (microscopia eletrônica).

Figura 10: a: resposta imunológica celular por lote testado com as duas formulações da vacina em um teste de potência (uma vacinação), b: como na figura a, porém com duas vacinações. "Formulação II": compreendendo 5% (p/p) de sacarose, de acordo com a Tabela 1 deste documento. 20 "Formulação I": tal como a formulação II, com a exceção que não há sacarose presente. µg se refere à µg FCMtb/dose. 85B: Ag85B.

Figura 11: Fluxograma do processo de acordo com a configuração preferida de realização da presente invenção.

Figura 12: Perfil imunológico de 1 inoculação de RUTI 25 µg tal como descrita no Exemplo 12.

Figura 13: Imunogenicidade (HIV- e HIV+) tal como descrito no Exemplo 12.

## REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, caracterizada por compreender:

- 5 (a) fragmentos de uma cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C),  
(b) um agente de formação de lipossoma,  
(c) 1% a 20% (p/v) de sacarose, de preferência 2% a 12% (p/v) de sacarose, mais de preferência de 3% a 8% (p/v) de sacarose, e mais de preferência de 4% a 6% (p/v) de sacarose,  
10 em que o diâmetro hidrodinâmico das partículas é de 120 nm ou menos, em que o tamanho hidrodinâmico é determinado pelo espalhamento de luz.

2. FORMULAÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo diâmetro hidrodinâmico das partículas estar  
15 na faixa de 40 a 110 nm, de preferência, de 55 a 95 nm.

3. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada pela formulação de lipossomas ser uma emulsão, em que o diâmetro hidrodinâmico das partículas é, de preferência, inferior a 40 nm.

20 4. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo índice de polidispersibilidade das partículas ser de 0,4 ou menos, de preferência 0,3.

25 5. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pela cepa do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) ser uma cepa virulenta do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-C) e, de preferência, a cepa NCTC 13536 do MTB-C, depositada em 2010 na NCTC (National Collection of Type Cultures), em Londres; e/ou  
30 em que os fragmentos de células MTB-C são ou

compreendem fragmentos de parede celular; e

em que a formulação compreende preferencialmente fragmentos da cepa MTB-C NCTC 13536, depositada em 2010 no NCTC em Londres.

5 6. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada por compreender ainda:

(d) um agente tensoativo; e/ou

(e) um ou mais surfactantes não iônicos; e

10 em que a razão entre (a) e (d) está opcionalmente entre 0,05:1 e 1:5 (p/p); e

em que opcionalmente o agente tensoativo é selecionado a partir de colato, desoxicolato, colesterol e hemisuccinato de colesterol.

15 7. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo agente de formação de lipossomas ser um fosfolipídio hidrogenado ou parcialmente hidrogenado ou não hidrogenado, de preferência, lecitina, e mais preferencialmente, lecitina de soja; e/ou

20 em que a dita formulação de lipossomas compreende ainda um ou mais surfactantes não iônicos; e/ou

em que a dita formulação de lipossomas contém adicionalmente um ou mais sais ou uma solução destes, em que o sal é, de preferência, cloreto de sódio; e/ou

em que a formulação de lipossomas é liofilizada.

25 8. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada por compreender pelo menos dois, de preferência três, mais preferencialmente quatro e ainda preferivelmente todas as seguintes características:

30 (i) um primeiro polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 70 kDa conforme medido em seguida à eletroforese

em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o primeiro polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à uma impressão digital peptídica da proteína HSP70 do *M. tuberculosis* (Rv0350),

5                   (ii) um segundo polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 38 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o segundo polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à uma impressão digital peptídica da proteína 38kDa  
10 do *M. tuberculosis* (Rv0934),

                  (iii) um terceiro polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 30 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o terceiro polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica  
15 semelhante à uma impressão digital peptídica da proteína Ag85B do *M. tuberculosis* (Rv1866c), e

                  (iv) um quarto polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 10 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que  
20 o quarto polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à uma impressão digital peptídica da proteína CFP10 do *M. tuberculosis* (Rv3874), e

                  (v) um quinto polipeptídeo com um peso molecular de cerca de 6 kDa conforme medido em seguida à eletroforese em  
25 gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS), em que o quinto polipeptídeo tem uma impressão digital peptídica semelhante à uma impressão digital peptídica da proteína ESAT-6 do *M. tuberculosis* (Rv3875).

                  9. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das  
30 reivindicações 1 a 8, caracterizada por pelo menos um dos

seguintes antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, ou fragmento deste, estarem presentes: HSP70, proteína 38 kDa e Ag85B.

5 10. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada por compreender um ou mais ácidos micólicos e/ou um micolato conjugado com açúcar, de preferência dimicolato de trealose e/ou um glicolípido, de preferência lipoarabinomanana.

10 11. SUSPENSÃO, caracterizada pela formulação de lipossoma, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, ser reconstituída em um solvente, onde o solvente é de preferência aquoso e mais preferencialmente é ou compreende soro fisiológico.

15 12. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada por compreender a formulação, conforme definida em qualquer das reivindicações 1 a 8 ou a suspensão, conforme definida na reivindicação 11, e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável e/ou um adjuvante farmacêuticamente aceitável.

20 13. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, a suspensão, conforme definida na reivindicação 11 ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 12, caracterizada por ser para uso em um método de tratamento do corpo humano ou animal por terapia.

25 14. FORMULAÇÃO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, a suspensão, conforme definida na reivindicação 11 ou a composição farmacêutica, conforme definida na reivindicação 12, caracterizada por ser para uso em um método de tratamento ou prevenção da tuberculose.

30 15. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por ser selecionada dentre o seguinte:

a) para uso em um método de prevenção de tuberculose ativa em indivíduos com uma infecção latente por tuberculose;

5 b) para uso em um método de profilaxia primária da tuberculose, a fim de evitar a infecção de indivíduos que foram expostos à doença, mas que ainda não estão infectados, ou

c) para uso em um método de tratamento ou prevenção da tuberculose latente.

10 16. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 ou 15, caracterizada por ser para administração ao corpo humano em uma dose que compreende 1 a 1000, de preferência 3 a 250, mais de preferência de 4 a 80 e  
15 ainda mais de preferência de cerca de 5, cerca de 25 ou cerca de 50 µg/dose de frCMT.

17. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 ou 15, caracterizada por ser para  
20 administração ao corpo humano em uma dose única de inoculação de 25 pg de frCMT.

18. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 17, caracterizada por ser para uso em  
25 terapia de combinação que compreende, de preferência, um antibiótico, mais de preferência um ou mais de isoniazida e uma ansamicina, em que a ansamicina é mais de preferência a rifampicina.

19. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU  
30 COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 17,

caracterizada por ser para uso em terapia adjuvante.

20. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada por ser para administração em terapia adjuvante a um ser humano positivo para HIV.

