

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 729**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2008 E 08758248 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **31.03.2010 EP 2167124**

54 Título: **El uso de monomicolil glicerol (MMG) como adyuvante**

30 Prioridad:

29.06.2007 DK 200700965

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

05.02.2013

73 Titular/es:

**STATENS SERUM INSTITUT (100.0%)
Orestads Boulevard 5
2300 Copenhagen S, DK**

72 Inventor/es:

**AGGER, ELSE, MARIE;
ANDERSEN, CLAIRE;
ANDERSEN, PETER;
BERSRA, GURDYAL y
MINIKIN, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 729 T3

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

DESCRIPCIÓN

El uso de monomicolil glicerol (MMG) como adyuvante

Campo de la invención

5 La presente invención revela el uso de monomicolil glicerol (MMG), un homólogo sintético, análogo o versión modificada del mismo para preparar un inmunomodulador, un adyuvante, el adyuvante y una vacuna o un sistema de suministro que comprende este adyuvante.

Antecedentes generales

10 Las primeras vacunas constaban de patógenos vivos atenuados. Las formas atenuadas eran organismos muy relacionados de origen natural o se obtenían a través de pases en serie en cultivo. Por ejemplo, la tuberculosis (TB) en el hombre se ha combatido durante muchos años por vacunación con una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, -la vacuna *M. bovis* BCG desarrollada hace más de 80 años. Sin embargo, aunque se han administrado más de 3 billones de dosis de BCG (más que cualquier otra vacuna) no siembre proporciona resistencia satisfactoria a TB humana en toda la población.

15 Hoy en día, un enfoque más actualizado es usar sustancias altamente purificadas, por ejemplo, proteínas o péptidos recombinantes purificados. Estas vacunas están bien definidas y sus reacciones secundarias están minimizadas. Desafortunadamente, muchas sustancias altamente purificadas no son muy inmunogénicas y no inducen una respuesta inmune suficiente para conferir protección. Para hacer esto, el antígeno necesita algo de ayuda de agentes potenciadores de la respuesta inmune llamados adyuvantes. Dependiendo del patógeno, la protección puede requerir que predomine una respuesta humoral o una respuesta mediada por células. Una reacción inmune que puede transferirse con suero inmune se llama inmunidad humoral y se refiere a resistencia que está mediada por anticuerpos que se unen a material antigénico asociado con un agente infeccioso y de este modo desencadena una respuesta inmune contra el mismo. La inmunidad mediada por células (CMI) depende de las células del sistema inmune que montan una respuesta inmune. Una respuesta inmune CM1, o T auxiliar (Th)1, está generalmente asociada en el combate de patógenos intracelulares, incluyendo leishmania y tuberculosis, pero también tiene un papel en el combate de otros tipos de infecciones, por ejemplo la infección por la levadura *Cándida*. Una respuesta inmune humoral o Th2 es necesaria para defenderse contra patógenos extracelulares, por ejemplo infecciones por helmintos.

20 En varios casos, por ejemplo, influenza, hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), clamidia y malaria dependiendo de la fase de infección, puede requerir una respuesta mixta Th1/Th2 (Mosmann y Sad 1996). Estas requieren tanto Th1 como Th2 porque partes de su ciclo celular son intracelulares pero también pasan por fases extracelulares, por ejemplo, transmisión entre células.

25 El desarrollo de un tipo específico de respuesta inmune (humoral o mediada por células) puede determinarse por la elección del adyuvante. Por ejemplo, la inmunidad protectora contra patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* requiere una respuesta inmune mediada por células, y un adyuvante adecuado para una vacuna de subunidad dirigida contra TB debe potenciar una respuesta Th1 (Lindblad y col. 1997).

30 Existe una gran cantidad de adyuvantes pero la mayoría de estos tienen numerosos problemas que impiden su uso en seres humanos. Solo unos pocos adyuvantes están aceptados para uso en seres humano, por ejemplo, adyuvantes basados alúmina (sales AlOH) y MF-59, pero ambos indican respuestas desviadas a Th2, lo que les hace inadecuados para una vacuna TB y otras vacunas que requieran una respuesta Th1 (Lindblad y col. 1997).

40 Durante los pasados 20-30 años se han identificado varios sistemas adyuvantes nuevos y algunos de ellos están actualmente en desarrollo. A pesar de este, aún se reconoce la necesidad de nuevos sistemas adyuvantes (Moingeon y col. 2001) y es evidente en la escasez de elecciones disponibles para uso clínico.

45 Un adyuvante (del latín *adjuvare*, para ayudar) puede definirse como cualquier sustancia que cuando se administra en la vacuna sirve para dirigir, acelerar, prolongar y/o potenciar la respuesta inmune específica. Los adyuvantes se han dividido en dos categorías principales, sistemas de suministro o inmunomoduladores/inmunoestimuladores. El sistema de suministro puede, por ejemplo, ser emulsiones, partículas de poliestireno, niosomas, ISCOM, virosomas, microesferas, o liposomas tipo tensoactivo, que son vesículas compuestas de bicapas lipídicas. Los liposomas actúan como vehículos del antígeno (dentro de las vesículas o unidos en la superficie) y pueden formar un depósito en el sitio de inoculación permitiendo una liberación lenta, continua del antígeno. Durante un tiempo después de la inyección y la fagocitosis, la presentación liposomal asegura que esté disponible una cantidad específica de antígeno para células presentadoras de un único antígeno (Gluck 1995). Los inmunomoduladores marcan como diana distintas células o receptores, por ejemplo, receptores tipo toll en la superficie de APC. Los sistemas de suministro e inmunomoduladores pueden usarse juntos, por ejemplo, como en la serie Glaxo de adyuvantes. Por lo tanto, además de suministrar el antígeno de la vacuna, el sistema de suministro también puede usarse para suministrar los inmunomoduladores.

Además de ser un componente en una vacuna, los inmunomoduladores pueden administrarse sin antígeno(s). Mediante este enfoque, es posible activar el sistema inmune de forma local, por ejemplo, visto como la maduración de células presentadoras de antígeno, producción de citoquinas que es importante para la actividad antitumoral y antiviral. Por tanto, la administración de inmunomoduladores puede, por ejemplo, ser un soporte en la erradicación del cáncer y enfermedades cutáneas. Ejemplos de inmunomoduladores que pueden administrarse de forma local son taxanos, por ejemplo Taxol, el ligando del receptor 7/8 tipo toll Resiquimod, Imiquimod, Gardiquimod.

El bromuro, cloruro, fosfato, acetato de dimetildiioctadecilamonio u otras sales orgánicas o inorgánicas (DDA) es un compuesto de amonio cuaternario lipófilo, que forma liposomas catiónicos en soluciones acuosas a temperaturas por encima de 40°C. DDA es un sistema de suministro muy eficaz que potencia la captación del antígeno de vacuna en APC. Se han descrito combinaciones de DDA y agentes inmunomoduladores. La administración de Arquad 2HT, que comprende DDA, en seres humanos fue prometedora y no indujo efectos secundarios aparentes (Stanfield, 1973). La combinación de DDA y TDB o DDA y MPL mostró una sinergia muy clara entre el vehículo de suministro (DDA) y el inmunomodulador (TDB o MPL) con niveles altamente elevados de respuesta CMI en comparación con la respuesta obtenida con cualquiera de los componentes solos. DDA, por lo tanto, es un vehículo de suministro prometedor para un antígeno de vacuna y un inmunomodulador, por ejemplo, en el desarrollo de un sistema adyuvante para una vacuna contra TB y otros patógenos intracelulares.

Se ha informado de que diversos componentes de micobacterias son inmunomoduladores. Cuando se usaron lípidos extraídos de *M. bovis* BCG como adyuvante, se obtuvo una respuesta en test cutáneo a ovalbúmina en cobayas (Hiu 1975). Liposomas formados a elevadas temperaturas a partir de lípidos polares totales de *M. bovis* BCG son capaces de generar una respuesta humoral contra ovalbúmina, y una vacuna preparada a partir de estos lípidos polares dio protección en ratones después de exposición con células tumorales (documento WO 03/011336). El efecto de lípidos totales de *M. tuberculosis* H37Rv como antígeno en una vacuna TB experimental para cobayas se investigó por (Dascher y col., 2003). En este estudio, se mezclaron liposomas basados en colesterol y 1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DSPC) con un extracto de lípidos totales de *M. tuberculosis* H37Rv. Después de retirar el disolvente, los lípidos se reconstituyeron con dimetildiioctadecilamonio (DDA) como adyuvante en tampón PBS. Los cobayas inmunizados con esta vacuna no mostraron una reducción significativa en las bacterias, lo que sugiere que esta formulación de liposomas mezclada con DDA carece de un antígeno fuerte o que la formulación de lípidos micobacterianos con colesterol: DSPC evita el efecto adyuvante de DDA. Como alternativa, como se administra una mezcla de diversos lípidos, los lípidos eficaces pueden constituir una proporción demasiado limitada de los lípidos totales.

También se han investigado diversos componentes purificados de micobacterias para su actividad adyuvante. El derivado de proteína purificada (PPD) no indujo una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado por sí misma, pero cuando se añadía Wax D (un complejo de fragmento de peptidoglicano de pared celular micobacteriana-arabinogalactano-ácido micólico) como adyuvante, se observó una fuerte reacción (Yamazaki S 1969). El inmunomodulador SSM o Z-100, un arabinomanano lipídico extraído de *M. tuberculosis*, tiene actividad antitumoral (Suzuki F 1986). Otro compuesto derivado de micobacterias es 6,6'-dimicolato de trehalosa (TDM) (factor de acordonamiento; un glucolípido que contiene ácido micólico) (Saito y col., 1976). Además, el TDM (o análogos sintéticos) tiene efectos inmunoestimuladores y se ha incluido en diversas formulaciones adyuvantes (McBride y col., 1998) (Koike y col., 1998).

En un artículo de Silva y col. (1985), se inyectaron cinco componentes de la fracción purificada de *Mycobacterium Bovis* BCG por vía intravenosa en forma de partículas de carbón vegetal recubiertas con lípidos y dieron lugar a una reacción inflamatoria en los pulmones de los ratones. Los cinco componentes incluían TDM, monomicolato de trehalosa (MMT), monomicolato de glucosa (MMGlc), monomicolato de arabinosa (MMAr), y un monomicolato de glicerol (MMGlyc). El artículo describe el grupo principal monomicolil glicerol mientras que la composición de los ácidos micólicos se define mal y no se proporcionan datos estructurales. Además, la reacción después de la administración de los lípidos se describe solamente como una actividad inflamatoria en los pulmones mientras que la capacidad de potenciar una respuesta inmune específica conocida como efecto adyuvante no se describe.

Leech y col. (1985) describieron el uso de micolato de L-ala-glicerol como adyuvante para sensibilizar a un animal por asistencia con hapteno. Se descubrió que el micolato de L-ala-glicerol era útil en un estrecho intervalo de dosificación en ausencia de un adyuvante.

Aunque la actividad inmunoestimuladora e inflamatoria de lípidos derivados de micobacterias se ha reconocido durante muchas décadas con una bibliografía en constante expansión de lípidos capaces de estimular respuestas inmunes en modelos animales (murinos), hasta la fecha, no se han identificado lípidos individuales con la capacidad de estimular células dendríticas (DC) humanas. Como ejemplo, aunque se ha demostrado que TDM es el lípido micobacteriano más activo en términos de respuestas proinflamatorias, no se ha observado activación de células dendríticas con estimulación con TDM (Uehori y col., 2003). De modo que aunque el TDM ha mostrado actividad inflamatoria en varios artículos, este lípido aparentemente carece de capacidad para activar las células dendríticas que son cruciales para iniciar una respuesta inmune. La identificación de dicho lípido con la capacidad de activar células dendríticas humanas sugeriría que podría usarse como parte de un nuevo sistema adyuvante que sería adecuado para su uso en seres humanos. Además, la ausencia de adyuvantes inductores de Th1 adecuados para su uso en seres humanos hace de la identificación de un lípido individual derivado de micobacterias con capacidad

promotora de Th1 un hallazgo significativo.

Las DC son células presentadoras de antígeno (APC) que desempeñan una tarea esencial para dirigir la respuesta inmune después de infección con patógenos, tales como *M. tuberculosis*. Por tanto, la producción de IL-12 por DC activadas representa una etapa vital en el control de la infección por *M. tuberculosis* ya que esta citoquina es la de importancia primordial para dirigir la producción de IFN- γ por células Th1, que promueve la activación de macrófagos (Nathan y col., 1983). Además, en los últimos años se han descubierto evidencias que indican que las micobacterias también abordan DC en un intento por modular la respuesta inmune y se ha establecido un papel crucial para los lípidos micobacterianos en este proceso.

Hasta el 40% del peso en seco de la envuelta celular de las micobacterias está compuesto por lípidos (Minnikin 1982). Estos lípidos se han asociado desde hace tiempo con la patogenicidad distintiva de esta familia de organismos y se sabe que desempeñan una tarea sustancial en la respuesta del hospedador a la infección por micobacterias (Brennan y Goren 1979). Son prominentes entre estos lípidos las ceras de dimicocerosato de ftiocerol (PDIM) (Minnikin y col., 2002), cuya presencia se ha demostrado estar correlacionada con la patogenicidad; mutantes de *M. tuberculosis* deficientes en PDIM muestran crecimiento atenuado en ratones (Sirakova y col., 2003). Muy relacionados con las PDIM son los llamados "glucolípidos fenólicos" (PGL), siendo un buen ejemplo los dimicocerosatos de 2-metilramnosil fenol-ftiocerol ("micósido B") encontrados en *Mycobacterium bovis*. Se ha demostrado recientemente una relación entre este monoglucosil PGL y la hipervirulencia de ciertos aislados de *M. tuberculosis* (Reed y col., 2004).

