

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية والتجارية  
-----

## (12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 28121 A1** (51) Cl. internationale : **A61P 37/04; A61K 39/04**

(43) Date de publication :  
**01.08.2006**

---

(21) N° Dépôt :  
**28985**

(22) Date de Dépôt :  
**28.04.2006**

(30) Données de Priorité :  
**31.10.2003 ES P 200302551**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:  
**PCT/ES2004/000482 29.10.2004**

(71) Demandeur(s) :  
**ARCHIVEL FARMA, S.L., Ctra. de la Mata, 97-Edif.Matamar, 2, P.I. Mata-Rocafonda  
08304 MATARO BARCELONE (ES)**

(72) Inventeur(s) :  
**MATA RIERA, Isabel ; CARDONA IGLESIAS, Pere Joan**

(74) Mandataire :  
**M. MEHDI SALMOUNI-ZERHOUNI**

---

(54) Titre : **Agent immunothérapeutique utile pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un agent immunothérapeutique basé sur des fragments de paroi cellulaire d'une souche virulente de Mycobacterium tuberculosis, à un procédé pour l'obtenir, à des formulations pharmaceutiques qui le contiennent et à son usage pour la préparation d'un médicament pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments.

Abrégé

La présente invention concerne un agent immunothérapeutique basé sur des fragments de paroi cellulaire d'une souche virulente de *Mycobacterium tuberculosis*, à un procédé pour l'obtenir, à des formulations pharmaceutiques qui le contiennent et à son usage pour la préparation d'un médicament pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments.

28121  
01 AOUT 2006

AGENT IMMUNOTHÉRAPIQUE UTILE POUR LE TRAITEMENT COMBINÉ  
DE LA TUBERCULOSE EN ASSOCIATION AVEC D'AUTRES MÉDICAMENTS

Domaine de la technique

5 Cette invention concerne un procédé pour préparer un agent immunothérapeutique utile pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments, basé sur des fragments de paroi cellulaire d'une souche virulente de *Mycobacterium tuberculosis*-complex et sur l'agent immunothérapeutique pouvant être obtenu par ce procédé.

10 État de la technique précédente

La tuberculose est une maladie infectieuse chronique causée par les bacilles *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C) qui incluent actuellement les espèces *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.microti* et *M.africanum*.

15 D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, on registre actuellement dans le monde 8.000.000 de nouveaux cas de personnes qui ont la maladie et environ 3.000.000 de personnes en meurent. Il est jugé qu'il existe dans le monde 2.000.000.000 de personnes infectées.

Le vaccin actuel employé dans le traitement préventif contre la tuberculose est basé sur les bactéries de la souche dénommée BCG (Bacille de  
20 Calmette-Guerin), une variante atténuée de *M.bovis*.

D'après WO-A-03018053, ce vaccin constitue la meilleure méthode actuellement disponible pour induire à l'immunoprotection face à la tuberculose quoique la sûreté et l'efficacité de ce vaccin dans son application aux humains sont l'objet de débats dans certains pays car il ne protège pas bien les adultes  
25 contre la tuberculose pulmonaire.

Par ailleurs, dans WO-A-03004520, il est commenté comme un fait connu que le traitement le plus efficace pour combattre la tuberculose chez les personnes affectées, aussi bien celles qui n'ont pas encore développé la maladie comme chez celles qui l'ont déjà, c'est l'administration de plusieurs  
30 médicaments, notamment l'isoniazide, durant une période de temps qui se prolonge pendant plusieurs mois.

Ce genre de traitement prolongé pourrait favoriser le développement de microorganismes résistants à ces médicaments dans le cas de ne pas suivre le traitement jusqu'au bout et, de plus, ces médicaments n'agissent qu'au

moment où le bacille a un métabolisme actif, c'est-à-dire lorsqu'il est dans la phase de croissance, mais pas lorsqu'il est en phase non active. Cela représente un inconvénient important car dans le processus de l'infection de la tuberculose, des bacilles dans la phase de métabolisme actif et dans la phase non active coexistent.

Pour essayer de résoudre les problèmes posés, tel que décrits au brevet US4724144, on utilise un agent immunothérapeutique basé sur des cellules mortes de *M. vaccae* comme adjuvant du traitement de la tuberculose en même temps que l'administration d'autres médicaments, par exemple la rifampicine et l'isoniazide.