21. FORMULAÇÃO DE LIPOSSOMAS, SUSPENSÃO OU COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada por ser para administração a um ser humano (soronegativo) negativo para HIV.

Figuras:

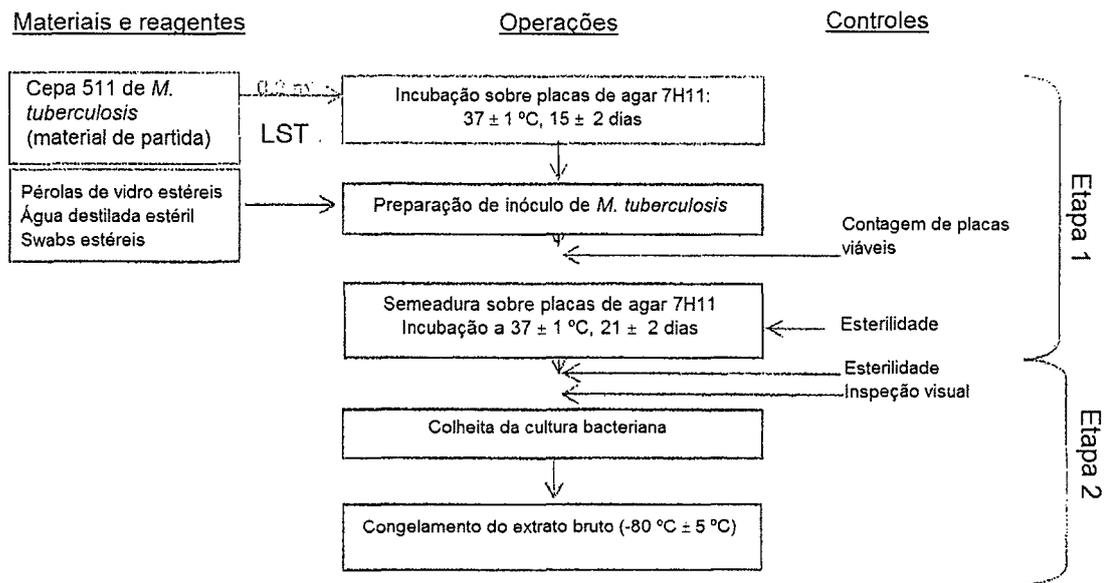


Figura 1