Otra clase de lípidos de particular interés son los trehalosa-6,6-dimicolatos (TDM), los llamados "factores de acordonamiento". TDM promueve el mantenimiento de lesiones granulomatosas estimulando la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-6 e IL-12, y la citoquina promotora de Th-1 IFN- γ (Lima y col., 2001) y tiene una tarea en la prolongación de la supervivencia de *M. tuberculosis* en el interior de macrófagos inhibiendo la fusión fagosoma-lisosoma (Indigo y col., 2002). La fina estructura de los componentes de micolato de TDM es importante en la activación proinflamatoria de macrófagos durante la infección temprana (Rao y col., 2005).

A pesar de su tarea en la potenciación de la supervivencia micobacteriana, la potencia inmunomoduladora de los lípidos micobacterianos también puede aprovecharse para crear una nueva generación de adyuvantes inductores de Th-1. En la identificación de lípidos individuales con potente actividad inmunoestimuladora, puede ser posible evitar los problemas de toxicidad asociados con el uso de células completas inactivadas por calor de *M. tuberculosis* mezcladas con aceite -adyuvante completo de Freund (CFA)- manteniendo al mismo tiempo la potente actividad adyuvante. De hecho, los liposomas formados a partir de lípidos polares del Bacilo-Calmette-Guerin (BCG) de *M. bovis* se ha demostrado recientemente que activan células dendríticas derivadas de médula ósea murina (BM-DC). Se descubrió que la mayor parte de esta actividad se puede atribuir al glucosfolípido lipídico dimanósido fosfatidilinositol (Sprott y col., 2004).

Recientes estudios en nuestros laboratorios han caracterizado la nueva combinación adyuvante de un lípido micobacteriano extraído de *M. bovis* BCG y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA) que es capaz de promover una respuesta inmune compleja y sostenida, con un fuerte componente tanto humoral como mediado por células (Rosenkrands y col., 2005). Se descubrió que la mayor parte de la actividad adyuvante de los lípidos totales de BCG se podía atribuir a los lípidos apolares.

Aunque estos estudios confirman adicionalmente el potencial de los lípidos micobacterianos para actuar como adyuvantes, la solución óptima sería identificar el lípido individual más inmunoestimulador que, solo, tenga potente actividad. Esto representaría un adyuvante más barato, incluso más simple y también crearía la posibilidad de preparar análogos sintéticos del lípido permitiendo un sistema más limpio que podría producirse en las grandes cantidades necesarias de un adyuvante para su uso en vacunas que se administren en todo el mundo.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no esté dentro de las reivindicaciones se proporciona solamente a modo de información.

La presente invención divulga un lípido inmunoestimulador, monomicolil glicerol (MMG) y homólogos sintéticos, análogos y versiones modificadas del mismo, capaces de activar DC humanas. El MMG se obtiene de la fracción apolar de los lípidos BCG totales y es responsable de inducir el efecto adyuvante y protector asociado con estos lípidos. El MMG sintético con una estructura de carbono más pequeña es capaz de potenciar las propiedades estimuladoras del MMG natural en DC humanas *in vitro*, y también induce una fuerte respuesta Th-1 *in vivo*, que se traduce en una respuesta inmune protectora de larga duración contra TB en el modelo de ratón.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no esté dentro de las reivindicaciones se proporciona solamente a modo de información. La presente invención desvela el uso de monomicolil glicerol (MMG) u homólogos sintéticos, análogos o versiones modificadas del mismo, todos definidos en las reivindicaciones, para preparar un inmunomodulador, un adyuvante y una vacuna o un sistema de suministro que

comprende este adyuvante que tiene una capacidad única de estimular las células dendríticas humanas.

Como inmunomoduladores, el MMG u homólogos sintéticos, análogos y versiones modificadas del mismo, todos definidos en las reivindicaciones, se administrarán sin antígeno o antígenos. Mediante este enfoque es posible activar el sistema inmune de forma local, por ejemplo observado como maduración de células presentadoras de antígeno, producción de citoquinas que es importante para la actividad antitumoral y antiviral.

Un adyuvante (del latín *adjuvare*, para ayudar) puede definirse como cualquier sustancia que cuando se administra en la vacuna sirve para dirigir, acelerar, prolongar y/o potenciar la respuesta inmune específica. Dependiendo de la naturaleza del adyuvante, puede promover una respuesta inmune mediada por células, una respuesta inmune humoral o una mezcla de las dos. Cuando se usa como adyuvante de vacuna, se añade un componente antigénico al adyuvante. Como la potenciación de la respuesta inmune mediada por adyuvantes no es específica, está bien comprendido en el campo que puede usarse el mismo adyuvante con diferentes antígenos para promover respuestas contra diferentes dianas, por ejemplo, con un antígeno de *M. tuberculosis* para promover inmunidad contra *M. tuberculosis* o con un antígeno derivado de un tumor, para promover inmunidad contra tumores de ese tipo específico.

Un adyuvante específico descrito por la invención es un adyuvante que comprende MMG o un homólogo sintético, análogo o versión modificada del mismo, todos definidos en las reivindicaciones, que comprende adicionalmente un vehículo de suministro, por ejemplo emulsiones, partículas de poliestireno, niosomas, ISCOM, virosomas, microesferas, o liposomas tipo tensioactivo. Los tensioactivos preferidos son más preferiblemente lípidos catiónicos basados en bromuro o cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-B o DDA-C) o la sal sulfato, fosfato o acetato de los mismos (DDA-X), o bromuro o cloruro de dimetildioctadecenilamonio (DODA-B o DODA-C) o el compuesto sulfato, fosfato o acetato de los mismos (DODA-X). Otros tipos de lípidos catiónicos preferidos usados en esta invención incluyen, aunque sin limitación, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano y dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP) y N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA). Otros tensioactivos se eligen entre DXPC, DXPE, DXPG o combinaciones de los mismos donde X es un reemplazo para la descripción de longitud de cadena, por ejemplo, P=palmitoil (16C), S=estearoil (18C), A=araquidoil (20C).

El vehículo de suministro también puede usarse para otros inmunomoduladores tales como TLR y ligandos no-TLR como MPL (monofosforil lípido A), ácido polinosínico policitídílico (poli-IC), muramil dipéptido (MDP), zimosán, ARN bicatenario (ARNbc), DC-Chol, oligodesoxinucleótidos CpG, péptidos catiónicos, TDM, TDB, tamoxifeno, o cualquier análogo de cualquiera de estas moléculas. Por tanto, un adyuvante preferido comprende MMG o un homólogo, análogo o versión modificada del mismo, todos definidos en las reivindicaciones, y comprende adicionalmente un ligando TLR o no-TLR en un vehículo de suministro.

Los sistemas de suministro que comprenden MMG u homólogos sintéticos, análogos o versiones modificadas del mismo, todos definidos en las reivindicaciones, pueden usarse para tratar el cáncer, un trastorno autoinmune, un trastorno nervioso, por ejemplo Alzheimer, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. El MMG u homólogos sintéticos, análogos y versiones modificadas del mismo, todos definidos en las reivindicaciones, se administra en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas TLR y no-TLR, antagonistas TLR y no-TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN y moléculas coestimuladoras.

Un componente o sustancia antigénica es una molécula, que reacciona con un anticuerpo preformado y/o los receptores específicos en células T y B. En el contexto de la vacunación, una molécula que puede estimular el desarrollo de células T o B específicas, que conduce a la formación de una población de memoria de células inmunes que promoverá una respuesta "de memoria" más rápida si el antígeno se encuentra una segunda vez con células inmunes. Como las poblaciones de memoria raramente son clonales, en la práctica esto significa que un antígeno es cualquier molécula o colección de moléculas, que puede estimular un aumento en las respuestas inmunes cuando se vuelve a encontrar con células inmunes de un individuo que se ha expuesto previamente al mismo.

La invención desvela adicionalmente una vacuna para administración parenteral, oral o a la mucosa o un sistema de suministro que comprende el adyuvante. Una vacuna preferida comprende un epítipo antigénico de un patógeno intracelular, por ejemplo, una micobacteria virulenta (por ejemplo, los productos de fusión Ag85b_TB10.4, Ag85b_ESAT-6_Rv2660, Ag85b_TB_10.4_Rv2660 y Ag85a_TB10.4_Rv2660), *Plasmodium falciparum* (Msp1, Msp2, Msp3, Ama1, GLURP, LSA1, LSA3 o CSP), *Chlamydia trachomatis* (por ejemplo, CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 o C681), VIH, influenza o Hepatitis B o C. El adyuvante o sistema de suministro también puede usarse en vacunas para tratar el cáncer, la alergia o enfermedades autoinmunes.

Un extracto de lípidos micobacterianos totales es una mezcla de lípidos obtenida de una micobacteria, por ejemplo, BCG, *M. microti*, *M. tuberculosis* y *M. vaccae*, por un procedimiento químico o físico. En el presente trabajo, el procedimiento usado para la extracción es la acción de disolventes orgánicos (como se describe a continuación), pero son posibles otras posibilidades conocidas por los especialistas en la técnica.

La fracción lipídica apolar se define como lípidos no polares. La fracción lipídica apolar se obtiene tratando las bacterias con una mezcla bifásica de metanol/solución salina y éter de petróleo. El extracto de éter de petróleo está compuesto de lípidos apolares (no polares). Después de ello, la fracción lipídica polar se obtiene por adición de cloroformo a las micobacterias y la fase acuosa residual. El extracto de cloroformo contiene los lípidos polares restantes. Los componentes principales en la fracción lipídica apolar son dimicocerosatos de ftiocerol, triacilgliceroles, micolipenatos de trehalosa y menaquinonas. Los componentes principales de la fracción lipídica polar son fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, y fosfatidilinositol. Los lípidos de polaridad intermedia son sulfolípidos, micolatos de trehalosa, fenolfioceroles glucosilados (incluyendo glucolípidos fenólicos, PGL) y trehalosas aciladas (Dobson y col., 1985).

MMG se refiere al monomicolil glicerol lipídico obtenido de la fracción lipídica apolar, y derivados, por ejemplo alfa-MMG y ceto-MMG y análogos naturales y sintéticos de los mismos. El MMG puede aislarse por procesamiento CCF en tolueno/acetona (95:5). El PGL y MMG se extraen juntos por este procedimiento pero pueden separarse en CCF 1-D en cloroformo:metanol:amoníaco 0,880 (97:3:0,5). Los derivados de MMG, alfa-MMG y ceto-MMG, pueden obtenerse calentando por calentamiento durante una noche a 100°C con TBAH acuoso al 5% (2,5 ml) en un tubo de 16 x 100 mm (Minnikin 1988).

Un homólogo sintético, análogo o versión modificada de MMG puede producirse por cualquier procedimiento convencional de síntesis química. Un análogo se refiere a uno de un grupo de compuestos similar en estructura pero diferente respecto a la composición elemental y homólogo se refiere a cualquier miembro de una serie homóloga de compuestos. Estos compuestos pueden ser de variables longitudes de cadena de carbono; en particular se ha asociado un tamaño reducido con toxicidad reducida y por lo tanto puede servir para disminuir cualquier toxicidad evidente de los análogos. Por tanto, las versiones sintéticas pueden basarse en cadenas de alquilo con, por ejemplo, 8-36 carbonos y con 0-3 dobles enlaces en cada cola lipídica. Como alternativa, puede obtenerse una forma simplificada eliminando una de las colas lipídicas. El tamaño de la estructura de carbono del MMG sintético es preferiblemente de C8 - C36, por ejemplo, 2,3-dihidroxi-2-butiril-octanoico (C12), 2,3-dihidroxi-2-hexil-decanoico (C16), 2,3-dihidroxi-2-heptil-undecanoico (C18), 2,3-dihidroxi-2-hexil-decanoico (C16), 2,3-dihidroxi-2-tetradecil-octadecanoico- (C32) o 2,3-dihidroxi-2-hexadecilicosanoico (C36) y más preferiblemente C8 o C16. Una versión modificada puede prepararse reemplazando el resto glicerol con otro grupo principal polioliol, por ejemplo polipropilenglicol y polietilenglicol. La estereoquímica alrededor de C2 y C3 del monomicolato sintético así como en el glicerol puede variarse. A continuación, MMG escrito solo también indica un homólogo sintético, análogo o versión modificada de MMG como se ha descrito anteriormente.

El componente o sustancia antigénica puede ser un polipéptido o una parte del polipéptido, que provoca una respuesta inmune en un animal o un ser humano, y/o en una muestra biológica determinada por cualquiera de los ensayos biológicos descritos en este documento. La parte inmunogénica de un polipéptido puede ser un epítipo de células T o un epítipo de células B. Para identificar los epitopes de células T relevantes que se reconocen durante una respuesta inmune, es posible usar un procedimiento de "fuerza bruta": como los epitopes de células T son lineales, mutantes de delección del polipéptido, si se construye sistemáticamente, revelarán qué regiones del polipéptido son esenciales en el reconocimiento inmune, por ejemplo, sometiendo estos mutantes de delección, por ejemplo, al ensayo de IFN-gamma descrito en este documento. Otro procedimiento utiliza oligopéptidos solapantes (preferiblemente sintéticos que tienen una longitud de, por ejemplo, 20 restos aminoácidos) derivados del polipéptido. Estos péptidos pueden ensayarse en ensayos biológicos (por ejemplo, el ensayo de IFN-gamma descrito en este documento) y algunos de estos darán una respuesta positiva (y por lo tanto serán inmunogénicos) como evidencia de la presencia de un epítipo de células T en el péptido. Los epitopes de células B lineales pueden determinarse analizando el reconocimiento de células B para péptidos solapantes que cubren el polipéptido de interés como se describe, por ejemplo, en Harboe y col., 1998.