Cependant, dans le brevet US6001361, on décrit que cet agent adjuvant n'a pas été employé pour vacciner massivement les personnes contre la tuberculose et qu'il n'y a pas beaucoup d'informations sur son efficacité.

Il existe donc le besoin de disposer d'un agent immunothérapeutique pour le traitement de la tuberculose qui agisse comme co-adjuvant des médicaments qui ne favorise pas le développement de microorganismes résistants et qui soit capable de générer une réponse immunologique même contre les bacilles qui se trouvent en phase non active.

Les auteurs de cette invention ont découvert un procédé permettant de préparer un nouvel agent immunothérapeutique utile pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments, qui comprend des fragments de paroi cellulaire d'une souche virulente de MTB-C, capable d'augmenter l'efficacité des médicaments associés en générant une réponse immunologique effective contre les bacilles qui ne sont pas en phase active, ce qui de plus réduit le risque d'apparition de résistance.

#### Objet de l'invention

L'objet de l'invention est un procédé pour l'obtention d'un agent immunothérapeutique comprenant des fragments de paroi cellulaire d'une souche virulente de MTB-C, qui soit utile dans le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments.

Font également partie de l'objet de cette invention l'agent immunothérapeutique que l'on peut obtenir selon le procédé précédent et son usage pour la préparation d'un médicament pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments.

Un objet additionnel consiste en les composés pharmaceutiques contenant cet agent immunothérapeutique.

Description détaillée de l'invention

Les auteurs de cette invention ont découvert un procédé pour l'obtention  
5 d'un agent immunothérapeutique comportant des fragments de paroi cellulaire  
d'une souche virulente de *Mycobacterium tuberculosis*-complex (MTB-C), ce  
procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- la culture de la souche virulente MTB-C durant une période de temps  
égale ou supérieure à trois semaines et ensuite,
- 10 - l'homogénéisation de la culture des cellules en présence d'un  
tensioactif non ionique.

La souche virulente peut être n'importe quelle souche virulente de MTB-  
C, car le bacille de la tuberculose est très stable et on n'a pas décrit l'apparition  
de mutations dans des composés immunogènes. Une des souches les plus  
15 utilisée par les chercheurs dans ce domaine, jugée souche virulente de  
référence, est la dénommée H37Rv que, par exemple, peut être librement  
achetée à la National Collection of Type Cultures (NCTC), Londres, Grande  
Bretagne (numéro de dépôt NC007416).

La souche virulente peut être cultivée par inoculation dans des milieux de  
20 culture bien connus par l'homme du métier. Il peut s'agir d'un milieu solide,  
comme par exemple, l'agar Middelbrook type 7H10 ou type 7H11, ou d'un  
moyen solide, comme par exemple le milieu de culture Sauton ou le milieu de  
culture Proskauere-Beck.

À l'effet de cette invention, il faut que la culture soit faite durant une  
25 période de temps égale ou supérieure à trois semaines, de préférence entre 3  
et 4 semaines. La température de culture est maintenue, de préférence entre  
34°C et 38°C.

Une fois la culture est finie, si elle a été faite dans la phase solide, on  
racle les plaques pour obtenir les colonies, en évitant l'extraction de milieu  
30 (agar) en même temps. Si la culture a été faite en phase liquide, on procède à  
la concentration et lavage des cellules en employant des techniques  
conventionnelles connues par l'homme du métier, comme par exemple, la  
centrifugation.

L'homogénéisation des cellules se fait dans un milieu tamponné à un pH neutre, et il est important à l'effet de cette invention que cette homogénéisation s'effectue en présence d'un tensioactif non ionique favorisant l'obtention de particules de paroi cellulaire finement partagées et émulsifie au moins en partie  
5 les fractions lipidiques indésirables.

Au moyen de ce processus d'homogénéisation, les cellules de MTB-C sont cassées et on obtient des petits fragments de paroi cellulaire.