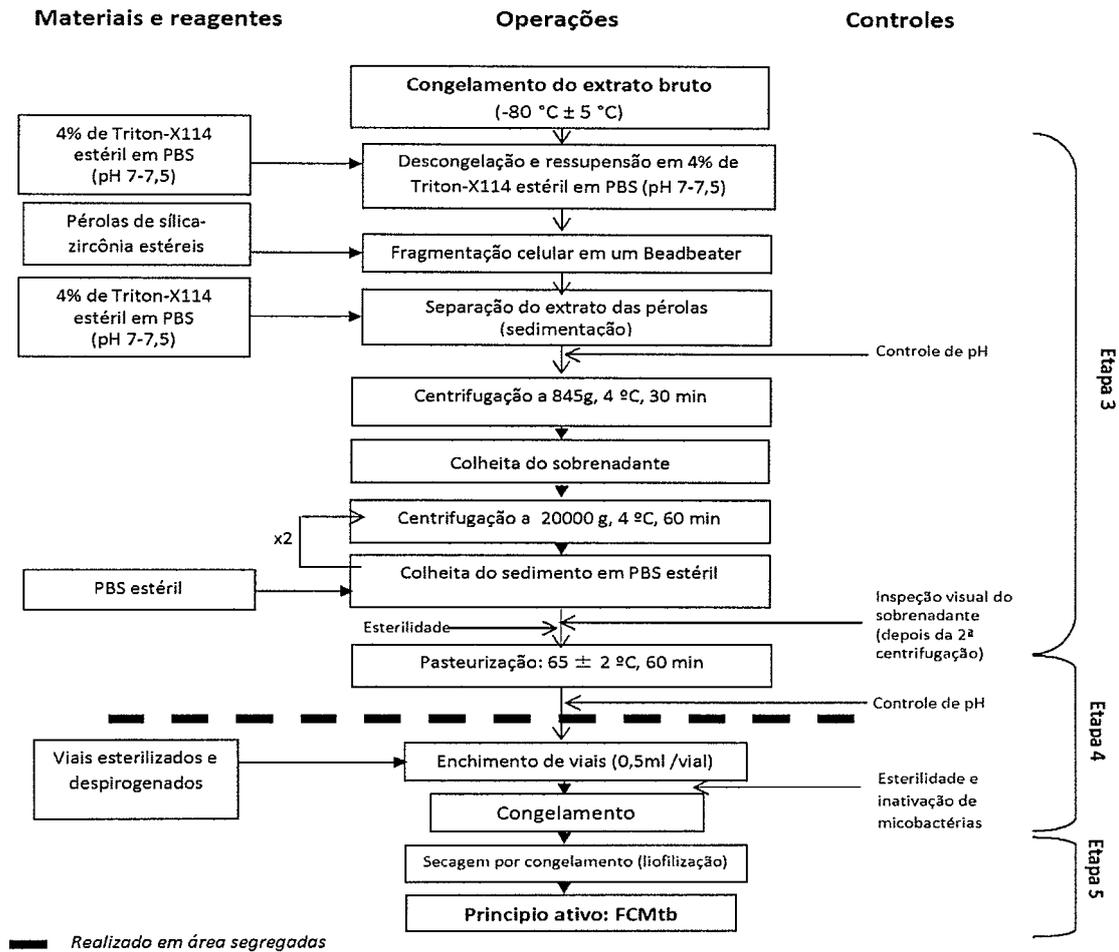


Figura 2

PERFIL DE PROTEÍNAS

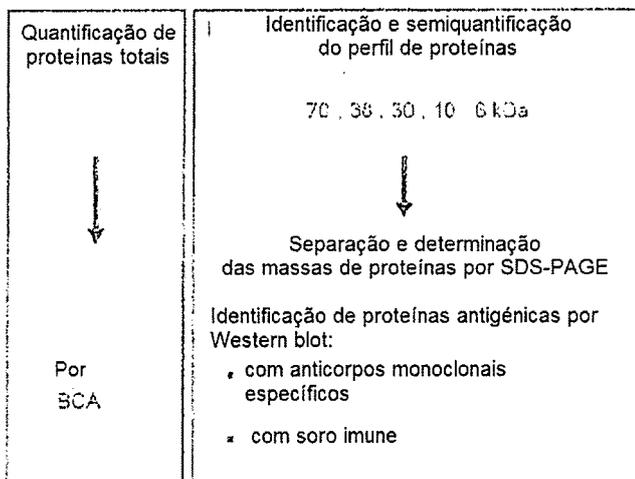


Figura 3

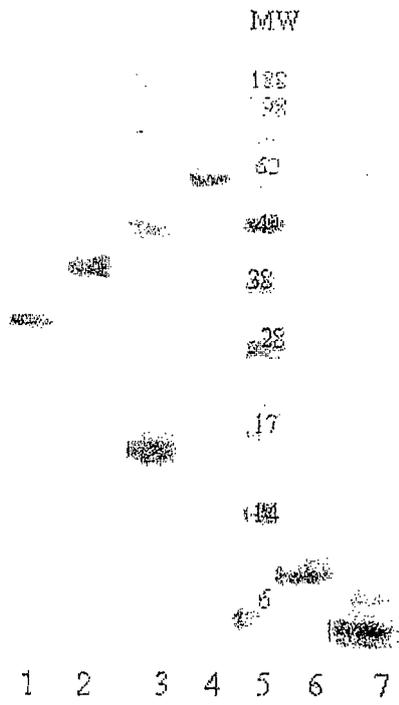


Figura 4

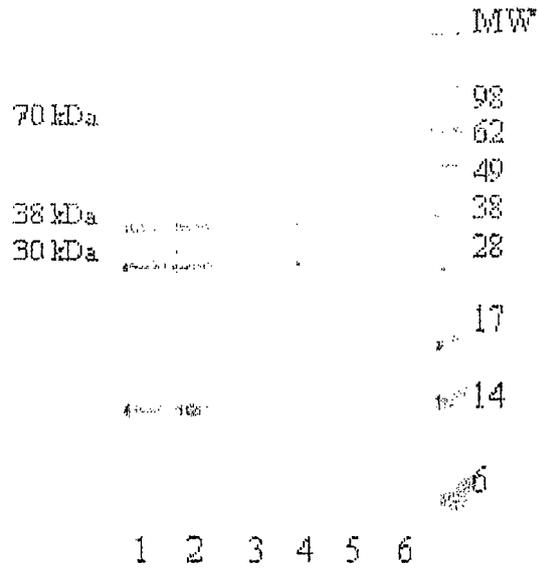


Figura 5a

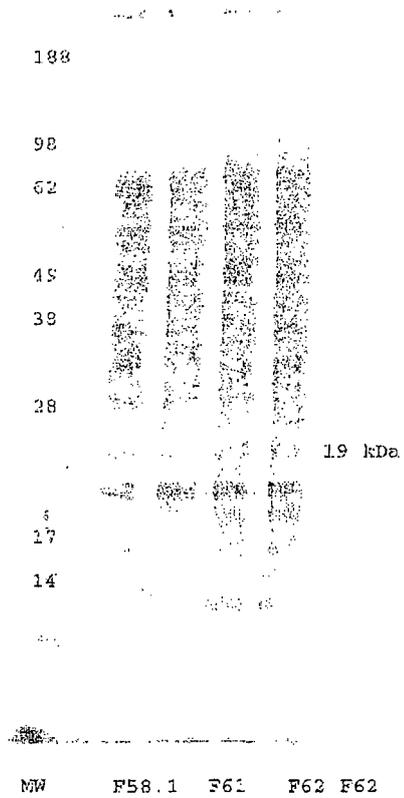