Aunque la longitud mínima de un epítipo de células T se ha demostrado que es al menos de 6 aminoácidos, es normal que dichos epitopes se constituyan de tramos más largos de aminoácidos. Por tanto, se prefiere que el fragmento polipeptídico de la invención tenga una longitud de la menos 7 restos aminoácidos, tal como al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 22, al menos 24, y al menos 30 restos aminoácidos. Por tanto, en realizaciones importantes del procedimiento de la invención, se prefiere que el fragmento polipeptídico tengo una longitud de como mucho 50 restos aminoácidos, tal como, como mucho 40, 35, 30, 25, y 20 restos aminoácidos. Se espera que los péptidos que tienen una longitud entre 10 y 20 restos aminoácidos muestren ser los más eficaces como herramientas de diagnóstico, y por lo tanto longitudes especialmente preferidas del fragmento polipeptídico usado en el procedimiento de la invención son 18, tal como 15, 14, 13, 12 e incluso 11 aminoácidos.

Específicamente, la sustancia antigénica puede obtenerse de un cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y otras micobacterias ambientales metabolizantes tales como, por ejemplo, *Mycobacterium avium*. Particularmente, sustancias interesantes del filtrado de dichas micobacterias son las proteínas de la familia del gen ESAT-6 (tal como ESAT6 y TB10.4) así como otros antígenos tempranos tales como Ag85A, Ag85B, ORF2c, Rv1036 y Rv0285 que son dianas dominantes para inmunidad mediada por células en la fase temprana de la tuberculosis en pacientes TB y en diferentes modelos animales. También son de relevancia otros antígenos tales como Rv2653, Rv2655, Rv2656, Rv2657, Rv2658, Rv2659, Rv2660 que son dianas dominantes durante fases

tardías de infección TB. Su inmunogenicidad per se es baja, pero en combinación con las combinaciones adyuvantes de la presente invención han resultado ser potentes candidatos para provocar inmunidad elevada y persistente contra tuberculosis como se demuestra en la siguiente parte detallada de esta memoria descriptiva.

5 Las proteínas de la familia del gen ESAT-6 así como muchos otros antígenos aplicables en combinación con las combinaciones adyuvantes de la presente invención, hoy en día pueden producirse de forma artificial, por ejemplo, sintéticamente o por técnicas recombinantes genéticas.

Se ha demostrado que las proteínas de fusión son especialmente muy adecuadas como sustancias antigénicas en vacunas, por ejemplo los productos de fusión Ag85b_TB_10.4, Ag85b_ESAT-6_Rv2660, Ag85b_TB_10.4_Rv2660 y Ag85a_TB10.4_Rv2660 ha demostrado ser muy eficaz contra TB.

10 Una vacuna se define como una suspensión de microorganismos muertos, atenuados, o modificados de otro modo (bacterias, virus, o rickettsias) o partes de los mismos para la inoculación para producir inmunidad contra una enfermedad. La vacuna puede administrarse de forma profiláctica para prevenir una enfermedad o como vacuna terapéutica para combatir enfermedades ya existentes tales como cáncer o enfermedades infecciosas latentes pero también en relación con alergias y enfermedades autoinmunes. La vacuna puede emulsionarse en un adyuvante
15 adecuado para potenciar la respuesta inmune.

Las vacunas se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que será terapéuticamente eficaz e inmunogénica. La cantidad ha administrarse depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo de montar una respuesta inmune, y el grado de protección deseado. Los intervalos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de
20 ingrediente activo por vacunación con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1 µg a 1000 µg, tal como en el intervalo de aproximadamente 1 µg a 300 µg, y especialmente en el intervalo de aproximadamente 1 µg a 50 µg. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables pero se tipifican por una administración inicial seguida de posteriores inoculaciones u otras administraciones.

El modo de aplicación puede variarse ampliamente. Cualquiera de los procedimientos convencionales para la administración de una vacuna es aplicable. Se cree que estos incluyen aplicación oral o a la mucosa sobre una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, por inyección o similares. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con la edad de la persona a vacunar y, en un menor grado, el tamaño de la persona a vacunar.

Las vacunas se administran convencionalmente por vía parenteral, por inyección, por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular. Formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales o a la mucosa. Para supositorios, aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente del 1-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes normalmente empleados tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y ventajosamente contienen el 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente el 25-70%.

La vacuna de elección puede ser, por ejemplo:

40 Vacuna de proteínas: Una composición de vacuna que comprende un polipéptido (o al menos una parte inmunogénica del mismo), una mezcla peptídica o polipéptido de fusión.

Vacunas recombinantes vivas: Expresión del antígeno relevante en una vacuna en un microorganismo no patógeno o virus. Ejemplos bien conocidos de dichos microorganismos son *Mycobacterium bovis* BCG, salmonela y pseudomonas y ejemplos de virus son virus Vaccinia y adenovirus.

45 Para todas estas construcciones de vacuna, la adición de un adyuvante adecuado ha provocado eficacias potenciadas de la vacuna (Brandt y col., 2000), (van Rooij y col., 2002), (Bennekov y col., 2006).

Los liposomas (o vesículas lipídicas) son compartimentos acuosos encerrados por una bicapa lipídica. Los componentes lipídicos son habitualmente fosfolípidos u otros anfífilos tales como tensioactivos, a menudo suplementados con colesterol y otros lípidos cargados. Los liposomas son capaces de atrapar compuestos solubles en agua y lípidos permitiendo de este modo que el liposoma actúe como vehículo. Los liposomas se han usado como sistema de suministro en farmacología y medicina tales como inmunoadyuvantes, tratamiento de enfermedades infecciosas e inflamaciones, terapia para el cáncer, y terapia génica (Gregoriadis y col., 1995). Los factores que pueden tener influencia sobre el efecto adyuvante de los liposomas son el tamaño liposomal, la composición lipídica, y la carga superficial. Además, la localización del antígeno (por ejemplo, esté adsorbido o acoplado covalentemente a la superficie del liposoma o encapsulado en compartimentos acuosos liposómicos) también puede ser importante. Las células dendríticas pueden usarse como vehículos de suministro de antígeno. La carga de antígeno en células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, ha demostrado ser un

procedimiento eficaz para generar células T activas con un papel en inmunidad antitumoral.

Los compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo bromuro, cloruro de dimetildiocetadecilamonio u otras sales orgánicas o inorgánicas del mismo (DDA-B, DDA-C o DDA-X), cloruro, bromuro de dimetildiocetadecilamonio u otras sales orgánicas o inorgánicas del mismo (DODA-C, DODA-B o DODA-X), o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano y dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP) y N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) tienen la capacidad de formar agregados lipídicos tales como bicapas lipídicas, liposomas de todos los tipos tanto unilamelares como multilamelares, micelas y similares cuando se dispersan en medio acuoso. Las membranas lipídicas de estas estructuras proporcionan una excelente matriz para la inclusión de otros compuestos anfífilos tales como glucolípidos, por ejemplo MMG o 6,6'-dibehenato de alfa, alfa'-trehalosa (TDB) que han demostrado estabilizar las dispersiones de vesículas (Davidsen y col., documento WO2006/002642).

La combinación de MMG y el sistema de suministro puede actuar de un modo sinérgico para potenciar la respuesta inmune, por ejemplo, cuando se administra DDA solo. Por tanto, DDA promueve un bajo nivel de producción de IFN- γ , sin embargo, en combinación con MMG, se potencia la protección de IFN- γ de forma drástica.

Los liposomas de esta invención pueden prepararse por una diversidad de procedimientos bien conocidos en la técnica (Davidsen y col., documento WO2006/002642). La incorporación de MMG en liposomas/sistemas de suministro puede hacerse por una diversidad de procedimientos bien conocidos en la técnica incluyendo mezcla simple de liposomas y MMG. En particular, la incorporación de MMG en liposomas puede hacerse como se describe en Davidsen y col., (documento WO2006/002642).

Además de proporcionar inmunidad contra enfermedades, las combinaciones de adyuvante de la presente invención también pueden usarse para producir anticuerpos contra compuestos que son sustancias poco inmunogénicas per se y dichos anticuerpos pueden usarse para la detección y cuantificación de los compuestos en cuestión, por ejemplo, en medicina y química analítica.

Levyendas de las figuras

Figura 1. Aislamiento y evaluación de la actividad inmunoestimuladora de lípidos apolares y polares de *M. bovis* BCG. Se analizaron lípidos polares y apolares extraídos de *M. bovis* BCG Copenhagen por CCF 2-D. En la fracción lipídica polar, 1-4 son manósidos de fosfatidilinositol, PI es fosfatidilinositol, PE es fosfatidiletanolamina y DPG es difosfatidilglicerol (cardiolípido). PG es L-alfa-fosfatidil-DL-glicerol, mientras que 5 y 6 son fosfolípidos desconocidos. En la fracción apolar, TAG es triacilglicerol, PDIM es dimicocerosatos de ftiocerol A, B y C, MMG es monomicolil glicerol, PGL es glucolípidos fenólicos y FFA son ácidos grasos libres (Panel A). Se incubaron iDC durante 24 h en presencia de medio solo, LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$), MPL (100 $\mu\text{g/ml}$), factor de acordonamiento (CF) (100 $\mu\text{g/ml}$), lípidos apolares (0,1 - 100 $\mu\text{g/ml}$) o lípidos polares (0,1 - 100 $\mu\text{g/ml}$). Se muestra la media geométrica de la intensidad fluorescente (MFI) de los niveles de marcadores superficiales sobre DC después del tratamiento. Los datos obtenidos de un experimento representativo de tres usando tres donantes diferentes (Panel B). Los sobrenadantes de cultivo obtenidos después del tratamiento con 100 $\mu\text{g/ml}$ de lípidos apolares o polares se analizaron por ELISA para la presencia de las citoquinas IL-6, TNF- γ e IL-12. Se presentan los datos obtenidos de un experimento representativo de tres realizados por triplicado, usando tres donantes diferentes (\pm s.e.m.) (Panel C). Proliferación (Panel D) y liberación de IFN- γ (Panel E) por células T de donantes PPD-negativos después de incubación con DC tratado durante 24 horas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de lípidos apolares o polares en un ensayo MLR. Se presentan los datos obtenidos de un experimento representativo de tres realizados por triplicado, usando tres donantes diferente (\pm s.e.m.)

Figura 2. Estructuras de MMG, TAG, PDIM y PGL. Análisis de CCF 2-D de los lípidos individuales PDIM, TAG, PGL y MMG (Panel A) y estructuras representativas de MMG, PGL, PDIM y TAG (Panel B).

Figura 3. Activación de células dendríticas humanas por MMG. Se incubaron iDC durante 24 h en presencia de medio solo (línea discontinua) o MMG, PDIM, PGL o TAG (10 $\mu\text{g/ml}$). Se descubrió que las preparaciones lipídicas estaban libres de contaminación con endotoxinas ($< 0,001$ ng de LPS/ μg de lípido). Se muestra la MFI de los niveles de marcadores superficiales sobre DC para un donante representativo de seis después de tratamiento (Panel A). Se analizaron los sobrenadantes de cultivo obtenidos después del tratamiento con MMG, PDIM A, PGL o TAG (10 $\mu\text{g/ml}$) por ELISA para la presencia de las citoquinas IL-6, TNF- α e IL-12 (Panel B). Se presenta la media (\pm s.e.m.) de los datos obtenidos de tres o cuatro experimentos usando diferentes donantes realizados por triplicado. Los datos se analizaron usando el ensayo de Tukey.

Figura 4. Alfa- y cetomicolatos de MMG son inmunoestimuladores. Se incubaron iDC durante 24 h en presencia de medio solo y alfa- o cetomicolatos de MMG (10 $\mu\text{g/ml}$). Se muestra la MFI de marcadores superficiales sobre DC después del tratamiento.

Figura 5. Liberación de IFN- γ inducida por MMG aislado de *M. bovis* BCG Copenhagen. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 en combinación con adyuvantes basados en lípidos aislados de BCG Copenhagen incorporados en liposomas DDA. Se midió la liberación de IFN- γ por PBMC aisladas del drenaje de

ganglios linfáticos días después de la vacunación.

Figura 6. Protección contra una infección por TB virulenta con adyuvantes de MMG. Se inmunizaron ratones C57BL/6 tres veces con Ag85B-ESAT-6 en combinación con adyuvantes basados en DDA y 10 ó 50 µg de MMG. Seis semanas después de la vacunación final, los ratones recibieron una exposición en aerosol con *M. tuberculosis*. Se midió la cantidad de bacterias en los pulmones y el bazo seis semanas después. Los ratones que recibieron una vacunación de BCG convencional se incluyeron como control positivo y ratones inmunizados con DDA/MMG (10 µg) sin antígeno como control negativo. La eficacia protectora de las vacunas experimentales se expresa como la reducción de Log10 en la carga bacteriana en el pulmón en comparación con ratones no inmunizados. Los resultados son los valores medios para seis ratones en cada grupo ± SEM. Los valores significativamente diferentes del control no inmunizado están marcados * P<0,05.