L'homogénéisation peut être faite au moyen de sonification par ultrasons ou en utilisant des petites boules d'environ 1 mm de diamètre, par exemple, de  
10 silice ou de silice-zirconium, en même temps qu'un homogénéisateur mécanique. Un homogénéisateur mécanique pouvant être utilisé, par exemple, est le modèle BEADBEATER de la société Biospec.

Le moyen tamponné est constitué, par exemple, d'un tampon PBS (solution saline de tampon phosphate)

15 Le type de tensioactif non ionique utilisé n'est pas critique, quoique, de préférence il est sélectionné entre le groupe des alkylphénols éthoxylés et les esters de sorbitan éthoxylés. Il est davantage préférable que le tensioactif non ionique soit sélectionné parmi les octylphénols éthoxylés. Et il est encore davantage préférable, d'utiliser des octylphénols éthoxylés ayant 7-8 mols  
20 d'oxyde d'éthylène, qui se trouvent dans le marché sous le nom, par exemple, de TRITON X-114. Le contenu du tensioactif non ionique dans l'étape d'homogénéisation est compris entre 1 et 15% du poids par rapport au total de l'homogénéisé.

La masse homogénéisée contenant déjà les fragments de paroi cellulaire  
25 souhaités, est soumise à un traitement conventionnel afin de séparer ces fragments des cellules non fragmentées et les composants solubilisés.

Par exemple, après avoir séparé par décantation les boules de silice ou de silice-zirconium, si on les avait utilisées, le produit résultant de l'homogénéisation est doucement centrifugé à une vitesse inférieure à 5.000  
30 t.p.m. pour éliminer comme sédiments les cellules non fragmentées.

Ensuite, le surnatant résultant est centrifugé à une vitesse de centrifugation plus élevée, par exemple supérieure à 15.000 t.p.m. pour éliminer les éléments solubilisés, qui sont concentrés dans le liquide surnatant tandis que les fragments de paroi cellulaire sont concentrés dans le sédiment. En

employant des techniques habituelles connues par l'homme du métier, telles que le lavage avec du tampon PBS et centrifugation, ce processus peut être répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un surnatant complètement transparent, qui est écarté.

5 Le sédiment obtenu, contenant les fragments de paroi cellulaire, est dispersé dans le tampon PBS et il est soumis à un processus chimique, par exemple au moyen de traitement avec du formol ou bien physique, par exemple par le traitement dans un autoclave ou pasteurisation assurant l'inactivation complète des cellules de MTB-C qui auraient pu rester viables après le  
10 processus de fragmentation et de purification.

Finalement, la dispersion de fragments de paroi cellulaire en tampon PBS est distribuée dans ces flacons et elle est lyophilisée à une température comprise entre  $-15^{\circ}\text{C}$  et  $-25^{\circ}\text{C}$  et avec un vide compris entre 0,1 et 0,5 mbar.

On obtient des flacons contenant des fragments de paroi cellulaire de  
15 MTB-C constituant l'agent immunothérapeutique de l'invention, et ils sont conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

À partir de l'agent immunothérapeutique de l'invention, on peut préparer des composés pharmaceutiques, également objet de l'invention, qui peuvent être formulées sous forme d'émulsion type de l'huile dans de l'eau (O/W) ou sous  
20 forme de liposomes. Les composés pharmaceutiques sous forme de liposomes sont les préférées.

La formation de liposomes peut être faite en employant des techniques conventionnelles bien connues de l'expert. Par exemple, les liposomes peuvent être formés en mélangeant dans un milieu aqueux les fragments de paroi  
25 cellulaire lyophilisés et les lipides auxiliaires pour la formation de liposomes, et en soumettant le mélange à un procédé standard d'homogénéisation, par exemple, au moyen de l'usage d'un agitateur à grande vitesse.

Les lipides auxiliaires pour fabriquer des liposomes sont largement connus par l'homme du métier. En général, des photolipides sont inclus, ayant  
30 une charge neutre et/ou négative et des stérois.

Les phospholipides employés peuvent être par exemple: la phosphatidylcholine, la phosphatidylserine et le phosphatidylinositol.

D'habitude, le composant majoritaire des liposomes est la phosphatidylcholine qui peut être synthétisée ou isolée de sources naturelles. Un produit commercial qui est très souvent utilisé est la lécithine de soja.