Figura 5b

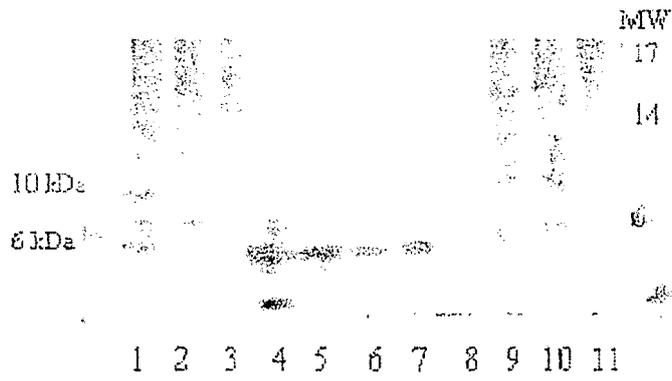


Figura 5c

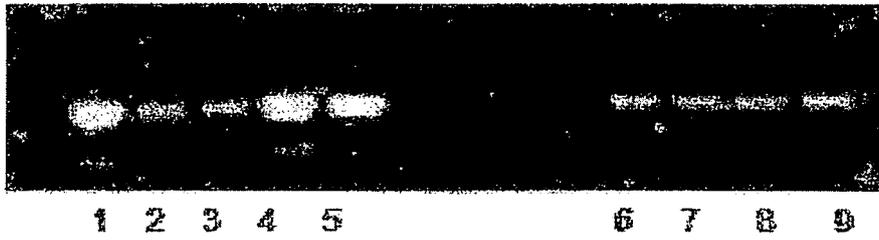


Figura 5d

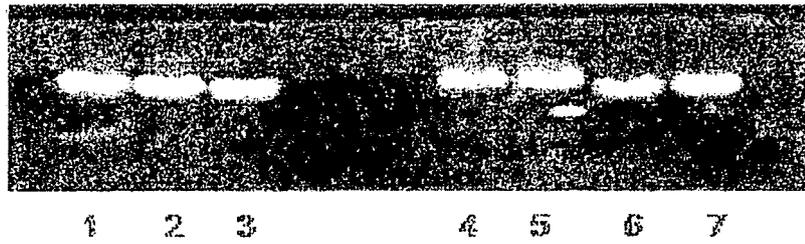


Figura 5e

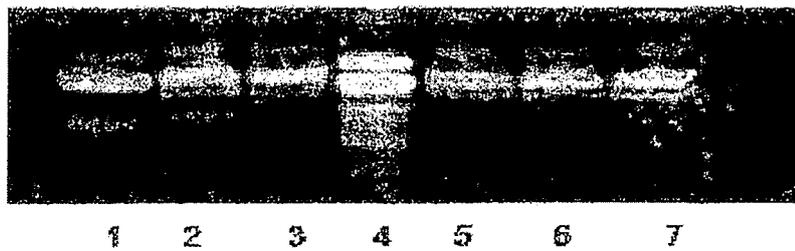


Figura 5f

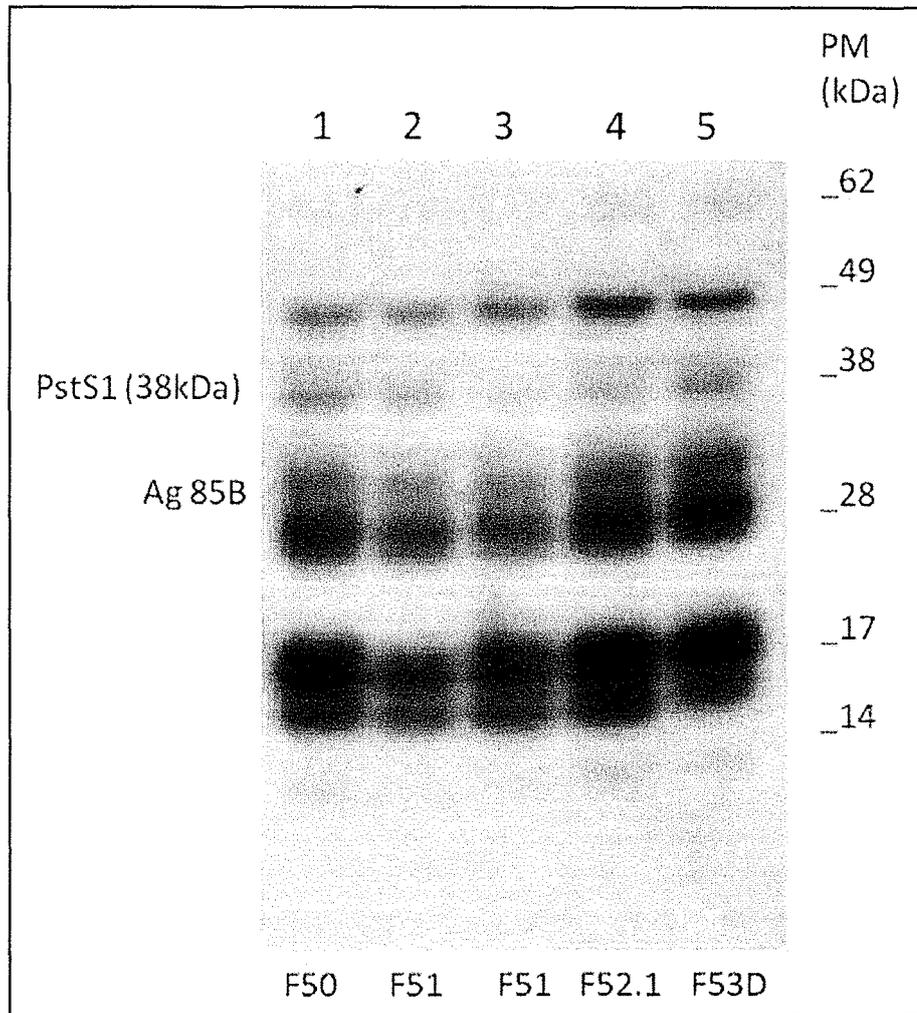