Figura 7. La liberación de IFN-γ está potenciada por la combinación de MMG y DDA. En dos experimentos, se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 en DDA o DDA/MMG (Panel A) o MMG o DDA/MMG (Panel B). Se midió la liberación de IFN-γ por PBMC aisladas de la sangre (Panel A) o en bazos (Panel B) tres semanas después de la última vacunación.

Figura 8. La liberación de IFN-γ está potenciada por la adición de TDB a la combinación MMG/DDA. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 administrado en MMG incorporado en liposomas DDA o liposomas DDA que contenían TBD. Se midió la liberación de IFN-γ por PBMC aisladas de la sangre 5 meses después de la vacunación.

Figura 9. Ejemplos de estructuras de análogos de MMG sintéticos.

Figura 10. Las respuestas inmunes son comparables con análogos de MMG naturales y sintéticos. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 en DDA, DDA/MMG (10 µg), DDA/MMG C36 (10 µg) o DDA/MMG C16 (10 µg). Se midió la liberación de IFN-γ por PBMC aisladas de la sangre una semana después de la última inmunización.

Figura 11. Respuestas inmunes superiores con una longitud de cadena más corta. Se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 en DDA o DDA con diversos análogos de MMG que varían de una longitud de cadena de 8 a 36 (1 µg/dosis). Se midió la liberación de IFN-γ por PBMC aisladas de la sangre tres semanas después de la última inmunización.

Ejemplos

Material y procedimientos:

Extracción de lípidos apolares y polares de *M. bovis* BCG

Se cultivó *Mycobacterium bovis* BCG (Copenhague) en medio de Sauton modificado. Las micobacterias se recogieron después de 2-3 semanas, se suspendieron en PBS y se inactivaron incubando durante 1 1/2 horas a 60°C. Los lípidos apolares y polares se extrajeron de acuerdo con protocolos convencionales (Dobson y col., 1985), (Rosenkrands y col., 2005).

Para la extracción de los lípidos apolares, se añadió metanol: NaCl al 0,3% (440 ml) y 440 ml de éter de petróleo a 20 g de micobacterias (peso húmedo) y la mezcla se agitó durante 2 horas. Después de la centrifugación, se retiró la capa superior y se volvió a extraer la capa inferior con 440 ml de éter de petróleo. Las fases sobrenadantes de ambas extracciones se combinaron y evaporaron para dar los lípidos apolares.

Para la extracción de los lípidos polares, la solución salina metanólica que contenía la biomasa se calentó en un baño de agua hirviendo durante 10 min a 100°C seguido por refrigeración durante 10 min a 37°C. Se añadió un volumen de 520 ml de cloroformo:metanol:NaCl al 0,3% (9:10:3) y la mezcla se agitó durante una noche. La mezcla total se pasó a través de un embudo de vidrio sinterizado; se recogió la torta de filtro y se volvió a extraer dos veces con 170 ml de cloroformo:metanol:NaCl al 0,3% (5:10:4). Se combinaron las tres fases acuosas de cloroformo metanólico y se añadieron 580 ml de cloroformo:NaCl acuoso al 0,3% (1:1), con agitación, durante 10 minutos. Después de permitir que las fases se separaran, se retiró y desechó la capa acuosa superior. La capa orgánica inferior se evaporó a sequedad para proporcionar los lípidos polares.

Purificación de lípidos apolares individuales

Se aislaron los PDIM y TAG usando procesamiento en CCF en éter de petróleo/acetona (98:2); se recuperó solamente el componente principal de PDIM, basado en ftiocerol A. Se aislaron PGL y MMG juntos por procesamiento en CCF en tolueno/acetona (95:5). PGL y MMG se separaron en CCF 1-D en cloroformo:metanol:amoníaco 0,880 (97:3:0,5). Los PDIM, TAG, PGL y MMG se sometieron a resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C a 500 MHz (Bruker drx500) y espectroscopía de masas (EM) por MALDI-TOF (Bruker Biflex IV). Las muestras (10 µl) de los extractos lipídicos rehidratados (1 mg/ml) se analizaron por SDS-PAGE (Laemmli y col., 1970) y tinción con plata (Blum y col., 1987) para el contenido de proteínas residuales. Se descubrió

que las preparaciones lipídicas estaban libres de contaminación con endotoxinas (<0,001 ng de LPS/ μ g de lípido).

Hidrólisis de monomicolil glicerol

5 Se calentó monomicolil glicerol durante una noche a 100°C con TBAH acuoso al 5% (2,5 ml) en un tubo de 16 x 100 mm (Minnikin y col., 1988). Después de refrigerar, la mezcla se diluyó con agua (2 ml) y se añadió una solución al 10% de yodometano (3 ml) en diclorometano y los tubos se colocaron en un rotador durante 1 hora. La capa acuosa superior se desechó, la capa inferior se lavó con volúmenes equivalentes de HCl 1 M y agua y se evaporó a sequedad para producir un residuo, que demostró por CCF (éter de petróleo:acetona 95:5) que contenía metilésteres de alfa- y cetomicolato. La CCF preparativa (como anteriormente) dio micolato de metilo y micolato de cetometilo.

10 Se usó derivatización con trimetilsililo para separar alfa-MMG y ceto-MMG. La mezcla de MMG y 600 ml de reactivo TRI-SIL (Pierce) se calentó a 75°C durante 20 min. La solución refrigerada después se secó en chorro de nitrógeno y se cargó en una placa de CCF preparativa y se reveló en éter de petróleo:tolueno (50:50) y las bandas de alfa-MMG y ceto-MMG se visualizaron usando rodamina al 0,01% y se examinaron con fluorescencia de onda larga. Las bandas correspondientes se rasparon de la placa de CCF y se extrajeron el alfa-MMG y ceto-MMG del gel de sílice tres veces usando dietiléter (3 x 5 ml). Los extractos combinados se secaron y los grupos trimetilsililo se retiraron por la adición de heptano:metanol (1:1) y unos pocos cristales de ácido para-toluenosulfónico y se mezclaron durante 1 hora. La capa de heptano se recuperó y evaporó a sequedad para producir alfa-MMG y ceto-MMG purificados.

La síntesis de MMG muestra producción de C36

20 Se colocó ácido 3-hidroxi-2-tetradecil-octadecanoico (ácido corinomicólico C₃₂ sintético, sintetizado de acuerdo con Datta y col., 1991) (100 mg, 0,20 mmol, 1 eq.) y 4-pirrolidinopiridina (100 mg, 3 eq.) en un matraz de fondo redondo de 50 ml y se añadió una solución de 50 μ l de 2,2-dimetil-4-hidroxitetil-1,3-dioxolano (glicerol de sn-isopropilideno) en diclorometano (500 μ l), junto con tamices moleculares de 4Å. La mezcla se recogió a sequedad completa a alto vacío a temperatura ambiente y se añadió N,N-diciclohexilcarbodiimidazol (DCC) (15 ml, de DCC 0,1 M en DCM, 5 eq.) y la reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante una noche. Los tamices moleculares se retiraron por filtración, la mezcla de reacción se redujo a sequedad al vacío y el residuo se purificó usando cromatografía en columna ultra rápida (Fluka 60741 SilicaFel 60), eluyendo con hexano:acetato de etilo (8:2) en incrementos del 5% para dar el compuesto puro protegido con isopropilideno (2,2-dimetil-[1,3]-dioxolan-4-ilmetil éster del ácido 3-hidroxi-2-tetradecil-octadecanoico) en un rendimiento del 56% (68 mg). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0,90 (t, 6H, CH₃), 1,20 (s, 54H, CH₂), 1,40 (s, 3H, CH₃), 1,45 (s, 3H, CH₃), 2,50 (m, 1H, CH), 4,05-4,40 (m, 5H, CH₂, CH); ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ_C 15,0 (CH₃), 22,1, 28,8, 28,9, 29,0, 31,4 (CH₂), 29,1 (CH₃), 52,1 (CH (CH₂)₁₃CH₃), 63,2 (CH₂OCO), 69,3 (CH₂O), 73,4 (CH (CH₂)₁₄CH₃), 174,3 (C=O); m/z (EI) 633,55 [M+Na⁺] (100%); EMAR calculado para C₃₈H₇₄O₅Na [M+Na⁺] 633,5536 encontrado 633,5527. Se disolvió 2,2-dimetil-[1,3]-dioxolan-4-ilmetil éster del ácido 3-hidroxi-2-tetradecil-octadecanoico (68 mg, 1 eq.) en 6 ml de una solución de ácido trifluoroacético:tetrahidrofurano:agua (8:17:3, en volumen) y se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución se neutralizó con bicarbonato sódico acuoso saturado y la mezcla se extrajo dos veces con cloroformo. El extracto orgánico se lavó con agua y salmuera, se secó y se redujo al vacío para producir el producto bruto en forma de un sólido blanco, que se purificó por cromatografía en columna ultra rápida en un cartucho de gel de sílice de 10 g Varian Bond Elut 12256026, eluyendo con hexano a hexano:acetato de etilo (7:3) en incrementos del 5%, para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanco en un rendimiento del 49% (32 mg). Punto de fusión 72-74°C. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ_H 0,90 (t, 6H, CH₃), 1,25 (s, 54H, CH₂), 2,50 (m, 1H, CH), 3,45-3,85 (m, 3H, CH, CH₂), 4,25 (m, 2H, CH₂); ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ_C 15,0 (CH₃), 26,3, 30,9, 31,3, 33,5 (CH₂), 47,5 (CH (CH₂)₁₃CH₃), 68,4 (CH₂), 69,5 (CH (CH₂)₁₄CH₃), 72,5 (CH₂O), 76,4 (CH), 175,4 (C-1); m/z (EI) 593,50 [M+Na⁺] (100%); EMAR calculado para C₃₅H₇₀O₅Na [M+Na⁺] 593,5121 encontrado 593,5143.

Ensayos con células dendríticas

45 Se obtuvieron DC derivadas de PBMC humanas de acuerdo con un procedimiento modificado de Romani y col., 1994. La sangre periférica se obtuvo de capas leucoplaquetarias. En resumen, se aislaron monocitos por centrifugación en Ficoll-Hypaque (medio de densidad Lymphoprep 1077, Nycomed, Oslo, Noruega) seguido por separación de células CD-14 positivas usando perlas magnéticas marcadas con anti-CD14 (MACS; Miltenyi Biotech, Bergesh Gladbach, Alemania). Los monocitos se cultivaron en RPMI 1640 completo suplementado con FCS al 10%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM (todos Gibco) (CM) y en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (Prepotech, Rocky Hill, NJ, Estados Unidos de América) y 50 ng/ml de IL-4 recombinante humana (Becton Dickinson (BD)) durante 7 días a 37°C, CO₂ al 5%.

55 En el día 7, se cultivaron las iDC (1 x 10⁵ células/ml) durante 24 horas adicionales con lipopolisacárido (LPS) (Escherichia coli O127:B8) (Sigma-Aldrich, Brondby, Dinamarca) o lípidos derivados de *M. bovis* BCG. Los extractos lipídicos se prepararon volviendo a disolver el material lipídico seco de *M. bovis* con cloroformo:metanol (2:1), seguido de evaporación del disolvente y sonicación con sonda en CM. Los lípidos se añadieron a DC inmaduras a 0,1 a 100 μ g/ml.

Análisis citométrico de flujo

Se tiñeron DC para marcadores superficiales por incubación primero con el mAb relevante (BD Pharmingen) (30 min, 4°C) seguido de anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con FITC diluido 1/20 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) (30 min, 4°C). La unión no específica del Ab se bloqueó con solución de suero de ternera fetal al 10% (15 min., 4°C) antes de la adición del mAb humano primario relevante. Las células teñidas se examinaron por citometría de flujo inmediatamente, usando un citómetro de flujo FACScan (BD) y se analizaron con el software CellQuest.

Mediciones de citoquinas

Se recogieron sobrenadantes de cultivo de DC y se almacenaron a -20°C. Se midieron la IL-12p70, IL-6 y TNF- α secretadas por ELISA (BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo de reacción leucocitaria mixta (MLR)

Se generaron iDC para el ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) a partir de monocitos como se resume anteriormente. Las células resultantes se cultivaron durante 24 horas en el mismo medio (iDC) o en el medio que contenía lípidos (10 ó 100 μ g/ml). Las titulaciones de DC de $0,125 \times 10^5$ a 2×10^5 se incubaron a 37°C/CO₂ al 5% con células T alogénicas (10^5 células/pocillo) de un donante PPD negativo en placas de microtitulación de 96 pocillo con fondo plano. Las células T se aislaron usando un kit de aislamiento de células T-Pan (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los co-cultivos de células T alogénicas DC se incubaron durante 6 días. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C hasta que se midió la IFN- γ secretada por ELISA (BD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Ambos ensayos después se pulsaron con medio que contenía 1 μ Ci/pocillo de [³H] timidina durante las 18 horas finales de cultivo. Las células se recogieron, y se midió la proliferación de células T por recuento de centelleo líquido (Microbeta Systems). Todos los ensayos se realizaron por triplicado usando al menos tres donantes diferentes.

Antígenos

Se produjo la proteína de fusión de Ag85B y ESAT-6 (a partir de ahora denominada Ag85B-ESAT-6) en forma de proteínas recombinantes como se ha descrito anteriormente (Olsen y col., 2001).

Animales

Se obtuvieron ratones BALB/c o C57BL/6 hembra, de 8 a 12 semanas de edad, de Bom-holtgaard (Ry, Dinamarca) o de Harlan Scandinavia (Dinamarca). Los ratones infectados se mantuvieron en jaulas con un cierre de seguridad de flujo laminar BL-3.