5 Les stéroïdes qui sont employés dans la préparation de liposomes peuvent être, notamment, le cholestérol et les sels biliaires.

De préférence, les liposomes sont formés en employant un mélange de lécithine de soja et de cholate de sodium.

Optionnellement, les liposomes peuvent contenir des additifs qui améliorent leur stabilité, par exemple la vitamine E, qui agit comme antioxydant  
10 des lipides.

Les liposomes obtenus présentent une distribution de taille dans laquelle 99,9% sont plus petits qu'un micron.

Les liposomes peuvent être soumis à la lyophilisation pour obtenir ainsi l'agent immunothérapeutique objet de l'invention sous forme de liposomes  
15 lyophilisés.

Fait également partie de l'objet de l'invention, l'usage de l'agent immunothérapeutique décrit pour la préparation d'un médicament pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments.

20 De préférence, sans pour autant écarter d'autres voies d'administration, l'agent immunothérapeutique objet de l'invention est administré parentéralement.

Parmi les médicaments antituberculeux connus, sont préférés pour le traitement combiné avec l'agent thérapeutique de l'invention, l'isoniazide et la rifampicine.

25 L'association de l'agent immunothérapeutique de l'invention avec les médicaments antituberculeux pour le traitement combiné de la maladie peut se faire simultanément ou séquentiellement, c'est-à-dire au moyen de l'administration simultanée des médicaments et de l'agent immunothérapeutique, ou au moyen de l'administration préalable des médicaments suivie de  
30 l'administration de l'agent immunothérapeutique.

D'une façon surprenante, on a trouvé que le traitement combiné de la tuberculose, par l'administration de l'agent immunothérapeutique de l'invention associé à des médicaments pour le traitement de la tuberculose augmente l'efficacité de ces médicaments car une réponse immunologique contre les



bacilles qui ne se trouvent pas dans la phase de métabolisme actif est générée, ce qui, de plus, réduit le risque de développement de la résistance.

Les exemples ci-après sont exposés pour offrir à l'homme du métier une explication détaillée de réalisations précises dans le domaine de l'invention.

5 Exemple 1.- Obtention de l'agent immunothérapeutique

80 - 100 plaques d'agar Middelbrook du type 7H11 sont inoculées avec la culture de H37Rv fourni par la National Collection of Type Cultures (NCTC), Londres, Grande Bretagne (numéro de dépôt NC007416). La concentration d'unités formant des colonies inoculée sur chaque plaque est de  $10^5$  -  $10^6$  UFC.  
10 Les plaques sont incubées durant 21 jours (3 semaines) à une température comprise entre  $34^{\circ}$  C et  $38^{\circ}$  C.

Après la période d'incubation, les colonies sont retirées des plaques d'agar au moyen d'une spatule, en faisant bien attention de ne pas retirer le milieu de culture. On obtient ainsi entre 15 et 18 g d'extrait cru.

15 L'extrait cru est dispersé sur environ 20 mL de tampon PBS qui contient 4% du poids de TRITON X-114. On ajoute à peu près 35 mL de boules de silice-zirconium de 1 mm de diamètre et on procède à l'homogénéisation mécanique avec l'homogénéisateur BEADBEATER de la société Biospec.

Le processus d'homogénéisation continu jusqu'à ce que dans la teinture  
20 d'un échantillon avec la technique de Ziehl-Neelsen, au moins 5 bacilles entiers soient détectés après avoir observé 100 champs à 1000 augmentations.

Le produit résultant de l'homogénéisation est séparé des boules de silice-zirconium par décantation. Elles sont lavées avec la solution tampon PBS contenant 4% du poids de TRITON X-114 et les eaux de lavage sont réunies  
25 avec le produit, en obtenant un volume total d'environ 80-100 mL.

Ensuite, le produit résultant de l'homogénéisation plus les eaux de lavage sont centrifugées à 3.000 t.p.m. durant 30 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à  $4^{\circ}$  pour éliminer les cellules non fragmentées dans le sédiment.

30 Le surnatant est conservé.

Ensuite ce surnatant est centrifugé à 15.100 t.p.m. (équivalent à 27.000 g) durant 60 minutes à  $4^{\circ}$  C, en obtenant un sédiment blanchâtre contenant les fragments de la paroi cellulaire.