Figura 6

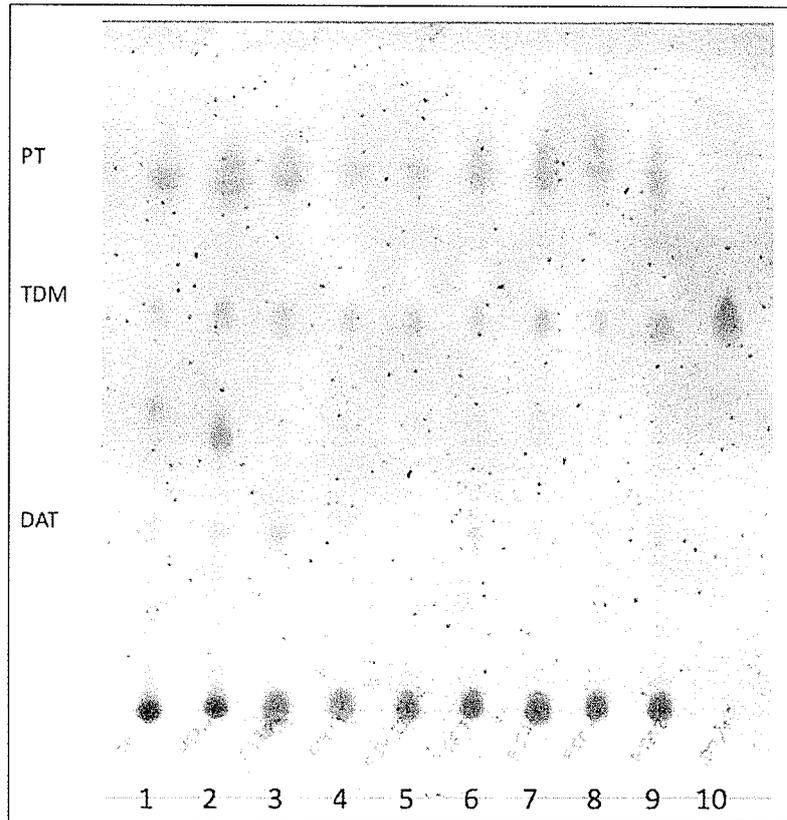


Figura 7a

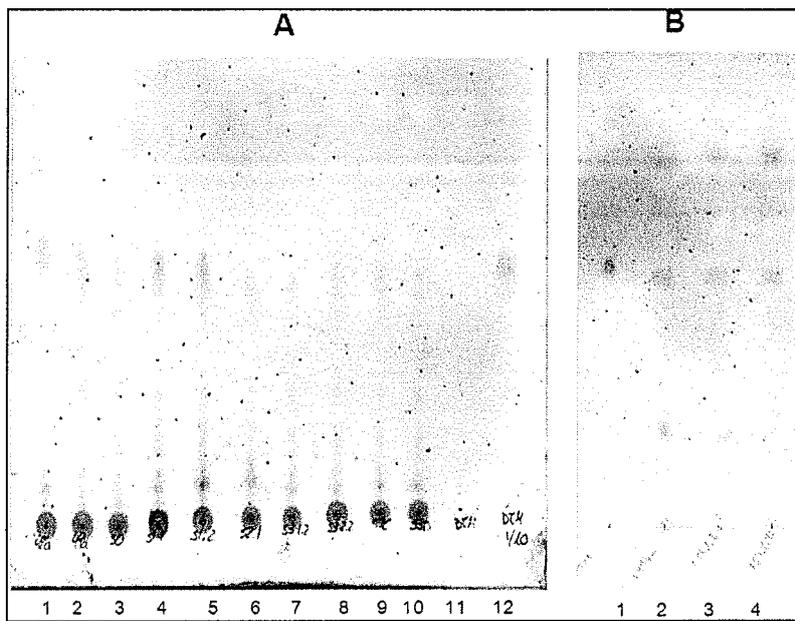


Figura 7b

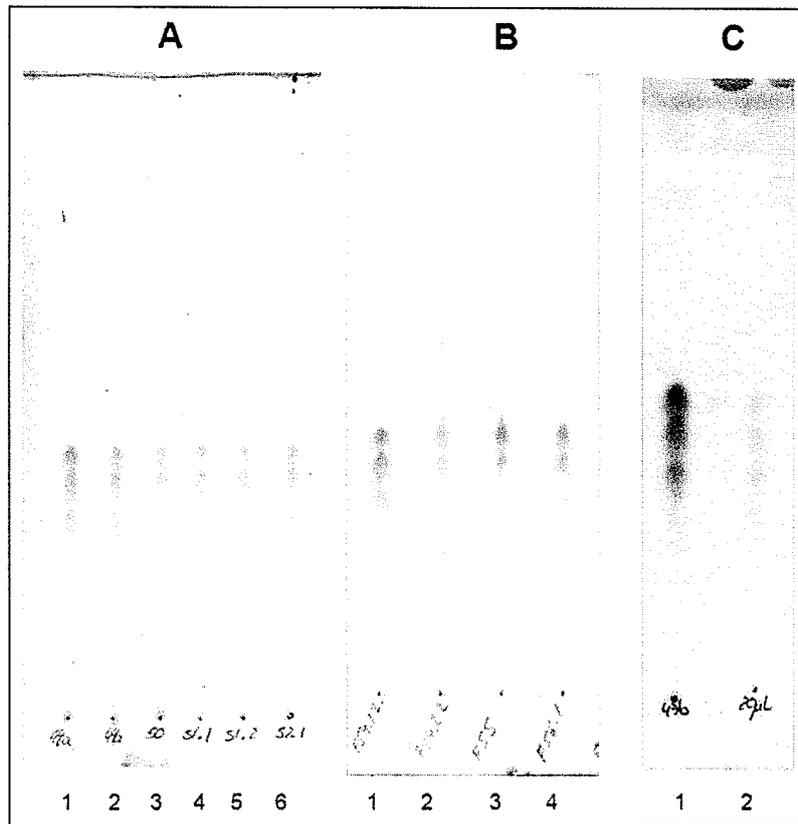


Figura 7c

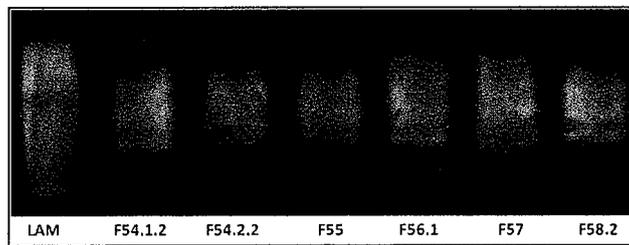
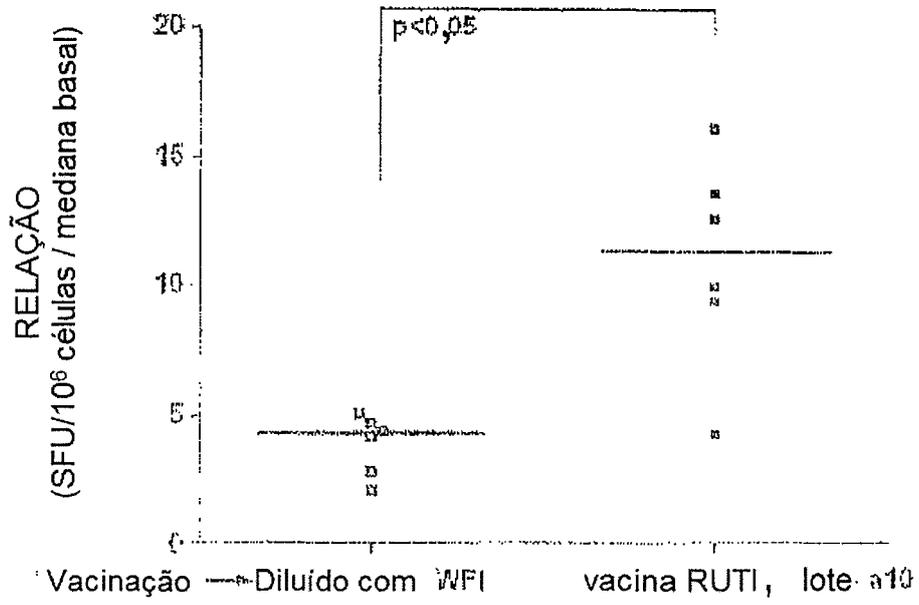