Inmunizaciones

Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea (s.c.) en la base de las colas hasta tres veces con un intervalo de dos semanas entre cada inmunización. Las vacunas (0,2 ml/ratón) constaron de 2 μ g de la proteína de fusión Ag85B-ESAT-6, emulsionada en 250 μ g de DDA, y 10 μ g de extracto lipídico rehidratado, salvo que se indique otra cosa. En algunos casos se incorporó TDB al 11% en moles en liposomas DDA (Davidsen y col., documento PCT/DK2005/000467). Como control positivo en los experimentos que implicaban infección por *M tuberculosis*, un único grupo de ratones recibió una dosis de BCG Danish 1331 inyectada por vía subcutánea en la base de la cola. Se prepararon extractos lipídicos totales o individuales por rehidratación del material lipídico seco de *M. bovis* con agua Milli Q a 1 ó 5 mg/ml seguido por sonicación con sonda. Las vacunas lipídicas convencionales se prepararon mezclando el antígeno con solución salina, seguido por adición del extracto lipídico rehidratado y DDA y mezclando con vórtice. La vacuna se dejó durante una noche para permitir la adsorción.

Cultivos de linfocitos

Se tomaron muestras de sangre o ganglios linfáticos inguinales de ratones 7 - 150 días después de la última inmunización y se prepararon como se ha descrito previamente (Rosenkrands y col., 2005). Los cultivos celulares se realizaron por triplicado en pocillos de microtitulación de fondo redondo que contenían 2×10^5 células en un volumen de 200 μ l de RPMI suplementado con 2-mercaptoetanol, glutamina, penicilina-estreptomina, hepes, y suero de ternera fetal al 10%. El antígeno para la re-estimulación se usó en una concentración de 5 μ g/ml. Los pocillos que contenían solamente medio o 5 μ g/ml de ConA se incluyeron en todos los experimentos como controles negativo y positivo, respectivamente. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron de cultivos paralelos después de 72 horas de incubación en presencia de antígeno, y la cantidad de IF- γ se determinó por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Brandt y col., 2000).

Infecciones experimentales

Para la evaluación de la eficacia de la vacuna, se expusieron ratones 2,5 meses después de la primera inmunización vía aerosol en un sistema de exposición por inhalación Glas-Col calibrado para depositar aproximadamente 25 UFC

de *M. tuberculosis* Erdman virulento en los pulmones. La carga bacteriana en el bazo y los pulmones se determinó seis semanas después sembrando en placa diluciones en serie en agar Middlebrook 7H11 suplementado con 2 µl de hidrazida de ácido 2-tiofenocarboxílico por ml para inhibir selectivamente el crecimiento de BCG. Las colonias se contaron después de 3-3 semanas de incubación a 37°C.

5 Análisis estadísticos

Se ensayaron las diferencias en la cantidad de colonias entre ratones infectados y ratones de control por análisis de la varianza. Cuando se indicaron efectos significativos, se evaluaron las diferencias entre las medias por ensayo de Dunnett. Para ensayos de DC humanas, se ensayaron las diferencias en la liberación de citoquinas en respuesta a diferentes lípidos por análisis de la varianza y cuando se indicaron efectos significativos, se evaluaron las diferencias entre las medias por ensayo de Tukey.

10 **Ejemplo 1**

AISLAMIENTO Y ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LOS LÍPIDOS APOLARES DE *M. BOVIS* BCG

Los lípidos totales de *M. bovis* BCG se separaron en las fracciones polar y apolar. En la fracción polar, los lípidos que pudieron identificarse fueron manósidos de fosfatidilinositol (1-4), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE), difosfatidilglicerol (DPG) y L-alfa-fosfatidil-DL-glicerol (PG). También se identificaron varios fosfolípidos desconocidos (7 y 8) (Fig. 1A). En la fracción apolar, los lípidos principales identificados fueron dimicocerosatos de ftiocerol (PDIM), triacilgliceroles (TAG), glucolípidos fenólicos (PGL) y monomicolil glicerol (MMG) (Fig. 1). FFA es ácidos grasos libres.

Se examinó la actividad inmunoestimuladora comparativa de los lípidos apolares y polares usando DC inmaduras (iDC) derivadas de monocitos de sangre periférica humana (Fig. 1). El tratamiento con lípidos apolares provocó una elevación dependiente de dosis de los niveles de los marcadores de activación CD86, CD40 y HLA-DR en comparación con controles no tratados (Fig. 2B). Una dosis de 100 µg/ml de lípidos apolares provocó una activación de DC comparable con la observada con la molécula inmunoestimuladora potente LPS (0,1 µg/ml) y superior en comparación con la del factor micobacteriano de acordonamiento (TDM) y MPL. La regulación positiva de estas moléculas estuvo acompañada por la secreción de los mediadores pro-inflamatorios factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interleuquina (IL)-6 e IL-12 (Fig. 2C). Los niveles de estas citoquinas pro-inflamatorias en los sobrenadantes de iDC tratadas con lípidos polares estuvieron por debajo de los límites de detección usando este ensayo. Finalmente, usamos la reacción leucocitaria mixta (MLR) usando células T alogénicas de un donante PPD-negativo (Fig. 2D y E), como otra lectura para la activación de DC. Apoyando adicionalmente el elevado estado de activación de las DC tratadas con los lípidos apolares, encontramos niveles elevados de proliferación y liberación de IFN-γ mientras que no se indujo MLR por la fracción polar.

20 **Ejemplo 2**

AISLAMIENTO DE LÍPIDOS INDIVIDUALES DEL EXTRACTO LIPÍDICO APOLAR DE *M. BOVIS* BCG Y CARACTERIZACIÓN DE MMG

Se aislaron los lípidos de la fracción apolar inmunoestimuladora usando CCF preparativa para dar muestras puras de dimicocerosato de ftiocerol A (PDIM A), TAG, PGL y MMG; también se detectaron cantidades minoritarias de ftiocerol B y ftiodiolona A pero no se recuperaron por los procedimientos preparativos empleados (Fig. 2A). La estructura e identidades de los lípidos se confirmaron por resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y espectroscopía de masas (EM) (Fig. 2B y datos no mostrados). El componente MMG presentó espectros de RMN de ¹H y ¹³C característicos de un 1-monoacilglicerol (Gunstone y col., 1991). La EM MALDI-TOF acoplada con los datos de RMN de la fracción MMG total (Tabla 1) reveló la presencia de alfa-micolato y ceto-micolato en la forma *cis* y *trans*. La proporción aproximada de los componentes principales fue 1,00: 0,29: 0,24, respectivamente.

Tabla 1: Espectrometría de masas MALDI-TOF de MMG purificado. Las señales son m/z para los iones M + Na⁺. Los componentes mayoritarios de la serie se muestran en negrita con el componente principal subrayado.

MMG			NÚMERO DE CARBONOS
c-ceto	t-ceto	a	
		1206	79
		<u>1234</u>	81
		1262	83
1306			84
1335			86
	1349		87

(continuación)

MMG			NÚMERO DE CARBONOS
1363			88
	<u>1377</u>		89
1391			90
	1405		91

Ejemplo 3ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS POR MMG

Se evaluaron MMG, PDIM A, PGL y TAG purificados para su capacidad de activar iDC humanas. En estos ensayos, se descubrió que MMG era de forma coherente el inductor más potente de la activación de DC conduciendo a una regulación positiva pronunciada de CD86, CD40 y HLA-DR (Fig. 3A). MMG incluso activó DC más que PDIM A, un lípido que se ha asociado desde hace mucho con la patogenicidad de micobacterias (Cox y col., 1999), que apareció como el segundo lípido más activo, mientras que PGL y TAG indujeron menos activación. En seis donantes individuales, el orden de activación observado fue MMG > PDIM A > PGL > TAG y el factor medio de aumento en los niveles de CD86 por encima de los niveles asociados con iDC no tratadas fueron del $1,91 \pm 0,29$, $1,82 \pm 0,43$, $1,52 \pm 0,26$ y $1,32 \pm 0,14$, respectivamente. La inducción de citoquinas siguió la misma tendencia global (Fig. 3B) destacando el MMG como el lípido inmunoestimulador más potente. Se liberó IL-6 por DC expuestas a MMG a niveles significativamente mayores ($P < 0,05$) que los inducidos por PGL o TAG. No se registraron diferencias significativas entre las inducciones de citoquinas por los otros lípidos. Por lo tanto, MMG puede clasificarse como el lípido inmunoestimulador más potente la fracción lipídica apolar de *M. bovis* BCG.

Ejemplo 4ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA DE ALFA- Y CETO-MMG

En este ejemplo, quisimos diseccionar adicionalmente las propiedades estimuladoras de MMG e identificar el componente activo responsable de su potente actividad inmunoestimuladora. El alfa-MMG y ceto-MMG se separaron después de la preparación de trimetilsilil éteres de MMG, CCF preparativa y posterior hidrólisis de los grupos protectores de trimetilsilil éter para producir alfa-MMG y ceto-MMG. Las estructuras de los alfa- y ceto-micolatos se documentan en la Fig. 2B. Cuando se evaluaron para su capacidad de activar iDC humanas, el alfa- y ceto-MMG estimularon con un aumento del orden de 2-3 veces en los niveles de marcadores de activación (Fig. 4). Por lo tanto, dos sub-componentes de MMG también muestran una marcada capacidad para estimular DC humanas.

Ejemplo 5INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE Th1 POR MMG AISLADO DE *M. BOVIS* BCG

Para estudiar la actividad adyuvante de MMG, los lípidos aislados se ensayaron para su capacidad de inducir la producción de IFN- γ en ratones. A ratones C57BL/6 se les administró 10 μ g de lípidos totales o individuales. *In vivo*, el DDA sirve como vehículo en el cual suministrar los lípidos. Por lo tanto, se administraron 2 μ g de la proteína de fusión Ag85B-ESAT-6 y 10 μ g de extracto lipídico rehidratado, emulsionados en 250 μ g de DDA, por vía subcutánea. Una dosis de 10 μ g de MMG incorporado en liposomas de DDA produjo niveles de IFN- γ de 10 ng/ml tras re-estimulación de PBMC aisladas del ganglio linfático de drenaje; un nivel que es comparable al registrado para lípidos totales en DDA a la dosis equivalente (Fig. 5). PDIM-A también indujo producción de IFN- γ , aunque a un nivel inferior, mientras que liposomas de DDA con TAG o PGL incorporado promovieron muy poca liberación de IFN- γ (Fig. 5 y datos no mostrados). Debe observarse que estos lípidos individuales parecen estar actuando como adyuvantes ya que no se observó respuesta de memoria tras la re-estimulación con un extracto lipídico total o los lípidos individuales (datos no mostrados). Por lo tanto, se identificó MMG también como el lípido apolar más activo *in vivo*, y solo podía dar cuenta de la mayor parte de la actividad adyuvante de los lípidos totales obtenidos de BCG.

Ejemplo 6EFICACIA PROTECTORA DE ADYUVANTES BASADOS EN MMG

Para evaluar la capacidad de adyuvante basados en MMG de proporcionar protección contra una infección por TB, se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 suministrada en MMG (dos dosis diferentes) y DDA. Se incluyeron grupos de ratones que recibieron una vacunación BCG y el adyuvante solo como controles positivo y negativo, respectivamente. Seis semanas después de la última vacunación, los ratones se expusieron con *M. tuberculosis* viva mediante una vía en aerosol. Se midió la capacidad de las vacunas de disminuir la carga bacteriana en los pulmones y el bazo seis semanas después. Estos datos mostraron niveles significativos de

protección con MMG/DDA como adyuvante y niveles protectores comparables a los de BCG (Figura 6). Como se esperaba, este efecto fue específico ya que ratones vacunados con el adyuvante sin antígeno no lograron inhibir el crecimiento bacteriano.

Ejemplo 7

5 UN MEJOR EFECTO COMBINANDO MMG Y DDA

Para evaluar el efecto de combinar un inmunomodulador (MMG) y un sistema de suministro (DDA), se vacunaron ratones C57BL/6 con DDA solo o la combinación de DDA/MMG (exp. 1, figura 7A) o en el exp. 2 (figura 7B) con MMG solo o la combinación de DDA/MMG. A partir de estos experimentos queda claro que la respuesta inmune se potencia drásticamente combinando DDA y MMG.

10 **Ejemplo 8**

POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR INCORPORACIÓN DE TDB/TERCER COMPONENTE EN MMG Y LIPOSOMAS DE DDA

Para estudiar el efecto sobre la actividad adyuvante de MMG cuando se combina con otros componentes inmunoestimuladores, se evaluó la respuesta inmune en ratones C57BL/6 después de inmunización subcutánea con Ag85B-ESAT-6 y 10 µg de MMG incorporados en liposomas de DDA o liposomas de DDA con los inmunomoduladores de TDB incorporados {Davidsen y col., documento PCT/DK2005/000467} 5 meses después de la primera vacunación. Aunque la combinación de MMG incorporado en liposomas de DDA produjo niveles de IFN-γ de ~25 ng/ml tras re-estimulación de PBMC aisladas de la sangre, se elevó la liberación de IFN-γ drásticamente cuando se empleaban liposomas de DDA con TDB incorporado (Figura 8). Por lo tanto, se observó un efecto sinérgico entre MMG, DDA y TDB, que indica que la acción de un tercer componente a la combinación de MMG y DDA podría potenciar adicionalmente la actividad adyuvante.