Le sédiment est conservé et le surnatant jaunâtre est éliminé.

Le sédiment est lavé d'abord avec un tampon PBS (3x3 mL), on disperse à nouveau dans 3 mL de cette solution tampon, on remplit jusqu'au bord à 20 mL avec du tampon PBS et on centrifuge à nouveau à 15.100 t.p.m. durant 60 minutes à 4° C.

5 Le surnatant obtenu est écarté.

L'opération de lavage et de centrifugation est répétée, de sorte que le surnatant obtenu soit complètement transparent et il est écarté.

Le sédiment contenant les fragments de paroi cellulaire, est lavé avec le tampon PBS (3x3 mL) et il est à nouveau dispersé dans 12 mL de tampon PBS.

10 Après le processus de centrifugation et de lavage, la dispersion de fragments de paroi cellulaire est réunie dans le tampon PBS dans un récipient et elle est pasteurisée par traitement à 65° C durant 1 heure.

Ensuite, on refroidit rapidement le mélange dans un bain de glace, et la dispersion de fragments de paroi cellulaire est distribuée dans des cryotubes à concurrence de 1 mL par cryotube.

La dispersions de fragments de paroi cellulaire contenue dans les cryotubes est congelée à -70° C et est soumise à un processus de lyophilisation à une température comprise entre -15 et -22° C et à un vide compris entre 0,180 et 0,400 mbar.

20 On obtient entre 1 et 1,5 g d'agent immunothérapeutique.

#### Exemple 2.- Obtention de liposomes de l'agent immunothérapeutique

740 et 770 mg du produit obtenu dans l'Exemple 1 sont pesés dans un vase de précipités auquel on ajoute 20 mL d'une dispersion de lécithine de soja qualité pharmaceutique dans de l'éthanol (1 kg de lécithine dans 1 litre d'éthanol absolu), et 7 mL d'une dissolution de cholate de sodium de qualité pharmaceutique dans de l'eau (200 g de cholate de sodium dans 1 litre d'eau bi-distillée).

Le pH est ajusté à une valeur comprise entre 7,7 et 8 avec une dissolution de HCl 0,997 N.

30 Les liposomes sont préparés par homogénéisation avec un agitateur à grande vitesse.

La dispersion de liposomes ainsi obtenue est diluée à 10% avec de l'eau bi-distillée et le pH est ajusté à une valeur comprise entre 7,1 et 7,3 avec une dissolution de HCl 0,0997 N.

La dispersion de liposomes est distribuée dans des cryotubes à concurrence de 0,5 mL par tube puis congelée à -80° C.

Ensuite, l'agent immunothérapeutique, objet de l'invention est lyophilisé et obtenu, sous forme de liposomes.

5 Exemple 3.- Effectivité de l'agent immunothérapeutique comme adjuvant du traitement avec des médicaments.

Dans le modèle d'infection on utilise des souris femelles âgées de 6 à 8 semaines des types BALB/c, 129/Sv, C57BL/6 et DBA/2, libres de pathogènes spécifiques.

10 Une souche virulente de *Mycobacterium tuberculosis* est cultivée dans un milieu Proskauer-Beck jusqu'à une phase moyenne logarithmique, et elle est conservée dans des parties aliquotes de 1 mL à -70° C jusqu'à son utilisation.

Les souris sont infectées par aérosol en les plaçant dans un appareil Middelbrook d'infection par aérosol qui fournit un inoculum d'environ 10-50  
15 bacilles viables dans les poumons.

La concentration bacillaire, c'est-à-dire le nombre de bacilles viables est déterminé en incubant des dilutions sériées d'homogénéisés de poumon gauche et rate dans de l'agar Middelbrook 7H11. L'homogénéisation du poumon gauche et de la rate se fait en présence de 1 mL de tampon PBS.