Figura 7d

PPD



85B

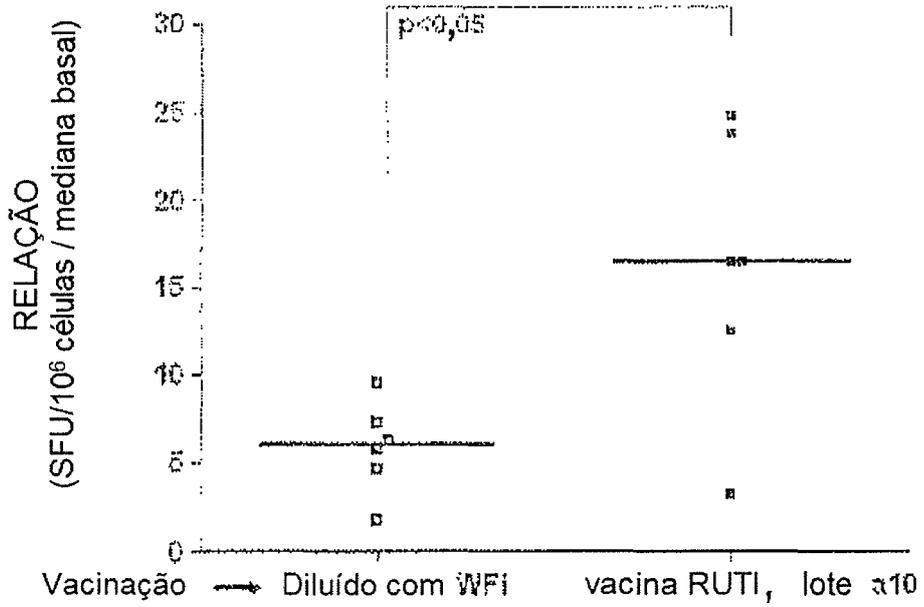


Figura 8

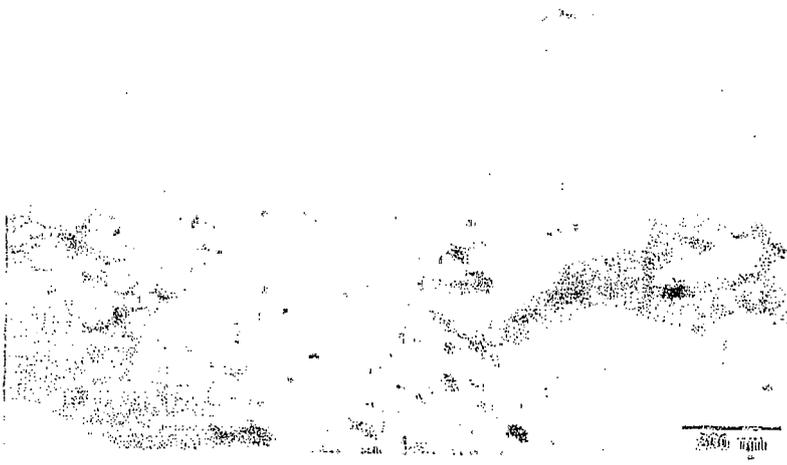
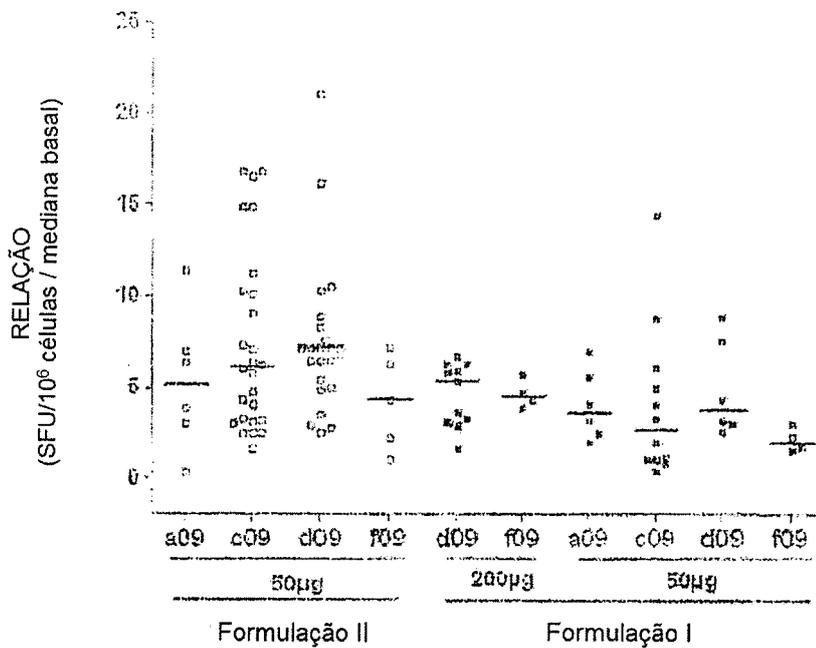


Figura 9

PPD



85B

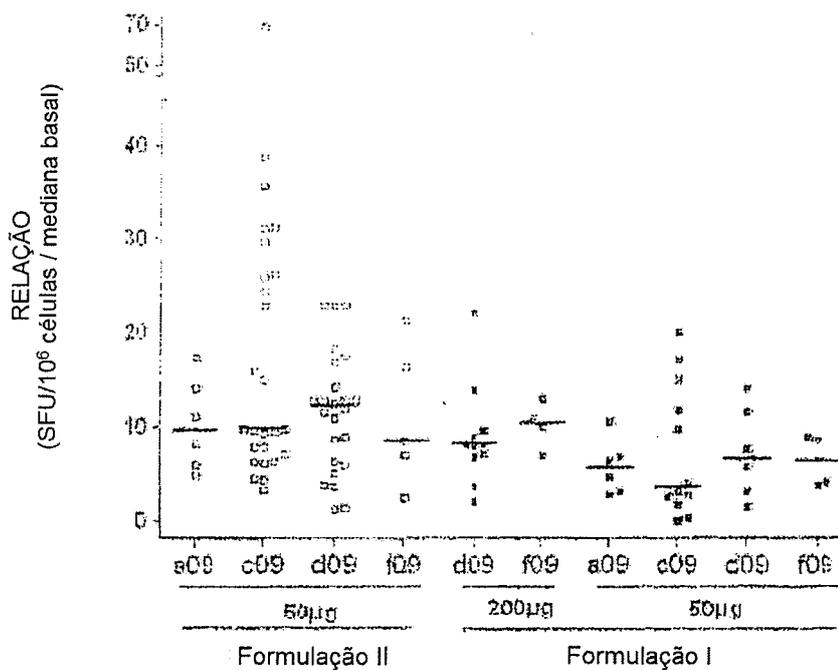
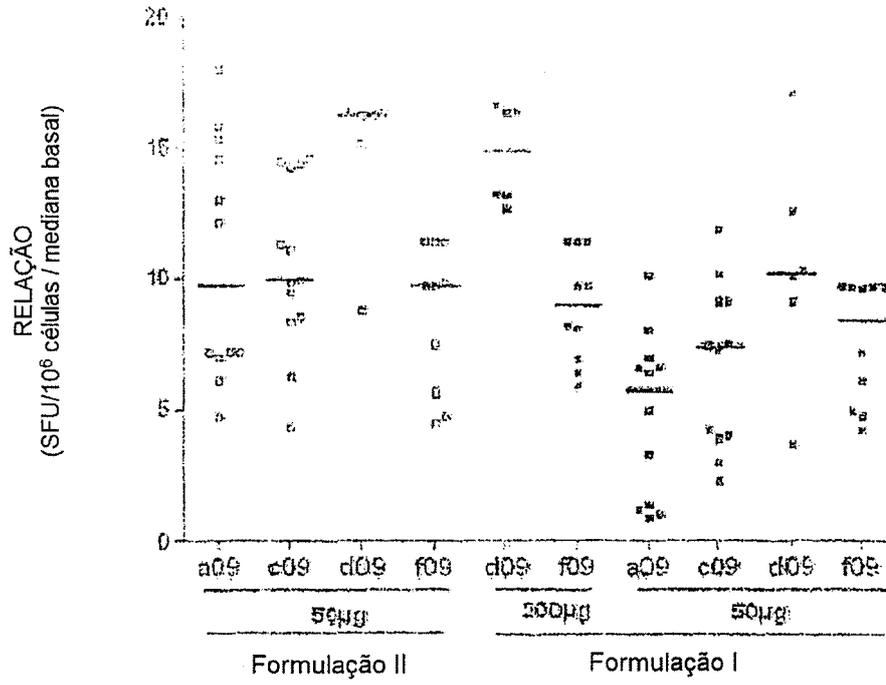