Ejemplo 9

LA ACTIVIDAD ADYUVANTE DE ANÁLOGOS DE MMG ES COMPARABLE CON LA DE MMG NATURAL

Para evaluar el efecto inmunológico de análogos sintéticos de MMG, se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 en DDA con MMG natural, análogo sintético de MMG con 16 carbonos (como se representa en la figura 9) y análogo sintético de MMG con 36 carbonos (como se representa en la figura 9) (todos 10 µg/DDA/MMG). Se midió la respuesta inmune en la sangre una semana después de la última vacunación y mostró niveles comparables de respuestas con los tres adyuvantes basados en MMG mientras DDA por sí mismo mostró de nuevo un efecto inferior.

30 **Ejemplo 10**

RESPUESTA INMUNES SUPERIORES CON LONGITUD DE CADENA MÁS CORTA.

Para evaluar el efecto inmunológico de análogos sintéticos de MMG con longitudes de cadena más cortas, se inmunizaron ratones C57BL/6 con Ag85B-ESAT-6 en DDA solo, DDA con MMG natural, DDA con diferentes análogos sintéticos que varían de C8 a C36 (todos 1 µg/dosis). Se midió la respuesta inmune en la sangre tres semanas después de la última vacunación y demostró que análogos sintéticos de MMG son activos incluso a niveles de dosis de 1 µg. Además, estos resultados también demuestran que análogos sintéticos de MMG con cadenas más cortas (de 16 C o menos) son más eficaces en comparación con MMG natural. *** P < 0,001. (Fig. 11)

Referencias

40 Bennekov, T., J. Dietrich, I. Rosenkrands, A. Stryhn, T.M. Doherty, y P. Andersen. 2006. Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine-induced protection against Mycobacterium tuberculosis. Eur. J. Immunol. 36(12): 3346-55.

Gregoriadis, G. 1995. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. Trends Biotechnol. 13(12): 527-37.

45 Blum, H., H. Beier, y H. J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

Brandt, L., M. Elhay, I. Rosenkrands, E.B. Lindblad, y P. Andersen. 2000. ESAT-6 subunit vaccination against Mycobacterium tuberculosis. Infect. Immun. 68: 791-795.

Brennan, P. J. y M. B. Goren. 1979. Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the mycobacterium avium. Mycobacterium intracellulare. Mycobacterium scrofulaceum serocomplex. Mycobacterium intracellulare serotype 9. J. Biol. Chem. 254(10): 4205-4211.

50

- Cox, J. S., B. Chen, M. McNeil, y W.R. Jacobs, Jr. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 402: 79-83.
- Dascher, C. C., K. Hiromatsu, y col. 2003. Immunization with a mycobacterial lipid vaccine improves pulmonary pathology in the guinea pig model of tuberculosis. *Int. Immunol.* 15(8): 915-925.
- 5 Davidsen, J., Rosenkrands, I., y P. Andersen. (Documento PCT/DK2005/000467)
- Dobson, G., D. E. Minnikin, S. M. Minnikin, J. H. Parlett, M. Goodfellow, y M. Ridell, a. M. M. Systematic analysis of complex mycobacterial lipids (ed. Minnikin, M. G. a. D. E.) 237-265 (Academic Press, Londres, 1985).
- Gluck, R. 1995. Liposomal presentation of antigens for human vaccines. *Pharm Biotechnol.* 6: 325-345.
- Gunstone, F. D. 1991. *Chemistry and Physics of Lipids* 58: 219-224.
- 10 Harboe, M., A.S. Malin, H.S. Dockrell, H.G. Wiker, G. Ulvsund, A. Holm, M.C. Jørgensen, Andersen P. B-cell epitope and quantification of the ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Inft. Immun.* 66 (2):717-23.
- Hiu, I. J. 1975. Mycobacterial adjuvant and its carrier. *Experientia.* 31(8): 983-5.
- Indrigo, J., R. L. Hunter, Jr, y col. 2002. Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages. *Microbiology* 148(7): 1991-1998.
- 15 Koike, Y., Y. C. Yoo, y col. 1998. Enhancing activity of mycobacterial cell-derived adjuvants on immunogenicity of recombinant human hepatitis B virus vaccine. *Vaccine* 16(20): 1982-1989.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 20 Lima, V. M. F., V. L. D. Bonato, y col. 2001. Role of Trehalose Dimycolate in Recruitment of Cells and Modulation of Production of Cytokines and NO in Tuberculosis. *Infect. Immun.* 69(9): 5305-5312.
- Lindblad, E., M. Elhay, y col. 1997. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines." *Infect. Immun.* 65(2): 623-629.
- McBride, B. W., A. Mogg, y col. 1998. Protective efficacy of a recombinant protective antigen against *Bacillus anthracis* challenge and assessment of immunological markers. *Vaccine* 16(8): 810-817.
- 25 Minnikin, D. E. 1982. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. *The Biology of the Mycobacteria.* C. R. a. J. L. Stanford. Londres, Academic Press.
- Minnikin, D. E. en *Bacterial Cell Surface Techniques* (ed. Hancock, I. C., Poxton, I. R.) 125-135 (Wiley, Chichester, 1988).
- 30 Minnikin, D. E. 1988. Isolation and purification of mycobacterial wall lipids. *Bacterial Cell Surface Techniques.* I. C. Hancock, Poxton, I. R. Chichester, Wiley: 125-135.
- Minnikin, D. E., L. Kremer, y col. 2002. "The Methyl-Branched Fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry & Biology* 9(5): 545-553.
- Moingeon, P., J. Haensler, y col. 2001. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 19(31): 4363-4372.
- 35 Mosmann, T. R. y S. Sad 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17(3): 138-146.
- Nathan, C., H. Murray, y col. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158(3): 670-689.
- 40 Olsen, A. W., L. A. H. van Pinxteren, L. M. Okkels, P. B. Rasmussen, y P. Andersen. 2001. Protection of Mice with a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion Protein of Antigen 85B and ESAT-6. *Infect. Immun.* 69:2773-2778. Rao V, F. N., Porcelli SA, Glickman MS 2005. *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med* 201: 535-543.
- Reed, M. B., P. Domenech, y col. 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431(7004): 84-87.
- 45 Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinker, P.O. Fritsch, R.M. Steinman, y G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J.Exp.Med* 180: 83-93.

- Rosenkrands, I., E.M. Agger, A.W. Olsen, K.S. Korsholm, C.S. Andersen, K.T. Jensen, y P. Andersen. 2005. Cationic Liposomes Containing Mycobacterial Lipids: a New Powerful Th1 Adjuvant System. *Infect. Immun.* 73: 5817-5826.
- 5 Saito, R., Tanaka, A., Sugiyama, K., Azuma, I. y Yamamura, Y. 1976. Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid." *Infect Immun.* 13(3): 776-781.
- Silva, C.L. 1985. Inflammation induced by mycolic acid-containing glycolipids of *Mycobacterium bovis* (BCG). *Brazilian J.Med.Biol.Res.* 18: 327-335.
- 10 Sirakova, T. D., V. S. Dubey, y col. 2003. The Largest Open Reading Frame (pks12) in the *Mycobacterium tuberculosis* Genome Is Involved in Pathogenesis and Dimycocerosyl Phthiocerol Synthesis. *Infect. Immun.* 71(7): 3794-3801.
- Sprott, G. D., C. J. Dicaire, y col. 2004. Activation of Dendritic Cells by Liposomes Prepared from Phosphatidylinositol Mannosides from *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin and Adjuvant Activity In Vivo. *Infect. Immun.* 72(9): 5235-5246.
- 15 Stanfield, J.P., D. Gall, Bracken P.M. 1973. Single-dose antenatal tetanus immunisation. *Lancet* 1 (7797):215-9.
- Suzuki F, B. R., Pollard RB. 1986. Importance of Lyt 1 + T-cells in the antitumor activity of an immunomodulator, SSM, extracted from human-type Tubercle bacilli. 1986 *77*(2): 441-7.
- 20 Uehori, J., M. Matsumoto, S. Tsuji, T. Akazawa, O. Takeuchi, S. Akira, T. Kawata, I. Azuma, K. Toyoshima, y T. Seya. 2003. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. *Infect. Immun.* 71:4238-4249.
- van Rooij, E. M. A., H. L. Glansbeek, y col. 2002. Protective Antiviral Immune Responses to Pseudorabies Virus Induced by DNA Vaccination Using Dimethyldioctadecylammonium Bromide as an Adjuvant." *J. Virol.* 76(20): 10540-10545.
- 25 Yamazaki S, K. K., Someya S, Azuma I, Yamamura Y. 1969. Studies on the allergenicity of various tuberculoprotein derivatives and the adjuvanticity of wax D fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 100(5): 691-8.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un monomicolil glicerol (MMG) sintético basado en cadenas de alquilo con 8-36 carbonos, y opcionalmente con una cola lipídica con 0-3 dobles enlaces en cada cola lipídica para preparar un adyuvante o inmunomodulador.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha cadena de alquilo tiene 8-16 carbonos.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 de MMG sintético o versiones modificadas basadas en cadenas de alquilo con 8 a 36 carbonos como se representa en la figura 9.
4. Un adyuvante o inmunomodulador que comprende un monomicolil glicerol (MMG) sintético basado en cadenas de alquilo con 8-36 carbonos, y opcionalmente con una cola lipídica con 0-3 dobles enlaces en cada cola lipídica.
- 10 5. Un adyuvante o inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende adicionalmente un tensioactivo.
6. Un adyuvante o inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el tensioactivo es bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA-B), cloruro de dimetildioctadecilamonio (DDA-C), sulfato de dimetildioctadecilamonio, sal fosfato o acetato, bromuro de dimetildioctadecenilamonio (DODA-B), cloruro de dimetildioctadecenilamonio (DODA-C), sulfato de dimetildioctadecenilamonio, fosfato o acetato, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-dimiristoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano, 1,2-diestearoil-3-trimetilamonio-propano y dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP) y N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA).
- 15 7. Un adyuvante o inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 5-7, que comprende un inmunomodulador adicional donde el inmunomodulador es un ligando del receptor no tipo Toll (TLR), o ligandos TLR, y/o cualquier análogo de los mismos.
- 20 8. El adyuvante o inmunomodulador de la reivindicación 7, en el que el ligando del receptor no tipo Toll (TLR) es 6,6'-dibehenato de alfa,alfa'-trehalosa (TDB) y muramil dipéptido (MDP).
9. El adyuvante o inmunomodulador de la reivindicación 7, en el que el ligando TLR es Poli I~:C.
10. Un MMG sintético basado en cadenas de alquilo con 8-36 carbonos opcionalmente con una cola lipídica con 0-3 dobles enlaces en cada cola lipídica.
- 25 11. Un análogo sintético de MMG de acuerdo con la reivindicación 10 con 8-16 carbonos o hasta 36 carbonos como se representa en la figura 9.
12. Una vacuna que comprende un adyuvante o inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 4-7, adecuada para su administración por cualquiera de las siguientes vías parenteral, oral, a la mucosa, sublingual, transdérmica, tópica, por inhalación, intranasal, en aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola génica, parche dérmico o en forma de gotas oculares o enjuague bucal.
- 30 13. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el componente antigénico comprende un epítipo antigénico de un patógeno intracelular.
14. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el componente antigénico comprende un epítipo antigénico de una micobacteria virulenta.
- 35 15. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la micobacteria se selecciona entre *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* o *M. africanum*.
16. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el componente antigénico comprende un epítipo antigénico de *Plasmodium falciparum*, *Chlamydia trachomatis*, VIH, influenzae o Hepatitis B o C.
- 40 17. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el epítipo antigénico de *Plasmodium falciparum* se selecciona entre Msp1, Msp2, Msp3, Amal, GLURP, LSA1, LSA3 o CSP.
18. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el epítipo antigénico de *Chlamydia trachomatis* se selecciona entre CT184, CT521, CT443, CT520, CT521, CT375, CT583, CT603, CT610 o CT681.
- 45 19. Una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 18 para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer, un trastorno autoinmune, trastornos nerviosos, Alzheimer, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno.
20. Un sistema de suministro que comprende un adyuvante o inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 4-7 para tratar el cáncer, un trastorno autoinmune, trastornos nerviosos, Alzheimer, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad causada por
- 50

un patógeno.