20 I) Traitement avec une dose d'agent immunothérapeutique liposomé simultanément avec de l'isoniazide.

Les souris infectées du type BALB/c ont été divisées en trois groupes:

- Seulement traitées avec de l'isoniazide à concurrence de 25 mg/kg et jour durant 5 jours par semaine, durant 6 semaines (Contrôle)
- 25 - Traités avec de l'isoniazide à concurrence de 25 mg/kg et jour durant 5 jours par semaine, durant 6 semaines et de plus avec une dose intranasale de 180 µg d'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention, et
- Traités avec de l'isoniazide à concurrence de 25 mg/kg et jour, durant 5 jours de la semaine, durant 6 semaines et de plus avec une dose intrapéritonéale de  
30 180 µg d'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention

Le traitement avec l'antibiotique isoniazide a débuté lors de la semaine 9 et il a continué jusqu'à la semaine 15.

La dose de l'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention a été administré la semaine 13.

La semaine 15, les animaux ont été sacrifiés et les concentrations bacillaires dans leur poumon gauche et leur rate ont été déterminées.

Les concentrations bacillaires, déterminées selon la méthode décrite dans l'introduction alinéa C, ont été sensiblement plus petites dans les poumons des animaux vaccinés, tandis que dans la rate, les résultats comparés avec le groupe de contrôle n'ont pas été statistiquement différents.

Les résultats exprimés en UFC/mL, sont montrés dans la table 1:

Table 1

10

Groupes de souris	Poumon	Rate
Contrôle	7,5± 2,89	0,75±0,33
Intranasal	≤2±0*	0,4±0,2
Intrapéritonéal	≤2±0*	0,52±0,44
*= valeur statistiquement significative par rapport au groupe Contrôle, pour p<0,05		

On peut observer que les souris traitées intranasalement et intrapéritonéalement avec l'agent immunogène liposomé, objet de l'invention, simultanément avec le traitement avec l'isoniazide, présente un nombre de bacilles dans les poumons considérablement inférieur à celui des souris qui n'ont été traitées qu'avec l'antibiotique isoniazide.

En tenant compte du fait que le nombre de bacilles déterminé inclus ceux qui sont en phase active et ceux qui sont en phase non active, le traitement avec l'agent immunogène liposomé permettrait une réduction dans le temps de traitement avec l'antibiotique, car le nombre de bacilles pouvant passer à la phase active avec le temps est considérablement réduit.

II Traitement avec trois doses d'agent immunothérapeutique liposomé postérieur à un traitement de rifampicine et d'isoniazide.

Les souris infectées du type 129/Sv ont été divisées en deux groupes:

- Traitées avec l'isoniazide à concurrence de 25 mg/kg et jour durant 5 jours par semaine, durant quatre semaines et rifampicine à concurrence de 10 mg/kg

25

et jour durant 5 jours par semaine durant quatre semaines (Contrôle), et

5

- Traitées de plus avec trois doses de 180µg d'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention, inoculées sous-cutané après le traitement avec la rifampicine et l'isoniazide.

Le traitement avec l'antibiotique isoniazide a débuté la semaine 9 et s'est prolongé durant 4 semaines. Le traitement avec la rifampicine a débuté la semaine 13, et a terminé la semaine 17.

10

Trois doses d'agent immunothérapeutique liposomé objet de l'invention ont été administrées durant les semaines 17, 19 et 21.

Les animaux ont été sacrifiés la semaine 22 et les concentrations bacillaires dans leur poumon gauche et dans leur rate ont été déterminées.

15

La concentration bacillaire a été sensiblement plus petite dans les poumons des animaux vaccinés, en comparaison avec le groupe de Contrôle, tandis que dans la rate, aucune différence significative n'a été trouvée entre les souris du groupe de Contrôle et ceux qui ont été traités en plus avec l'agent immunothérapeutique liposomé.

Les résultats, exprimés en  $\log_{10}$  UPC/mL, sont montrés dans la Table 2:

20

Table 2

Groupe de souris	Poumon	Rate
Contrôle	2,67±0,83	2,35±1,18
Sous-cutané	1,61±0,58*	1,37±1,02
*= valeur statistiquement significative par rapport au groupe de Contrôle, pour $p < 0,05$		

25

On peut observer que les souris traitées sous-cutanément avec l'agent immunogène liposomé, objet de l'invention, postérieurement à un traitement avec les antibiotiques isoniazide et rifampicine, présentent un nombre de bacilles dans les poumons considérablement inférieur à celui des souris qui n'ont été traitées qu'avec des antibiotiques.

