

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 759**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/12** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 39/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2010 PCT/US2010/020531**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10081026**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2010 E 10729590 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2385980**

54 Título: **Vacunas bacterianas con glicolípidos de tipo ceramida asociados a la pared celular, y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**08.01.2009 US 143389 P**

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

**12.07.2018**

73 Titular/es:

**ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC.  
(100.0%)  
1300 Morris Park Avenue  
Bronx, NY 10461, US**

72 Inventor/es:

**PORCELLI, STEVEN A. y  
VENKATASWAMY, MANJUNATHA M.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones :

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

**ES 2 675 759 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

Vacunas bacterianas con glicolípidos de tipo ceramida asociados a la pared celular, y usos de las mismas

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

5 La invención se refiere generalmente al campo de la inmunología.

Técnica antecedente

10 Se sabe que las micobacterias provocan enfermedades graves en mamíferos, por ejemplo tuberculosis, enfermedad de Hansen, lepra, tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, dermatopatía, o enfermedad diseminada. Un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, y 2 millones de personas mueren de tuberculosis (TB) cada año aunque la vacuna del bacilo Calmette Guérin (BCG) ha estado disponible durante más de 75 años. Hoft DF, Lancet 372: 164-175 (2008). La tuberculosis es actualmente la segunda causa más importante de muerte de una enfermedad infecciosa a nivel mundial, tras el VIH/SIDA. Young DB et al., Journal of Clinical Investigation 118: 1255-1265 (2008).

15 Varios estudios sugieren que las células T restringidas tanto por MHC de clase I como de clase II son necesarias para el control eficaz de la infección por *M. tuberculosis*. Mogues T et al., J Exp Med 193: 271-280 (2001) y Flynn JL et al., Proc Natl Acad Sci USA 89: 12013-12017 (1992). Sin embargo, los ratones que son deficientes en la molécula presentadora del antígeno lipídico, CD1d, no son más susceptibles que los ratones de tipo salvaje a la infección de *M. tuberculosis*, indicando que las células NKT restringidas por CD1d no son absolutamente necesarias para la inmunidad protectora. Behar SM et al., J Exp Med 189: 1973-1980 (1999). Las células T asesinas naturales (NKT) representan un subconjunto de linfocitos T que expresan tanto el receptor de células T como el receptor de células NK, y desempeñan un papel tendiendo puentes entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Kronenberg M y Gapin L, Nat Rev Immunol 2: 557-568 (2002). Al activarlas, las células NKT pueden tener un impacto pronunciado sobre la inmunidad temprana y retrasada frente a diversos patógenos, incluyendo *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis* y *Leishmania major*. Kronenberg (2002); Behar SM y Porcelli SA, Curr Top Microbiol Immunol 314: 215-250 (2007); Emoto M et al., Eur J Immunol 29: 650-659 (1999); Ishikawa H et al., Int Immunol 12: 1267-1274 (2000); y Ranson T et al., J Immunol 175: 1137-1144 (2005). Se ha dado a conocer que la activación de células NKT conduce a mayores respuestas de células T CD4 y CD8, e induce la maduración de células dendríticas. Nishimura T et al., Int Immunol 12: 987-994 (2000) y Silk JD et al., J Clin Invest 114: 1800-1811 (2004).

30 A diferencia de células T convencionales, que reconocen péptidos unidos a MHC, las células NKT son específicas para antígenos lipídicos presentados por la proteína de tipo MHC clase I CD1d. Hasta la fecha, se han identificado varios antígenos glicolipídicos, incluyendo glicolípidos autoderivados y derivados de bacterias, que pueden ser presentados por CD1d para activar células NKT. Tsuji M Cell Mol Life Sci 63: 1889-1898 (2006). Las células NKT que tienen receptores de células T con reordenamientos V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 invariables (células iNKT) poseen reactividad frente a un glicosfingolípido,  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), cuando es presentado por CD1d. Kronenberg M y Gapin L, Nat Rev Immunol 2: 557-568 (2002); Kronenberg M, Annu Rev Immunol 23: 877-900 (2005). Estudios recientes han mostrado que las vacunas frente a Plasmodia, *Leishmania donovani*, *Listeria monocytogenes* y VIH se podrían mejorar activando células iNKT a través de la coadministración de  $\alpha$ GalCer como adyuvante. Gonzalez-Aseguinolaza G et al., J Exp Med 195: 617-624 (2002); Dondji B et al., European Journal of Immunology 38: 706-719 (2008); Huang YX et al., Vaccine 26: 1807-1816 (2008); y Enomoto N et al., FEMS Immunol Med Microbiol 51: 350-362 (2007).

45 Como sustancia terapéutica, se ha mostrado que  $\alpha$ GalCer reduce la carga del parásito de la malaria en ratones, y prolonga la supervivencia de ratones infectados por *M. tuberculosis*. Gonzalez-Aseguinolaza G et al., Proc Natl Acad Sci USA 97: 8461-8466 (2000); Chackerian A et al., Infection and Immunity 70: 6302-6309 (2002). De este modo, aunque las células T restringidas por CD1d no son absolutamente necesarias para la inmunidad óptima, su activación específica potencia la resistencia del hospedante a enfermedades infecciosas.

50 Una única inyección de  $\alpha$ GalCer en ratones induce una tormenta citocínica en el suero, dando como resultado la secreción de IFN $\gamma$ , IL-12 e IL-4. Fujii S et al., Immunol Rev 220: 183-198 (2007). La estimulación de células iNKT restringidas por CD1d mediante  $\alpha$ GalCer también conduce a una activación rápida de células NK, células dendríticas, células B, y células T convencionales. Nishimura T et al., Int Immunol 12: 987-994 (2000); Kitamura H et al., J Exp Med 189: 1121-1128 (1999); Fujii S et al., J Exp Med 198: 267-279 (2003). Las células iNKT producen grandes cantidades de IFN $\gamma$ , y la producción requiere el contacto directo entre células iNKT y DCs a través de interacciones de ligando CD40-CD40. Nishimura T et al., Int Immunol 12: 987-994 (2000). Se ha mostrado que IFN $\gamma$  producido por células iNKT tiene un papel crítico en el efecto antimetastásico de  $\alpha$ GalCer en modelos de tumor murino. Hayakawa Y et al., Eur J Immunol 31: 1720-1727 (2001); Smyth MJ et al., Blood 99: 1259-1266 (2002). De este modo, se ha propuesto que la activación de células iNKT puede modular respuestas inmunes adaptativas al influir sobre el entorno de citocinas tempranas.

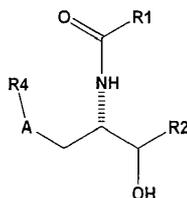
Recientemente, que un análogo de C-glicósido de una aGalCer, conocido como la  $\alpha$ -C-GalCer, se ha establecido como un compuesto distorsionante de Th1 predominante que tiene una actividad antitumoral y antimalárica superior en comparación con aGalCer en ratones. Este compuesto también induce mayores niveles de citocinas de Th1, IL-12 e IFN $\gamma$ , en ratones. Schmiegl J et al., *Journal of Experimental Medicine* 198: 1631-1641 (2003). Se ha probado que estas dos citocinas, IL-12 e IFN $\gamma$ , son esenciales para el control de TB en ratones y en seres humanos. Freidag BL et al., *Infect Immun* 68: 2948-2953 (2000).

Existen muy pocos estudios sobre el uso de adyuvantes con la vacuna BCG en el modelo de ratón frente a la tuberculosis. Uno de tales estudios informa de una protección mejorada frente a la exposición a *M. tuberculosis* cuando se usó CpG ODN junto con la vacunación de BCG. Freidag BL et al., *Infect Immun* 68: 2948-2953 (2000). La mayoría de los estudios tempranos sobre el efecto adyuvante de aGalCer con vacunas frente a diversas enfermedades infecciosas han utilizado una coadministración separada de aGalCer con la vacuna respectiva a fin de aprovechar su actividad adyuvante. Gonzalez-Aseguinolaza G et al. (2002); Dondji B et al. (2008); Huang YX et al. (2008); y Enomoto N et al. (2007). De este modo, existe aún la necesidad de composiciones y vacunas eficaces para potenciar las respuestas inmunes frente a antígenos bacterianos, por ejemplo micobacterianos.

## SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una bacteria modificada que comprende una célula bacteriana y una glicosilceramida heteróloga, en la que dicha glicosilceramida se incorpora en la pared celular de dicha célula bacteriana, en la que dicha bacteria modificada es obtenible cultivando dicha célula bacteriana en medio de cultivo y añadiendo dicha glicosilceramida al medio de cultivo en condiciones en las que dicha glicosilceramida se incorpora en la pared celular de dicha célula bacteriana, en la que dicha célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en una célula micobacteriana, una célula de *Listeria*, una célula de *Salmonella*, una célula de *Yersinia*, una célula de *Francisella*, y una célula de *Legionella*, y en la que dicha glicosilceramida estimula las células T asesinas naturales (NKT).

En una realización, la glicosilceramida heteróloga comprende la fórmula I:



(Fórmula I)

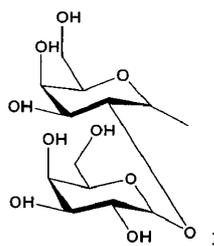
en la que R1 es un alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado; o R1 es -C(OH)-R3, en el que R3 es un alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub> lineal o ramificado; o R1 es un alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> en el que (i) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> está sustituido con un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático, o (ii) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> incluye, dentro de la cadena de alquilo o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub>, un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático;

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- (a) -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
- (b) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
- (c) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,
- (d) -CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
- (e) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

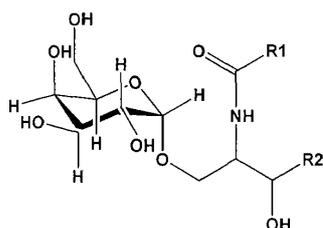
en los que X es un número entero que oscila de 4-17;

R4 es un monosacárido enlazado en  $\alpha$  o enlazado en  $\beta$ , o cuando R1 es un alcano C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado, R4 es:



y A es O o -CH<sub>2</sub>.

En una realización, la  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, comprende la Fórmula II:



(Fórmula II)

5 en la que

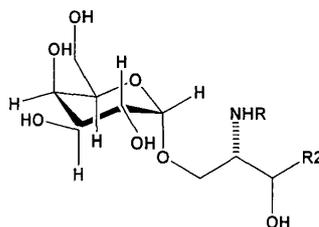
R1 es un alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado; o R1 es -C(OH)-R3, en el que R3 es alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub> lineal o ramificado; y

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- (a) -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
- 10 (b) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
- (c) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,
- (d) -CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
- (e) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

en los que X es un número entero que oscila de 4-17.

15 En una realización, la  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, comprende la Fórmula III:



(Fórmula III)

20 en la que R es H o -C(O)R1, en el que R1 es alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado; o R1 es -C(OH)-R3, en el que R3 es alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub> lineal o ramificado; o R1 es un alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> en el que (i) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> está sustituido con un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático, o (ii) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> incluye, dentro de la cadena de alquilo o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub>, un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático; o R1 es un -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R5, en el que n es un número entero que oscila de 0-5, y R5 es -C(O)OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituido, un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo, y

25 R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- (a) -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

- (b)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$ ,
- (c)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,
- (d)  $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$ ,
- (e)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,

5 en los que X es un número entero que oscila de 4-17.

En una realización, la célula bacteriana está viva, muerta, o atenuada.

En una realización, la bacteria modificada potencia las respuestas de células T CD8 específicas del antígeno frente a un antígeno. En una realización adicional, el antígeno es un antígeno micobacteriano.

10 En una realización, la bacteria modificada expresa un antígeno heterólogo. En una realización adicional, el antígeno heterólogo es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno parasitario, o un antígeno específico de un tumor. En otra realización, el antígeno heterólogo es un péptido inmunogénico.

En una realización, la célula bacteriana es una célula bacteriana recombinante.

15 La presente invención también se refiere a una composición que comprende una bacteria modificada y un vehículo farmacéutico. En una realización, el vehículo farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en disolución salina, disolución salina amortiguada, dextrosa, agua, glicerol, y sus combinaciones. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante. En otra realización, la composición es una composición de vacuna.

20 La presente invención también se refiere a la bacteria modificada para uso en métodos para tratar o prevenir una enfermedad en un animal, que comprende administrar a un animal que necesite tratamiento o prevención una bacteria modificada. En una realización, la bacteria modificada se administra en una cantidad suficiente para alterar la progresión de la enfermedad. En otra realización, la bacteria modificada se administra en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune en el animal frente a la enfermedad.

25 En una realización, una respuesta inmune es potenciada o modificada con respecto a una respuesta inmune producida por una célula bacteriana no asociada con un glicolípido de tipo ceramida. En una realización, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad viral, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, y una enfermedad proliferativa. En una realización adicional, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en tuberculosis, tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea, enfermedad diseminada, peste bubónica, peste pulmonar, tularemia, enfermedad legionelosis, carbungo, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, toxoinfección alimentaria, listeriosis, malaria, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS), Virus del Papiloma Humano (HPV), Virus Sincitial Respiratorio (RSV), gripe, hepatitis (HAV, HBV, y HCV), y cáncer.

30 La presente invención también se refiere a una bacteria modificada para uso en un método para inducir una respuesta inmune frente a un antígeno en un animal, que comprende administrar al animal una bacteria modificada. En una realización, la bacteria modificada se administra en una cantidad suficiente para potenciar una respuesta de células T CD8 específica del antígeno, o potenciar la actividad de las células T asesinas naturales (NKT) en el animal. En otra realización, la respuesta inmune comprende una respuesta de anticuerpo. En otra realización, la respuesta inmune comprende una respuesta de células T CD8. En otra realización, la respuesta inmune comprende una respuesta de células T CD8 y una respuesta de anticuerpo.

35 La presente invención también se refiere a la bacteria modificada para uso en un método para modular una respuesta de células T CD8 frente a BCG en un animal, que comprende administrar al animal una cantidad eficaz de una bacteria modificada.

En una realización, la bacteria modificada se administra mediante una ruta seleccionada del grupo que consiste en intramuscular, intravenosa, intratraqueal, intranasal, transdérmica, intradérmica, subcutánea, intraocular, vaginal, rectal, intraperitoneal, intrainestinal, mediante inhalación, o mediante una combinación de dos o más de dichas rutas.

45 La presente invención también se refiere a un método para obtener un complejo micobacteriano de glicosilceramida, que comprende (a) cultivar una célula micobacteriana en medio de cultivo, y (b) añadir una glicosilceramida heteróloga al medio de cultivo en condiciones en las que dicha glicosilceramida se incorpora a la pared celular de dicha célula micobacteriana.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle más abajo.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Incorporación estable de aGalCer en la pared celular de BCG de *M. bovis*. (A) Gráfica que muestra

la solubilidad de  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ GalCer en  $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$  (2:1), disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) + 0,05% de Tween 80, o 0,05% de Tiloxapol. (B) Gráfica que muestra la incorporación de  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ GalCer en BCG de *M. bovis* que se hace crecer en presencia de diferentes concentraciones de  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ GalCer en medio Middlebrooks 7H9 libre de proteína con 0,05% de Tiloxapol. (C) Bandas de cromatografía de capa fina de lípido de la pared celular extraído de BCG de *M. bovis* que se hizo crecer en presencia de  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ GalCer en medio Middlebrooks 7H9 libre de proteína con 0,05% de Tiloxapol. Línea 1:  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ GalCer se disolvió directamente en cloroformo-metanol 2:1. Línea 2:  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ GalCer se extrajo de BCG de *M. bovis*.

Figura 2: aGalCer unido a BCG de *M. bovis* es biológicamente activa *in vitro*. (A) Curvas de respuesta frente a la dosis que muestran la producción de IL-2 durante 24 h al activar del hibridoma de células NKT DN3A4-1.2 cuando se incubaba con células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) infectadas con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. (B) y (C) Curvas de respuesta frente a la dosis que muestran la producción durante 24 horas de (B)  $\text{IFN}\gamma$  y (C) IL-4 al activar esplenocitos de ratón con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG infectados con BMDC. (D), (E) y (F) Curvas de respuesta frente a la dosis que muestran la producción de (D)  $\text{IFN}\gamma$ , (E)  $\text{TNF}\alpha$ , y (F) IL-13 al activar un clon de célula iNKT humana con células dendríticas humanas derivadas de monocitos infectadas con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. (G) y (H) Curvas de respuesta frente a la dosis que muestran la producción de (G)  $\text{IFN}\gamma$  y (H) IL-4 al activar células mononucleares hepáticas a partir de un ratón C57BL/6 sin tratamiento previo cuando se incubaban con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG infectadas con BMDC.

Figura 3: aGalCer unido a BCG de *M. bovis* es biológicamente activa *in vitro*. (A), (B), y (C) Gráficas que muestran los niveles séricos (ng/ml) de (A)  $\text{IFN}\gamma$ , (B) IL-12p70, y (C) IL-4 en diversos puntos de tiempo 1 a 50 horas después de la inyección en ratones a los que se les administró 4,8 nmoles de vehículo (Veh), BCG, aGalCer o aGalCer/BCG ( $5 \times 10^6$  CFU).

Figura 4: aGalCer y  $\alpha$ -C-GalCer inducen el aumento rápido de la maduración de DC y marcadores coestimuladores cuando se administran con BCG de *M. bovis*. (A) y (B) Perfiles en histograma para marcadores de maduración de DC 20 horas después de la inyección IP de Vehículo, BCG, aGalCer/BCG y  $\alpha$ -C-GalCer/BCG en células dendríticas CD11c+ (A) esplénicas (B) hepáticas. Aumento de moléculas de MHC II y coestimuladoras: CD80, CD86, CD70, y 41BB. (C) y (D) Se muestran para aGalCer/BCG y  $\alpha$ -C-GalCer/BCG gráficas que muestran el incremento, en número de veces, de los niveles de MHC II, CD80, CD86, CD70, y 41BB en células de (C) bazo (D) hígado.

Figura 5: La vacunación con BCG-OVA y aGalCer como adyuvante potencia las respuestas de células T CD8 frente a antígenos micobacterianos. (A) Gráficas que muestran los resultados de un ensayo ELISPOT para células T CD8 productoras de  $\text{IFN}\gamma$  específicas frente al péptido OVA, SIINFEKL (SEQ ID NO: 1), a las 3 semanas en bazo de ratones tras la inmunización con aGalCer/BCG-Ova, BCG-Ova, o no vacunados (Unvac.). (B) Gráfica que muestra los resultados del ensayo ELISPOT para células T CD8 productoras de  $\text{IFN}\gamma$  específicas contra SIINFEKL a los 2 meses en bazo de ratones tras la inmunización con aGalCer/BCG-Ova,  $\alpha$ -C-GalCer/BCG-Ova, BCG-Ova, o no vacunados. (C) Gráfica que muestra los resultados del ensayo ELISPOT para células T CD8 productoras de  $\text{IFN}\gamma$  específicas frente al péptido Mtb, epítipo de TB10.3/4 MHC-I (H-2K<sup>d</sup>) GYAGTLQSL (SEQ ID NO: 2), a las 2 semanas en ratones BALB/c tras la inmunización con aGalCer/BCG, BCG solo, o sin vacunar. (D) Gráficas de puntos que muestran ratones Thy1.1<sup>+</sup> B6.PL representativos inyectados con esplenocitos Thy1.2<sup>+</sup> OT-I marcados con CFSE, e infectados con aGalCer/BCG-Ova,  $\alpha$ -C-GalCer/BCG-Ova, o BCG-Ova. (E) Gráfica que muestra el porcentaje de células sin dividir para células descritas en (D).

Figura 6: Inmunidad protectora frente a exposición a *M. tuberculosis* virulenta en ratones tras la vacunación con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. (A) y (B) Gráfica que muestra CFU media (y desviación estándar) de *M. tuberculosis* en pulmón (A) y bazo (B) de ratones C57BL/6 a las 3 y 6 semanas tras la exposición con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv para grupos de 7 ratones que estaban sin tratamiento (Unvac.) o vacunados (BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG). (C) Gráfica que muestra las CFU media de *M. tuberculosis* en pulmón y bazo de ratones CD1d-KO a las 6 semanas tras la exposición con la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv para grupos de 4 ratones que estaban sin tratamiento (Unvac.) o vacunados (BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG). (D) Gráfica que muestra las CFU media de *M. tuberculosis* en pulmón y bazo de ratones Jalpha-18KO a las 6 semanas tras la exposición para grupos de 4 ratones que estaban sin tratamiento (Unvac.) o vacunados (BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG). \*p < 0,05; \*\*p < 0,007 (ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Turkey).

Figura 7: Los pulmones de ratones vacunados y expuestos con *M. tuberculosis* virulenta se examinaron histológicamente a las 6 semanas tras la exposición. (A) Imagen de lesiones pulmonares que se diseminan, más graves, con neumonía granulomatosa extensa y consolidación, en ratones sin vacunar en comparación con ratones vacunados con (B) BCG, (C)  $\alpha$ GalCer/BCG, o (D)  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. Aumento original, 20x.

Figura 8: La vacunación con aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG no potencia significativamente respuestas de

células T CD4 frente a antígenos micobacterianos en comparación con BCG. (A) Gráfica que muestra el ensayo de ELISPOT para células T CD4 esplénicas productoras de IFN- $\gamma$  frente a p25 de Ag85B a los 2 meses en ratones C57BL/6 tras la inmunización con BCG, aGalCer/BCG,  $\alpha$ -C-GalCer/BCG, o sin vacunar. (B) Gráfica que muestra la frecuencia de células T CD4 multifuncionales que producen IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$  en bazo a los 2 meses tras la inmunización con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. (C) y (D) Gráficas que muestran la frecuencia de células T reguladoras en (C) bazo y (D) pulmón en ratones C57BL/6 a los 2 meses tras la vacunación con BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. (E) Las gráficas de puntos muestran ratones Thy1.1<sup>+</sup> B6.PL representativos inyectados con esplenocitos Thy1.2<sup>+</sup> P25TCR-Tg marcados con CFSE, e infectados con el BCG, aGalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG. (F) Gráfica que muestra el porcentaje de células sin dividir para las células descritas en (E).

Figura 9: La vacunación con aGalCer incorporada en BCG (Incorp) potencia respuestas de células T CD8 frente a antígenos micobacterianos en comparación con la administración separada (Sep = BCG-OVA y aGalCer inyectados separadamente en diferentes sitios) o mezclados (Mix = BCG-OVA y aGalCer mezclados juntos en la misma jeringuilla inmediatamente antes de la inyección). (A) y (B) Gráficas que muestran los resultados del ensayo ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas para (A) SIINFEKL (SEQ ID NO: 1) o (B) el epítipo restringido por MHC clase I TB10.4 (H-2K<sup>b</sup>) QIMYNYIPAM (SEQ ID NO: 3) a los 17 días en ratones (células reunidas del bazo y de ganglios linfáticos inguinales) tras la inmunización mediante inyecciones intradérmicas con BCG-OVA (5 x 10<sup>6</sup> BCG-OVA por ratón), 0,1  $\mu$ g de aGalCer + BCG-OVA (Sep), 0,1  $\mu$ g de aGalCer + BCG-OVA (Mix), 4  $\mu$ g de aGalCer + BCG-OVA (Sep), 4  $\mu$ g de aGalCer + BCG-OVA (Mix), y aGalCer/BCG (Incorp).

Figura 10: La vacunación con aGalCer incorporada en BCG (Incorp) potencia las respuestas de células T CD8 frente a antígenos micobacterianos en comparación con la administración separada (Sep = BCG-OVA y aGalCer inyectados separadamente en diferentes sitios) o mezclada (Mix = BCG-OVA y aGalCer mezclados juntos en la misma jeringuilla inmediatamente antes de la inyección). (A) y (B) Gráficas que muestran los resultados del ensayo ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas frente a (A) el epítipo restringido por MHC clase I (H-2K<sup>b</sup>) TB10.4 QIMYNYIPAM (SEQ ID NO: 3), o frente a (B) SIINFEKL (SEQ ID NO: 1), en ratones tras la inmunización con BCG-OVA (5 x 10<sup>6</sup> BCG-OVA por ratón), 0,1  $\mu$ g de aGalCer + BCG-OVA (Sep), 0,1  $\mu$ g de aGalCer + BCG-OVA (Mix), y aGalCer/BCG-OVA (Incorp).

Figura 11: Los glicolípidos que activan células iNKT se incorporan directamente en micobacterias vivas para obtener una potenciación óptima del cebado de células T CD8. La vacunación con aGalCer o  $\alpha$ -C-GalCer incorporada en BCG (Inc) potenció significativamente las respuestas de células T CD8 frente a antígenos micobacterianos, en comparación con la vacunación con (BCG) sin modificar, BCG sin modificar más 0,1  $\mu$ g de glicolípido (aGalCer o  $\alpha$ -C-GalCer, según se indica) inyectado en un sitio distinto (Sep), o BCG sin modificar mezclada con 0,1  $\mu$ g de glicolípido (aGalCer o  $\alpha$ -C-GalCer, según se indica) inmediatamente antes de la inyección e inyectado en el mismo sitio. Gráficas que muestran los resultados del ensayo ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas frente al péptido presentado por MHC clase I del epítipo restringido por MHC clase I (H-2K<sup>b</sup>) del antígeno micobacteriano TB10.4 QIMYNYIPAM (SEQ ID NO: 3) en suspensiones de células del bazo procedentes de ratones a las 3 semanas tras la inmunización <sup>\*\*\*</sup>, p < 0,01 (ANOVA).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones, células aisladas, vacunas, y métodos que son útiles para potenciar, es decir, provocar, estimular o incrementar, una respuesta inmune. Se describe aquí una bacteria modificada que comprende una glicosilceramida asociada físicamente con una célula bacteriana, por ejemplo glicosilceramidas incorporadas de forma estable en una pared de célula bacteriana, por ejemplo una pared de célula micobacteriana. Las bacterias modificadas de la presente invención pueden potenciar una respuesta inmune al afectar la actividad de células T asesinas naturales ("NKT") restringidas por CD1d. En ciertas realizaciones, las composiciones, por ejemplo composiciones de vacuna, de la invención incluyen una  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, incorporada en la pared celular del bacilo Calmette-Guerin (BCG) de *M. bovis*. Las bacterias modificadas como se describen aquí son útiles para estimular respuestas inmunes deseables, por ejemplo respuestas inmunes frente a antígenos micobacterianos. La respuesta inmune puede ser útil para prevenir, tratar o mejorar enfermedades causadas por patógenos bacterianos, por ejemplo micobacterias, por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*, que provocan TB en seres humanos.