21. Un sistema de administración de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el MMG sintético se administra en combinación con una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonistas TLR y no TLR, antagonistas TLR y no TLR, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, inmunomoduladores o moléculas coestimuladoras.
- 5

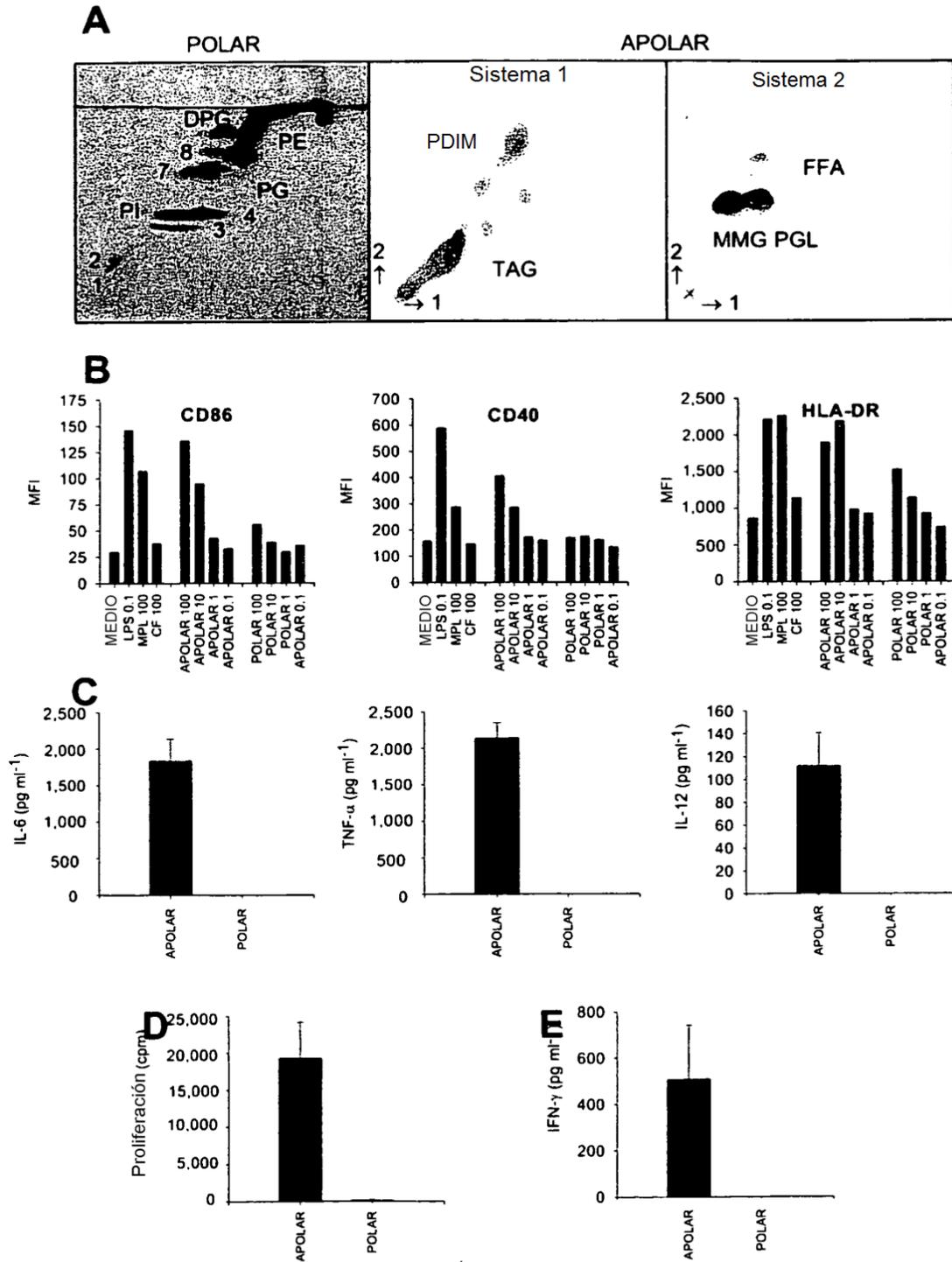
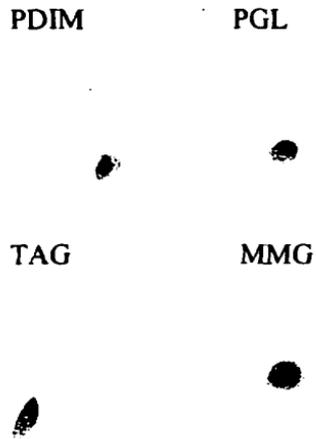