Figura 10a

PPD



85B

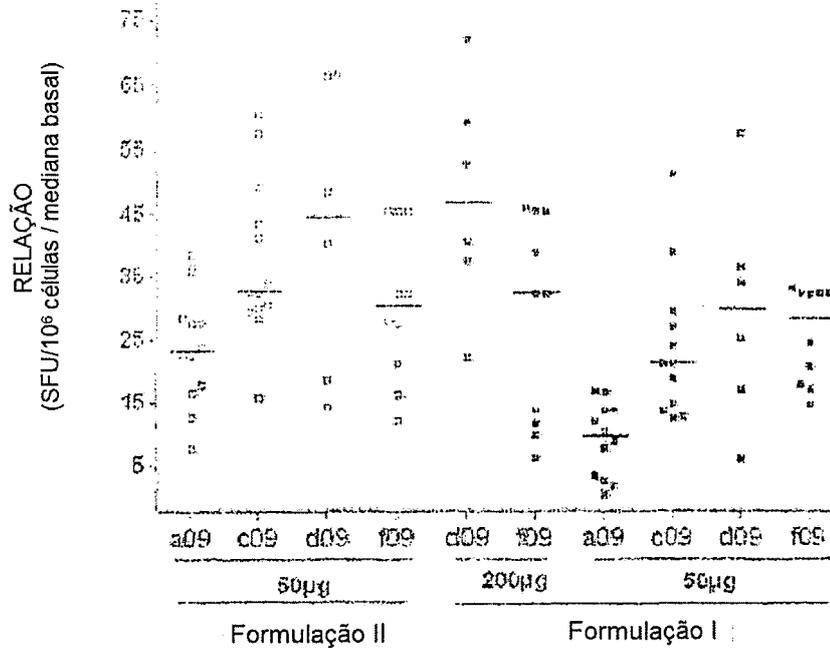


Figura 10b

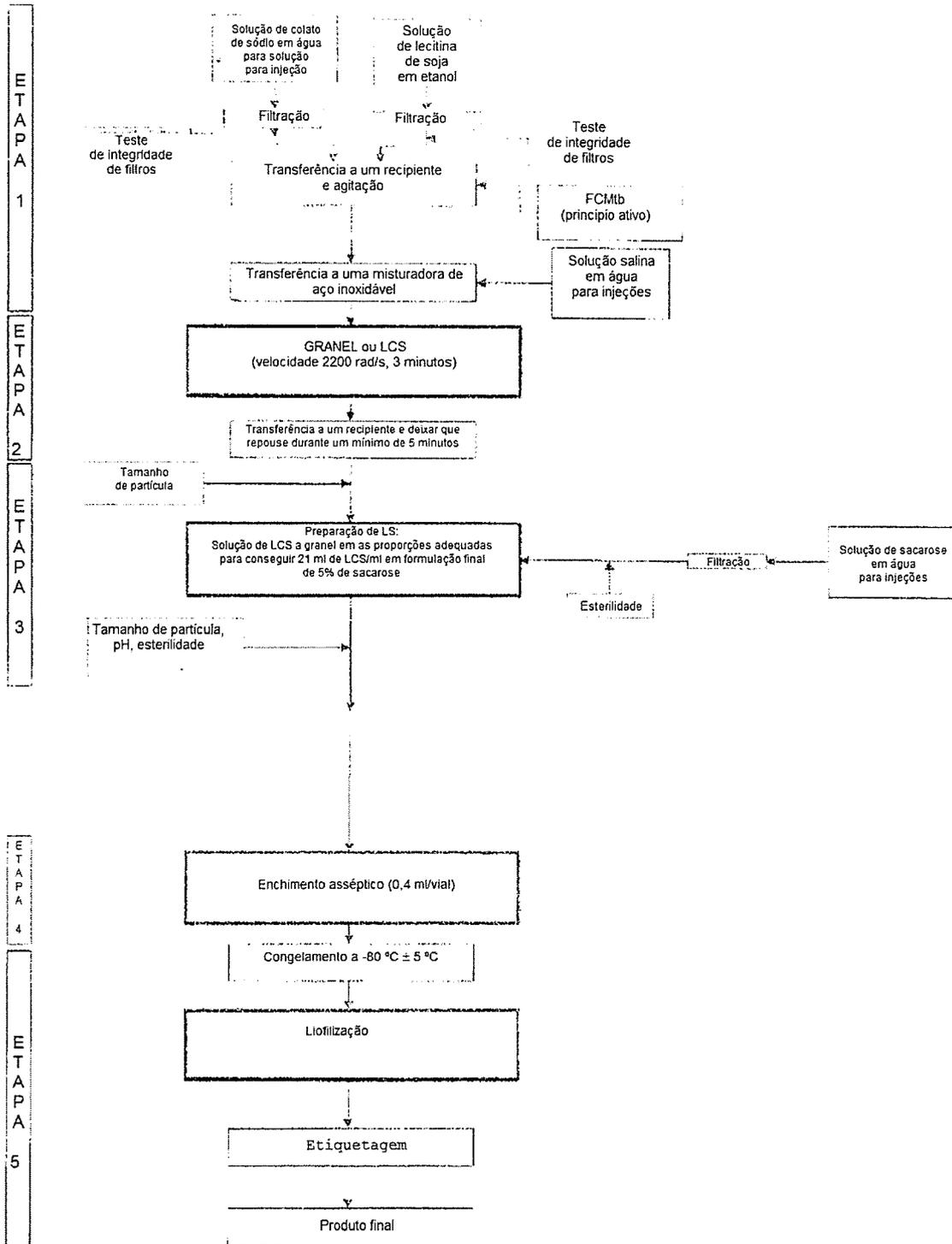


Figura 11

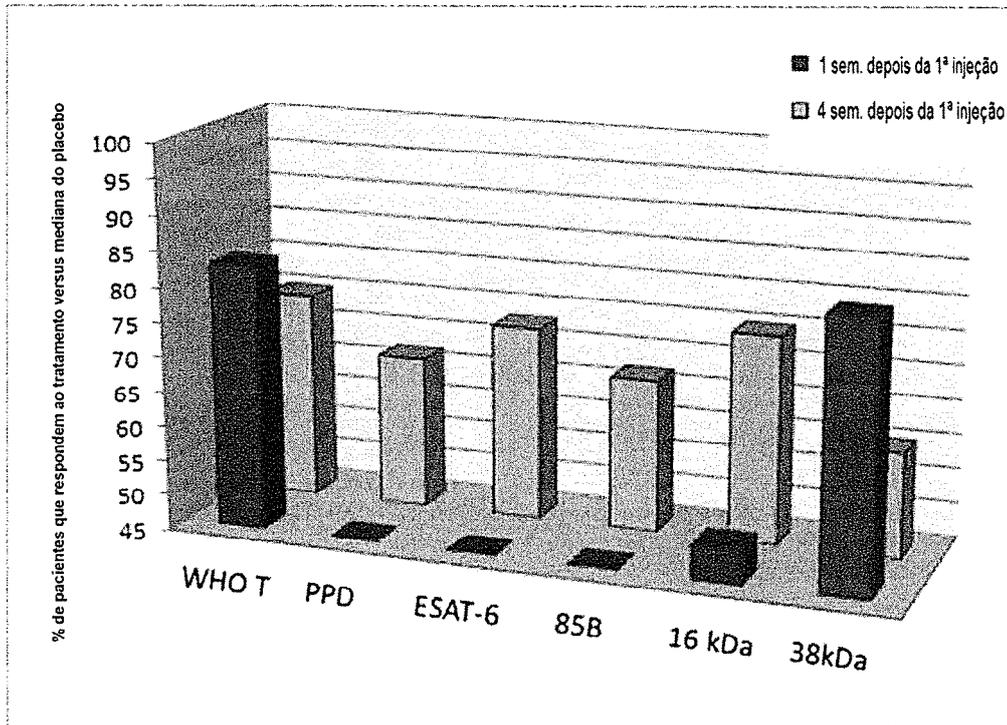


Figura 12