Ventajas de la invención también incluyen que el suministro de adyuvantes glicosilceramídicos directamente a las mismas células que se infectan con una bacteria, por ejemplo una bacteria atenuada viva, permite el enfoque del adyuvante de una manera que permite que se usen dosis mucho más pequeñas. De ese modo, reduciendo la toxicidad local y sistémica, y disminuyendo los costes de producción. Además, el enlace físico, por ejemplo incorporación directa, tiene ventajas prácticas, particularmente para vacunas que seleccionan como diana a poblaciones en el tercer mundo en las que hay problemas de suministro y de almacenamiento. Las bacterias asociadas físicamente, por ejemplo incorporadas directamente, con glicosilceramidas, que se liofilizan y se reconstituyen después, deberían permitir que se recuperase intacta la actividad del adyuvante. De este modo, la

vacuna liofilizada se podría rehidratar y suspender sobre el terreno para la administración.

Definiciones

Se ha de observar que el término “un” o “una” entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, “un vector” se entiende que representa uno o más vectores. Como tal, los términos “un” (o “una”), “uno o más”, y “al menos un”, se pueden usar aquí de forma intercambiable.

Como se explica con más detalle más abajo, la presente invención incluye una glicosilceramida, por ejemplo una  $\alpha$ -galactosilceramida, también denominada como  $\alpha$ -GalCer, o un análogo de la misma, tal como  $\alpha$ -C-GalCer, asociada físicamente con una célula bacteriana, por ejemplo incorporada en una pared de célula bacteriana, por ejemplo una pared de célula micobacteriana. En ciertas realizaciones, la glicosilceramida está asociada físicamente a través de interacciones no covalentes. “Glicolípidos de tipo ceramida”, como se hace referencia aquí, incluyen glicolípidos con galactosa o glucosa enlazada mediante  $\alpha$ . Los ejemplos de glicolípidos de tipo ceramida se describen aquí, y también se pueden encontrar, por ejemplo, en Porcelli, Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2006/0052316, Tsuji, Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2006/0211856, Jiang, Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2006/0116331, Hirokazu et al., Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2006/0074235, Tsuji et al., Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2005/0192248, Tsuji, Solicitud de Patente U.S. nº 2004/0127429, y Tsuji et al., Solicitud de Patente U.S. nº 2003/0157135, todas las cuales se incorporan como referencia aquí en sus totalidades.

Vacunas

El término “vacuna” se refiere a una composición que, cuando se administra a un animal, es útil estimulando una respuesta inmune, por ejemplo frente a una infección, por ejemplo una infección micobacteriana. La invención se refiere a una composición de vacuna que comprende células bacterianas, por ejemplo células micobacterianas, en la que dichas células pueden estar muertas, vivas y/o atenuadas, por ejemplo BCG, que es una vacuna bacteriana atenuada viva. Las vacunas bacterianas, por ejemplo vacunas bacterianas vivas, vacunas bacterianas muertas, o vacunas bacterianas atenuadas, son conocidas en la técnica, o se pueden producir mediante métodos bien conocidos por una persona de pericia normal en la técnica, usando experimentación normal. Una vacuna bacteriana de la invención también puede incluir bacterias recombinantes, por ejemplo una micobacteria recombinante.

En una realización, una célula bacteriana está modificada, por ejemplo “modificada por glicolípidos”, para enlazar físicamente un glicolípido a la célula bacteriana, por ejemplo un glicolípido de tipo ceramida se incorpora en la pared celular de una célula bacteriana, por ejemplo una célula micobacteriana.

En otra realización, las células bacterianas de la invención modificadas con un glicolípido se pueden usar como vehículos para el suministro de antígenos heterólogos, por ejemplo polipéptidos inmunogénicos. Por ejemplo, una célula bacteriana modificada con un glicolípido, por ejemplo una célula bacteriana recombinante que tiene un glicolípido de tipo ceramida incorporado en su pared celular, se puede usar como un vehículo para el suministro de antígenos desde otro patógeno (por ejemplo, antígenos bacterianos (por ejemplo, antígenos de *Salmonella*, *Listeria*, *Bacillus anthracis*, y *Shigella*), fúngicos, parasitarios (por ejemplo, un antígeno malárico de *Plasmodium*), o víricos (por ejemplo, un antígeno vírico de VIH, VIS, HPV, RSV, gripe o hepatitis (HAV, HBV, y HCV)) o antígenos específicos de un tumor.

En una realización, la bacteria modificada de la invención incluye células micobacterianas modificadas, por ejemplo células del bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *M. bovis*, a las que se ha incorporado de forma estable y no covalentemente  $\alpha$ -GalCer. BCG es una vacuna bacteriana atenuada viva. Albert Calmette y Camille Guerin del Instituto Pasteur atenuaron la micobacteria relacionada con *Mycobacterium bovis*, que está estrechamente relacionada con *M. tuberculosis*, para producir el bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *Mycobacterium bovis* haciéndolo crecer en medio de cultivo durante 13 años, y monitorizando su decaimiento de la virulencia en animales a lo largo de este período. BCG se ha convertido en una de las vacunas más ampliamente usada de todas, siendo a la vez barata y segura. Sin embargo, la vacuna BCG ha tenido un efecto limitado frente a la epidemia de TB en el mundo desarrollado. Doherty T y Anderson P, Clinical Microbio Reviews 18(4):687-702 (2005). En otra realización, las células micobacterianas son células de *M. smegmatis*, que es otra cepa no patogénica de micobacterias que se puede administrar a mamíferos sin provocar enfermedad.

Además de las células micobacterianas modificadas, otras bacterias modificadas de la invención son bacterias modificadas derivadas de la especie *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus anthracis* que provoca carbunco), la especie *Salmonella* (por ejemplo, que provoca fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, toxoinfección alimentaria), especie *Staphylococcus*, especie *Streptococcus*, especie *Listeria* (por ejemplo, que provoca listeriosis), especie *Shigella*, especie *Yersinia* (por ejemplo, que provoca la peste bubónica y peste pulmonar), especie *Francisella* (por ejemplo, que provoca tularemia), y especie *Legionella* (por ejemplo, que provoca legionelosis).

El término “antígeno”, y el término relacionado “antigénico”, como se usan aquí, se refieren a una sustancia que se une específicamente a un anticuerpo o a un receptor de célula T.

El término “inmunógeno”, y el término relacionado “inmunogénico”, como se usa aquí, se refiere a la capacidad para inducir una respuesta inmune, incluyendo una respuesta inmune de anticuerpo y/o una respuesta inmune celular en

un animal, por ejemplo un mamífero. Es probable que un inmunógeno también será antigénico, pero un “antígeno”, debido a su tamaño o conformación, puede no ser necesariamente un “inmunógeno”. Una “composición inmunogénica” induce una respuesta inmunógena en un sujeto, por ejemplo anticuerpos que reconocen específicamente uno o más antígenos, contenidos en esa “composición inmunogénica”.

5 La expresión “respuesta inmune” pretende incluir una actividad de células del sistema inmune en respuesta a un antígeno o inmunógeno. Tales actividades incluyen, pero no se limitan a, producción de anticuerpos, citotoxicidad, proliferación de linfocitos, liberación de citocinas, inflamación, fagocitosis, presentación de antígenos, y similares. Una respuesta inmune que es muy específica a un antígeno o inmunógeno dado, por ejemplo producción de anticuerpos específicos o producción de linfocitos T específicos, se denomina aquí como una “respuesta inmune adaptativa”. Una respuesta inmune que no es específica a un antígeno dado, por ejemplo liberación de citocinas por células NK y NKT, se denomina aquí una “respuesta inmune innata”. Los ejemplos de respuestas inmunes incluyen una respuesta de anticuerpo o una respuesta celular, por ejemplo célula T citotóxica.

15 Las expresiones “respuesta inmune protectora” o “respuesta inmune terapéutica” se refieren a una respuesta inmune frente a un inmunógeno que en cierto modo previene o detiene al menos parcialmente los síntomas de la enfermedad, efectos secundarios o progresión. Por “protectora” se quiere decir que la respuesta inmune es inducida en un animal sujeto que no ha contraído una enfermedad, en el que la respuesta inmune alivia, reduce, modera, o, en algunos casos, previene completamente los síntomas de la enfermedad si el animal la contrae más tarde o es susceptible a esa enfermedad, por ejemplo exposición a *M. tuberculosis*. Por “terapéutica” se quiere decir que la respuesta inmune es inducida en un animal sujeto que tiene la enfermedad, por ejemplo un ser humano con tuberculosis, en el que la respuesta inmune alivia, reduce, modera, o, en algunos casos, elimina totalmente los síntomas de la enfermedad.

20 La expresión “modular una respuesta inmune” se refiere a cualquier forma en la que una respuesta inmune dada se incrementa, disminuye o cambia por una composición o tratamiento, con respecto a la respuesta inmune sin esa composición o tratamiento. Por ejemplo, el uso de un adyuvante para incrementar una respuesta inmune frente a un antígeno es considerado una modulación de esa respuesta inmune. La disminución en una respuesta inmune, por ejemplo prevención de autoinmunidad, es también una modulación. Además, el cambio de una respuesta inmune, por ejemplo de una respuesta TH2 primaria a una respuesta TH1 primaria, es una modulación de una respuesta inmune. La presente invención permite métodos para modular una respuesta inmune al administrar a un animal una composición que comprende una bacteria modificada, por ejemplo una célula bacteriana con una glicosilceramida incorporada en su pared celular, por ejemplo una pared de célula micobacteriana.

25 El término “adyuvante” se refiere a un material que tiene la capacidad de (1) alterar o incrementar la respuesta inmune frente a un antígeno particular, o (2) incrementar o ayudar a un efecto de un agente farmacológico. En ciertas realizaciones, un glicolípido de tipo ceramida funciona como un adyuvante al administrarlo simultáneamente con una célula bacteriana, por ejemplo un BCG, por ejemplo cuando el glicolípido de tipo ceramida se incorpora en la pared de la célula BCG. En otra realización, se incluye un segundo adyuvante. Otros adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, derivados de LPS (por ejemplo, monofosforil lípido A (MPL)), agonistas de TLR9 (por ejemplo, CPG ODNs), agonistas de TLR7/8 (por ejemplo, imiquimod), citocinas y factores de crecimiento; componentes bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, en particular superantígenos, exotoxinas y componentes de la pared celular); sales a base de aluminio; sales a base de calcio; sílice; polinucleótidos; toxoides; proteínas séricas, virus y materiales derivados víricamente, venenos, venenos de animales, compuestos de imidazoquinilina, poloxámeros, y lípidos catiónicos.

35 Se ha mostrado que una gran variedad de materiales tiene actividad adyuvante a través de una variedad de mecanismos. Cualquier compuesto que pueda incrementar la expresión, antigenicidad o inmunogenicidad de un inmunógeno es un adyuvante potencial. Otros adyuvantes potenciales de la invención incluyen, pero no se limitan a: glicolípidos; quimiocinas; compuestos que inducen la producción de citocinas y quimiocinas; interferones; vehículos inertes, tales como alumbre, bentonita, látex, y partículas acrílicas; copolímeros de bloques de tipo pluronic, tal como TiterMax® (copolímero de bloques CRL-8941, escualeno (un aceite metabolizable) y un estabilizante de sílice en micropartículas); formadores de depósito, tal como adyuvante de Freund; materiales tensioactivos, tales como saponina, lisolecitina, retinal, Quil A, liposomas, y formulaciones de polímeros de pluronic; estimulantes de macrófagos, tales como lipopolisacárido bacteriano; activadores del complemento de la ruta alternativa, tales como insulina, zymosan, endotoxina, y levamisol; tensioactivos no iónicos; copolímeros de tribloques de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno); mLT; MF59™; SAF; el sistema adyuvante Ribi™; dimicolato de trehalosa (TDM); esqueleto de la pared celular (CWS); Detox™; QS21; Stimulon™; adyuvante completo de Freund; adyuvante incompleto de Freund; factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF); factor de necrosis tumoral (TNF); MPL 3-O-desacetilado; oligonucleótidos CpG; éteres de polioxi-etileno, ésteres de polioxi-etileno, y combinaciones de más de un adyuvante.

45 En ciertas realizaciones, el adyuvante es una citocina. Una composición de la presente invención puede comprender una o más citocinas, quimiocinas, o compuestos que inducen la producción de citocinas y quimiocinas. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10),

interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18), interferón alfa (IFN $\alpha$ ), interferón beta (IFN $\beta$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), interferón omega (IFN $\omega$ ), interferón tau (IFN $\tau$ ), factor I inductor de interferón gamma (IGIF), factor beta de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), RANTES (célula T normal, expresada y presumiblemente segregada, regulada con la activación), proteínas inflamatorias de macrófagos (por ejemplo, MIP-1 alfa y MIP-1 beta), factor iniciador del alargamiento de *Leishmania* (LEIF), y ligando de Flt-3.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden además otro componente, por ejemplo un polipéptido con actividad inmunológica. Por ejemplo, la proteína con actividad inmunológica es una molécula coestimulante, tal como un receptor de tipo toll ("TLR"), B7.1 o B7.2. "B7" se usa aquí para referirse genéricamente a B7.1 o B7.2. Una molécula coestimulante, por ejemplo el dominio extracelular de B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) que interacciona con CD28 en células T y NK, se puede administrar como una fusión aminoterminal a  $\beta$ 2-microglobulina incorporada en la estructura de un complejo CD1d soluble para uso en la presente invención. Véase, por ejemplo, el documento WO 9964597, publicado el 16 de diciembre de 1999. En ciertas realizaciones, la incorporación de una molécula coestimulante, por ejemplo una molécula señalizadora de B7, con las composiciones de la invención permite una activación más eficaz y prolongada de células NKT mediante un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana de la invención.

En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden además componentes adyuvantes adicionales, por ejemplo cualquiera de los adyuvantes descritos anteriormente, tales como derivados de LPS (por ejemplo, MPL), agonistas de TLR9 (por ejemplo, CPG ODNs), agonistas de TLR7/8 (por ejemplo, imiquimod), citocinas y factores de crecimiento; componentes bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, en particular superantígenos, exotoxinas y componentes de la pared celular); sales a base de aluminio; sales a base de calcio; sílice; polinucleótidos; toxoides; proteínas séricas, virus y materiales derivados víricamente, venenos, venenos de animales, compuestos de imidazoquinilina, poloxámeros, lípidos catiónicos, y agonistas del receptor de tipo Toll (TLR). Los ejemplos de adyuvantes agonistas de TLR que son eficaces incluyen, pero no se limitan a: N-acetilmuramyl-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), lipopolisacáridos (LPS), LPS genéticamente modificado y/o degradado, alumbre, glucano, factores estimulantes de colonias (por ejemplo, EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, G-CSF PEGilado, SCF, IL-3, IL6, PIXY 321), interferones (por ejemplo,  $\gamma$ -interferón,  $\alpha$ -interferón), interleucinas (por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18), saponinas (por ejemplo, QS21), monofosforil lípido A (MPL), monofosforil lípido A 3-O-desacetilado (3D-MPL), secuencias de CpG no metiladas, 1-metiltriptófano, inhibidores de arginasa, ciclofosfamida, anticuerpos que bloquean funciones inmunosupresoras (por ejemplo, anticuerpos anti-CTLA4), lípidos (tales como restos de ácido palmítico), tripalmitoil-S-glicerilcistein liseril-serina (P<sub>3</sub> CSS), y adyuvante de Freund. Como alternativa, o adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden comprender además una linfocina o citocina que modula la activación de células inmunes, tal como el factor de crecimiento transformante (TGF, por ejemplo, TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ );  $\alpha$  interferones (por ejemplo IFN $\alpha$ );  $\beta$  interferones (por ejemplo IFN $\beta$ );  $\gamma$  interferones (por ejemplo IFN $\gamma$ ) o proteína asociada a la función linfocitaria, tal como LFA-1 o LFA-3; o una molécula de adhesión intercelular, tal como ICAM-1 o ICAM-2.

Las composiciones de la invención pueden comprender además un polipéptido inmunogénico. En ciertas realizaciones, las células bacterianas recombinantes modificadas con un glicolípido de la invención se pueden usar como vehículos para el suministro de antígenos o inmunógenos heterólogos. Los antígenos o inmunógenos heterólogos pueden incluir, pero no se limitan a, polipéptidos inmunogénicos. En una realización, el polipéptido inmunogénico se puede expresar mediante una célula bacteriana recombinante modificada con un glicolípido de la invención, por ejemplo polipéptidos inmunogénicos de patógenos heterólogos expresados por células micobacterianas recombinantes con un glicolípido de tipo ceramida incorporado en la pared de la célula micobacteriana.

Un "polipéptido inmunogénico" pretende englobar polipéptidos antigénicos o inmunogénicos, por ejemplo materiales de poliaminoácidos que tienen epítomos o combinaciones de epítomos. Como se usa aquí, un polipéptido inmunogénico es un polipéptido que, cuando se introduce en un vertebrado, reacciona con las moléculas del sistema inmune del vertebrado, es decir, es antigénico, y/o induce una respuesta inmune en el vertebrado, es decir, es inmunogénico. Es probable que un polipéptido inmunogénico también será antigénico, pero un polipéptido antigénico, debido a su tamaño o conformación, puede no ser necesariamente inmunogénico. Los ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de agentes infecciosos tales como bacterias, virus, parásitos, u hongos, alérgenos tales como aquellos de caspa de la mascota, plantas, polvo, y otras fuentes medioambientales, así como ciertos autopolipéptidos, por ejemplo antígenos asociados a un tumor.

Los polipéptidos antigénicos e inmunogénicos se pueden usar para prevenir o tratar, por ejemplo curar, mejorar, disminuir la gravedad de, o prevenir o reducir el contagio de enfermedades infecciosas víricas, bacterianas, fúngicas, y parasitarias, así como para tratar alergias y enfermedades proliferativas tales como cáncer.

Además, los polipéptidos antigénicos e inmunogénicos se pueden usar para prevenir o tratar, por ejemplo curar, mejorar o disminuir la gravedad de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cánceres de la cavidad oral y de la faringe (por ejemplo, lengua, boca, faringe), del sistema digestivo (por ejemplo, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, ano, canal anal, anorrecto, hígado, vesícula biliar, páncreas), del sistema respiratorio (por ejemplo, laringe, pulmón), de huesos, articulaciones, tejidos blandos (incluyendo corazón), piel, melanoma, mama,

órganos reproductores (por ejemplo, cuello uterino, endometrio, ovario, vulva, vagina, próstata, testículos, pene), del sistema urinario (por ejemplo, vejiga urinaria, riñón, uréter, y otros órganos urinarios), del ojo, cerebro, sistema endocrino (por ejemplo, tiroides y otros endocrinos), linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin), mieloma múltiple, leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica).

Los ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos víricos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ejemplo un antígeno de la cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptidos del virus del moquillo, polipéptidos del virus del Ébola, polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos del virus de la hepatitis (AE), por ejemplo un antígeno del núcleo o de la superficie de hepatitis B, polipéptidos del virus del herpes, por ejemplo una glicoproteína del virus del herpes simple o del virus de varicela zóster, polipéptidos del virus de la inmunodeficiencia, por ejemplo la envoltura o proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, polipéptidos del virus de peritonitis infecciosa, polipéptidos del virus de la gripe, por ejemplo una hemaglutinina, neuraminidasa, o nucleoproteína de la gripe A, polipéptidos del virus de la leucemia, polipéptidos del virus de Marburgo, polipéptidos de ortomixovirus, polipéptidos del virus del papiloma, polipéptidos del virus de la parainfluenza, por ejemplo la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptidos de paramixovirus, polipéptidos de parvovirus, polipéptidos de pestivirus, polipéptidos de picornavirus, por ejemplo un polipéptido de la cápside del virus de la polio, polipéptidos de poxvirus, por ejemplo un polipéptido del virus de la vacuna, polipéptidos del virus de la rabia, por ejemplo una glicoproteína G del virus de la rabia, polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus, y polipéptidos de rotavirus.

Los ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, *Actinomyces* polypeptides, *Bacillus* polypeptides, por ejemplo, polipéptidos inmunogénicos de *Bacillus anthracis*, polipéptidos de *Bacteroides*, polipéptidos de *Bordetella*, polipéptidos de *Bartonella*, polipéptidos de *Borrelia*, por ejemplo, *B. burgdorferi* OspA, polipéptidos de *Brucella*, polipéptidos de *Campylobacter*, polipéptidos de *Capnocytophaga*, polipéptidos de *Chlamydia*, polipéptidos de *Clostridium*, polipéptidos de *Corynebacterium*, polipéptidos de *Coxiella*, polipéptidos de *Dermatophilus*, polipéptidos de *Enterococcus*, polipéptidos de *Ehrlichia*, polipéptidos de *Escherichia*, polipéptidos de *Francisella*, polipéptidos de *Fusobacterium*, polipéptidos de *Haemobartonella*, polipéptidos de *Haemophilus*, por ejemplo, proteína de la membrana exterior de tipo b de *H. influenzae*, polipéptidos de *Helicobacter*, polipéptidos de *Klebsiella*, polipéptidos de bacterias de la forma L, polipéptidos de *Leptospira*, polipéptidos de *Listeria*, polipéptidos de *Mycobacteria*, polipéptidos de *Mycoplasma*, polipéptidos de *Neisseria*, polipéptidos de *Neorickettsia*, polipéptidos de *Nocardia*, polipéptidos de *Pasteurella*, polipéptidos de *Peptococcus*, polipéptidos de *Peptostreptococcus*, polipéptidos de *Pneumococcus*, polipéptidos de *Proteus*, polipéptidos de *Pseudomonas*, polipéptidos de *Rickettsia*, polipéptidos de *Rochalimaea*, polipéptidos de *Salmonella*, polipéptidos de *Shigella*, polipéptidos de *Staphylococcus*, polipéptidos de *Streptococcus*, por ejemplo, proteínas M de *S. pyogenes*, polipéptidos de *Treponema*, y polipéptidos de *Yersinia*, por ejemplo antígenos F1 y V de *Y. pestis*.

Los ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos parasitarios incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Balantidium coli*, polipéptidos de *Entamoeba histolytica*, polipéptidos de *Fasciola hepatica*, polipéptidos de *Giardia lamblia*, polipéptidos de *Leishmania*, y polipéptidos de *Plasmodium* (por ejemplo, polipéptidos de *Plasmodium falciparum*).

Los ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos fúngicos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de *Candida*, polipéptidos de *Coccidioides immitis* o de *C. posadasii*, polipéptidos de *Cryptococcus*, polipéptidos de *Histoplasma*, polipéptidos de *Pneumocystis*, y polipéptidos de *Paracoccidioides*.

Los ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos asociados a un tumor incluyen, pero no se limitan a, regiones variables de inmunoglobulinas específicas de un tumor, GM2, Tn, sTn, antígeno de Thompson-Friedenreich (TF), Globo H, Le(y), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, antígenos carcinoembrionarios, cadena beta de gonadotropina coriónica humana (hCG beta), C35, HER2/neu, CD20, PSMA, EGFRvIII, KSA, PSA, PSCA, GP100, MAG E 1, MAG E 2, TRP 1, TRP 2, tirosinasa, MART-1, PAP, CEA, BAGE, MAG E, RAGE, y proteínas relacionadas.

Las composiciones de la invención pueden comprender además otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, y agentes antimitóticos. Los antimetabolitos incluyen metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina. Los agentes alquilantes incluyen mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomantol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino. Las antraciclinas incluyen daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorrubicina (también denominada aquí como adriamicina). Ejemplos adicionales incluyen mitoxantrona y bisantreno. Los antibióticos incluyen dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC). Los agentes antimitóticos incluyen vincristina y vinblastina (que se denominan normalmente como alcaloides de la vinca). Otros agentes citotóxicos incluyen procarbazona, hidroxiurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones. Ejemplos adicionales de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, ricina, doxorrubicina, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, etopósido, tenopósido, colquicina, dihidroxiantracindiona, 1-deshidrotestosterona, y glucocorticoide. Los análogos y homólogos de tales agentes terapéuticos están englobados por la presente invención.

## Célula bacteriana

La bacteria modificada de la invención puede derivar de una forma nativa de una célula bacteriana, o puede ser una célula bacteriana recombinante. La glicosilceramida está asociada físicamente con una célula bacteriana, por ejemplo incorporada en una pared de una célula bacteriana, y se usa como adyuvante para potenciar una respuesta inmune, por ejemplo frente a una bacteria.

Las bacterias se pueden describir como grampositivas o gramnegativas. Beveridge TJ, *Biotech Histochem* 76(3): 111-118 (2001); Gram HC, *Fortschritte der Medizin* 2: 185-189 (1884). Las bacterias grampositivas son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta mediante tinción de Gram. Las bacterias grampositivas se caracterizan generalmente por tener, como parte de su estructura de la pared celular, peptidoglicano así como polisacáridos y/o ácidos teicoicos. Los peptidoglicanos, que algunas veces también se denominan mureína, son heteropolímeros de hebras de glicano, que están reticuladas a través de péptidos cortos. Las bacterias gramnegativas están rodeadas generalmente por dos membranas. La membrana exterior contiene lipopolisacáridos (LPS) y porinas, y funciona como una barrera de permeabilidad. Las micobacterias producen una cobertura exterior espesa rica en micolato, que funciona como una barrera eficiente. Las bacterias son acidorresistentes, y están relacionadas filogenéticamente con las bacterias grampositivas.

Los agentes bacterianos o fúngicos que pueden provocar enfermedad o síntomas, y que se pueden tratar, prevenir y/o diagnosticar por una bacteria modificada, o composición, o composición de vacuna de la presente invención, pueden incluir, pero no se limitan a, las siguientes bacterias gramnegativas y grampositivas y familias bacterianas y hongos: *Acinetobacter*, Actinomycetes (por ejemplo, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, Bacillaceae (por ejemplo, *Bacillus*, *anthracis*), Bacteroidaceae, *Blastomyces*, *Bordetella*, *Brucella*, *Candidia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Coccidioides*, *Corynebacterium*, *Cryptococcus*, *Dermatophytes*, Enterobacteriaceae (*E. coli* (por ejemplo, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enterohemorrágica), *Klebsiella*, *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, y *Salmonella paratyphi*), *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*, etc.), *Erysipelothrix*, *Francisella*, *Helicobacter*, Legionellaceae, Spirochaetaceae (por ejemplo, *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*)), Leptospiraceae, *Listeria*, *Mycoplasmatales*, *Mycobacterium leprae*, Vibrionaceae (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), Neisseriaceae (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*), *Actinobacillus*, *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae* tipo B), *Pasteurella*, *Pseudomonas*, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, *Treponema pallidum*, Staphylococcaceae (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, y Streptococcaceae (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* del Grupo B).