La même conclusion de l'alinéa I) peut être appliquée à ce cas.

III) Traitement avec trois doses d'agent immunothérapeutique liposomé simultanément avec l'isoniazide.

Les souris infectées du type C57BL/6 ont été divisées en deux groupes :

- Traitées seulement avec l'isoniazide à concurrence de 25 mg/kg et jour  
5 durant 5 jours par semaine durant 8 semaines (Contrôle), et
- Traitées de plus avec trois doses de 180 µg d'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention, inoculées intranasales.

Le traitement a débuté la semaine 9 avec l'antibiotique isoniazide, qui s'est prolongé jusqu'à la semaine 17.

10 Les doses d'agent immunothérapeutique liposomé sont administrées pendant les semaines 13, 15 et 17.

Les souris ont été sacrifiées pendant les semaines 15 et 28 et les concentrations bacillaires ont été déterminées dans leur poumon gauche et leur rate.

15 La concentration bacillaire a été sensiblement inférieure dans les poumons des animaux vaccinés, après l'administration d'une ou de trois doses (correspondant aux semaines 15 et 28 respectivement) en comparaison avec le groupe de Contrôle.

20 Les résultats obtenus par les poumons après une dose d'agent immunologique (semaine 15) et après 3 doses (semaine 28) exprimés en log<sub>10</sub> UFC/ml, sont montrés dans la table 3:

Table 3

Groupe de souris	Semaine 15 (1 dose)	Semaine 28 (3 doses)
Contrôle	2,34±0,24	3,86±0,41
Intranasal	1,59±0,61*	3,48±0,18*
* = valeur statistiquement significative par rapport au groupe de Contrôle, pour p<0,05		

25 On peut observer que les souris traitées avec une seule dose de l'agent immunogène liposomé intranasalement, simultanément à un traitement avec l'antibiotique isoniazide, présente un nombre de bacilles dans les poumons considérablement inférieur à celui des souris qui n'ont été traitées qu'avec l'antibiotique.

La même conclusion de l'alinéa I) peut être appliquée dans ce cas.

Dans le cas de la rate, la concentration bacillaire a été sensiblement plus petite chez les animaux vaccinés après l'administration des 3 doses (correspondant à la semaine 28), en comparaison avec le groupe Contrôle.

5 Les résultats obtenus pour la rate, exprimés en  $\log_{10}$  UFC/mL, sont montrés dans la Table 4:

Table 4

Groupe de souris	Semaine 15	Semaine 28
Contrôle	1,47±0,44	3,84±0,48
Intranasal	1,41±0,58	3,43±0,29*
* = valeur statistiquement significative par rapport au groupe Contrôle, pour $p < 0,05$		

10 On peut observer que les souris traitées intranasalement avec trois doses de l'agent immunogène liposomé, objet de l'invention, simultanément à un traitement avec l'antibiotique isoniazide, présentent un nombre de bacilles dans les poumons considérablement inférieur aux souris qui n'ont été traitées qu'avec l'antibiotique.

15 La même conclusion de l'alinéa I) peut être appliqué dans ce cas.

IV) Étude comparative pour étudier l'effet des antibiotiques, de l'agent immunothérapeutique liposomé et de l'interaction entre les deux.

20 Des essais ont été réalisés avec des souris DBA/2, conformément à un dessin factoriel  $2^2$ , sous les conditions montrées dans la table 5:

Table 5

Essai	Antibiotique	Agent immunothérapeutique liposomé
1	Non	Non
2	Oui	Non
3	Non	Oui
4	Oui	Oui

Dans l'essai 1, les souris infectées sont restées sans aucun traitement.

Dans l'essai 2, les souris infectées n'ont été traitées qu'avec l'antibiotique isoniazide à concurrence de 25 mg/kg et jour durant 5 jours par semaine durant 4 semaines et la rifampicine à concurrence de 10 mg/kg et jour durant 5 jours par semaine durant 4 semaines, à partir de la semaine 9 postérieure à l'infection.

Dans l'essai 3, les souris infectées n'ont été traitées qu'avec trois doses de 180 µg d'agent immunothérapeutique liposomé administrées sous-cutanément pendant les semaines 9, 11 et 15 postérieures à l'infection.