Fig. 1

A



B

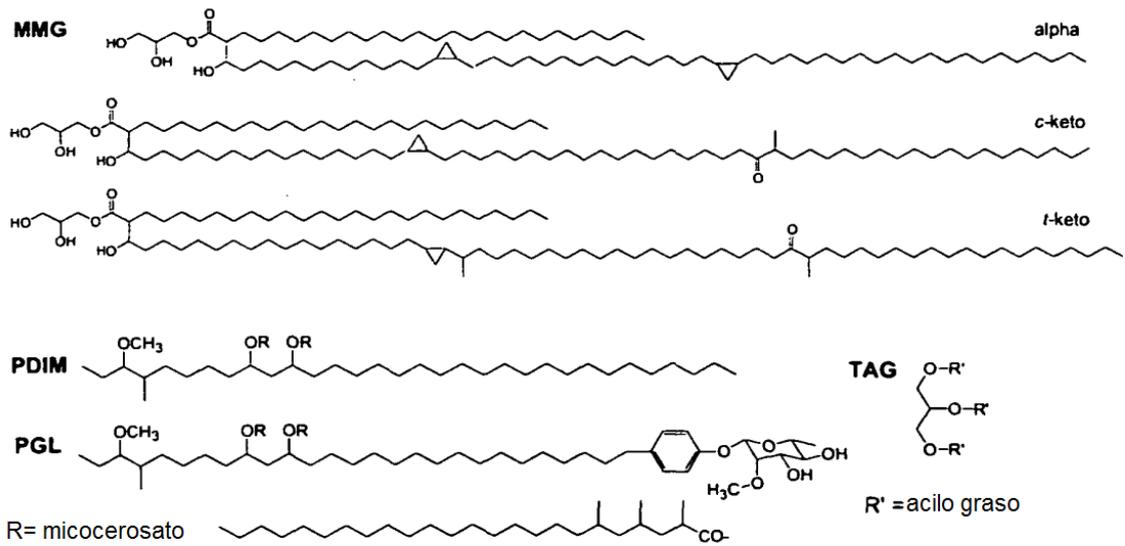


Fig. 2

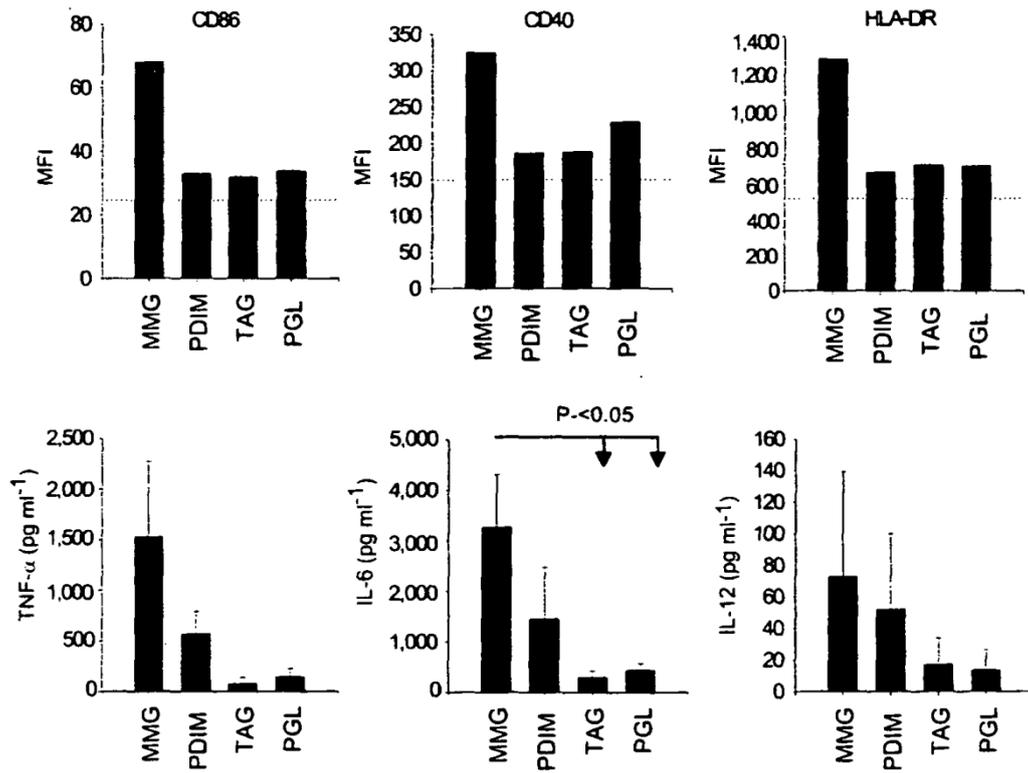


Fig. 3

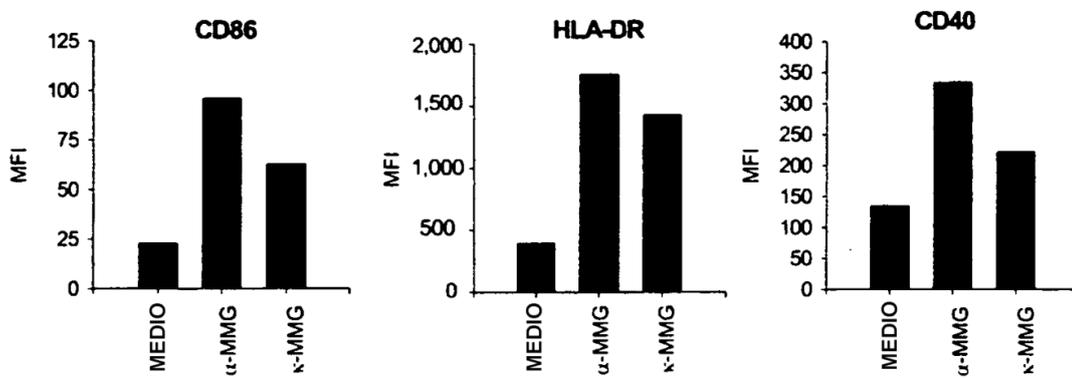


Fig. 4

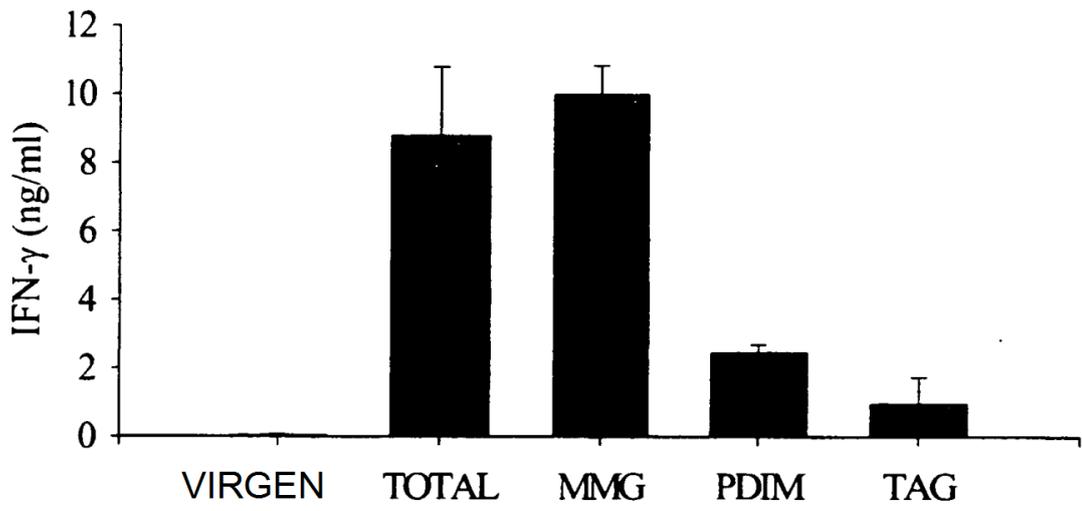


Fig. 5

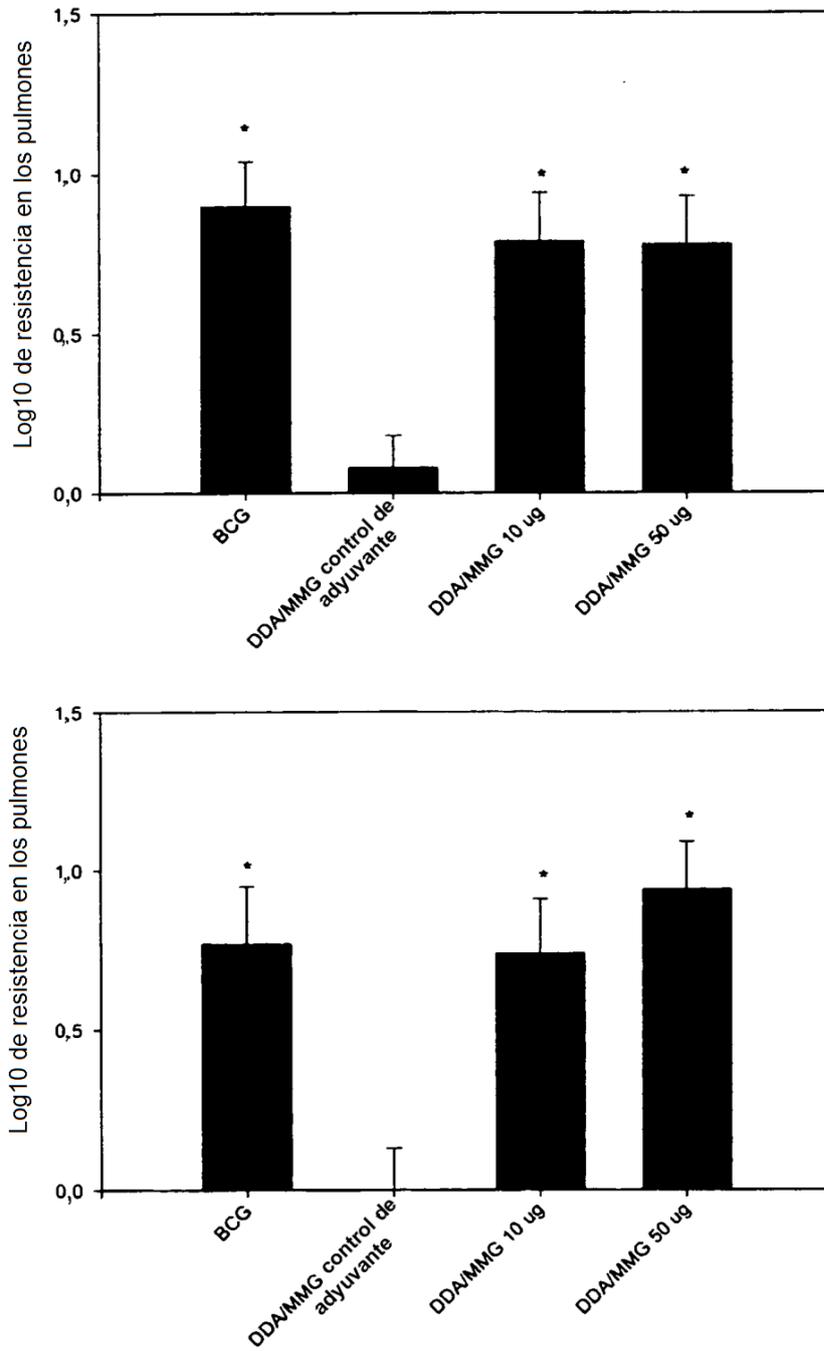


Fig. 6

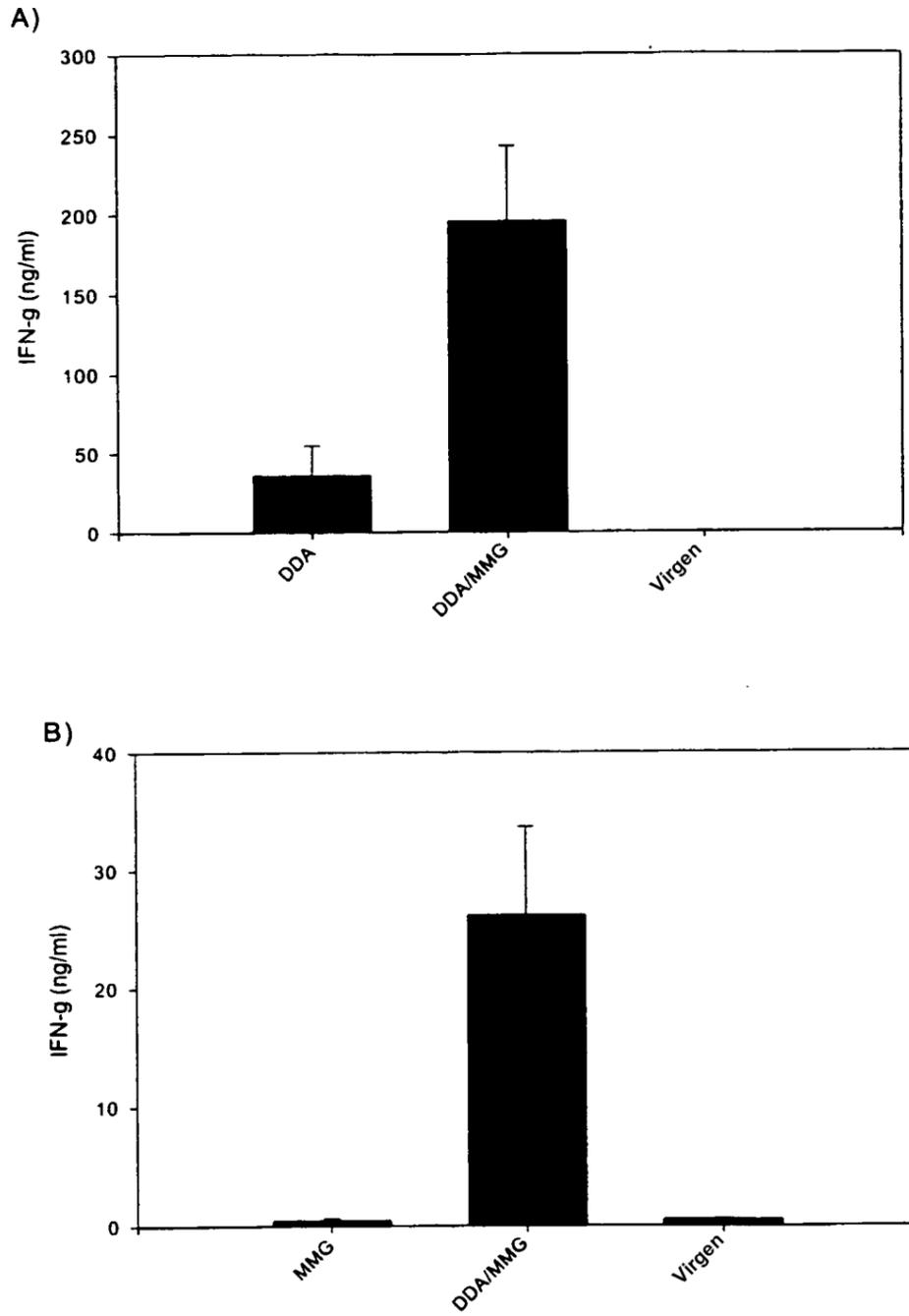


Fig. 7

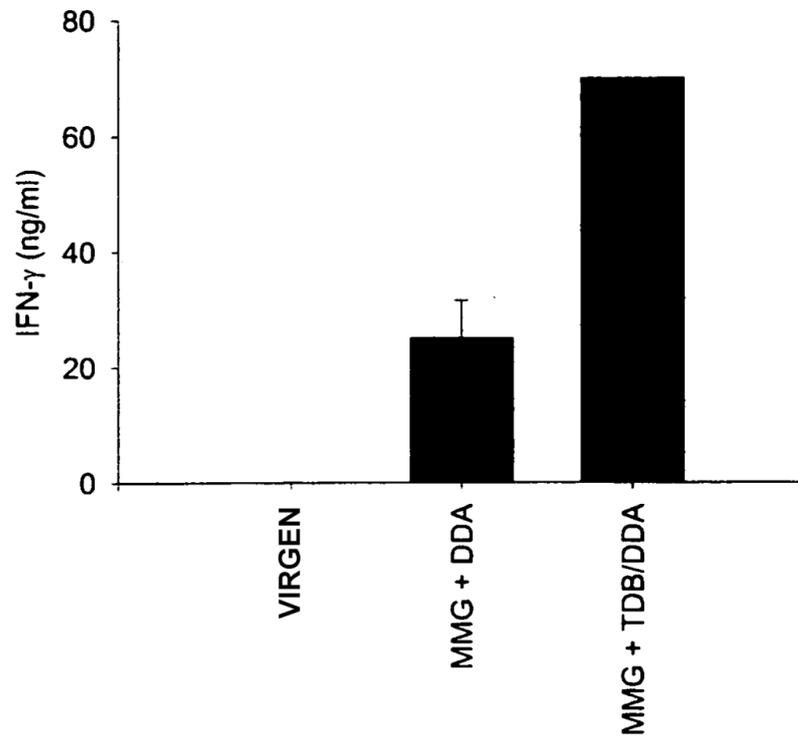
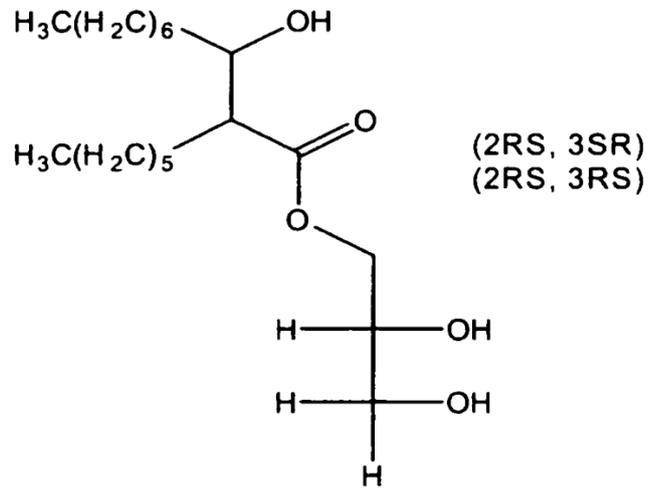


Fig. 8

C16



C36

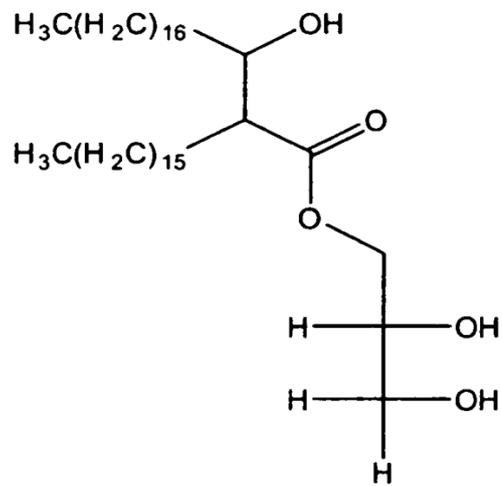


Fig. 9

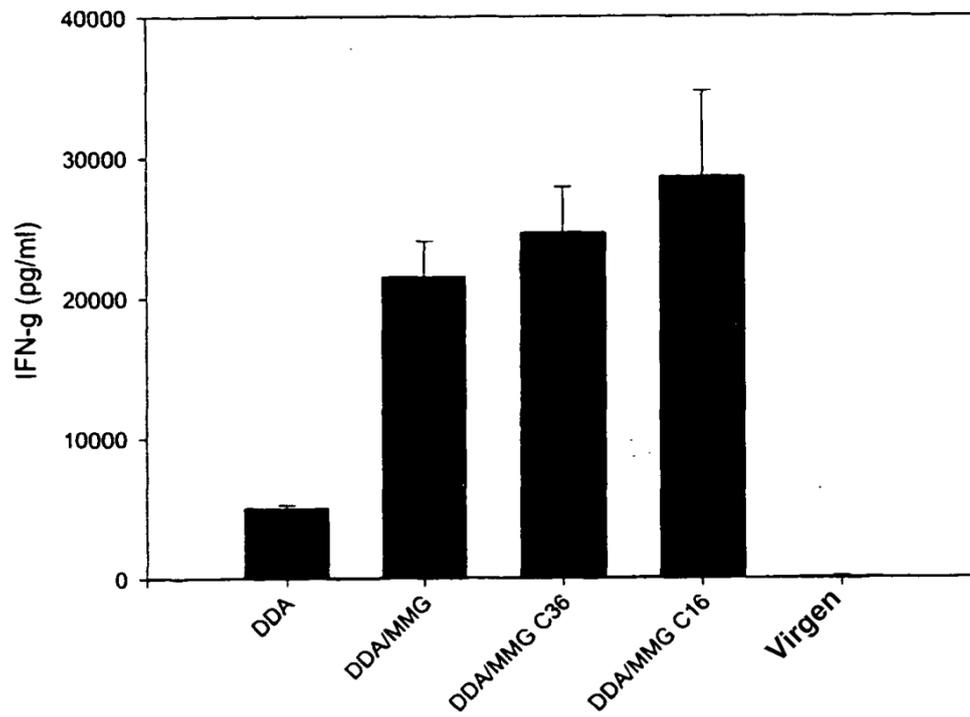


Fig. 10

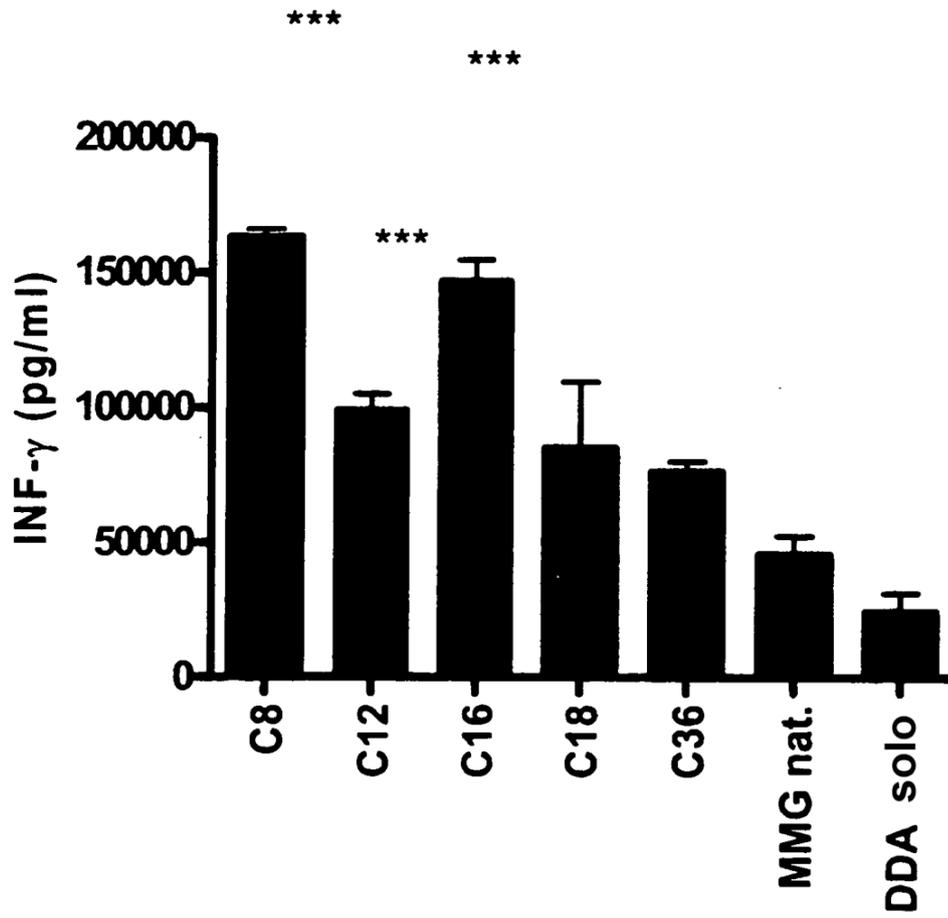


Fig. 11