Estas familias bacterianas o fúngicas pueden provocar las siguientes enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a: bacteriemia, endocarditis, infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveítis), gingivitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, infecciones relacionadas con SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, enfermedad de Reiter, infecciones del aparato respiratorio, tales como tosferina o enfisema, septicemia, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, envenenamiento alimentario, fiebre tifoidea, neumonía, gonorrea, meningitis (por ejemplo, meningitis tipos A y B), clamidiasis, sífilis, difteria, lepra, paratuberculosis, tuberculosis (TB), enfermedad de Hansen, tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea, o enfermedad diseminada, lupus, botulismo, gangrena, tétanos, impétigo, fiebre reumática, escarlatina, enfermedades transmitidas sexualmente, enfermedades cutáneas (por ejemplo, celulitis, dermatomycosis), toxemia, infecciones del aparato urinario, e infecciones de heridas.

Una bacteria modificada, composición, o composición de vacuna de la invención se puede usar para tratar, prevenir y/o diagnosticar cualquiera de estos síntomas o enfermedades. En realizaciones específicas, las composiciones de la invención se usan para tratar: tuberculosis, tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea, enfermedad diseminada, peste bubónica, peste pulmonar, tularemia, legionelosis, carbunco, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, toxoinfección alimentaria, listeriosis, malaria, VIH, VIS, HPV, gripe, hepatitis (HAV, HBV, y HCV), y cáncer.

## Micobacterias

El género *Mycobacterium* incluye patógenos que se sabe que provocan enfermedades graves en mamíferos, incluyendo, por ejemplo, tuberculosis y lepra. *Mycobacterium* (también denominado como micobacteria) no contienen endosporas o cápsulas, y habitualmente son consideradas grampositivas. Además de los ácidos grasos habituales encontrados en lípidos de membrana, las micobacterias tienen una amplia variedad de *n*-ácidos grasos de cadena muy larga saturados (C<sub>18</sub>-C<sub>32</sub>) y monoinsaturados (hasta C<sub>26</sub>). La aparición de ácidos grasos de cadena muy larga  $\alpha$ -alquílicos  $\beta$ -hidroxílicos, por ejemplo ácidos micólicos, es un sello distintivo de las micobacterias y especies relacionadas. Los ácidos micólicos micobacterianos son grandes (C<sub>70</sub>-C<sub>90</sub>), con una gran ramificación en  $\alpha$  (C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub>). La cadena principal contiene uno o dos dobles enlaces, anillos de ciclopropano, grupos epoxídicos, grupos metoxi, grupos ceto, o ramificaciones metílicas. Tales ácidos son componentes principales de la pared celular, que aparecen mayoritariamente esterificados en agrupaciones de cuatro en las unidades hexa-arabinofuranosílicas terminales de los polisacáridos principales de la pared celular denominados arabinogalactanos. También se encuentran esterificados en las posiciones 6 y 6' de trehalosa para formar el "factor de acordonamiento". También se encuentran pequeñas cantidades de micolato esterificadas con glicerol o azúcares tales como trehalosa, glucosa y fructosa, dependiendo de los azúcares presentes en el medio de cultivo. Las micobacterias también contienen una

amplia variedad de ácidos grasos con ramificaciones metílicas. Éstos incluyen ácidos grasos de C<sub>18</sub> 10-metílicos (ácido tuberculoesteárico encontrado esterificado en manósidos de fosfatidil inositida), ácido de C<sub>14</sub> 2,4-dimetílico y ácidos grasos de C<sub>14</sub> a C<sub>25</sub> mono-, di- y trimetil ramificados encontrados en lipooligosacáridos que contienen trehalosa, ácido de C<sub>27</sub> insaturado trimetílico (ácido fienoico), ácidos grasos de C<sub>28</sub>-C<sub>32</sub> tetrametil ramificados (ácidos micocerósicos) y homólogos más cortos encontrados en glicolípidos fenólicos y ésteres de ftiocerol, y ácidos ftioceránicos ramificados con múltiples metilos, tales como ácido de C<sub>37</sub> heptametil ramificado, y ácidos oxigenados ramificados con múltiples metilos, tal como el ácido de C<sub>40</sub> 17-hidroxi-2,4,6,8,10,12,14,16-octametílico encontrado en sulfolípidos. Además, los ácidos micocerósicos y otros ácidos ramificados se esterifican con fticerol y fenolfticerol y sus derivados. Kolattukudy et al., Mol. Microbio. 24(2):263-270 (1997). Las pruebas implican a lípidos específicos de la cubierta celular en la patogénesis de Mtb. Rao, et al., J. Exp. Med., 201(4):535-543 (2005).

Las especies de *Mycobacterium* incluyen, pero no se limitan a: *M. abscessus*; *M. africanum*; *M. agri*; *M. aichiense*; *M. alvei*; *M. arupense*; *M. asiaticum*; *M. aubagnense*; *M. aurum*; *M. austroafricanum*; complejo de *Mycobacterium avium* (MAC); *M. avium*; *M. avium paratuberculosis*, que está implicada en la enfermedad de Crohn en seres humanos y en la enfermedad de Johne en ovejas; *M. avium silvaticum*; *M. avium "hominissuis"*; *M. colombiense*; *M. boenickei*; *M. bohemicum*; *M. bolletii*; *M. botniense*; *M. bovis*; *M. branderi*; *M. brisbanense*; *M. brumae*; *M. canariense*; *M. caprae*; *M. celatum*; *M. chelonae*; *M. chimaera*; *M. chitae*; *M. chlorophenolicum*; *M. chubuense*; *M. conceptionense*; *M. confluentis*; *M. conspicuum*; *M. cookii*; *M. cosmeticum*; *M. diernhoferi*; *M. doricum*; *M. duvalii*; *M. elephantis*; *M. fallax*; *M. farcinogenes*; *M. flavescens*; *M. florentinum*; *M. fluoroanthenivorans*; *M. fortuitum*; *M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*; *M. frederiksbergense*; *M. gadium*; *M. gastri*; *M. genavense*; *M. gilvum*; *M. goodii*; *M. gordonae*; *M. haemophilum*; *M. hassiacum*; *M. heckeshornense*; *M. heidelbergense*; *M. hiberniae*; *M. hodleri*; *M. holsaticum*; *M. houstonense*; *M. immunogenum*; *M. interjectum*; *M. intermedium*; *M. intracellulare*; *M. kansasii*; *M. komossense*; *M. kubicae*; *M. kumamotoense*; *M. lacus*; *M. lentiflavum*; *M. leprae*, which causes leprosy; *M. lepraemurium*; *M. madagascariense*; *M. mageritense*; *M. malmoense*; *M. marinum*; *M. massiliense*; *M. microti*; *M. monacense*; *M. montefiorensis*; *M. morioakaense*; *M. mucogenicum*; *M. murale*; *M. nebraskense*; *M. neoaurum*; *M. neworleansense*; *M. nonchromogenicum*; *M. novocastrense*; *M. obuense*; *M. palustre*; *M. parafortuitum*; *M. parascrofulaceum*; *M. parvum*; *M. peregrinum*; *M. phlei*; *M. phocaicum*; *M. pinnipedii*; *M. porcinum*; *M. poriferae*; *M. pseudoshottsii*; *M. pulveris*; *M. psychrotolerans*; *M. pyrenivorans*; *M. rhodesiae*; *M. saskatchewanense*; *M. scrofulaceum*; *M. senegalense*; *M. seoulense*; *M. septicum*; *M. shimoidei*; *M. shottsii*; *M. simiae*; *M. smegmatis*; *M. sphagni*; *M. szulgai*; *M. terrae*; *M. thermoresistibile*; *M. tokaiense*; *M. triplex*; *M. triviale*; complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), cuyos miembros son agentes etiológicos de la tuberculosis humana y animal (*M. tuberculosis*, la causa principal de tuberculosis humana; *M. bovis*; *M. bovis BCG*; *M. africanum*; *M. canetti*; *M. caprae*; *M. pinnipedii*); *M. tusciae*; *M. ulcerans*, que provoca la "úlceras de Buruli", o "úlceras de Bairnsdale"; *M. vaccae*; *M. vanbaalenii*; *M. wolinskyi*; y *M. xenopi*.

Las micobacterias se pueden clasificar en varios grupos con el fin de diagnosticarlas y tratarlas, por ejemplo: complejo de *M. tuberculosis* (MTB) que puede provocar tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, el bacilo de Dassie, y *M. canettii* (nombre propuesto) (Somoskovi, et al., J. Clinical Microbio 45(2):595-599 (2007)); *M. leprae*, que provoca la enfermedad de Hansen o lepra; las micobacterias no tuberculosas (NTM) son todas las otras micobacterias que pueden provocar tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea, o enfermedad diseminada. Los miembros del MTB muestran un grado elevado de homogeneidad genética. Somoskovi (2007). Las micobacterias de la invención pueden incluir micobacterias recombinantes. Por ejemplo, células micobacterianas recombinantes, por ejemplo células BCG recombinantes, por ejemplo, células rBCG30.

#### Bacterias recombinantes

Una bacteria modificada de la invención también puede incluir una célula bacteriana recombinante, por ejemplo una célula micobacteriana recombinante. Un ejemplo no limitante de una célula bacteriana recombinante es rBCG30, que deriva de una cepa de vacuna de BCG, y que se ha modificado genéticamente para sobreexpresar el antígeno inmunodominante Ag85B. Véase Doherty y Anderson, *Clinical Microbio Reviews* 18(4): 687-702 (2005). Otros ejemplos de células bacterianas recombinantes adecuadas para producir bacteria modificada con glicolípidos de la invención incluyen, pero no se limitan a, BCG-HIV; BCG-SIV; BCG-HCV; rBCG/IL-2, y *M. smegmatis* recombinante que expresa péptidos del VIH (véanse, por ejemplo, Aldovini y Young, Nature 351: 479-482 (1994); Yasutomi et al., J. of Immunol. 150(7):3101-3107 (1993); Uno-Furuta et al., Vaccine 21(23): 3149-3156 (2003); Matsumoto et al., J. Exp. Med. 188(5): 845-854 (1998); Yamada et al., J. of Urology 164(2): 526-531 (2000); Cayabyab et al., J. of Virology 80(4): 1645-1652 (2006); Stover et al., Nature 351: 456-460 (1991); y Bloom et al., patente U.S. nº 5.504.005).

En una realización, la bacteria modificada comprende una célula bacteriana recombinante manipulada para expresar un polipéptido codificado por polinucleótidos no nativos, por ejemplo BCG-HIV, en el que la célula bacteriana recombinante está asociada físicamente con una glicosilceramida. La invención se refiere además a una composición o composición de vacuna que comprende una bacteria modificada de la invención, en la que la célula bacteriana es nativa o recombinante.

La invención se refiere además a una bacteria modificada recombinante (manipulada genéticamente), por ejemplo un complejo de glicosilceramida/célula micobacteriana, que expresa ADN que codifica un polipéptido heterólogo. El

ADN se puede incorporar en el genoma bacteriano, o puede existir extracromosómicamente usando técnicas de ingeniería genética estándar. Las bacterias recombinantes de la invención se pueden manipular usando vectores para la introducción de ADN de interés, por ejemplo ADN que codifica antígenos o inmunógenos heterólogos, en bacterias, por ejemplo micobacterias.

5 Como se usa aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano). Los vectores de la presente invención son capaces de dirigir la expresión de genes que  
10 codifican polipéptidos, por ejemplo polipéptidos inmunogénicos, a los que están enlazados operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos.

Los vectores de expresión que comprenden ácidos nucleicos que codifican polipéptidos pueden ser útiles en la presente invención, por ejemplo para la expresión de polipéptidos inmunogénicos, a partir de bacterias recombinantes, por ejemplo micobacterias recombinantes modificadas con glicolípidos. La elección del vector y de las  
15 secuencias de control de la expresión a las que tales ácidos nucleicos están enlazados operablemente depende de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo la expresión proteínica, y de la célula hospedante a transformar.

Los elementos de control de la expresión útiles para regular la expresión de una secuencia codificante operablemente enlazada son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción, y otros elementos reguladores. Cuando se usa un promotor inducible, se puede controlar, por ejemplo mediante un cambio en el estado de los nutrientes del medio de la célula hospedante, o un cambio en la temperatura. Las regiones que codifican los polinucleótidos y los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden asociar con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente  
20 invención.

En una realización, la expresión bacteriana de un polinucleótido de interés ocurre extracromosómicamente, por ejemplo a partir de un plásmido (por ejemplo, episómicamente). Por ejemplo, un gen de interés se clona en un plásmido y se introduce en una célula micobacteriana cultivada, por ejemplo BCG o *M. smegmatis*, en la que el gen de interés codifica un polipéptido de interés, por ejemplo un polipéptido inmunogénico. Se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicones y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedante, por ejemplo células hospedantes micobacterianas. El vector puede portar un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas.  
30

Un vector puede incluir, pero no se limita a, un replicón procariota, es decir, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y mantener extracromosómicamente la molécula de ADN recombinante en una célula hospedante bacteriana. Tales replicones son bien conocidos en la técnica. Además, los vectores que incluyen un replicón procariota también pueden incluir un gen cuya expresión confiere un marcador detectable tal como una resistencia a un fármaco. Los ejemplos no limitantes de genes bacterianos con resistencia a fármacos son aquellos que confieren resistencia a ampicilina o tetraciclina.  
35

Los vectores que incluyen un replicón procariota también pueden incluir un promotor procariota o de bacteriófago, para dirigir la expresión de las secuencias génicas codificantes en una célula hospedante bacteriana. Las secuencias promotoras compatibles con hospedantes bacterianos típicamente se proporcionan en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN a expresar. Los ejemplos de promotores que se pueden usar para la expresión en células hospedantes procariotas, por ejemplo células hospedantes micobacterianas, incluyen, pero no se limitan a, promotores del choque térmico, promotores de la proteína del estrés, promotores de pMTB30, promotores de B-lactamasa (penicilinas), promotores de lactosa, promotores que expresan resistencia a kanamicina, promotores que expresan resistencia a cloranfenicol, y promotores cl (véase también Sambrook et al.). En la invención se pueden usar diversos vectores de clonación procariotas. Los ejemplos de tales vectores plasmídicos incluyen, pero no se limitan a, pUC8, pUC9, pBR322 y pBR329 (BioRad® Laboratories), pPL, pEMBL y pKK223 (Pharmacia) (véase también Sambrook et al.).  
45

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas vía técnicas de transformación o de transfección convencionales. Como se usan aquí, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedante, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedantes se pueden encontrar en Sambrook et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio. La transformación de células hospedantes, por ejemplo células bacterianas tales como células micobacterianas recombinantes o células micobacterianas modificadas con un glicolípidos, se puede lograr mediante métodos convencionales adecuados al vector y célula hospedante empleados. Para la transformación de células hospedantes procariotas, por ejemplo células micobacterianas, se pueden emplear métodos de  
60

electroporación y de tratamiento salino (Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-14 (1972)), así como otras técnicas conocidas en la técnica.

Como se usa aquí, el término "polipéptido" pretende englobar un único "polipéptido" así como múltiples "polipéptidos", y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) enlazados linealmente mediante enlaces amídicos (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. De este modo, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido" los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos", o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y el término "polipéptido" se puede usar en lugar de, o de forma intercambiable con, cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones del polipéptido tras la expresión. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural, o se puede producir mediante tecnología recombinante, pero no se traduce necesariamente a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Se puede generar de cualquier manera, incluyendo mediante síntesis química.

Un polipéptido puede tener un tamaño de alrededor de 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos.

Mediante un "polipéptido aislado", o un fragmento, variante o derivado del mismo, se quiere decir un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede eliminar de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos recombinantemente, expresados en células hospedantes o como un componente de una vacuna bacteriana recombinante, se consideran aislados para los fines de la invención, como lo son los polipéptidos nativos o recombinantes que se han separado, fraccionado, o purificado parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada.

También se incluyen como polipéptidos de la presente invención los fragmentos, derivados, análogos, o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", cuando se refieren a polipéptidos de la presente invención, incluyen cualesquiera polipéptidos que retienen al menos algunas de las propiedades biológicas, antigénicas, o inmunogénicas del polipéptido nativo correspondiente.

El término "polinucleótido", pretende englobar un único ácido nucleico así como múltiples ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o constructo de ácido nucleico aislado, por ejemplo ARN mensajero (ARNm), ARN derivado víricamente, o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amídico, tal como el encontrado en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). La expresión "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo fragmentos de ADN o de ARN, presentes en un polinucleótido. El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se quiere decir una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido terapéutico contenido en un vector se considera aislado para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedantes heterólogas, por ejemplo células bacterianas recombinantes, o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como también formas de hebras positivas y negativas, y formas bicatenarias, de vectores de pestivirus descritos aquí. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma, o un terminador de la transcripción.

Como se usa aquí, un "polinucleótido heterólogo" o un "ácido nucleico heterólogo" o un "gen heterólogo" o una "secuencia heteróloga" o un "segmento de ADN exógeno" se refiere a un polinucleótido, ácido nucleico o segmento de ADN que se origina a partir de una fuente extraña a la célula hospedante particular, o, si procede de la misma fuente, está modificado de su forma original. Un gen heterólogo en una célula hospedante incluye un gen que es endógeno a la célula hospedante particular, pero que se ha modificado. De este modo, las expresiones se refieren a un segmento de ADN que es extraño o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedante en la que el elemento no se encuentra normalmente.

Como se usa aquí, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA, o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que es parte de una región codificante, si está presente, pero cualesquiera secuencias de flanco, por ejemplo promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas de 5' y 3', y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes de la presente invención pueden estar presentes en un único constructo polinucleotídico, por ejemplo en un único vector, o en distintos constructos polinucleotídicos, por ejemplo en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes. Además, un vector,

polinucleótido, o ácido nucleico de la invención puede codificar dos o más regiones codificantes heterólogas, ya sea fusionadas o sin fusionar. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

5 En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico, que codifica un polipéptido, normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o de la terminación asociados operablemente con una o más regiones codificantes. Una asociación operable es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal manera para colocar la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de un polipéptido, y un promotor asociado con ella) están "asociados operablemente" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado, y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN que se va a transcribir. De este modo, una región promotora estaría asociada operablemente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fue capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de una célula, que dirige la transcripción sustancial del ADN solamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores, y señales de terminación de la transcripción, se pueden asociar operablemente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de una célula.

20 Mediante "una secuencia de aminoácidos de referencia" se quiere decir la secuencia específica sin la introducción de ninguna sustitución de aminoácido. Como entenderá cualquiera de pericia normal en la técnica, si no hay sustituciones, el "polipéptido aislado" de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia.

25 Los polipéptidos descritos aquí pueden tener diversas alteraciones, tales como sustituciones, inserciones o supresiones. Los aminoácidos ejemplares que se pueden sustituir en el polipéptido incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

30 También se contemplan fragmentos correspondientes de polipéptidos al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% idénticos a los polipéptidos y polipéptidos de referencia descritos aquí.

35 Como se sabe en la técnica, la "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Cuando se explica aquí, el hecho de que cualquier polipéptido particular sea al menos alrededor de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntico a otro polipéptido se puede determinar usando métodos y programas/software de ordenador conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se ajustan, por supuesto, de manera que el porcentaje de identidad se calcule a lo largo de la longitud completa de la secuencia polipeptídica de referencia, y de manera que se permitan espacios en homología de hasta 5% del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

#### Antígenos de glucosilceramida

45 Los antígenos de glucosilceramida útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, aquellos glicolípidos de tipo ceramida que son capaces de modular una respuesta inmune en un animal cuando están presentes con una célula bacteriana, por ejemplo mediante incorporación del glicolípido de tipo ceramida en la pared celular de una célula bacteriana. Los antígenos pueden derivar de antígenos extraños o de autoantígenos. Además, los antígenos de glucosilceramida pueden ser sintéticos. Los antígenos adecuados se describen, por ejemplo, en Porcelli, *Pub. Sol. de Patente U.S. n° 2006/0052316*, Tsuji, *Pub. Sol. de Patente U.S. n° 2006/0211856*, Jiang, *Pub. Sol. de Patente U.S. n° 2006/0116331*, Hirokazu et al., *Pub. Sol. de Patente U.S. n° 2006/0074235*, Tsuji et al., *Pub. Sol. de Patente U.S. n° 2005/0192248*, Tsuji, *Solicitud de Patente U.S. n° 2004/0127429*, y Tsuji et al., *Solicitud de Patente U.S. n° 2003/0157135*. En ciertas realizaciones, la glucosilceramida es  $\alpha$ -GalCer o un análogo de la misma. En otras realizaciones, la glucosilceramida es una  $\alpha$ -C-GalCer o un análogo de la misma.

La expresión "opcionalmente sustituido", como se usa aquí, significa no sustituido o sustituido con uno o más sustituyentes, incluyendo halógeno (F, Cl, Br, I), alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, o alcoxi.

El término “alquilo”, como se usa aquí por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificado que tiene típicamente de uno a dieciocho carbonos o el número de carbonos designado. En una de tales realizaciones, el alquilo es metilo. Los grupos alquilo ejemplares no limitantes incluyen etilo, n-propilo, isopropilo, y similares.

- 5 La expresión “alquilo sustituido”, como se usa aquí, se refiere a un alquilo como se define anteriormente que tiene uno o más sustitutos de halógeno (F, Cl, Br, I).

10 El término “heterociclo”, como se usa aquí, significa un anillo heterocíclico monocíclico o bicíclico que 3 a 10 miembros que está saturado, insaturado, no aromático, o aromático, que contiene hasta 4 heteroátomos. Cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, que puede estar cuaternizado; oxígeno; y azufre, incluyendo sulfóxido y sulfona. El heterociclo puede estar unido vía un átomo de nitrógeno, de azufre, o de carbono. Los heterociclos representativos incluyen piridilo, furilo, tiofenilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropirindinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, quinolinilo, -isoquinolinilo, -cromonilo, -coumarinilo, -indolilo, -indolizinilo, -benzo[b]furanilo, -benzo[b]tiofenilo, -indazolilo, -purinilo, -4H-quinolizinilo, -isoquinolilo, -quinolilo, -ftalazinilo, -naftiridinilo, -carbazolilo, y similares. El término heterociclo también incluye heteroarilos.

20 El término “arilo”, como se usa aquí, por sí mismo o parte de otro grupo, se refiere a sistemas anulares aromáticos monocíclicos y bicíclicos que tienen típicamente de seis a catorce átomos de carbono (es decir, arilo de C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>), tales como fenilo, 1-naftilo, y similares.

La expresión “arilo sustituido”, como se usa aquí, se refiere a un arilo como se define anteriormente que tiene uno o más sustitutos, incluyendo halógeno (F, Cl, Br, I) o alcoxi.

25 El término “aralquilo”, como se usa aquí, por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un alquilo como se define anteriormente que tiene uno o más sustituyentes arílicos. Los grupos aralquilo ejemplares no limitantes incluyen bencilo, feniletilo, difenilmetilo, y similares.

El término “alcoxi”, como se define aquí, por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un alquilo unido a un átomo de oxígeno terminal. Los grupos alcoxi ejemplares no limitantes incluyen metoxi, etoxi, y similares.

30 El término “alcano”, como se usa aquí, significa un hidrocarburo saturado no cíclico de cadena lineal o ramificado. El alcano de cadena lineal representativo incluye -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo. El alcano ramificado representativo incluye -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -tert-butilo, -isopentilo, -neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-metilhexilo, 2-metilhexilo, 3-metilhexilo, 4-metilhexilo, 5-metilhexilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,2-dimetilhexilo, 1,3-dimetilhexilo, 3,3-dimetilhexilo, 1,2-dimetilheptilo, 1,3-dimetilheptilo, y 3,3-dimetilheptilo.

35 El término “alqueno”, como se usa aquí, significa un hidrocarburo no cíclico de cadena lineal o ramificado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. El alqueno de cadena lineal y ramificado representativo incluye -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexenilo, -2-hexenilo, -3-hexenilo, -1-heptenilo, -2-heptenilo, -3-heptenilo, -1-octenilo, -2-octenilo, -3-octenilo, -1-nonenilo, -2-nonenilo, -3-nonenilo, -1-decenilo, -2-decenilo, -3-decenilo, y similares.

El término “cicloalcano”, como se usa aquí, significa un hidrocarburo cíclico saturado que tiene de 3 a 15 átomos de carbono. Los cicloalcanos representativos son ciclopropilo, ciclopentilo, y similares.

El término “alquilocicloalqueno”, como se usa aquí, por sí mismo o como parte de otro grupo, se refiere a un alquilo como se define anteriormente unido a un cicloalcano como se define anteriormente.

45 El término “cicloalqueno”, como se usa aquí, significa un hidrocarburo no aromático monocíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono en el sistema cíclico y de 5 a 15 átomos de carbono. Los cicloalquenos representativos incluyen -ciclopentenilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexenilo, -ciclohexadienilo, -cicloheptenilo, -cicloheptadienilo, -cicloheptatrienilo, -ciclooctenilo, -ciclooctadienilo, -ciclooctatrienilo, -ciclooctatetraenilo, -ciclononenilo -ciclononadienilo, -ciclodecenilo, -ciclodecadienilo, y similares. El término “cicloalqueno” también incluye bicicloalquenos y tricicloalquenos. El término “bicicloalqueno”, como se usa aquí, significa un sistema anular hidrocarbonado bicíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono en uno de los anillos y de 8 a 15 átomos de carbono. Los bicicloalquenos representativos incluyen, pero no se limitan a, -indenilo, -pentalenilo, -naftalenilo, -azulenilo, -heptalenilo, -1,2,7,8-tetrahidronaftalenilo, y similares. El término “tricicloalqueno”, como se usa aquí, significa un sistema anular hidrocarbonado tricíclico que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono en uno de los anillos y de 8 a 15 átomos de carbono. Los tricicloalquenos representativos incluyen, pero no se limitan a, -antraceno, -fenantreno, -fenaleno, y similares.

La expresión “anillo aromático”, como se usa aquí, significa un anillo carbocíclico aromático de 5 a 14 miembros, incluyendo sistemas anulares tanto monocíclicos, bicíclicos como tricíclicos. Los anillos aromáticos representativos son fenilo, naftilo, antrilo, y fenantrilo.

La frase “oxo”, como se usa aquí, significa un doble enlace a oxígeno, es decir, C=O.

- 5 El término “monosacárido”, como se usa aquí, significa cualquiera de los azúcares simples que sirven como bloques de construcción para los hidratos de carbono. Los ejemplos de monosacáridos incluyen glucosa, fucosa, galactosa, y manosa.

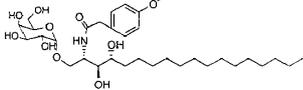
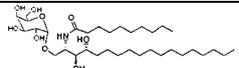
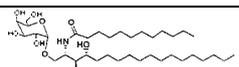
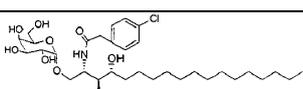
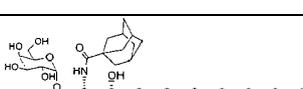
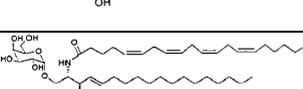
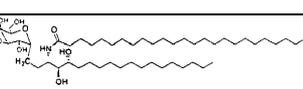
Otras glicosilceramidas para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los antígenos de glicosilceramidas en la Tabla 1.