Dans l'essai 4, le traitement avec l'antibiotique isoniazide a débuté la semaine 9 et s'est prolongé durant 4 semaines. Pendant la semaine 13, le traitement avec la rifampicine a débuté, qui a fini durant la semaine 17. Durant les semaines 17, 19 et 21 trois doses d'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention, ont été administrées.

Durant la semaine 22, tous les animaux ont été sacrifiés et les concentrations bacillaires dans le poumon gauche ont été déterminées. Les résultats obtenus pour le poumon, sont exprimés en  $\log_{10}$  UFC/mL, sont montrés dans la Table 6:

Table 6

Essai	Antibiotique	Agent immunothérapeutique liposomé	$\log_{10}$ UFC/mL
1	Non	Non	5,37±0,27
2	Oui	Non	3,29±0,8*
3	Non	Oui	5,69±0,22
4	Oui	Oui	0,69±0**

\* = valeur statistiquement significative par rapport aux essais 1,3 et 4 pour  $p < 0,05$ ;  
 \*\*= valeur statistiquement significative par rapport aux essais 1,2 et 3 pour  $p < 0,05$

On peut noter que le traitement combiné des antibiotiques isoniazide et rifampicine avec l'agent immunothérapeutique liposomé, objet de l'invention, conduit à une réduction du nombre de bacilles considérablement plus grande que l'usage d'un quelconque des seuls deux facteurs (antibiotiques et agent immunothérapeutique liposomé).



Si l'on tient compte que le nombre de bacilles déterminé inclus ceux qui se trouvent à la phase active et ceux qui sont à la phase non active, le traitement combiné de l'agent immunogène liposomé en association avec d'autres médicaments permettrait une réduction dans le temps de traitement avec ces médicaments, car le nombre de bacilles pouvant passer à une phase active avec le temps est considérablement réduit.

## REVENDEICATIONS

- 1.- Un procédé pour l'obtention d'un agent immunothérapeutique comportant des fragments de paroi cellulaire d'une souche virulente *Mycobacterium tuberculosis-complex* (MTB-C), ce procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:
- 5
- cultiver la souche virulente MTB-C durant une période de temps égale ou supérieure à trois semaines et, ensuite,
  - homogénéiser la culture de cellules en présence d'un tensioactif non ionique.
- 10
- 2.- Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la période de temps de culture est comprise entre 3 et 4 semaines.
- 3.- Un procédé conformément aux revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le tensioactif non ionique est sélectionné d'un groupe des alkyl phénols éthoxylés et les esters de sorbitan éthoxylés.
- 15
- 4.- Un procédé conformément à la revendication 3 caractérisé en ce que le tensioactif non ionique est sélectionné entre les octylphénols éthoxylés.
- 5.- Un procédé, conformément à la revendication 4, caractérisé en ce que le tensioactif non ionique est sélectionné entre les octylphénols éthoxylés avec 7-8 mols d'oxyde d'éthylène.
- 20
- 6.- Un procédé conformément aux revendication 1 à 5, caractérisé en ce que l'homogénéisation est effectuée dans un milieu tamponné à pH neutre.
- 7.- Un procédé conformément aux revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend de plus les étapes suivantes:
- séparer par centrifugation les cellules non fragmentées et les composants solubilisés,
  - faire subir un traitement chimique ou physique à la fraction de fragments de paroi cellulaire pour inactiver les éventuelles cellules de souche virulente qu'elle contient éventuellement, et
  - dessécher l'agent immunothérapeutique obtenu par lyophilisation.
- 25
- 8.- Un agent immunothérapeutique pouvant être obtenu par un procédé conformément à une quelconque des revendications 1 à 7.
- 30
- 9.- Un composé pharmaceutique comprenant l'agent immunothérapeutique de la revendication 8.

10.- Un composé pharmaceutique conformément à la revendication 9 comprenant l'agent immunothérapeutique sous forme de liposomes.

11.- Usage de l'agent immunothérapeutique de la revendication 8 pour la préparation d'un médicament pour le traitement combiné de la tuberculose en association avec d'autres médicaments.

12.- Usage conformément à la revendication 11, caractérisé en ce que les médicaments sont l'isoniazide et/ou la rifampicine.