SUMÁRIO VIH - PACIENTES QUE RESPONDEM AO TRATAMENTO

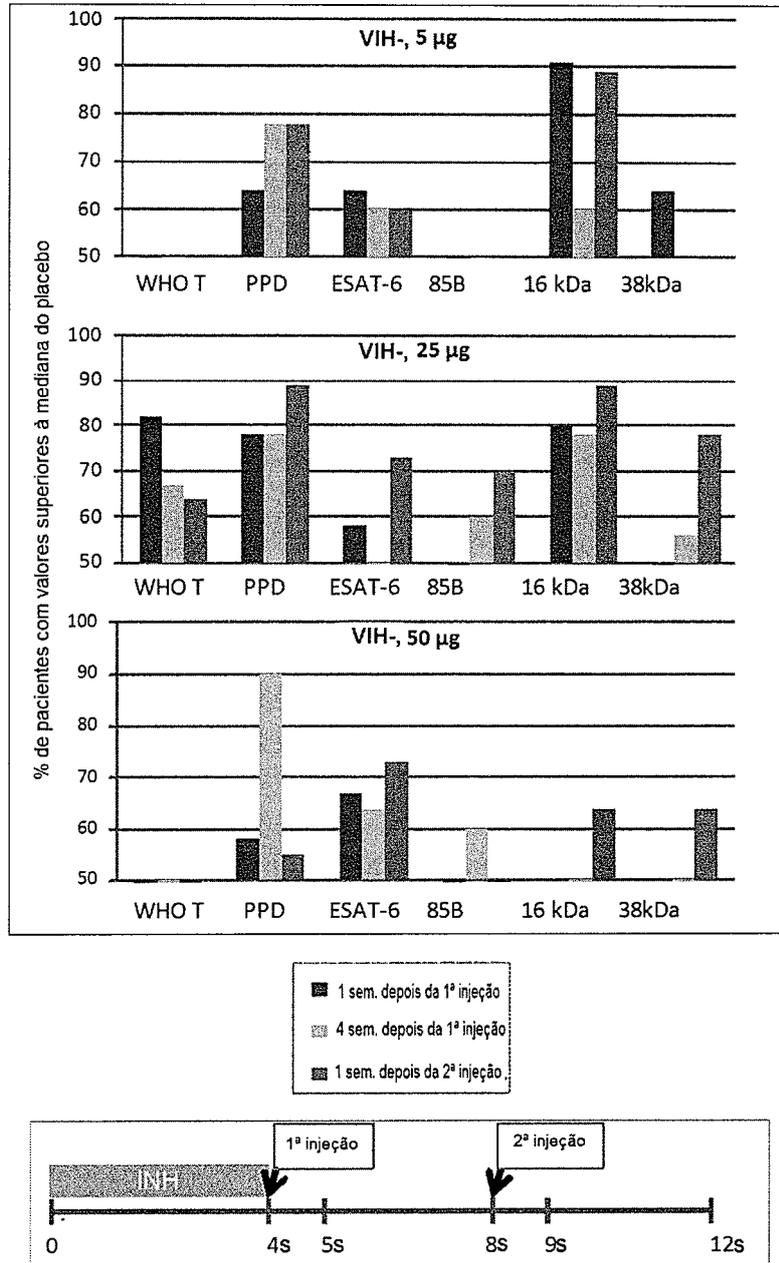


Figura 13

SUMÁRIO VIH - PACIENTES QUE RESPONDEM AO TRATAMENTO

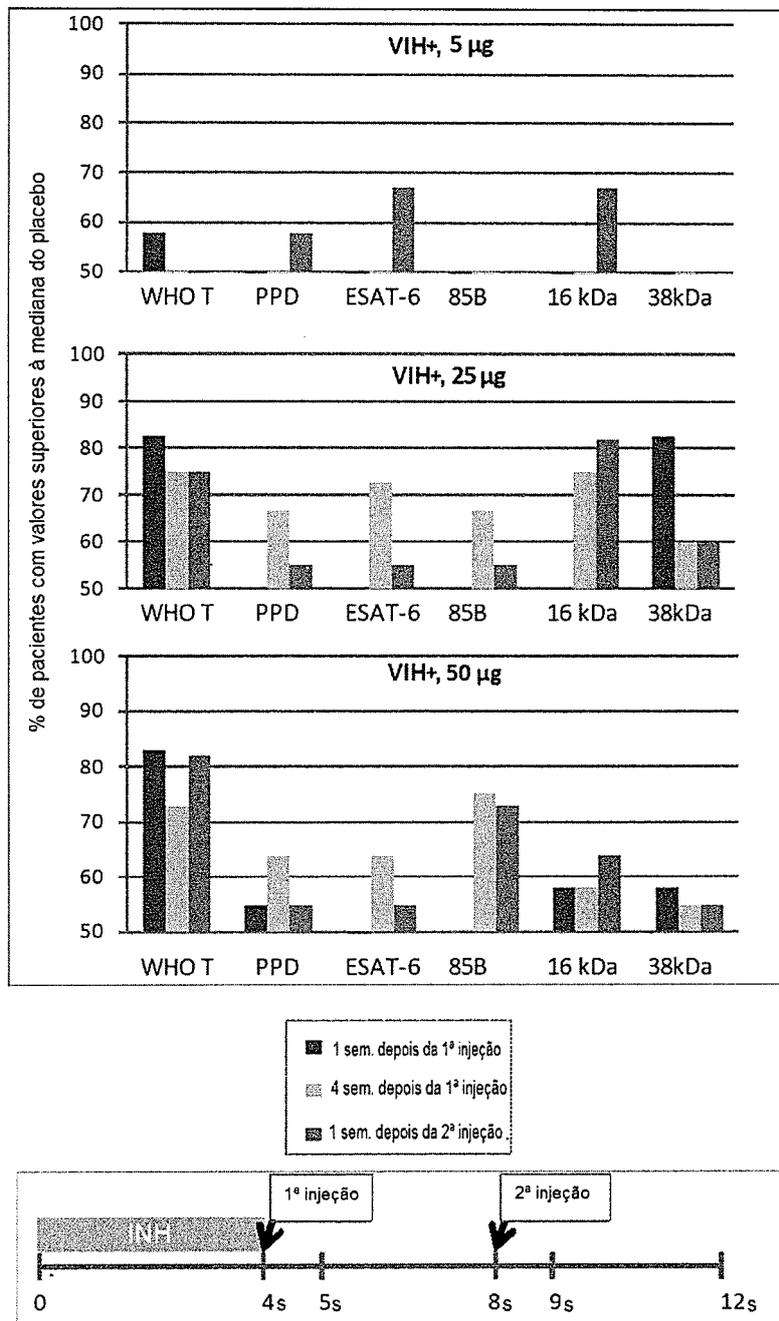


Figura 13 (continuação)