10

Tabla 1

Compuesto	Grupo CHO	Estructura
DB04-1 (KRN7000)	$\alpha$ -D-Gal	
DB01-1	$\alpha$ -D-Gal	
DB02-1	$\alpha$ -D-Glu	
DB02-2	$\alpha$ -D-Man	
DB03-2	$\alpha$ -D-Gal	
DB03-3	$\alpha$ -D-Gal	
DB03-4	$\alpha$ -D-Gal	
DB03-5	$\alpha$ -D-Gal	
DB03-6	$\alpha$ -D-Gal	
DB04-11	$\alpha$ -D-Gal	
DB06-9	D-Gal ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2)D-Gal	
DB08-1	$\alpha$ -D-Gal	
DB08-2	$\alpha$ -D-Gal	

Compuesto	Grupo CHO	Estructura
DB08-3	$\alpha$ -D-Gal	
DB09-1	$\alpha$ -D-Gal	
DB09-2	$\alpha$ -D-Gal	
AH04-1 (OCH)	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-00	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-4	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-6	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-07	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-15	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-16	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-17	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-22	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-24	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-25	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-30	$\alpha$ -D-Gal	

Compuesto	Grupo CHO	Estructura
YTC03-33	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-34	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-35	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-39	$\alpha$ -D-Gal	
YTC03-41	$\alpha$ -D-Gal	
BF 1508-84	$\alpha$ -D-Gal	
RF03-1 (C-glicósido)	$\alpha$ -D-Gal	

En una bacteria modificada de la invención, un antígeno está “asociado físicamente” con una célula bacteriana para producir una “bacteria modificada”. Por “asociado físicamente” se quiere decir una interacción directa con la célula bacteriana, por ejemplo en intercalación en la membrana plasmática o en la superficie rica en lípidos de una pared de la célula bacteriana, por ejemplo en la pared de la célula micobacteriana, mediante métodos estándar conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. En ciertas realizaciones, el está físicamente asociado con una pared de la célula bacteriana a través de medios no covalentes. Por ejemplo, las células bacterianas que se hacen crecer en presencia de incorporaran el en sus paredes celulares. En un aspecto de la invención, un que está físicamente asociado a través de interacciones no covalentes a una célula bacteriana permanece extraíble de la pared de la célula bacteriana, y el glicolípido de tipo ceramida retiene su estructura química y actividad biológica tras la extracción. La detección del asociado físicamente con la pared celular se puede lograr por métodos conocidos por alguien de pericia en la técnica. Un complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana se puede obtener uniendo de forma estable un antígeno a una pared de la célula bacteriana. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención permiten la administración simultánea de un antígeno y una célula bacteriana, por ejemplo la presentación de una célula micobacteriana modificada con un glicolípido a una célula presentadora de antígeno. En ciertas realizaciones, se incorporan en una pared de la célula micobacteriana. La célula bacteriana, por ejemplo célula micobacteriana, puede ser una célula bacteriana muerta, viva y/o atenuada. En otra realización, la célula bacteriana puede ser recombinante.

Una bacteria modificada de la presente invención puede comprender un solo antígeno, o puede comprender mezclas heterogéneas de antígenos. Esto es, poblaciones de células bacterianas se pueden asociar físicamente con un solo antígeno, o se pueden asociar físicamente con una mezcla de antígenos.

Una bacteria modificada de la invención, por ejemplo un complejo bacteriano de la presente invención, o una composición o una composición de vacuna que la comprende, se puede marcar para que sea directamente detectable, o se puede usar conjuntamente con inmunorreactivos marcados secundarios que se unirán específicamente al compuesto, por ejemplo para fines de detección o de diagnóstico. Los marcadores de interés pueden incluir colorantes, enzimas, 15x : glicosilceramida

quimioluminiscentes, partículas, radioisótopos, u otro agente detectable directa o indirectamente. Como alternativa, se puede usar un marcador de segunda etapa, por ejemplo anticuerpo marcado dirigido contra uno de los constituyentes del compuesto de la invención.

Los ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa, y acetilcolina

esterasa.

Los ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados incluyen  $^3\text{H}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{To}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{217}\text{Ci}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ , etc. Los ejemplos de marcadores isotópicos no radioactivos adecuados incluyen  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Tr}$ , y  $^{56}\text{Fe}$ .

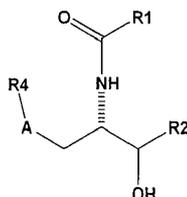
- 5 Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen un marcador de  $^{152}\text{Eu}$ , un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato, un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de aloficocianina, un marcador de o-faldehído, y un marcador de fluorescamina.

- 10 Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador de luminal, un marcador de isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa, y un marcador de aequorina.

Los ejemplos de agentes de contraste de resonancia magnética nuclear incluyen núcleos de metales pesados tales como Gd, Mn, y Fe.

- 15 Las técnicas típicas para unir los marcadores descritos anteriormente a glicolípidos de tipo ceramida o a polipéptidos se proporcionan por Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1-31 (1976), y Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1-40 (1977). Las técnicas de acoplamiento mencionadas más adelante son el método de glutaraldehído, el método de peryodato, el método de dimaleimida, el método de éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida.

En realizaciones adicionales, la glicosilceramida, o análogo de la misma, comprende la Fórmula I:



(Fórmula I)

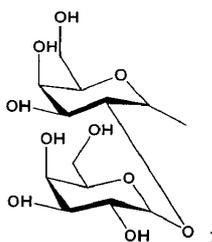
- 20 en la que R1 es un alcano de  $\text{C}_1\text{-C}_{27}$  o alqueno de  $\text{C}_2\text{-C}_{27}$  lineal o ramificado; o R1 es  $-\text{C}(\text{OH})\text{-R}_3$ , en el que R3 es un alcano de  $\text{C}_1\text{-C}_{26}$  o alqueno de  $\text{C}_2\text{-C}_{26}$  lineal o ramificado; o R1 es un alcano o alqueno de  $\text{C}_6\text{-C}_{27}$  en el que (i) el alcano o alqueno de  $\text{C}_6\text{-C}_{27}$  está sustituido con un cicloalcano de  $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ , cicloalqueno de  $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ , heterociclo, o anillo aromático, o (ii) el alcano o alqueno de  $\text{C}_6\text{-C}_{27}$  incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo de  $\text{C}_6\text{-C}_{27}$ , un cicloalcano de  $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ , cicloalqueno de  $\text{C}_5\text{-C}_{15}$ , heterociclo, o anillo aromático;

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- 25 (a)  $-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$ ,  
 (b)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$ ,  
 (c)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  
 (d)  $-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$ ,  
 (e)  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{CH}_2)_x\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,

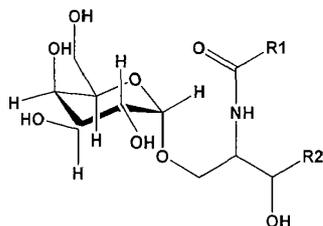
- 30 en los que X es un número entero que oscila de 4-17;

R4 es un monosacárido enlazado en  $\alpha$  o enlazado en  $\beta$ , o cuando R1 es un alcano  $\text{C}_1\text{-C}_{27}$  lineal o ramificado, R4 es:



y A es O o  $-\text{CH}_2$ .

En otra realización, la  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, comprende la Fórmula II:



(Fórmula II)

en la que

5 R1 es un alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado; o R1 es -C(OH)-R3, en el que R3 es alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub> lineal o ramificado; y

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

(a) -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

(b) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

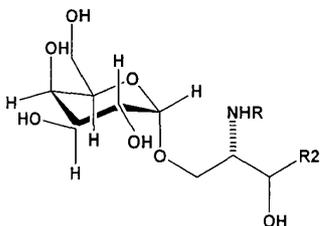
(c) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

10 (d) -CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

(e) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

en los que X es un número entero que oscila de 4-17.

En otra realización, la  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, comprende la Fórmula III:



(Fórmula III)

15 en la que R es H o -C(O)R1, en el que R1 es alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado; o R1 es -C(OH)-R3, en el que R3 es alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub> lineal o ramificado; o R1 es un alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> en el que (i) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> está sustituido con un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático, o (ii) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> incluye, dentro de la cadena de alquilo o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub>, un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático; o R1 es un -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R5, en el que n es un número entero que oscila de 0-5, y R5 es -C(O)OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituido, un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo, y

20

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

(a) -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

25 (b) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

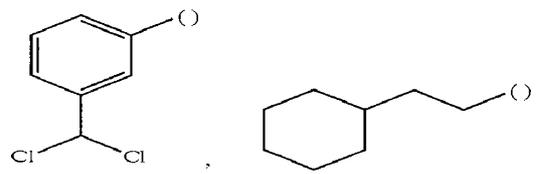
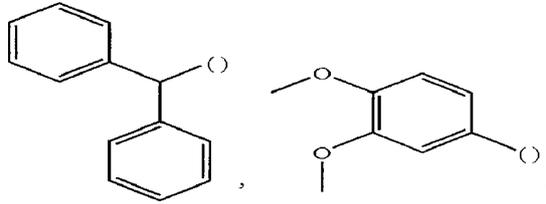
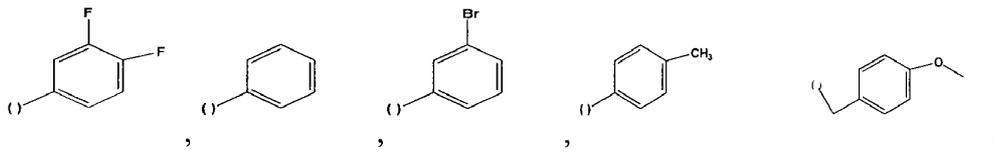
(c) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

(d) -CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,

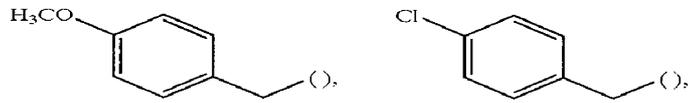
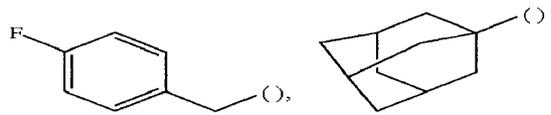
(e) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,

en los que X es un número entero que oscila de 4-17.

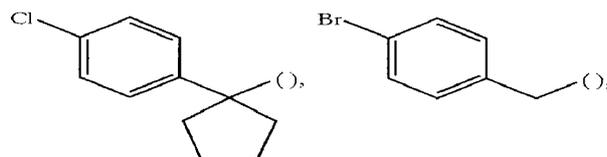
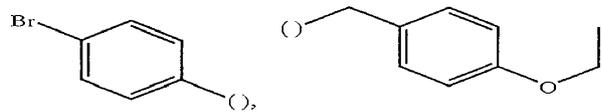
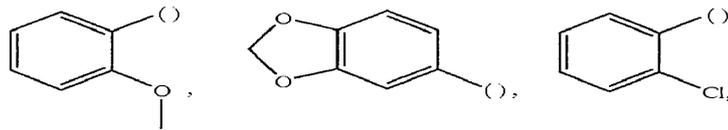
30 En una realización adicional, R1 se selecciona del grupo que consiste en



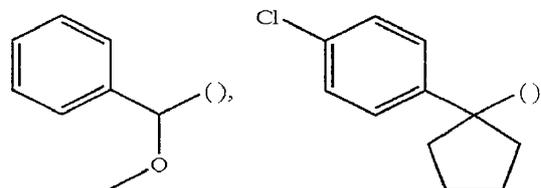
5



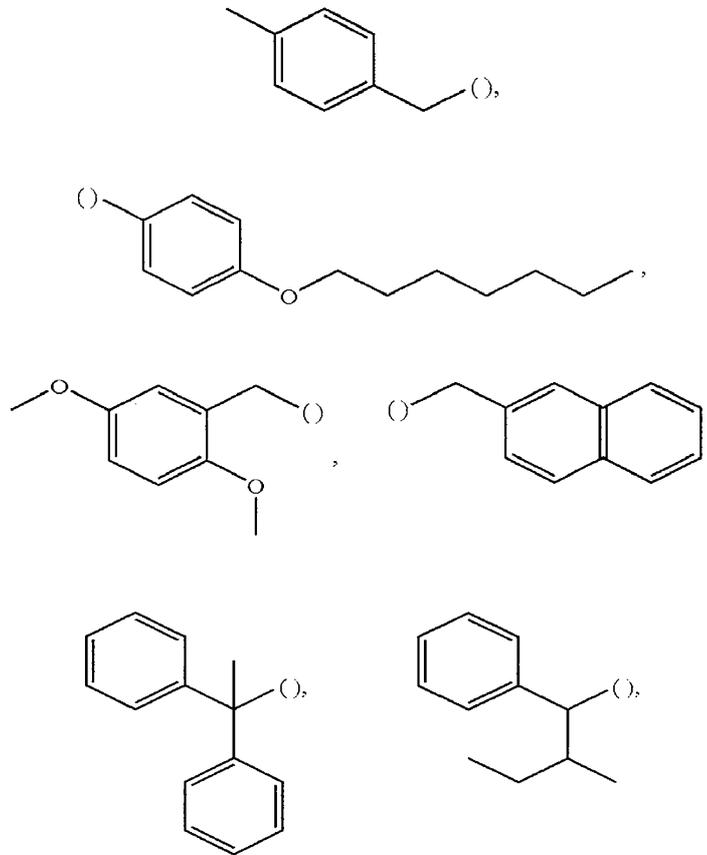
10



15 -continuación

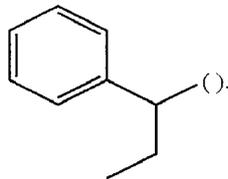


5



y

10



en las que ( ) representa el punto de unión de R1 al compuesto de Fórmula III.

15

En otra realización, la  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, comprende (2S,3S,4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (KRN7000) o (2S,3S)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3-octadecanodiol).

En otra realización, la  $\alpha$ -galactosilceramida, o análogo de la misma, comprende (2S,3S,4R)-1-CH<sub>2</sub>-( $\alpha$ -galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol ( $\alpha$ -C-GalCer).

Otros ejemplos no limitantes de glicosilceramidas se describen en Tsuji et al., patente U.S. n° 7.273.852; Taniguchi et al., patente U.S. n° 6.531.453; e Higa et al., patente U.S. n° 5.936.076.

20

Células T asesinas naturales (NKT)

25

El sistema inmune natural conecta un balance complejo entre respuestas inmunes protectoras muy agresivas frente a patógenos extraños y la necesidad de mantener tolerancia a tejidos normales. En años recientes ha habido un reconocimiento creciente de que las interacciones entre muchos tipos celulares diferentes contribuyen a mantener este balance. Tales interacciones pueden dar como resultado, por ejemplo, respuestas polarizadas con producción de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, interferón-gamma) por células T de tipo TH1, o la producción de interleucina-4 (IL-4) por células T de tipo TH2 que suprimen la actividad de TH1. En un número de modelos de animales diferentes, se ha mostrado que la polarización de células T hacia TH1 favorece la inmunidad protectora frente a tumores o a patógenos infecciosos, mientras que la polarización de células T hacia TH2 puede ser un factor

crítico para prevenir el desarrollo de enfermedad autoinmune mediada por células. La condición que determina si la estimulación inmune dará como resultado una inmunidad agresiva mediada por células, o una disminución de tales respuestas, están muy localizadas, en el sentido de que cada tejido comprende un conjunto distintivo de células presentadoras de antígeno (APC) y estirpes linfocíticas que interactúan para favorecer diferentes respuestas inmunes. Por ejemplo, en condiciones óptimas, las células dendríticas (DC) situadas en un tejido normal pueden representar predominantemente una estirpe y etapa de maduración que favorecen las interacciones tolerogénicas y sirven como una barrera frente a la autoinmunidad mediada por células, mientras que un tumor o sitio de infección atraerá a células dendríticas mieloides maduras que estimulan respuestas inmunes potentes mediadas por células.

Las células NKT restringidas por CD1d son una clase única de células T no convencionales que parece desempeñar un papel importante definiendo el resultado de la estimulación inmune en el entorno local. Comparten con la clase más grande de células NKT la expresión de marcadores de estirpes de células T como de células asesinas naturales (NK). Como tales, las células NKT son consideradas como parte de la inmunidad innata, como las células NK, y en seres humanos su frecuencia en individuos normales puede ser tan alta como 2,0% de los linfocitos T totales (Gumperz et al., *J Exp Med* 195:625 (2002); Lee et al., *J Exp Med* 195:637 (2002)).

Las células NKT restringidas por CD1d se distinguen de otras células NKT por su especificidad por antígenos lipídicos y glicolipídicos presentados por la molécula monomórfica del MHC clase Ib, CD1d (Kawano et al., *Science* 278:1626-1629 (1997)). CD1d es una molécula no codificada por el MHC que se asocia con  $\beta$ 2-microglobulina y está estrechamente relacionada con moléculas clásicas del MHC clase I. CD1d tiene un bolsillo hidrófobo de unión a antígeno que está especializado para la unión de las cadenas hidrocarbonadas de colas lipídicas o péptidos hidrófobos. Zeng et al., *Science* 277: 339-345, (1997). Se sabe que CD1d se une al esfingolípido  $\alpha$ -glicosilado derivado de esponja marina,  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer), y a moléculas relacionadas tales como antígenos glicolipídicos de tipo ceramida, con galactosa o glucosa enlazada mediante  $\alpha$ , pero no manosa. Kawano et al., *Science* 278:1626-1629 (1997); y Zeng et al., *Science* 277: 339-345 (1997). Como se explica aquí, la capacidad para activar células NKT restringidas por CD1d mediante estimulación con  $\alpha$ -GalCer o moléculas relacionadas unidas a CD1d de células presentadoras de antígeno ha facilitado enormemente el análisis funcional de este subconjunto de células T no convencionales. En ausencia de inflamación, se ha mostrado que las células NKT restringidas por CD1d se localizan preferentemente en ciertos tejidos como el timo, hígado y médula ósea (Wilson et al., *Trends Mol Med* 8:225 (2002)), y la actividad antitumoral de células NKT se ha investigado principalmente en metástasis hepática de ratones.

Las células NKT tienen una capacidad inusual de segregar citocinas tanto TH1 como TH2, y se han documentado funciones citotóxicas así como reguladoras potentes en inflamación, autoinmunidad e inmunidad tumoral (Bendelac et al., *Science* 268:863 (1995); Chen y Paul, *J Immunol* 159:2240 (1997); y Exley et al., *J Exp Med* 186:109 (1997)).

Entre las células NKT restringidas por CD1d se encuentra un subconjunto, denominado aquí como "células iNKT", que expresa un receptor de células  $\alpha\beta$ T (TCR) muy conservado. En seres humanos, este TCR invariante comprende  $V\alpha 24\alpha 15$  en asociación con  $V\beta 11$ , mientras que, en ratones, el receptor comprende las  $V\alpha 14\alpha 18$  y  $V\beta 8.2$  muy homólogas. Otras células NKT restringidas por CD1d expresan TCR más variable. Tanto las clases invariantes de TCR como variantes de TCR de células T restringidas por CD1d se pueden detectar mediante la unión de tetrámeros de CD1d cargados con  $\alpha$ -GalCer (Benlagha et al., *J Exp Med* 191:1895-1903 (2000); Matsuda et al., *J Exp Med* 192:741-754 (2000); y Karadimitris et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3294-3298 (2001)). Las células NKT restringidas por CD1d, como se definen en esta solicitud (NKT restringidas por CD1d), incluyen células que expresan TCR invariante o variante y que se unen o son activadas por CD1d cargado con  $\alpha$ -GalCer o con antígenos glicolipídicos de tipo ceramida relacionados. Las células NKT restringidas por CD1d, como se definen en esta solicitud (CD1d-NKT), incluyen células que expresan TCR invariante o variante y que se unen o son activadas por CD1d cargado con  $\alpha$ -GalCer o con esfingolípidos relacionados que tienen galactosa o glucosa enlazada mediante  $\alpha$ , incluyendo moléculas tales como OCH, que difieren de  $\alpha$ -GalCer por tener una base de esfingosina de cadena larga acortada (C5 frente a C14) y la cadena acílica (C24 frente a C26) (Miyamoto et al., *Nature* 413:531-4 (2001)).

Se ha mostrado que las NKT restringidas por CD1d tienen actividad citotóxica directa frente a dianas que expresan CD1d. Sin embargo, es probable que el efecto de las NKT restringidas por CD1d sobre las respuestas inmunes se amplifique a través del reclutamiento de otros linfocitos, ya sea por interacción directa o, quizás incluso más importantemente, por reclutamiento indirecto a través de interacción con DC. NKT restringidas por CD1d tienen la capacidad única de segregar grandes cantidades de IL-4 e IFN- $\gamma$  prematuramente en una respuesta inmune. La secreción de IFN- $\gamma$  induce activación de DC, que producen interleucina-12 (IL-12). IL-12 estimula más secreción de IFN- $\gamma$  por células NKT, y también conduce a la activación de células NK que segregan más IFN- $\gamma$ .

Puesto que las NKT restringidas por CD1d son capaces de segregar rápidamente grandes cantidades tanto de IL-4 como de IFN- $\gamma$ , la polarización de las respuestas inmunes dependerá de si predomina el efecto de las citocinas IFN- $\gamma$  proinflamatoria o IL-4 antiinflamatoria. Se ha dado a conocer que esto es, en parte, función de la frecuencia relativa de diferentes subconjuntos de NKT restringidas por CD1d. Estos subconjuntos incluyen (i) una población de NKT restringidas por CD1d invariante, que es negativa tanto para CD4 como para CD8 y que da lugar predominantemente a una respuesta de tipo TH1 que incluye la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  proinflamatorios, y (ii) una población distinta de NKT restringidas por CD1d que es CD4+ y que da lugar a una respuesta tanto de tipo TH1

como de tipo TH2 que incluye la secreción de las citocinas antiinflamatorias de tipo Th2 IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Lee et al., J Exp Med 195:637-41 (2002); y Gumperz et al., J Exp Med 195:625-36 (2002)). Además, la actividad de las células NKT está modulada diferentemente dependiendo del glicolípido de tipo ceramida particular unido a CD1d (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente US nº 2006/0052316). Los factores locales que influyen en la activación de subconjuntos de NKT restringidas por CD1d incluyen el entorno citocínico y, de forma importante, las DC que son reclutadas hacia ese entorno.

Se ha mostrado que una familia de glicolípidos de tipo ceramida (es decir,  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) y  $\alpha$ -glicosilceramidas relacionadas) estimula fuertes respuestas restringidas por CD1d por células NKT murinas (Kawano et al., 1997). Estos compuestos contienen un azúcar de hexosa  $\alpha$ -anomérica (galactosa o glucosa que es activa para el reconocimiento de células NKT), que los distingue de las ceramidas que aparecen normalmente en tejidos de mamífero, que contienen solamente azúcares  $\beta$ -anoméricos. Se sabe que estos compuestos aparecen de forma natural en esponjas marinas, fuente a partir de la cual se aislaron originalmente, y fueron de interés para los inmunólogos cuando se demostró que  $\alpha$ -GalCer indujo rechazo de tumor drástico como resultado de la activación inmune cuando se inyectó en ratones que portan tumores (Kobayashi et al., Oncol. Res. 7:529-534 (1995)). Subsiguientemente, esta actividad se enlazó con la actividad de  $\alpha$ -GalCer para activar rápidamente células NKT a través de un mecanismo dependiente de CD1d. Ahora se ha mostrado que  $\alpha$ -GalCer se une a CD1d, creando así un complejo molecular que tiene una afinidad medible para los TCRs de células NKT (Naidenko et al., J Exp. Med. 190:1069-1080 (1999); Matsuda et al., J Exp. Med. 192:741 (2000); Benlagha et al., J Exp. Med. 191:1895-1903 (2000)). De este modo,  $\alpha$ -GalCer proporciona un agente potente que puede permitir la activación de la mayoría de células NKT tanto *in vitro* como *in vivo*.

La  $\alpha$ -GalCer activadora de NKT más ampliamente estudiada, denominada KRN7000 en la bibliografía, es una molécula sintética que tiene una estructura similar a formas naturales de  $\alpha$ -GalCer que se aislaron originalmente de una esponja marina en base a su actividad anticancerosa en roedores (Kawano et al., Science 278:1626-1629 (1997); Kobayashi et al., 1995; Iijima et al., Bioorg. Med. Chem. 6:1905-1910 (1998); Inoue et al., Exp. Hematol. 25:935-944 (1997); Kobayashi et al., Bioorg. Med. Chem. 4:615-619 (1996a) y Biol. Pharm. Bull. 19:350-353 (1996b); Uchimura et al., Bioorg. Med. Chem. 5:2245-2249 (1997a); Uchimura et al., Bioorg. Med. Chem. 5:1447-1452 (1997b); Motoki et al., Biol. Pharm. Bull. 19:952-955 (1996a); Nakagawa et al., Oncol. Res. 10:561-568 (1998); Yamaguchi et al., Oncol. Res. 8:399-407 (1996)). Otro análogo sintético de KRN7000 con una base de esfingosina truncada mostró una capacidad mejorada para suprimir la autoinmunidad en un modelo de ratón de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (Miyamoyo et al., Nature 413:531-534 (2001)). En la patente U.S. nº 5.936.076 se identifican otras variantes alteradas en la base esfingosínica de  $\alpha$ -GalCer.

Un cuerpo importante de bibliografía que data desde noviembre de 1997 hasta la actualidad ha estudiado el mecanismo mediante el cual KRN7000 activa el sistema inmune de mamíferos (Kawano et al., Science 278:1626-1629 (1997); Benlagha et al., J Exp. Med. 191:1895-1903 (2000); Burdin et al., Eur. J Immunol. 29:2014-2025 (1999); Crowe et al., J. Immunol. 171:4020-4027 (2003); Naidenko et al., J Exp. Med. 190:1069-1080 (1999); Sidobre et al., J. Immunol. 169:1340-1348 (2002); Godfrey et al., Immunol. Today 21:573-583 (2000); Smyth y Godfrey, Nat. Immunol. 1:459-460 (2000)). Estos estudios muestran uniformemente que el mecanismo proximal para el efecto de KRN7000 es la unión de este compuesto a una proteína CD1d, que se expresa en la mayoría de células hematopoyéticas, así como también algunas estirpes de células epiteliales y otras estirpes celulares. La unión de KRN7000 a CD1d crea un complejo molecular que es reconocido con afinidad elevada por los receptores de antígeno de células T (TCRs) de un subconjunto de linfocitos T denominados células T asesinas naturales (células NKT). El reconocimiento del complejo KRN7000/CD1d conduce a la activación rápida de las células NKT, que residen en el hígado, bazo y otros órganos linfoides y tienen el potencial de viajar a potencialmente cualquier tejido. Las células NKT activadas segregan rápidamente un amplio intervalo de quimiocinas y otras citocinas, y también tienen la capacidad de activar otros tipos celulares tales como células dendríticas y células asesinas naturales (NK). Se ha mostrado que la cadena de sucesos que sigue a la activación de células NKT por los complejos de KRN7000/CD1d tiene muchos efectos potenciales aguas abajo en el sistema inmune. Por ejemplo, en el marco de ciertos tipos de infecciones, esto conduce a un efecto adyuvante que estimula la inmunidad adaptativa frente a la infección y promueve la curación. O, en el marco de ciertos tipos de enfermedades autoinmunes, la activación de células NKT por KRN7000 puede alterar el curso de la respuesta autoinmune de una manera que suprime la destrucción tisular y mejora la enfermedad.

Las funciones de los linfocitos NKT siguen sin resolverse completamente, pero una variedad de estudios apunta a un papel importante para estas células T en la regulación de respuestas inmunes. Un sello distintivo de las células NKT es su producción rápida de grandes cantidades de tanto IL-4 como de IFN- $\gamma$  por la estimulación de sus  $\alpha$ - $\beta$ TCRs (Exley et al., J. Exp. Med. 186:109 (1997)). De hecho, su identificación como quizás la célula principal responsable de la producción temprana de IL-4 durante la activación inmune sugiere que pueden desempeñar un papel crítico a la hora de polarizar respuestas de células T de tipo 2 (Th2). A este respecto, no es sorprendente que se ha identificado que las células NKT desempeñan un papel significativo en la determinación del resultado de infecciones con una variedad de diferentes patógenos en ratones.

Un número de mecanismos indirectos contribuye al efecto protector de células NKT restringidas por CD1d. La activación de células NKT mediante administración de  $\alpha$ -GalCer *in vivo* da como resultado la activación

concomitante de células NK (Eberl y MacDonald, Eur. J. Immunol. 30:985-992 (2000); y Carnaud et al., J. Immunol. 163:4647-4650 (1999)). En ratones deficientes en células NKT,  $\alpha$ -GalCer es incapaz de inducir actividad citotóxica por células NK. Las células NKT también potencian la inducción de células T citotóxicas clásicas restringidas por MHC clase I (Nishimura et al., Int Immunol 12:987-94 (2000); y Stober et al., J Immunol 170:2540-8 (2003)).

- 5 La disponibilidad de un antígeno definido, por ejemplo  $\alpha$ -GalCer y antígenos relacionados, que se puede emplear para activar específicamente células NKT restringidas por CD1d ha hecho posible examinar el papel de estas células T no convencionales en una variedad de respuestas inmunes.

La administración de alfa-GalCer tiene un efecto sobre un número de diferentes infecciones microbianas, incluyendo efectos protectores en infecciones de malaria murina, fúngicas y del virus de la hepatitis B. Kakimi et al., J Exp Med 192:921-930 (2000); Gonzalez-Aseguinolaza et al., Proc Natl Acad Sci USA 97:8461-8466 (2000); y Kawakami et al., Infect Immun 69:213-220 (2001). También se han observado efectos drásticos de la administración de  $\alpha$ -GalCer en modelos de animales de inmunidad tumoral. Por ejemplo, la estimulación con  $\alpha$ -GalCer suprime las metástasis pulmonar y hepática de una manera dependiente de NKT (Smyth et al., Blood 99:1259 (2002)). Además, se ha mostrado que  $\alpha$ -GalCer tiene un efecto protector frente a ciertas enfermedades autoinmunes, incluyendo diabetes de tipo 1 y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un sistema de modelo murino bien conocido para la esclerosis múltiple). Hong S et al. Nat. Med. 7:1052-1056 (2001) y Miyamoto K. et al., Nature 413:531-534 (2001).

#### Ensayos de actividad de NKT

La capacidad de una composición de la presente invención para modular una respuesta inmune se puede determinar fácilmente mediante un ensayo *in vitro*. Las células NKT para uso en los ensayos incluyen estirpes de células NKT transformadas, o células NKT que se aíslan de un mamífero, por ejemplo de un ser humano o de un roedor, tal como un ratón. Las células NKT se pueden aislar de un mamífero clasificando células que se unen a tetrameros de CD1d: $\alpha$ -GalCer. Véanse, por ejemplo, Benlagha et al., J Exp Med 191:1895-1903 (2000); Matsuda et al., J Exp Med 192:741-754 (2000); y Karadimitris et al., Proc Natl Acad Sci USA 98:3294-3298 (2001). Un ensayo adecuado para determinar si un compuesto o composición de la presente invención es capaz de modular la actividad de células NKT se realiza cocultivando células NKT y células presentadoras de antígeno, añadiendo el compuesto o composición particular de interés al medio de cultivo que selecciona como diana directamente a las células presentadoras de antígeno o a las células NKT, y midiendo la producción de IL-4 o IFN- $\gamma$ . Un incremento o disminución significativa en la producción de IL-4 o IFN- $\gamma$  sobre el mismo cocultivo de células en ausencia del compuesto o composición de la invención, o en presencia de un compuesto o composición de la invención con un anticuerpo no seleccionador de diana, indica estimulación, o inhibición, de células NKT.

Las células NKT empleadas en los ensayos se incuban en condiciones adecuadas para la proliferación. Por ejemplo, un hibridoma de células NKT se incuba adecuadamente a alrededor de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en un medio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 5 x 10<sup>-5</sup> M de 2-mercaptoetanol). Se pueden añadir diluciones en serie del compuesto al medio de cultivo de células NKT. Las concentraciones adecuadas del compuesto añadidas a las células NKT estarán típicamente en el intervalo de 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-6</sup> M. El uso de numerosas dosis de antígeno y APC, que dan una activación de células NKT ligeramente por debajo de la máxima, se puede usar para detectar la estimulación o inhibición de respuestas de células NKT por los compuestos de la invención.

Como alternativa, en lugar de medir una proteína expresada, tal como IL-4 o IFN- $\gamma$ , la modulación de la activación de células NKT se puede determinar mediante cambios en la proliferación de células T dependiente del antígeno, según se mide mediante técnicas de radiomarcaje como se reconocen en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir un nucleótido marcado (por ejemplo, tritiado) en un medio de cultivo de ensayo. La incorporación de tal nucleótido etiquetado en el ADN sirve como una medida de la proliferación de células T. Este ensayo no es adecuado para células NKT que no requieren la presentación del antígeno para crecer, por ejemplo hibridomas de células NKT. Una diferencia en el nivel de proliferación de células T tras el contacto con el compuesto o composición de la invención indica que el complejo modula la actividad de las células T. Por ejemplo, una disminución en la proliferación de células NKT indica que el compuesto o composición puede suprimir una respuesta inmune. Un incremento en la proliferación de células NKT indica que el compuesto o composición puede estimular una respuesta inmune.

Adicionalmente, se puede usar el ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr para determinar la actividad citotóxica.

50 Estos ensayos *in vitro* se pueden emplear para seleccionar e identificar complejos de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana, y composiciones que los comprenden, que son capaces de modular apropiadamente una respuesta inmune. Los ensayos descritos anteriormente, por ejemplo medida de la producción de IL-4 o IFN- $\gamma$  o la proliferación de células NKT, se emplean para determinar si el contacto con el compuesto modula la activación de células T.

55 Además, o como alternativa, se pueden usar experimentos de exposición de inmunización en animales, por ejemplo ratones, conejos, primates no humanos, para identificar complejos de glicolípidos de tipo ceramida/célula bacteriana, y composiciones que los comprenden, que son capaces de modular apropiadamente una respuesta inmune y que pueden ser eficaces para el tratamiento y/o prevención de enfermedades bacterianas, por ejemplo tuberculosis, en

seres humanos. Por ejemplo, los ratones se pueden vacunar con el complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana, por ejemplo BCG/ $\alpha$ GalCer o BCG/ $\alpha$ -C-GalCer (por ejemplo,  $5 \times 10^6$  CFU/ratón), y se pueden exponer a una bacteria infecciosa, por ejemplo la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv.

Métodos de tratamiento

5 Una bacteria modificada, composición, o composición de vacuna de la presente invención se puede usar tanto para prevenir la enfermedad como también para tratar terapéuticamente una enfermedad, por ejemplo una enfermedad vírica, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, una enfermedad alérgica, o una enfermedad proliferativa, por ejemplo cáncer. En individuos que ya sufren una enfermedad, la presente invención se usa para estimular o modular adicionalmente el sistema inmune del animal, reduciendo o eliminando  
10 así los síntomas asociados con esa enfermedad o trastorno. Como se define aquí, "tratamiento" se refiere al uso de una o más bacterias modificadas, composiciones, o composiciones de vacuna de la presente invención para prevenir, curar, retrasar o reducir la gravedad de síntomas de una enfermedad dada en un animal, y/o para no dar como resultado el empeoramiento de la enfermedad a lo largo de un período de tiempo específico en un animal que ya ha contraído la enfermedad y de este modo necesita terapia.

15 El término "prevención" o "prevenir" se refiere al uso de una o más bacterias modificadas, composiciones, o composiciones de vacuna de la presente invención para generar inmunidad en un animal que todavía no ha contraído una enfermedad, previniendo o reduciendo de ese modo los síntomas de la enfermedad si el animal está dispuesto más tarde a desarrollar esa enfermedad. Los métodos de la presente invención se pueden denominar por lo tanto como métodos terapéuticos o métodos preventivos o profilácticos. No es necesario que cualquier bacteria  
20 modificada, composición o composición de vacuna de la presente invención proporcione inmunidad total frente a un agente de enfermedad, o cure o elimine totalmente todos los síntomas de la enfermedad.

Como se usa aquí, un "animal que necesita inmunidad terapéutica y/o preventiva" se refiere a un individuo para el cual es deseable tratar, es decir, prevenir, curar, retrasar, o reducir, la gravedad de ciertos síntomas de la enfermedad, y/o no dar como resultado el empeoramiento de la enfermedad a lo largo de un período de tiempo  
25 específico.

Una "cantidad eficaz" es aquella cantidad cuya administración a un individuo, ya sea en una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento y/o prevención. Una cantidad es eficaz, por ejemplo, cuando su administración da como resultado una incidencia o gravedad reducida de los síntomas de la enfermedad asociados con *M. tuberculosis* con respecto a un individuo no tratado, según se determina alrededor de dos semanas tras la  
30 exposición a *M. tuberculosis* infecciosa. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratar, del grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, ser humano, primate no humano, primate, etc.), de la capacidad de respuesta del sistema inmune del individuo, del grado de protección deseado, de la formulación de la vacuna, de una evaluación profesional de la situación médica, y de otros factores relevantes. Se espera que la cantidad eficaz caerá en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de ensayos habituales.

35 El término "vertebrado" pretende englobar un "vertebrado" singular así como múltiples "vertebrados", y comprende mamíferos y pájaros, así como peces, reptiles, y anfibios.

El término "mamífero" pretende englobar un "mamífero" singular y múltiples "mamíferos", e incluye, pero no se limita a, seres humanos; primates tales como simios, monos (por ejemplo, búho, ardilla, cebú, rhesus, verde africano, patas, cinomolgo, y cercopiteco), orangutanes, babuinos, gibones, y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos;  
40 félidos tales como gatos, leones, y tigres; equinos tales como caballos, burros, y cebras, animales para alimentación tales como vacas, cerdos, y ovejas; ungulados tales como ciervo y jirafas; úrsidos tales como osos; y otros tales como conejos, ratones, hurones, focas, ballenas. En particular, el mamífero puede ser un sujeto humano, un animal para alimentación, o un animal de compañía.

El término "pájaro" pretende englobar un "pájaro" singular y múltiples "pájaros", e incluye, pero no se limita a, pájaros de agua silvestres tales como patos, gansos, charranes, pardelas, y gaviotas; así como especies aviares domésticas  
45 tales como pavos, pollos, codorniz, faisanes, gansos, y patos. El término "pájaro" también engloba pájaros paseriformes tales como estorninos y periquitos.

La invención permite métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un animal que necesite de tal tratamiento o prevención, que comprenden administrar a un animal con esa enfermedad, o que tiene tendencia a contraer esa  
50 enfermedad, una composición que comprende una célula bacteriana, por ejemplo una célula micobacteriana, y un antígeno de glicolípido de tipo ceramida, en la que dicho glicolípido de tipo ceramida se incorpora en la pared celular de la célula bacteriana como se describe aquí. En realizaciones adicionales, la célula bacteriana se puede usar como un vehículo para el suministro de antígenos desde otro patógeno o desde un antígeno específico de un tumor.

La presente invención también permite un método para modular, es decir, ya sea estimular o inhibir, una respuesta inmune, que comprende administrar a un animal una cantidad eficaz de una composición que comprende una célula  
55 bacteriana, por ejemplo una célula micobacteriana, y un glicolípido de tipo ceramida, en la que dicho glicolípido de tipo ceramida se incorpora en la pared celular de la célula bacteriana como se describe aquí.

- 5 En ciertas realizaciones, los métodos habilitados incluyen tratar una enfermedad, por ejemplo una enfermedad micobacteriana, en un animal con la enfermedad, administrando al animal con la enfermedad una composición de la invención, por ejemplo una bacteria, por ejemplo una micobacteria modificada, por ejemplo una célula BCG, asociada físicamente con un glicolípido de tipo ceramida, por ejemplo incorporado en su pared celular de una manera no covalente, en una cantidad suficiente para alterar la progresión de dicha enfermedad.
- 10 En otras realizaciones, los métodos habilitados incluyen prevenir una enfermedad, por ejemplo una enfermedad micobacteriana, en un animal que necesite prevención de la enfermedad, administrando al animal que lo necesite una composición de la invención, por ejemplo una micobacteria modificada, por ejemplo una célula BCG, asociada físicamente con un glicolípido de tipo ceramida, por ejemplo incorporado en su pared celular de una manera no covalente, en una cantidad suficiente para potenciar una respuesta inmune frente a la bacteria o el antígeno codificado por la bacteria, con respecto a la administración de una célula bacteriana no modificada que carece del glicolípido de tipo ceramida.
- 15 En realizaciones adicionales, la enfermedad que se está tratando o previniendo puede ser, sin limitación, una enfermedad infecciosa vírica, bacteriana, fúngica, o parasitaria, una alergia, o una enfermedad proliferativa tal como cáncer. Más específicamente, la enfermedad puede ser, por ejemplo, tuberculosis, enfermedad de Hansen, tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea, enfermedad diseminada, peste bubónica, peste pulmonar, tularemia, legionelosis, carbunco, fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea, toxinfeción alimentaria, listeriosis, malaria, VIH, VIS, HPV, RSV, gripe, hepatitis (HAV, HBV, y HCV).
- 20 En otra realización, los métodos habilitados incluyen potenciar una respuesta inmune frente a una célula bacteriana, por ejemplo una célula micobacteriana, en un animal, que comprende administrar al animal una bacteria modificada de la invención, por ejemplo glicolípido de tipo ceramida incorporado en la pared celular de una célula bacteriana; y en los que la bacteria modificada se administra en una cantidad suficiente para potenciar respuestas de células T CD8 específicas del antígeno frente a un antígeno, y potenciar la actividad de células T asesinas naturales (NKT) en dicho mamífero.
- 25 En otra realización, los métodos habilitados incluyen la administración simultánea de un adyuvante de glicolípido de tipo ceramida y una célula bacteriana, por ejemplo una célula micobacteriana, a una célula presentadora de antígeno mediante la unión de forma estable de un adyuvante de glicolípido de tipo ceramida a la pared celular de la célula bacteriana para obtener un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana; y administrar entonces el complejo de glicosilceramida/célula bacteriana a la célula presentadora de antígeno.
- 30 Como se usa aquí, un “sujeto que lo necesita” se refiere a un individuo para el cual es deseable tratar, es decir, prevenir, curar, retrasar, o reducir la gravedad de los síntomas de una enfermedad, por ejemplo una infección bacteriana, y/o no dar como resultado el empeoramiento de una enfermedad a lo largo de un período de tiempo específico.
- 35 Según estos métodos, una bacteria modificada, composición, o composición de vacuna de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para alterar la progresión de una enfermedad.
- 40 “Inmunización” (administración de una vacuna) es un procedimiento habitual y ampliamente extendido, y las vacunas de la invención usadas pueden ser esencialmente cualquier preparación destinada a la profilaxis inmunológica activa, incluyendo, sin limitación, preparaciones de microbios muertos de cepas virulentas, y microbios vivos de cepas atenuadas. *Stedman’s Illustrated Medical Dictionary* (24<sup>a</sup> edición), Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1526 (1982). En algunos casos, las vacunas se deben administrar más de una vez a fin de inducir una protección eficaz; por ejemplo, las vacunas antitoxínicas conocidas deben administrarse en múltiples dosis.
- 45 Los términos “sensibilización” o “primario” y “refuerzo” o “revacunación”, como se usan aquí, se refieren a las inmunizaciones iniciales y subsiguientes, respectivamente, es decir, según las definiciones que estos términos tienen normalmente en inmunología. Sin embargo, en ciertas realizaciones, por ejemplo cuando el componente de sensibilización y el componente de refuerzo están en una única formulación, las inmunizaciones iniciales y subsiguientes pueden no ser necesarias ya que tanto las composiciones de “sensibilización” como de “refuerzo” se administran simultáneamente. Véanse también McShane H, *Curr Opin Mol Ther* 4(1):13-4 (2002), y Xing Z y Charters TJ, *Expert Rev Vaccines* 6(4):539-46 (2007), ambos incorporados aquí como referencia.
- 50 En otras realizaciones, una o más composiciones de la presente invención se utilizan en un régimen de “sensibilización-refuerzo”. En estas realizaciones, una o más composiciones de vacuna de la presente invención se suministran a un vertebrado, estimulando de ese modo la respuesta inmune del vertebrado a un antígeno bacteriano, por ejemplo un antígeno micobacteriano, y después se utiliza como vacunación de refuerzo una segunda composición inmunogénica. Para estimular la inmunidad, se usan una o más composiciones de vacuna de la presente invención, y después se usa una segunda composición inmunogénica, por ejemplo una vacuna bacteriana
- 55 recombinante, para reforzar la respuesta inmune antibacteriana. Las composiciones de vacuna pueden comprender uno o más vectores para la expresión de uno o más genes que codifican polipéptidos inmunogénicos como se describen aquí.
- La presente invención permite además un método para generar, potenciar o modular una respuesta inmune

5 protectora y/o terapéutica frente a un patógeno, por ejemplo un patógeno bacteriano, fúngico, vírico o parasitario, o un antígeno tumoral, en un vertebrado, que comprende administrar a un vertebrado que necesita inmunidad terapéutica y/o preventiva una o más de las bacterias modificadas, composiciones o composiciones de vacuna descritas aquí. En este método, la composición incluye una bacteria modificada, por ejemplo una micobacteria que comprende un glicolípido de tipo ceramida incorporado en su pared celular.

10 En ciertas realizaciones, la bacteria modificada, composición o composición de vacuna de la invención, por ejemplo, BCG/ $\alpha$ GalCer o BCG/ $\alpha$ -C-GalCer, se puede usar para reducir la dosis requerida para obtener una respuesta favorable a la vacuna. Esto tendría los beneficios potenciales de reducir la toxicidad local y sistémica, incrementando así el perfil de seguridad de la vacuna. Además, esto podría tener el beneficio de permitir un coste de producción reducido.

15 Ciertas realizaciones de la presente invención permiten un método para reducir o eliminar la respuesta anérgica de células NKT a múltiples administraciones de antígenos de glicosilceramida administrados por sí mismos, que por lo tanto son presentados a células NKT en el contexto de una pared de célula bacteriana. Se ha mostrado que múltiples administraciones de  $\alpha$ -GalCer, administrada por sí misma, hace que las células NKT se hagan no sensibles durante un período de tiempo prolongado. La presente invención, en la que se usan glicolípidos tales como  $\alpha$ -GalCer para la administración como parte de un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana, puede proteger a las células NKT de la anergia en respuesta a un antígeno, y puede permitir una respuesta prolongada con las múltiples administraciones. En consecuencia, las células NKT se activan en respuesta a la estimulación con complejos de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana cargados con un antígeno de glicolípido de tipo ceramida de la presente invención, y además, las células NKT se pueden reactivar en respuesta a la reestimulación por complejos de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana cargados con un antígeno de glicolípido de tipo ceramida de la presente invención.

25 Según los métodos habilitados, una composición que comprende una célula bacteriana y un antígeno de glicolípido de tipo ceramida como se describe aquí se administra para modular una respuesta inmune en un animal, por ejemplo un vertebrado, por ejemplo un mamífero, por ejemplo un ser humano. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención dan como resultado la potenciación de la respuesta inmune, por ejemplo frente a un inmunógeno suministrado antes, después o concurrentemente con un complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana. La administración de complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la invención, por ejemplo con un inmunógeno, puede dar típicamente como resultado la liberación de una citocina a partir de células inmunes, por ejemplo células NKT o células NK. Las citocinas liberadas en respuesta a la administración de una bacteria modificada, composición o composición de vacuna de la invención pueden ser aquellas asociadas con una respuesta inmune de tipo TH1, por ejemplo interferón gamma y TNF-alfa. Como alternativa, o además, la administración de una bacteria modificada, composición, o composición de vacuna de la presente invención puede dar como resultado la liberación de citocinas asociadas con una respuesta inmune de tipo TH2, por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-10, o IL-13. Como alternativa, o además, la administración de una bacteria modificada, composición o composición de vacuna de la presente invención puede dar como resultado la liberación de otras citocinas, por ejemplo IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-17, IL-23, TNF- $\beta$ /LT, MCP-2, oncostatina-M, y RANTES. Los métodos para modular el tipo de citocinas liberadas incluyen variar el antígeno de glicolípido de tipo ceramida del complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana. La elección y el ensayo de diversos antígenos de glicosilceramida en busca de su efecto sobre la liberación de citocinas a partir de NKT u otras células inmunes se puede realizar usando ensayos *in vitro* descritos en cualquier otra parte aquí y en Porcelli, Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2006/0052316, así como mediante métodos adicionales bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica. La administración de complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la presente invención, y composiciones de vacuna que los comprenden, puede modular además una respuesta inmune induciendo la proliferación de células NKT, y también induciendo el reclutamiento y/o la activación de otras células inmunes que incluyen, pero no se limitan a, células NK, CTLs, otros linfocitos T, por ejemplo linfocitos T CD8+ o CD4+, células dendríticas, linfocitos B, y otras.

50 En ciertas realizaciones, la administración de complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la presente invención, y composiciones que los comprenden, afecta a una o más actividades de células NKT, tales como, pero sin limitarse a, proliferación celular, la producción de una o más citocinas, o el reclutamiento y/o la activación de células del sistema inmune que no son NKT, incluyendo, pero sin limitarse a, células NK, CTLs, otros linfocitos T, por ejemplo linfocitos T CD8+ o CD4+, células dendríticas, linfocitos B, y otras.

55 Ciertas realizaciones de la presente invención implican el uso de complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la invención como vacunas recombinantes usadas para modular una respuesta inmune frente a un inmunógeno, por ejemplo un antígeno patógeno o un antígeno tumoral, que es expresado por el complejo de célula bacteriana/glicosilceramida. En consecuencia, la presente invención permite un método para inducir una respuesta inmune frente a un inmunógeno en un animal, en el que el método comprende administrar a un animal que lo necesite una composición que comprende un inmunógeno, que está presente en un complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula bacteriana. Según esta realización, el complejo de glicosilceramida/célula bacteriana se administra en una cantidad suficiente para inducir la respuesta inmune frente al inmunógeno, por ejemplo patógeno o inmunógeno bacteriano expresado por la bacteria recombinante, con respecto a la administración del inmunógeno sin el complejo de glicosilceramida/célula bacteriana. En ciertas realizaciones, un complejo de

glicosilceramida/célula bacteriana para uso como una vacuna puede ser una célula bacteriana recombinante que presenta un antígeno recombinante. En otras realizaciones, la respuesta inmune es frente a la célula bacteriana del complejo de glicosilceramida/célula bacteriana. En otras realizaciones, un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana para uso como una vacuna se puede dirigir hacia un órgano, tejido, célula o marcador de superficie celular particular, como se describe, por ejemplo, en Bruno et al. Pub. Sol. de Patente U.S. nº 2006/0269540.

En ciertas realizaciones, los complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la presente invención, y las composiciones que los comprenden, son para uso como una vacuna terapéutica, por ejemplo para un animal que ya sufre una enfermedad tal como tuberculosis. Según estos usos, la respuesta inmune provocada por una bacteria modificada de la invención es eficaz para tratar, por ejemplo afectar, el resultado de la enfermedad al reducir los síntomas o disminuir la gravedad de la enfermedad, y el complejo de glicosilceramida/célula bacteriana se administra en una cantidad suficiente para modular la respuesta inmune frente al inmunógeno con respecto a la administración del inmunógeno en ausencia del complejo de glicosilceramida/célula bacteriana. Como alternativa, los complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la presente invención, y las composiciones que los comprenden, son para uso como una vacuna profiláctica, es decir, para prevenir o reducir los síntomas de una enfermedad, tal como una enfermedad infecciosa, que puede ser contraída por ese animal en el futuro. De acuerdo con estos usos, la respuesta inmune provocada por los complejos de glicosilceramida/célula bacteriana es eficaz previniendo, por ejemplo afectando, el resultado de la enfermedad al reducir los síntomas o disminuir la gravedad de la enfermedad, y el complejo de glicosilceramida/célula bacteriana se administra en una cantidad suficiente para modular la respuesta inmune frente al inmunógeno con respecto a la administración del inmunógeno en ausencia del complejo de glicosilceramida/célula bacteriana.

La presente invención también proporciona composiciones del complejo de glicosilceramida/célula bacteriana para uso en los métodos descritos aquí. Tales composiciones comprenden una célula bacteriana y una glicosilceramida como se describe en cualquier otra parte aquí. Por ejemplo, las composiciones del complejo de glicosilceramida/célula bacteriana de la presente invención pueden incluir un complejo de glicosilceramida/célula micobacteriana, por ejemplo aGalCer/BCG y  $\alpha$ -C-GalCer/BCG.

Los métodos, bacterias modificadas, composiciones, o composiciones de vacuna como se describen aquí, también son útiles para provocar una respuesta inmune frente a agentes infecciosos, por ejemplo un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana en el que la célula bacteriana del complejo expresa un antígeno heterólogo, por ejemplo un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, o un antígeno parasitario. Los agentes infecciosos que pueden causar enfermedad o síntomas que se pueden tratar mediante los métodos, bacterias modificadas, composiciones o composiciones de vacuna de la invención incluyen, pero no se limitan a, agentes víricos, bacterianos, fúngicos, y parasitarios. Los ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias víricas de ADN y ARN: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae (hepatitis), Herpesviridae (tales como, Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Herpes Zoster), Mononegavirus (por ejemplo, Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (por ejemplo, gripe), Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (tal como viruela o virus de la vacuna), Reoviridae (por ejemplo, Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus), y Togaviridae (por ejemplo, Rubivirus). Los virus que caen dentro de estas familias pueden provocar una variedad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a: artritis, bronconeumonía, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, activa crónica, delta), meningitis, enfermedades oportunistas (por ejemplo, SIDA), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, parainfluenza, rabia, resfriado común, poliomieltis, leucemia, rubéola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, verrugas), y viremia.

De forma similar, los agentes bacterianos o fúngicos que pueden provocar enfermedad o síntomas se pueden tratar o prevenir mediante los métodos, bacteria modificada, composiciones o composiciones de vacuna de la invención. Estos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias de bacterias gramnegativas y grampositivas y hongos: Actinomycetales (por ejemplo, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia), Aspergillosis, Bacillaceae (por ejemplo, carbunco, Clostridium), Bacteroidaceae, Blastomycosis, Bordetella, Borrelia, Brucellosis, Candidiasis, Campylobacter, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Dermatocycoses, Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella, Serratia, Yersinia), Erysipelothrix, Helicobacter, Legionellosis, Leptospirosis, Listeria, Mycoplasmatales, Neisseriaceae (por ejemplo, Acinetobacter, Gonorrhoea, Meningococcus), infecciones por Pasteurellaceae (por ejemplo, Actinobacillus, Haemophilus, Pasteurella), Pseudomonas, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, sífilis, y estafilococos. Estas familias bacterianas o fúngicas pueden provocar las siguientes enfermedades o síntomas, incluyendo, pero sin limitarse a: bacteriemia, endocarditis, infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveítis), gingivitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, infecciones relacionadas con SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, enfermedad de Reiter, infecciones del aparato respiratorio, tales como tosferina o enfisema, septicemia, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, envenenamiento alimentario, fiebre tifoidea, neumonía, gonorrea, meningitis, clamidiasis, sífilis, difteria, lepra, paratuberculosis, tuberculosis, enfermedad de Hansen, tuberculosis que se asemeja a enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea, enfermedad diseminada, lupus, botulismo, gangrena, tétanos, impétigo, fiebre reumática, escarlatina, enfermedades transmitidas sexualmente, enfermedades cutáneas (por ejemplo, celulitis, dermatomycosis), toxemia, infecciones del

aparato urinario, e infecciones de heridas.

Además, una bacteria modificada, composiciones, o composiciones de vacuna de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades causadas por agentes parasitarios. Aquellas que se pueden tratar mediante los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias: amebiosis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamebiosis, durina, ectoparasitaria, giardiosis, helmintosis, leishmaniosis, teileriosis, toxoplasmosis, tripanosomiosis, y tricomonas.

Según los métodos descritos, las bacterias modificadas, composiciones o composiciones de vacuna para uso en los métodos de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, mediante vías intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), o intrapulmonar. Otras vías adecuadas de administración incluyen, pero no se limitan a, la administración intratraqueal, transdérmica, intraocular, intranasal, por inhalación, intracavidad, intraductal (por ejemplo, en el páncreas), e intraparenquimal (es decir, en cualquier tejido). El suministro transdérmico incluye, pero no se limita a, la administración intradérmica (por ejemplo, en la dermis o epidermis), transdérmica (por ejemplo, percutánea) y transmucosal (es decir, en o a través de la piel o tejido mucosal). La administración intracavidad incluye, pero no se limita a, la administración en las cavidades oral, vaginal, rectal, nasal, peritoneal, o intestinal, así como la administración intratecal (es decir, en el canal espinal), intraventricular (es decir, en los ventrículos cerebrales o ventrículos cardíacos), intraauricular (es decir, en la aurícula del corazón) y subaracnoidea (es decir, en los espacios subaracnoideos del cerebro).

Las composiciones de la presente invención comprenden además un vehículo adecuado. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del complejo de glicosilceramida/célula micobacteriana, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo incluye, pero no se limita a, disolución salina, disolución salina amortiguada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y sus combinaciones. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

#### Composiciones farmacéuticas

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones que son adecuadas, dentro del alcance del juicio médico atinado, para el contacto con los tejidos de seres humanos y de animales sin toxicidad excesiva u otras complicaciones proporcionales con una relación de beneficio/riesgo razonable. En algunas realizaciones, las composiciones y vacunas de la presente invención son farmacéuticamente aceptables.

Los complejos de glicosilceramida/célula bacteriana de la presente invención se pueden administrar en composiciones farmacéuticas, por ejemplo composiciones de vacuna, en combinación con uno o más excipientes, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que, cuando se administran a un paciente humano, el uso individual o diario total de las composiciones farmacéuticas de la presente invención será decidido por el médico responsable dentro del alcance del juicio médico atinado. El nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el tipo y grado de la respuesta a lograr; de la composición específica de otro agente, si lo hay, empleado; de la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; del tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción de la composición; de la duración del tratamiento; de los fármacos (tales como un agente quimioterapéutico) usados en combinación o coincidentemente con la composición específica; y de factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Las formulaciones adecuadas, conocidas en la técnica, se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (edición más moderna), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Una composición a usar en un tratamiento preventivo o terapéutico dado se formulará y dosificará de una manera consistente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la condición clínica del paciente individual (especialmente los efectos secundarios de la prevención o tratamiento con los compuestos solos), el sitio de suministro del compuesto, el método de administración, el calendario de administración, y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad eficaz" de los compuestos de la invención, para los fines aquí, se determina así mediante tales consideraciones.

La dosificación apropiada de las composiciones, por ejemplo composiciones de vacuna, de la invención, a administrar a un paciente, se determinará mediante un médico. Sin embargo, como guía, una cantidad adecuada de una composición de la invención puede estar entre alrededor de  $10^1$  a  $10^{12}$  CFU por dosis, por ejemplo  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ , o  $10^{12}$  CFU, suspendida en 0,05 a 0,1 ml de un vehículo inmunológicamente inerte, por ejemplo un vehículo farmacéutico. En una realización, una cantidad eficaz de la vacuna de la invención para inducir inmunidad suficiente para prevenir o tratar, es decir, curar, mejorar, disminuir la gravedad de, o prevenir o reducir una enfermedad descrita aquí, es alrededor de  $10^3$  a alrededor de  $10^7$  unidades formadoras de colonia (CFU)/kg de peso corporal. Una composición de la invención se puede administrar como una única dosis o como múltiples dosis. Las formulaciones de vacuna de la presente invención se pueden emplear en formas de dosificación tales como cápsulas, disoluciones líquidas, suspensiones, o elixires, para administración oral, o líquido estéril para formulaciones tales como disoluciones o suspensiones para, por ejemplo, administración parenteral, intranasal o tópica.

Las composiciones de la invención se pueden administrar oralmente, intravenosamente, rectalmente,

parenteralmente, intracisternalmente, intradérmicamente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (mediante polvos, ungüentos, geles, cremas, gotas o parche transdérmico), bucalmente, o como una pulverización oral o nasal. El término "parenteral", como se usa aquí, se refiere a modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular, e infusión.

5 Las composiciones, por ejemplo composiciones de vacuna, de la invención se pueden formular según métodos conocidos. Los métodos de preparación adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, A. Osol, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980), y Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995), las cuales se incorporan aquí como referencia en sus totalidades. Aunque la composición se puede administrar como una disolución acuosa, también se puede formular como una emulsión, gel, disolución, suspensión, forma liofilizada, o cualquier otra forma conocida en la técnica. Además, la composición puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes, y conservantes. Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar sujetos humanos. En ciertas realizaciones, una célula hospedante, por ejemplo una célula bacteriana, que tiene un vector que expresa un polipéptido, por ejemplo un polipéptido inmunogénico, de la presente invención se incorpora en una composición. La concentración de polipéptidos de la invención en las composiciones de la invención puede variar ampliamente, es decir, desde menos de alrededor de 0,1%, habitualmente a o a al menos alrededor de 2%, hasta tanto como 20% a 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente mediante volúmenes de fluido, viscosidades, etc., según el modo particular de administración seleccionado.

Las composiciones de la invención se almacenarán normalmente en recipientes de una dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas o viales cerrados herméticamente, como una disolución acuosa, o como una formulación liofilizada para reconstitución. Las composiciones micobacterianas con adyuvante glicolípido incorporado directamente se pueden liofilizar, y la actividad del adyuvante se recuperará intacta cuando la composición se rehidrate y suspenda para inyección. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se llenan viales de 10 ml con 5 ml de disolución acuosa al 1% (p/v) filtrada de forma estéril, y la mezcla resultante se liofiliza. Una disolución para infusión se prepara reconstituyendo la composición liofilizada usando agua, por ejemplo agua bacteriostática para inyección.

Las composiciones de la invención son útiles para la administración a cualquier animal, por ejemplo un mamífero (tal como simios, vacas, caballos, cerdos, jabalíes, ovejas, roedores, cabras, perros, gatos, pollos, monos, conejos, hurones, ballenas, y delfines), y un ser humano.

Los modelos de animales que han mostrado ser buenos equivalentes para enfermedad humana incluyen, pero no se limitan a, cobayas y primates no humanos (véanse, por ejemplo, Balasubramanian V et al., Immunobiology 191(4-5):395-401 (1994) y Barclay WR et al., Infect. Immun. 2(5):574-582 (1970), ambos incorporados aquí como referencia en su totalidad).

La invención también permite un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociada con tales recipientes puede estar una nota en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de sustancias farmacéuticas o productos biológicos, nota la cual refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana. Además, las composiciones de la presente invención se pueden emplear conjuntamente con otras composiciones terapéuticas.

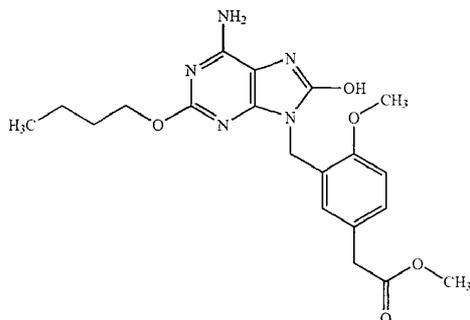
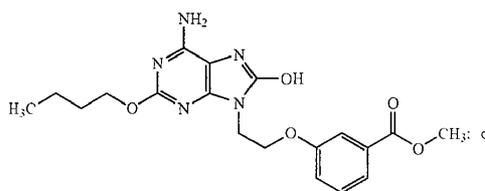
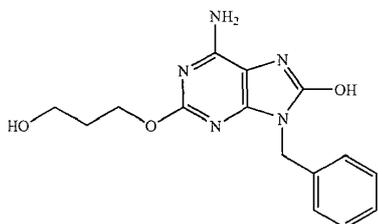
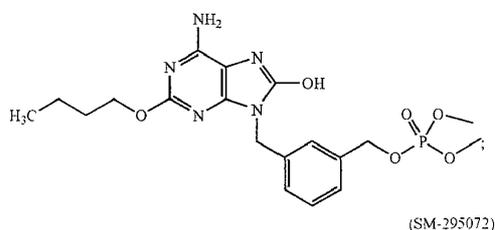
Las preparaciones adecuadas de tales vacunas incluyen, pero no se limitan a, inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensión, en líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar, o los polipéptidos se pueden encapsular en liposomas. Los ingredientes inmunogénicos activos se mezclan a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, o similar, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la preparación de vacuna también puede incluir cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH, y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna.

Las composiciones de la presente invención que comprenden un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana pueden comprender además adyuvantes adicionales. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces como se describe anteriormente pueden incluir, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina, GM-CSF, QS-21 (fármaco de investigación, Progenics Pharmaceuticals, Inc.), DETOX (fármaco de investigación, Ribic Pharmaceuticals), BCG, y oligonucleótidos ricos en CpG.

Las composiciones de la presente invención que comprenden un complejo de glicosilceramida/célula bacteriana pueden comprender además adyuvantes adicionales que también son agonistas del receptor de tipo Toll (TLR). Los

ejemplos de adyuvantes agonistas del TLR que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: N-acetilmuramil-L-alanin-D-isoglutamina (MDP), lipopolisacáridos (LPS), LPS genéticamente modificado y/o degradado, alumbre, glucano, factores estimulantes de colonias (por ejemplo, EPO, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, G-CSF PEGilado, SCF, IL-3, IL6, PIXY 321), interferones (por ejemplo,  $\gamma$ -interferón,  $\alpha$ -interferón), interleucinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18), saponinas (por ejemplo, QS21), monofosforil lípido A (MPL), monofosforil lípido A 3 O-desacetilado (3D-MPL), secuencias de CpG sin metilar, 1-metilriptófano, inhibidores de arginasa, ciclofosfamida, anticuerpos que bloquean funciones inmunosupresoras (por ejemplo, anticuerpos anti-CTLA4), lípidos (tales como restos de ácido palmítico), tripalmitoil-S-glicerilcistein liseril-serina ( $P_3$  CSS), y adyuvante de Freund. Otros ejemplos de adyuvantes incluyen compuestos tales como isatoribina y sus derivados (Anadys Pharmaceuticals) o imidazoquinolinaminas, tales como imiquimod y resiquimod (Dockrell y Kinghom, J. Antimicrob. Chemother., 48:751-755 (2001) y Hemmi et al., Nat. Immunol., 3:196-200 (2002), ribonucleósidos de guanina, tales como ribonucleósidos de guanina C8-sustituídos o N7, C-8-disustituídos (Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:6646-6651 (2003) y los compuestos que se describen en las Pub. de Pat. n<sup>os</sup> JP-2005-089.334; WO99/32122; WO98/01448 WO05/092893; y WO05/092892, y el agonista de TLR-7 SM360320 (9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxi-etoxi)adenina) descrito en Lee et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103(6):1828-1833 (2006).

Además de isatoribina, otros adyuvantes agonistas del TLR incluyen (9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxi-etoxi)adenina) (SM360320), Actilon.TM. (Coley Pharmaceutical Group, Inc.), y los siguientes compuestos de Sumitmo Pharmaceutical Co, Ltd.:



20

25

Otros adyuvantes que se pueden usar conjuntamente con la composición de la presente invención se describen en la Pub. PCT n<sup>o</sup> WO 2005/000348, Pub. Pat. U.S. n<sup>o</sup> 2007/0292418, y Pub. Pat. U.S. n<sup>o</sup> 2007/0287664.

Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH. La composición puede ser una disolución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, pastilla, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender además otros compuestos que modulan una respuesta inmune, por ejemplo citocinas. El término "citocina" se refiere a polipéptidos, incluyendo, pero sin limitarse a, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, e IL-18),  $\alpha$  interferones (por ejemplo, IFN- $\alpha$ ),  $\beta$  interferón (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$  interferones (por ejemplo, IFN- $\gamma$ ), factores estimulantes de colonias (CSFs, por ejemplo, CSF-1, CSF-2, y CSF-3), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento transformante (TGF, por ejemplo, TGF $\alpha$  y TGF $\beta$ ), y factores de crecimiento similares a insulina (IGFs, por ejemplo, IGF-I e IGF-II).

La práctica de la presente invención empleará, excepto que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1992), DNA Cloning, D. N. Glover ed., Volúmenes I y II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al. Pat. U.S. nº: 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., N.Y.; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Los principios generales de la ingeniería de anticuerpos se exponen en *Antibody Engineering*, 2ª edición, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Oxford Univ. Press (1995). Los principios generales de ingeniería de proteínas se exponen en *Protein Engineering, A Practical Approach*, Rickwood, D., et al., Eds., IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng. (1995). Los principios generales de anticuerpos y la unión de anticuerpos-haptenos se exponen en: Nisonoff, A., *Molecular Immunology*, 2ª ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1984); y Steward, M.W., *Antibodies, Their Structure and Function*, Chapman and Hall, Nueva York, NY (1984). Adicionalmente, los métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente se siguen generalmente como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites et al. (eds), *Basic and Clinical Immunology* (8th ed.), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994) y Mishell and Shiigi (eds), *Selected Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980).

Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, Nueva York (1982); Kennett, R., et al., eds., *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York (1980); Campbell, A., "Monoclonal Antibody Technology" en Burden, R., et al., eds., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1984), Kuby *Immunology* 4ª ed. Ed. Richard A. Goldsby, Thomas J. Kindt y Barbara A. Osborne, H. Freeman & Co. (2000); Roitt, I., Brostoff, J. y Male D., *Immunology* 6ª ed. Londres: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. y Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology* Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Verlag (2001); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (2001); Lewin, *Genes VIII*, Prentice Hall (2003); Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); Dieffenbach y Dveksler, *PCR Primer* Cold Spring Harbor Press (2003).

## 45 EJEMPLOS

### Materiales y métodos

Ratones. Se obtuvieron ratones C57BL/6 y BALB/c de tipo salvaje hembras de seis (6) a 8 semanas de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). Los ratones CD1d<sup>-/-</sup> fueron proporcionados por M. Exley y S. Balk (Beth Israel-Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston). Los ratones J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> deficientes en células NKT V14i fueron un regalo de M. Taniguchi y T. Nakayama (Chiba University, Chiba, Japón). Todos los ratones se enjaularon en una instalación de nivel 3 de bioseguridad en condiciones libres de patógenos específicos, y se usaron en un protocolo aprobado por la institución.

Células y estirpes celulares. Se prepararon células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) procedentes de ratones C57BL/6 y BALB/c en base a un protocolo publicado. Lutz MB, et al, *J Immunol Methods* 223: 77-92 (1999). De forma breve, las células de médula ósea se obtuvieron del fémur y tibia, y se colocaron en placas a 2 x 10<sup>6</sup> células/placa en una cápsula de Petri bacteriológica. Las células se incubaron en medio de cultivo de GM-CSF durante 10 días antes de cosechar las células dendríticas no adherentes, como se describe en Lutz et al. El hibridoma de NKT de V $\alpha$ 14i DN3A4-1.2 fue proporcionado por M. Kronenberg (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 10% de FCS inactivado por calor (Gemini Biological Products, Calabasas, CA), 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM

de aminoácidos no esenciales, 55  $\mu\text{M}$  de 2-mercaptoetanol, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomocina (GIBCO), en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células del bazo se prepararon machacándolas con un émbolo de jeringuilla, y haciéndolas pasar a través de un filtro de células de 70  $\mu\text{m}$ . La lisis de los glóbulos rojos se llevó a cabo con amortiguador de lisis de glóbulos rojos (SIGMA). Las células mononucleares hepáticas se aislaron usando el siguiente procedimiento. El hígado se trató con 0,014 unidades de Wunsch/ml de Liberase (Roche) durante 30 minutos. El homogenado se hizo pasar a través de un filtro celular de 70  $\mu\text{m}$ , y las células mononucleares se aislaron del pelete usando un gradiente de Percoll de 45%, 67,5%.

Glicolípidos.  $\alpha\text{GalCer}$  se sintetizó según métodos publicados (Yu, K.O.A. et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 102:3383 (2005)), y  $\alpha\text{-C-GalCer}$  se obtuvo de la NIH Tetramer Core Facility [www.niaid.nih.gov/reposit/tetramer/genguide.html](http://www.niaid.nih.gov/reposit/tetramer/genguide.html). Los glicolípidos se almacenaron en seco a -20°C. Alícuotas procedentes del lote madre se reconstituyeron hasta 100  $\mu\text{M}$  en DMSO para el trabajo *in vitro*, o hasta 500  $\mu\text{M}$  en 0,5% de Tween-20 en PBS para estudios *in vivo*.

Cepas bacterianas. *M. bovis* BCG (danesa) se obtuvo de Statens Serum Institute, Dinamarca, y la BCG-Ova recombinante (cepa de Pasteur) fue un regalo proporcionado amablemente por Subash Sad, National Research Council-Institute for Biological Sciences, Ottawa, Ontario, Canadá (véase Dudani R et al., J. Immunol. 168(11): 5737-45 (2002)). Estas cepas se hicieron crecer en medio Middlebrook 7H9 libre de proteínas (Difco) con 0,05% de tiloxapol y 20  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha\text{GalCer}$  o  $\alpha\text{-C-GalCer}$ . La cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv (obtenida de Trudeau Institute), se hizo crecer en medio Middlebrook 7H9 suplementado con complejo de ácido oleico-albúmina-dextrosa (Difco).

Incorporación de  $\alpha\text{GalCer}$  marcado con  $^{14}\text{C}$  en BCG viva. *M. bovis* BCG se hizo crecer en medio Middlebrook 7H9 libre de proteínas que contiene 0,05% de tiloxapol y 20  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha\text{GalCer}$  marcado con  $^{14}\text{C}$ , hasta una OD de 0,5 a 1,0. Las bacterias se lavaron a conciencia, se secaron, y la incorporación de lípido se evaluó mediante conteo de centelleo  $\beta$ . Las bacterias secas se usaron para la extracción de lípido de la pared celular, que se usó para el ensayo de TLC.

Actividad *in vitro* de  $\alpha\text{GalCer}$  y  $\alpha\text{-C-GalCer}$  incorporado en BCG ( $\alpha\text{GalCer-BCG}$  y  $\alpha\text{-C-GalCer-BCG}$ , respectivamente). Para el ensayo de hibridoma de NKT, se infectaron BMDC con BCG,  $\alpha\text{GalCer-BCG}$  o  $\alpha\text{-C-GalCer-BCG}$  a una MOI de 10:1 y las células de hibridoma de NKT V $\alpha$ 14i (50.000 células) se añadieron durante 12 h. La IL-2 sobrenadante se evaluó mediante ELISA. Para estimulaciones de células esplenocíticas o hepáticas, esplenocitos en bruto se colocaron en placas a 500.000 células, o células mononucleares hepáticas se colocaron en placas a 400.000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos con BMDCs de C57BL/6 infectadas con BCG,  $\alpha\text{GalCer-BCG}$  o  $\alpha\text{-C-GalCer-BCG}$ . Para la activación de los esplenocitos, las BMDCs infectadas se usaron en números de células a partir de 25.000 células/pocillo, diluidas 4 veces hasta 3.125 células/pocillo. Las células hepáticas se estimularon con  $10^5$  BMDCs infectadas por pocillo. Tras 48 h a 37°C, se retiraron 150  $\mu\text{l}$  de sobrenadante para las medidas de citocinas. Los niveles de IL-4 e IFN $\gamma$  del sobrenadante se midieron mediante ELISA usando pares de anticuerpos de captura y de detección biotinilado (BD PharMingen) y estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Zymed) con sustrato TMB-Turbo (Pierce).

Activación de clones de células NKT humanas. Células dendríticas humanas derivadas de monocitos se infectaron a una MOI de 5:1, se incubaron con un clon de células NKT (50.000 células) durante 24 horas, y el sobrenadante se ensayó para determinar IFN $\gamma$  e IL-13.

Actividad *in vivo* de  $\alpha\text{GalCer}$  incorporado en BCG. A los ratones se les administraron inyecciones intraperitoneales (i.p.) de  $\alpha\text{GalCer-BCG}$  en 0,2 ml de PBS más 0,05% de Tiloxapol o vehículo solo. Los sueros se recogieron y evaluaron para determinar IL-4, IL-12p70, e IFN $\gamma$  mediante ELISA de captura como se describe en Yu KO et al, Proc Natl Acad Sci USA 102: 3383-3388 (2005).

Ensayo de maduración de células dendríticas *in vivo* tras la inyección intraperitoneal de  $\alpha\text{GalCer-BCG}$ . Se inyectaron i.p. ratones C57BL/6 o CD1d $^{-/-}$  con  $\alpha\text{GalCer-BCG}$ , y los esplenocitos y las células mononucleares hepáticas se cosecharon 20 h y 40 h más tarde. Las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorocromo para CD11c, CD80, CD86, MHC-II (IA/IE), CD70, 41BB y OX40. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo LSR II.

Ensayo de ELISPOT de IFN- $\gamma$  de células T. Se usó ELISPOT para detectar la secreción de IFN $\gamma$  por células T CD8 $^{+}$  individuales procedentes de ratones infectados tras la estimulación con el péptido OVA 257-264 (SIINFEKL (SEQ ID NO: 1)), el péptido restringido por MHC-I (H-2K $^d$ ) de TB10.3/4 (GYAGTLQSL (SEQ ID NO: 2)) o el péptido restringido por MHC-I (H-2K $^b$ ) de TB10.3/4 (QIMYNPAM (SEQ ID NO: 3)) *in vitro*. Placas de ELISPOT (Millipore) se revistieron con el anticuerpo de captura anti-IFN $\gamma$  (BD Biosciences) durante 16 horas a temperatura ambiente (RT). Las placas se lavaron y bloquearon con 1% de BSA durante 2 horas a RT. Tras el tratamiento con amortiguador de lisis de RBC (Sigma-Aldrich), las células T se separaron usando el Dynal Mouse T Cell Negative Isolation Kit (Invitrogen). Las células T separadas se cultivaron con esplenocitos procedentes de un ratón sin tratamiento previo y los péptidos (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas a 37°C. Después de que se retiraron las células, las placas se lavaron con PBS, seguido de PBS con 0,05% de Tween-20 (PBST). El anticuerpo de detección anti-IFN $\gamma$  biotinilado (BD Biosciences) se añadió durante 2 horas a 37°C, seguido del lavado con PBST. Se añadió estreptavidina-fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) a

las placas durante 1 hora (37°C), seguido del lavado y adición del sustrato BCIP/NBT (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo lavando los pocillos con agua, y las manchas se contaron usando un lector de ELISPOT (Autoimmun Diagnostika). Las respuestas de células T CD4<sup>+</sup> también se evaluaron para el péptido -25 (FQDAYNAAGGHNAVF (SEQ ID NO: 4)) (5 µg/ml) aminoácidos 240 a 254 de *M. tuberculosis* Ag85B.

- 5 Ensayo de presentación de antígeno *in vivo*. Los esplenocitos donantes se aislaron de ratones transgénicos para TCR OT-1 deficientes en Ragl (Taconic/National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID]). Tras la lisis de los RBC, las células se marcaron con 10 µM de éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) durante 5 minutos a RT a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml en PBS más 0,1% de BSA. Las células se lavaron una vez con PBS más 0,1% de BSA, y dos veces con PBS antes de la inyección en ratones receptores B6.PL (Thy1.1<sup>+</sup>) (The Jackson Laboratory). Los ratones recibieron  $5 \times 10^6$  o  $1 \times 10^7$  células marcadas vía la vena lateral de la cola, y entonces se vacunaron subcutáneamente con  $5 \times 10^6$  CFU de BCG-OVA/αGalCer, BCG-OVA o BCG. Los esplenocitos se cosecharon 5-7 días más tarde, se tiñeron con anticuerpos anti-Thy1.2, anti-CD8 y anti-B220 (BD Biosciences), y se analizaron mediante citometría de flujo. La expansión se cuantificó mediante el acotamiento en la población transferida (Thy1.2<sup>+</sup>), y midiendo el porcentaje de células sin dividir (CFSE<sup>high</sup>) dentro de esta población.
- 10
- 15 Estudios de vacunación y exposición. Todos los estudios con animales fueron aprobados por los comités de cuidado y uso de animales institucionales del Albert Einstein College of Medicine. Los ratones C57BL/6 se vacunaron intradérmicamente con BCG sola, o con la BCG que se hizo crecer con uno de los glicolípidos ( $5 \times 10^6$  CFU/ratón). La exposición aerogénica se realizó 2 meses más tarde usando una cámara de inhalación Glas-Col para suministrar 50-100 CFU por animal de cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv. Los ratones se sacrificaron a las 3 y 6 semanas tras la exposición. Los pulmones y bazo de ratones individuales se retiraron asépticamente y se homogeneizaron por separado en 5 ml de disolución salina normal más 0,05% de Tween-80 usando un mezclador Seward Stomacher 80 (Tekmar). Los homogenizados se diluyeron en serie y se colocaron en placas en agar Middlebrook 7H10 con higromicina (50 µg/ml). Los tejidos pulmonares se procesaron para la histopatología usando una fijación de parafina estándar, cortando en secciones y tiñendo con H&E.
- 20

## 25 Ejemplo 1

Incorporación estable de αGalCer en la pared celular de micobacterias vivas

Este Ejemplo demuestra la incorporación estable de un glicolípido de tipo ceramida ejemplar, αGalCer, en la pared celular de una micobacteria. La célula bacteriana, *M. bovis* BCG, es una vacuna bacteriana atenuada viva que es ingerida activamente por APCs y procesada para la presentación del antígeno. Se ensayó la solubilidad de αGalCer marcada con <sup>14</sup>C en (1) polisorbato Tween-80 (0,05%) y (2) tiloxapol (0,05%). La solubilidad con tiloxapol para αGalCer marcado con <sup>14</sup>C fue mayor que la solubilidad en Tween-80 (Fig. 1A). Células BCG se hicieron crecer en presencia de αGalCer marcado con <sup>14</sup>C con tiloxapol (0,05%) en medio Middlebrook 7H9 libre de proteínas. Las células se lavaron entonces a conciencia con PBS-tiloxapol (0,05%), y los recuentos por centelleo mostraron que el αGalCer radiomarcado estaba asociado con la pared celular de BCG (Fig. 1B).

30

- 35 Los lípidos de la pared celular se extrajeron de BCG que se hizo crecer en presencia de αGalCer marcado con <sup>14</sup>C, y se sometieron a cromatografía de capa fina. El lípido radiomarcado procedente del extracto lipídico tuvo una movilidad similar a la del αGalCer marcado con <sup>14</sup>C libre, mostrando que este glicolípido de tipo ceramida estaba unido de forma estable a la pared celular y estaba químicamente intacto (Fig. 1C). La cuantificación de las bandas de TLC mostró que alrededor de 21,4% del glicolípido de tipo ceramida radiomarcado estaba incorporado en la pared de la célula bacteriana. De este modo, un glicolípido de tipo ceramida, αGalCer, se incorporó de forma estable en una pared de célula micobacteriana permitiendo la administración simultánea de tanto el adyuvante glicolípido como la vacuna BCG.
- 40

## Ejemplo 2

αGalCer o α-C-GalCer unido a la pared de la célula BCG es biológicamente activo *in vitro* en ensayos de ratón y humanos

45

Este Ejemplo demuestra que el glicolípido de tipo ceramida incorporado en una pared de la célula micobacteriana (complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula micobacteriana) es biológicamente activo. Se sabe que αGalCer y sus análogos activan células NKT *in vitro*. Esta actividad biológica se ensayó para determinar si los glicolípidos de tipo ceramida incorporados en una pared de la célula micobacteriana retenían la capacidad para activar células NKT *in vitro*. BMDC de ratón, infectadas con α-GalCer-BCG o α-C-GalCer-BCG, se incubaron con un hibridoma de células NKT. IL-2 fue fácilmente detectable en el sobrenadante de una manera dependiente de la dosis, indicando una activación muy eficiente de células NKT *in vitro* por cada uno de los glicolípidos de tipo ceramida que se unieron a la pared de la célula BCG (Figs. 2A). Todos los valores de la Figura 2 se muestran como media de cultivos por triplicado.

50

- 55 La activación de esplenocitos de ratón con BMDCs infectadas con αGalCer-BCG indujo producción de IFNγ e IL-4, como se muestra en la Fig. 2B y Fig. 2C. La estimulación de células mononucleares hepáticas con BMDCs infectadas con αGalCer-BCG indujo IFNγ e IL-4 (Fig. 2G y 2H, respectivamente), mientras que BMDC infectadas con

$\alpha$ -C-GalCer-BCG indujo IFN $\gamma$  pero no IL-4 detectable a partir de células mononucleares hepáticas (Fig. 2G y 2H). La actividad de  $\alpha$ -GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG también se ensayó en un sistema humano estimulando un clon de células NKT con células dendríticas humanas derivadas de monocitos infectadas. El complejo de  $\alpha$ -GalCer-BCG indujo fuertemente IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-13 de una manera dependiente de la dosis, indicando que la estrategia de incorporar un adyuvante de glicolípido de tipo ceramida en la pared celular de células de vacuna puede ser aplicable a seres humanos (Fig. 2D, 2E y 2F, respectivamente).

La capacidad de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos infectadas con  $\alpha$ -GalCer-BCG para activar un clon de células NKT humanas muestra que esta estrategia de vacuna es aplicable a la vacunación de seres humanos frente a la tuberculosis.

### Ejemplo 3

$\alpha$ -GalCer-BCG induce una respuesta detectable de citocinas *in vivo*

Este ejemplo demuestra que un complejo de glicolípido de tipo ceramida/célula micobacteriana retiene actividad *in vivo*. La administración de  $\alpha$ -GalCer a ratones induce una respuesta de citocinas séricas. Se ensayó la actividad *in vivo* de células BCG unidas a glicolípidos de tipo ceramida. Se inyectaron intraperitonealmente células BCG infectadas con  $\alpha$ -GalCer ( $5 \times 10^6$ ) en ratones C57BL/6, y se examinó el suero en busca de citocinas en diversos puntos de tiempo. Los complejos de  $\alpha$ -GalCer/BCG indujeron niveles séricos significativos de IFN $\gamma$ , IL-12 e IL-4 (Fig. 3A, 3B y 3C), con cinéticas que fueron similares a las observadas con glicolípido libre. De este modo, se mostró que los complejos de  $\alpha$ -GalCer/BCG son activos *in vivo*. Las citocinas séricas no se detectaron en ratones CD1d KO o  $\alpha$ -18 KO (ambos deficientes en NKT) que fueron inyectados con  $\alpha$ -GalCer/BCG (dato no mostrado), mostrando que la producción de citocinas por el complejo de  $\alpha$ -GalCer/BCG es a través de la asociación con CD1d e implica la activación de células NKT.

### Ejemplo 4

$\alpha$ -GalCer induce activamente moléculas coestimuladoras en células dendríticas *in vivo*

Este ejemplo demuestra que los complejos de glicolípido de tipo ceramida/célula micobacteriana retienen la capacidad para inducir la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas CD11c<sup>+</sup> (DCs). Se sabe que  $\alpha$ -GalCer y  $\alpha$ -C-GalCer solo puede inducir expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas CD11c<sup>+</sup>. Se inyectaron i.p. ratones C57BL/6 con  $\alpha$ -GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG. Se ensayaron los niveles de expresión de moléculas MHC-II y coestimuladoras sobre las CD11c<sup>+</sup> DCs en bazo e hígados. Ambos complejos de glicolípido de tipo ceramida/célula micobacteriana indujeron aumento de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD70 y 4-1BB en bazo e hígado con respecto a BCG sola (Fig. 4A y 4B). El número de veces de incremento con moléculas MHC-II y coestimuladoras se muestra en la Fig. 4C y 4D. El adyuvante  $\alpha$ -C-GalCer incorporado indujo un aumento más pronunciado de moléculas CD86, CD70 y 4-1BB en el hígado (Fig. 4D). El aumento de MHC II fue similar al inducido por BCG en el bazo o el hígado. También se verificó que estos efectos dependieron de la activación de células NKT invariantes al ensayar ratones que carecen genéticamente de CD1d (dato no mostrado).

Estos resultados muestran que la actividad biológica de los glicolípidos de tipo ceramida está intacta tras la incorporación en la pared de las células BCG. En particular,  $\alpha$ -GalCer-BCG y  $\alpha$ -C-GalCer-BCG inducen maduración completa de DCs, según se determina por una mayor expresión de moléculas coestimuladoras, que incluyen CD80 y CD86, así como moléculas de MHC clase II en DCs. El aumento de la maduración y marcadores coestimuladores se retrasó en ratones a los que se les administró la vacuna BCG sola en comparación con BCG complejada con glicolípido de tipo ceramida, que contribuye probablemente a respuestas de células T mejoradas frente a antígenos micobacterianos. De este modo, los ratones inyectados con células BCG que incorporan glicolípido de tipo ceramida tuvieron un efecto de vacuna mejorado en comparación con células BCG solas.

### Ejemplo 5

Potenciación de la sensibilidad de células T CD8 específicas del antígeno mediante administración simultánea de adyuvantes de glicolípido de tipo ceramida

Este ejemplo demuestra que las micobacterias con  $\alpha$ -GalCer y  $\alpha$ -C-GalCer incorporado de forma estable en sus paredes celulares exhiben respuestas mejoradas de células T CD8 frente a antígenos micobacterianos expresados por BCG. Se vacunaron ratones C57BL/6 con  $\alpha$ -GalCer complejado con BCG-OVA, o con  $\alpha$ -C-GalCer complejado con BCG-OVA y se analizaron para determinar las células T CD8 sensibles al péptido OVA SIINFEKL (SEQ ID NO: 1) en el bazo mediante ELISPOT de IFN $\gamma$ . Se observó sensibilización significativamente potenciada de células T CD8 específicas de SIINFEKL en ratones a los que se les administraron los glicolípidos complejados con la vacuna BCG-OVA, en comparación con ratones que fueron vacunados con la BCG-OVA sola durante 3 semanas o 2 meses (Fig. 5A y 5B, respectivamente). Se analizó mediante ELISPOT de IFN $\gamma$  el efecto adyuvante de  $\alpha$ -GalCer complejado con BCG para potenciar la sensibilización de células T CD8 frente al epítipo de MHC-I GYAGTLQSL (SEQ ID NO: 2) del antígeno micobacteriano endógeno TB10.4 en ratones BALB/c vacunados. La activación de células T CD8<sup>+</sup> se evaluó 5-7 días tras la infección mediante dilución de éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE). Los

ratones a los que se les administró la vacuna BCG complejada con  $\alpha$ GalCer mostraron una mayor respuesta de células T CD8 específica de GYAGTLQSL (SEQ ID NO: 2) con respecto a los no vacunados o los vacunados con BCG sola (Fig. 5C). Estos resultados demuestran que las respuestas de células T CD8 específicas del antígeno micobacteriano se potencian activando células NKT durante la inmunización con un glicolípido de tipo ceramida y BCG-OVA.

Se usó la transferencia adoptiva de células T sin tratamiento previo marcadas con CFSE procedentes de ratones OT-I transgénicos para TCR reactivos a SIINFEKL/H-2K<sup>b</sup> para mostrar la sensibilización de células T CD8<sup>+</sup> restringidas por MHC clase I reactivas con SIINFEKL en el contexto de vacunación. Hinchey J, et al., J Clin Invest 117: 2279-2288 (2007). Ratones Thy1.1<sup>+</sup> B6.PL se inyectaron con esplenocitos Thy1.2<sup>+</sup> marcados con CFSE procedentes de ratones OT-I, seguido de la vacunación con BCG-OVA sola, complejo de  $\alpha$ GalCer/BCG-OVA o complejo de  $\alpha$ -C-GalCer/BCG-OVA. La activación y proliferación de células T CD8<sup>+</sup> se evaluaron mediante dilución de CFSE en la población transferida a los 5-7 días tras la infección (FIG. 5D). Se observó proliferación parcial de células T OT-I transferidas en ratones infectados con BCG-OVA (mostrado como un porcentaje de células sin dividir). Por el contrario, la infección de  $\alpha$ GalCer/BCG-OVA o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG-OVA indujo un incremento significativo en la proliferación de células T transferidas (Fig. 5E).

### Ejemplo 6

La incorporación en la pared celular de glicolípidos de tipo ceramida que activan células NKT potencia la inmunidad protectora inducida por la vacuna BCG de *M. bovis*

Usando estudios de inmunización y exposición, este ejemplo demuestra que la sensibilización de células T potenciada, observada cuando se vacunaron ratones con  $\alpha$ GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG, también mejoró la eficacia protectora de la vacuna BCG.

Ratones C57BL/6, que estaban sin tratamiento previo (disolución salina) o que se inmunizaron 2 meses antes mediante la vía intradérmica con  $5 \times 10^6$  BCG (danesa) viva,  $\alpha$ GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG, se expusieron mediante infección con aerosol de dosis baja (50-100 CFU) a *M. tuberculosis* H37Rv virulenta. En ratones sin tratamiento, se detectó crecimiento sustancial en los pulmones y diseminación hacia los bazo a las 3 y 6 semanas tras la exposición. Sin embargo, la vacunación con BCG (danesa),  $\alpha$ -GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG redujo considerablemente las cargas bacterianas de *M. tuberculosis* tanto en pulmones como bazo de ratones expuestos al aerosol, en comparación con controles sin tratamiento (Fig. 6A y 6B). La vacunación de  $\alpha$ -C-GalCer-BCG protegió significativamente mejor que BCG en el punto de tiempo de 3 semanas tanto en pulmones como en bazo. La inmunización con  $\alpha$ -C-GalCer-BCG también mostró un efecto más prolongado sobre el control de la infección de *M. tuberculosis* en comparación con la inmunización con BCG, como se indica mediante reducciones en las CFU en ambos órganos a las 6 semanas tras la exposición. El C-glicósido fue superior a  $\alpha$ GalCer, ya que mejoró la eficacia protectora de BCG tanto en los pulmones como en el bazo, probablemente debido a que este análogo induce una respuesta de citocina Th1 pronunciada. La protección provocada por la inmunización con  $\alpha$ GalCer-BCG y  $\alpha$ -C-GalCer-BCG fue significativamente mayor que la obtenida con la vacunación de BCG en el punto de tiempo de 6 semanas en el pulmón y en el bazo.

El examen histopatológico de los pulmones procedentes de ratones inmunizados con BCG,  $\alpha$ GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG mostró inflamación relativamente leve con granulomas pequeños y compactos ricos en linfocitos, en comparación con ratones sin tratamiento, que tuvieron amplias lesiones granulomatosas pobremente organizadas (Fig. 7A, 7B, 7C, y 7D). Se observó infiltración predominantemente linfocítica en ratones vacunados con  $\alpha$ GalCer/BCG en comparación con una infiltración histocítica y linfocítica mixta observada en ratones vacunados con BCG.

De este modo, una única inmunización intradérmica con BCG que incorpora  $\alpha$ GalCer o  $\alpha$ -C-GalCer condujo a una potenciación significativa de la inmunidad protectora frente a una exposición de aerosol con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

### Ejemplo 7

La actividad adyuvante de glicolípidos de tipo ceramida incorporados requiere CD1d y es específica de la activación de células NKT

Este ejemplo demuestra que la actividad adyuvante proporcionada por glicolípido de tipo ceramida incorporado es debida a la activación específica de células NKT. Se usaron experimentos de inmunización y exposición con ratones carentes (KO) de CD1d, o ratones KO de  $J\alpha 18$ , que son ambos deficientes en células NKT invariantes que son activadas por los glicolípidos. No se observó ninguna diferencia en la protección entre ratones KO de CD1d inmunizados con BCG e inmunizados con BCG complejada con glicolípido (Fig. 6C) y ratones KO de  $J\alpha 18$  (Fig. 6D). De este modo, la presencia de células NKT invariantes es importante para la protección potenciada proporcionada en ratones de tipo salvaje por un glicolípido de tipo ceramida incorporado en una pared de célula micobacteriana.

### Ejemplo 8

Sensibilización de células T CD4 específicas del antígeno mediante los adyuvantes de glicolípido de tipo ceramida

Este ejemplo demuestra que  $\alpha$ GalCer-BCG y  $\alpha$ -C-GalCer-BCG no potencian respuestas de células T CD4 frente a p25 del antígeno micobacteriano Ag85B. Ratones C57BL/6 se vacunaron con  $\alpha$ GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG y se analizaron en busca de las respuestas de células T CD4 frente al péptido P25 del antígeno micobacteriano 85B en el bazo mediante ELISPOT de IFN $\gamma$ . No se observaron diferencias en la sensibilización de estas células T CD4 en ratones que recibieron las vacunas de BCG complejadas con glicolípido en comparación con ratones que se vacunaron con BCG sola (Fig. 8A, 8B y 8C). La activación de células T CD4<sup>+</sup> se evaluó 7 días tras la infección mediante dilución de CFSE. El porcentaje de linfocitos en el pulmón en ratones C57BL/6 a los 2 meses tras la vacunación con BCG,  $\alpha$ GalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG no mostró ninguna potenciación significativa con  $\alpha$ GalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG (Fig. 8D).

Se observó la sensibilización de células T CD4 restringidas por MHC clase II reactivas frente a p25 del antígeno 85B en el contexto de la vacunación. Se usó la transferencia adoptiva de células T sin tratamiento marcadas con CFSE procedentes de ratones transgénicos para TCR reactivos frente a p25. Wolf AJ et al., J. Immunol. 179(4):2509-19 (2007). Ratones Thy1.1<sup>+</sup> B6.PL se inyectaron con esplenocitos Thy1.2<sup>+</sup> marcados con CFSE procedentes de ratones p25, seguido de la vacunación con BCG sola,  $\alpha$ GalCer-BCG o  $\alpha$ -C-GalCer-BCG. La activación y proliferación de células T CD4<sup>+</sup> se evaluaron mediante dilución de CFSE en la población transferida a los 7 días tras la infección (Fig. 8E). No se observó proliferación significativa de células T p25 transferidas en ratones infectados con BCG,  $\alpha$ GalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG (Fig. 8F). La activación y proliferación de células T CD4 p25 entre ratones inmunizados con BCG sola o con BCG con adyuvantes de glicolípido de tipo ceramida fueron similares.

De este modo, los adyuvantes de glicolípido no parecen tener un impacto sobre las respuestas de células T CD4.

### Ejemplo 9

Potenciación de la sensibilización de células T CD8 específicas del antígeno mediante administración de glicolípido de tipo ceramida incorporado en BCG en comparación con la administración separada o BCG sola

Este ejemplo demuestra que la vacunación con glicolípido de tipo ceramida incorporado en paredes de células BCG da como resultado una potenciación de las respuestas de células T CD8 frente a antígenos micobacterianos, en comparación con la administración separada de BCG,  $\alpha$ GalCer/BCG o  $\alpha$ -C-GalCer/BCG (Fig. 8F) (inyectados separadamente en diferentes sitios), la administración mixta de BCG-OVA +  $\alpha$ GalCer (mezclados juntos en la misma jeringuilla inmediatamente antes de la inyección), o BCG-OVA sola. La administración fue mediante inyecciones intradérmicas. Se inmunizaron tres (3) ratones por grupo. El ensayo de ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas para los restos SIINFEKL (SEQ ID NO: 1) del péptido OVA, a los 17 días en ratones tras la inmunización con  $\alpha$ GalCer separada, mezclada, o incorporada en la pared celular, y BCG, mostró una sensibilización potenciada de las células T con  $\alpha$ GalCer incorporado en la pared de células BCG (Fig. 9A). El ensayo de ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas para los restos GYAGTLQSL (SEQ ID NO: 2) del péptido de Mtb TB10.3/4 en ratones tras la inmunización con  $\alpha$ GalCer-BCG también mostró actividad potenciada en comparación con la administración separada o mixta (Fig. 9B). El ensayo de ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas para TB10.4 en ratones tras la inmunización con  $\alpha$ GalCer/BCG, y el ensayo de ELISPOT para células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  específicas para SIINFEKL en ratones tras la inmunización con  $\alpha$ GalCer + BCG-OVA (administrados separadamente o mezclados), muestran que los glicolípidos de tipo ceramida incorporados potenciaron la actividad en comparación con la administración separada o mixta (Fig. 10A y 10B). Se obtuvieron resultados similares usando  $\alpha$ -C-GalCer en lugar de  $\alpha$ GalCer (Fig. 11). De este modo, el adyuvante de glicolípido de tipo ceramida asociado físicamente y las células micobacterianas muestran una potenciación mejorada de células T CD8, que se piensa que es una base para el efecto adyuvante de las vacunas micobacterianas, tales como BCG.

Estos resultados indican que al suministrar el adyuvante directamente a las mismas células que se infectan con la micobacteria, el adyuvante de glicolípido de tipo ceramida tiene un efecto potenciado. De este modo, se espera que el adyuvante incorporado permita que se usen dosis más pequeñas de vacuna, así como reducir la toxicidad local y sistémica y disminuir el coste de la producción de vacuna.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VACCINEX

PORCELLI, Steven A.

VENKATASWAMY, Manjunatha M.

<120> VACUNAS BACTERIANAS CON GLICOLÍPIDOS DE TIPO CERAMIDA ASOCIADOS A LA PARED CELULAR, Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 1843.058PC01/EJH/BNC

<140> Por asignar

<141> Herewith

<150> 61/143,389

<151> 2009-01-08

5 <160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido OVA sintético

<400> 1

**Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu**  
**1 5**

15 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Epítopo de MHC-I (H-2Kd) de TB10.3/4 sintético

<400> 2

**Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu**  
**1 5**

<210> 3

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo de MHC-I (H-2Kb) de TB10.4 sintético

<400> 3

30 **Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met**

**1 5**

<210> 4

<211> 15

35 <212> PRT

ES 2 675 759 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido-25 sintético

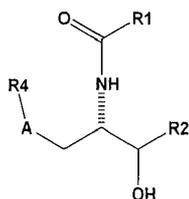
<400> 4

	<b>Phe</b>	<b>Gln</b>	<b>Asp</b>	<b>Ala</b>	<b>Tyr</b>	<b>Asn</b>	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	<b>Gly</b>	<b>Gly</b>	<b>His</b>	<b>Asn</b>	<b>Ala</b>	<b>Val</b>	<b>Phe</b>
5	1			5					10					15	

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria modificada, que comprende: una célula bacteriana y una glicosilceramida heteróloga, en la que dicha glicosilceramida se incorpora en la pared celular de dicha célula bacteriana, en la que dicha bacteria modificada es obtenible cultivando dicha célula bacteriana en medio de cultivo y añadiendo dicha glicosilceramida al medio de cultivo en condiciones en las que dicha glicosilceramida se incorpora en la pared celular de dicha célula bacteriana, en la que dicha célula bacteriana se selecciona del grupo que consiste en una célula micobacteriana, una célula de *Listeria*, una célula de *Salmonella*, una célula de *Yersinia*, una célula de *Francisella*, y una célula de *Legionella*, y en la que dicha glicosilceramida estimula células T asesinas naturales (NKT).
2. La bacteria modificada de la reivindicación 1, en la que dicha célula micobacteriana es una célula del complejo de *M. tuberculosis* (MTBC), o una célula micobacteriana no tuberculosa (NTM).
3. La bacteria modificada de la reivindicación 2, en la que dicha célula MTBC se selecciona del grupo que consiste en una célula de *M. tuberculosis*, una célula de *M. bovis*, una célula de *M. bovis* del bacilo Calmette-Guérin (BCG), una célula de *M. africanum*, una célula de *M. canetti*, una célula de *M. caprae*, y una célula de *M. pinnipedii*.
4. La bacteria modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha glicosilceramida comprende una  $\alpha$ -galactosilceramida.
5. La bacteria modificada de la reivindicación 4, en la que dicha glicosilceramida comprende una estructura seleccionada de una de las siguientes:

(i) Fórmula I:

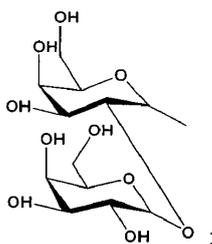


(Fórmula I)

- 20 en la que R1 es un alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado; o R1 es -C(OH)-R3, en el que R3 es un alcano de C<sub>1</sub>-C<sub>26</sub> o alqueno de C<sub>2</sub>-C<sub>26</sub> lineal o ramificado; o R1 es un alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> en el que (i) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> está sustituido con un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático, o (ii) el alcano o alqueno de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub> incluye, dentro de la cadena de alquilo o alquenilo de C<sub>6</sub>-C<sub>27</sub>, un cicloalcano de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, cicloalqueno de C<sub>5</sub>-C<sub>15</sub>, heterociclo, o anillo aromático;
- 25 R2 es uno de los siguientes (a)-(e):
- (a) -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
  - (b) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
  - (c) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,
  - (d) -CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>,
  - (e) -CH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,
- 30

en los que X es un número entero que oscila de 4-17;

R4 es un monosacárido enlazado en  $\alpha$  o enlazado en  $\beta$ , o cuando R1 es un alcano C<sub>1</sub>-C<sub>27</sub> lineal o ramificado, R4 es:





anillo aromático; o R1 es un  $-(CH_2)_nR_5$ , en el que n es un número entero que oscila de 0-5, y R5 es  $-C(O)OC_2H_5$ , un cicloalcano de  $C_5-C_{15}$  opcionalmente sustituido, un anillo aromático opcionalmente sustituido, o un aralquilo, y

R2 es uno de los siguientes (a)-(e):

- 5
- (a)  $-CH_2(CH_2)_xCH_3$ ,
  - (b)  $-CH(OH)(CH_2)_xCH_3$ ,
  - (c)  $-CH(OH)(CH_2)_xCH(CH_3)_2$ ,
  - (d)  $-CH=CH(CH_2)_xCH_3$ ,
  - (e)  $-CH(OH)(CH_2)_xCH(CH_3)CH_2CH_3$ ,

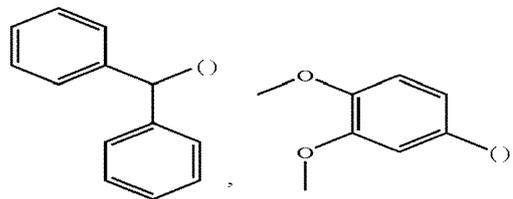
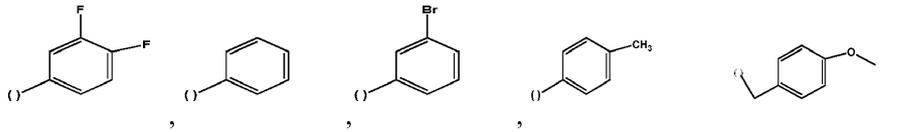
10 en los que X es un número entero que oscila de 4-17.

(v) Fórmula III, en la que R1 está sustituido con oxo; hidroxilo; halógeno; fenilo;  $-OC(O)R_6$ ;  $-R_6$ ;  $-C(O)R_6$ ; o  $N(R_6)_2$ ,

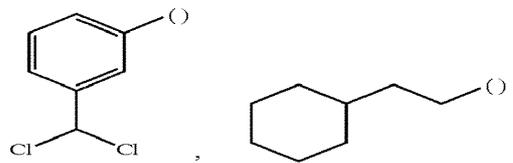
en el que cada R6 es independientemente hidrógeno, alquilo de  $C_1-C_6$ , o un anillo aromático opcionalmente sustituido con halógeno; hidroxilo;  $-OC(O)R_7$ ;  $-OR_7$ ;  $-C(O)R_7$  o  $N(R_7)_2$ , y

en el que cada R7 es independientemente hidrógeno o alquilo de  $C_1-C_6$ ,

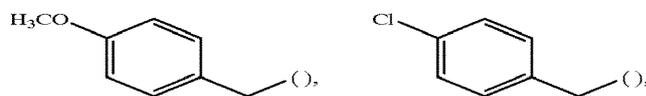
15 (vi) Fórmula III, en la que R1 se selecciona del grupo que consiste en

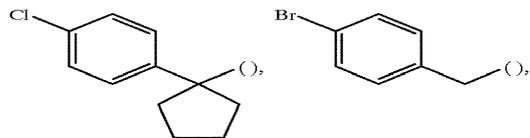
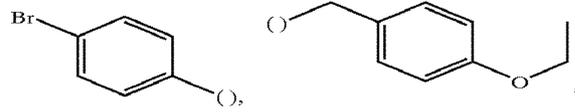
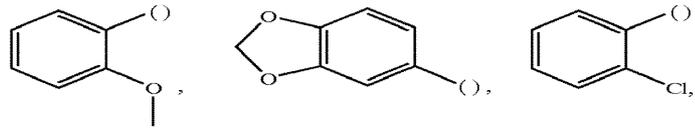


20



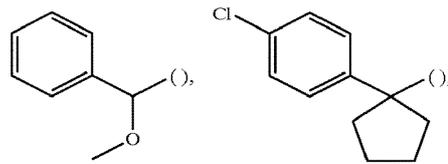
25



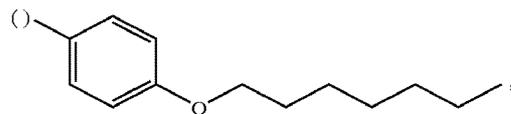
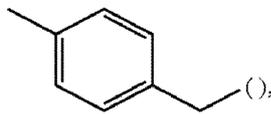


5

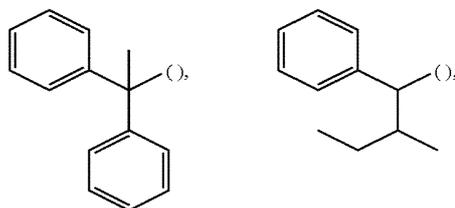
-continuación



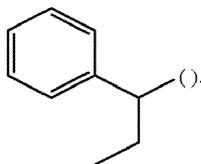
10



15



y



en los que ( ) representa el punto de unión de R1 al compuesto de Fórmula III,

- 5 (vii) (2S, 3S, 4R)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (KRN7000),
- (viii) (2S,3S)-1-O-( $\alpha$ -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3-octadecanodiol, y
- (ix) (2S, 3S, 4R)-1-CH<sub>2</sub>-( $\alpha$ -D-galactopiranosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecanotriol (a-C-GalCer).
6. La bacteria modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha célula bacteriana está viva, muerta, o atenuada.
- 10 7. La bacteria modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que potencia una respuesta de célula T CD8 específica de un antígeno frente a un antígeno.
8. La bacteria modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha bacteria modificada es un vehículo para un antígeno heterólogo.
- 15 9. Una composición que comprende la bacteria modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un vehículo farmacéutico.
10. La composición de la reivindicación 9, que comprende además un adyuvante.
11. La bacteria modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición según la reivindicación 9 o 10, para uso como un medicamento.
- 20 12. La bacteria modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición según la reivindicación 9 o 10, para uso en un método para la inducción de una respuesta inmune terapéutica o profiláctica en un animal, que comprende
- (a) administrar a un animal que necesite de dicho tratamiento dicha bacteria modificada o dicha composición; en la que dicha bacteria modificada o composición se administra en una cantidad suficiente para alterar la progresión de dicha enfermedad; o
- 25 (b) administrar a un animal que necesite de dicha prevención dicha bacteria modificada o dicha composición; en la que dicha bacteria modificada o composición se administra en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune en dicho animal frente a dicha enfermedad, en la que dicha enfermedad es una enfermedad vírica, una enfermedad bacteriana, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, o una enfermedad proliferativa.
- 30 13. La bacteria modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición según la reivindicación 9 o 10, para uso en un método para inducir respuesta inmune frente a un antígeno en un animal, que comprende administrar a dicho animal dicha bacteria modificada o dicha composición.
14. La bacteria modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición según la reivindicación 9 o 10, para uso en un método para modular una respuesta de célula T CD8 frente a BCG en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad eficaz de dicha bacteria modificada o dicha composición, en la que dicha célula bacteriana es una célula BCG.
- 35 15. Un método para obtener una bacteria micobacteriana modificada según la reivindicación 1, que comprende (a) cultivar una célula micobacteriana en un medio de cultivo, y (b) añadir un glicolípido de tipo ceramida, que es una glicosilceramida heteróloga para la célula micobacteriana y que estimula células T asesinas naturales (NKT), al medio de cultivo en condiciones en las que dicho glicolípido de tipo ceramida se incorpora en la pared celular de dicha célula micobacteriana.
- 40

FIG. 1

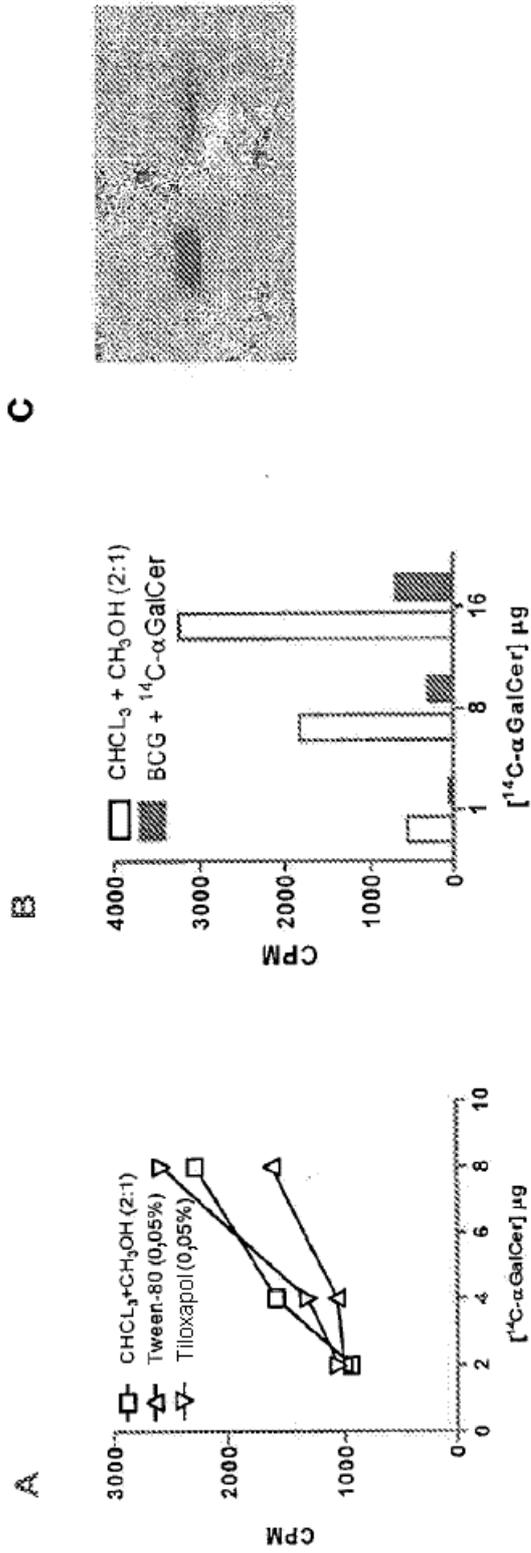


FIG. 2

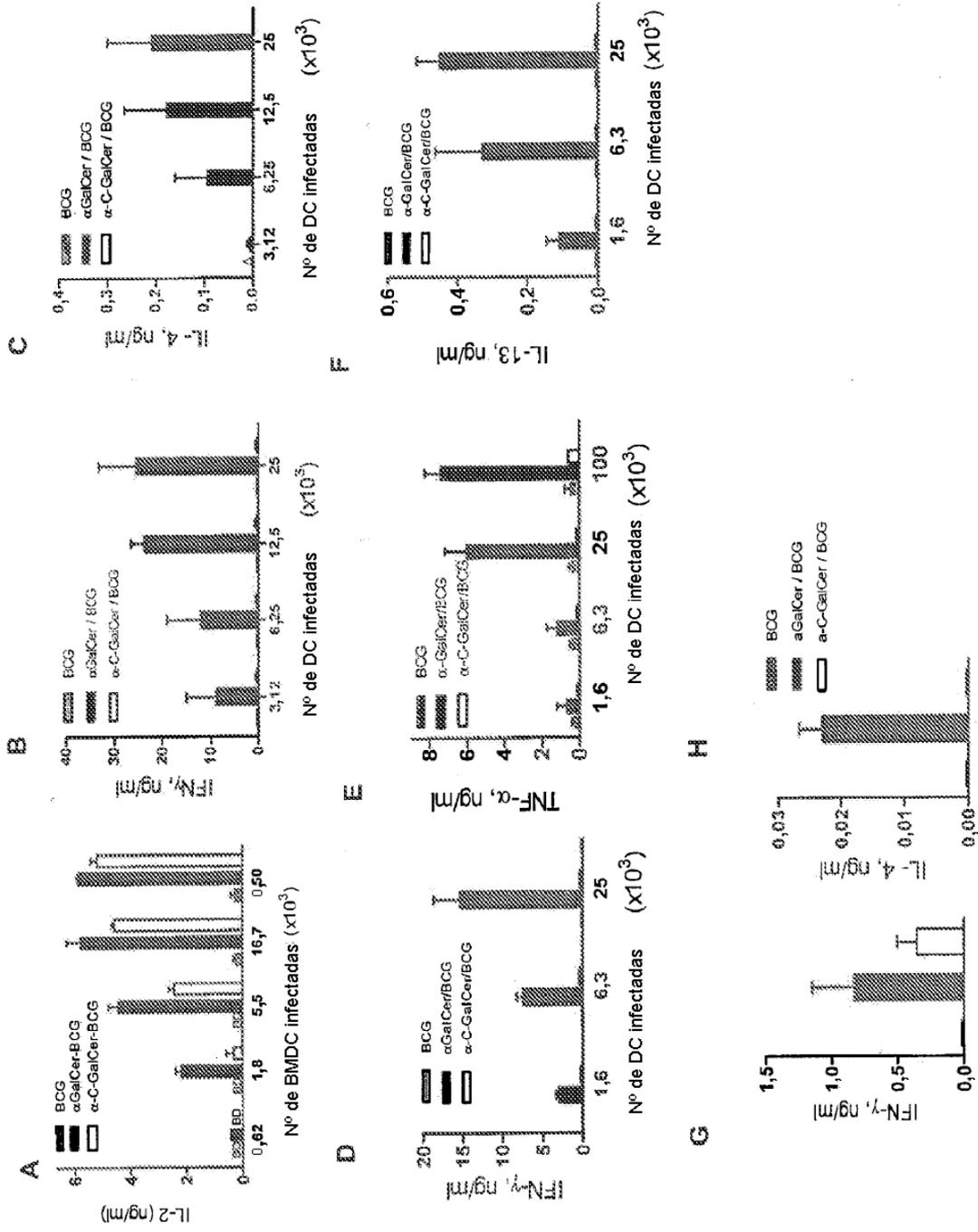


FIG. 3

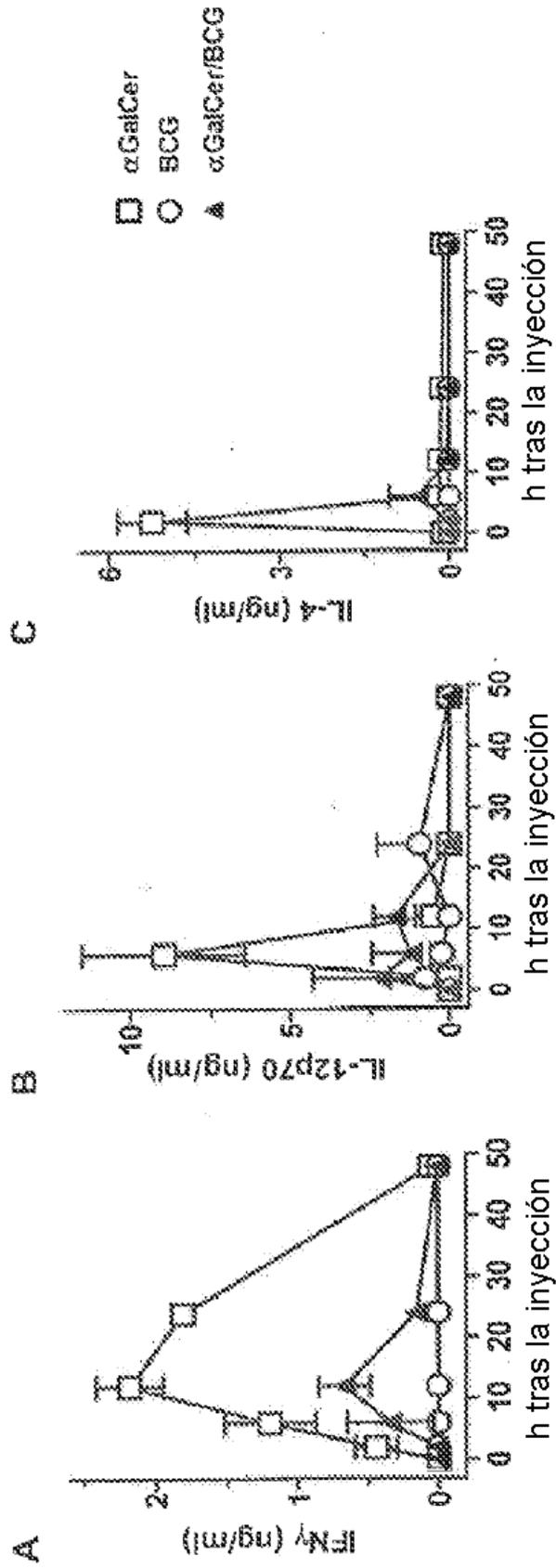


FIG. 4

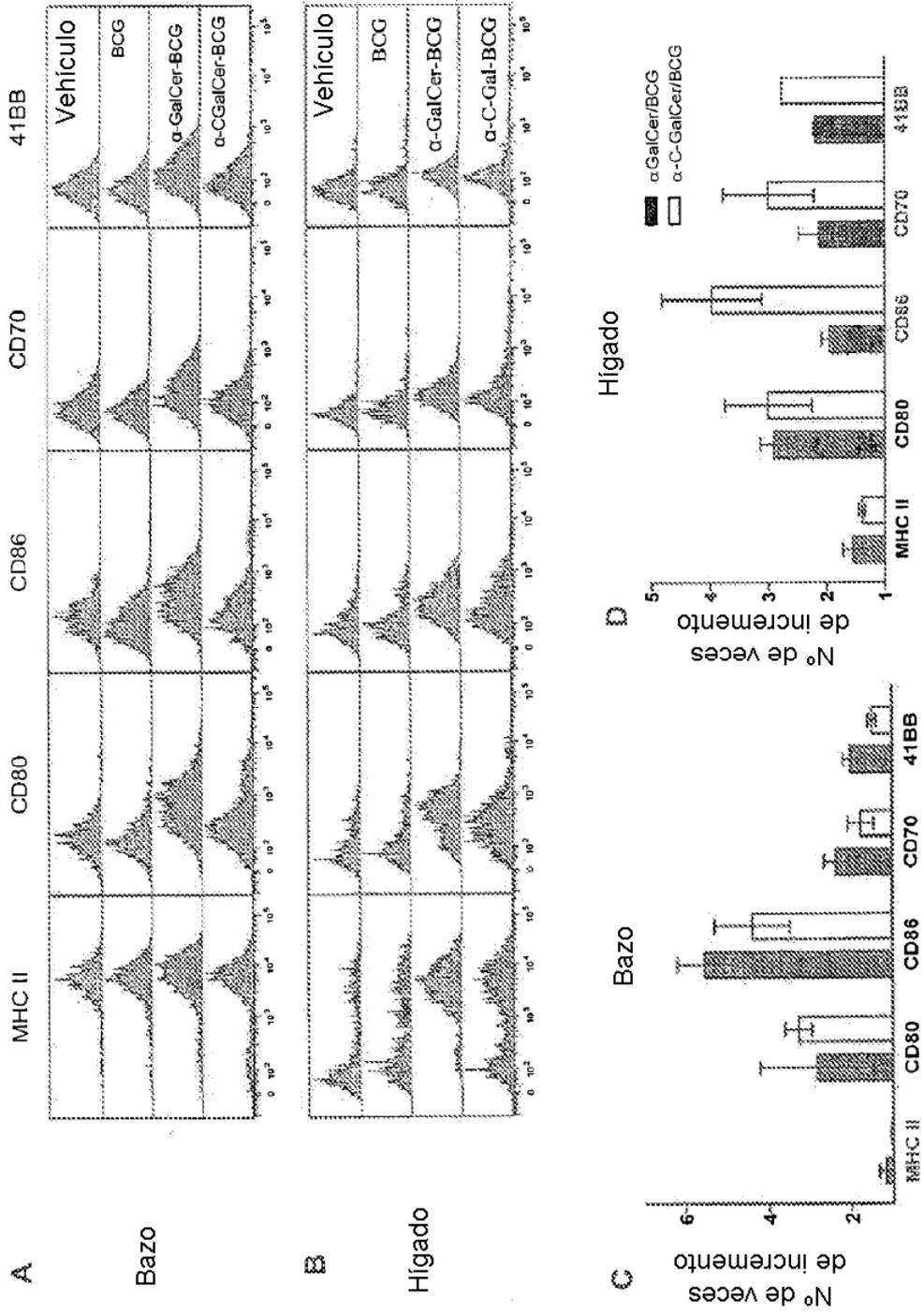


FIG. 5

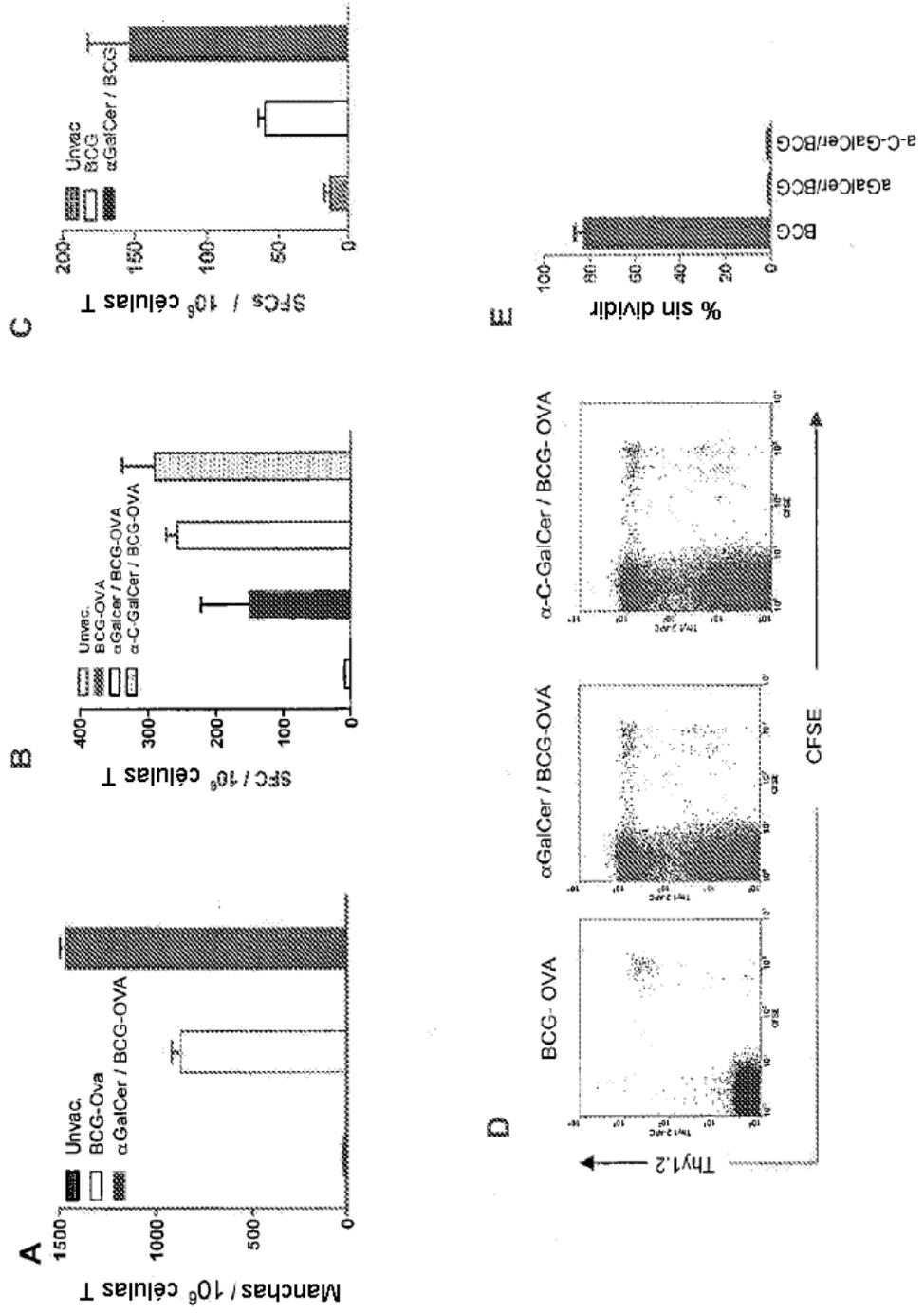


FIG. 6

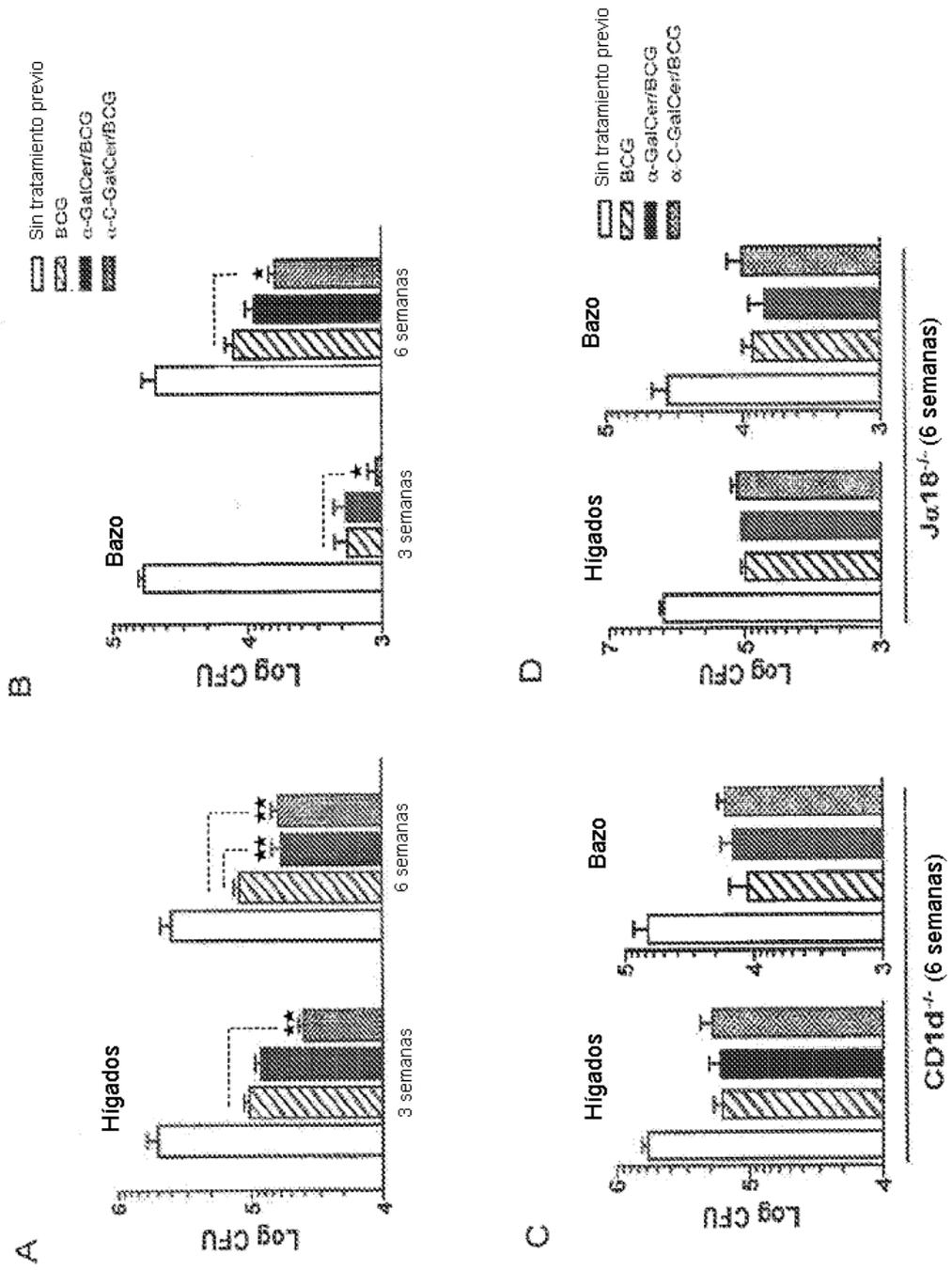


FIG. 7

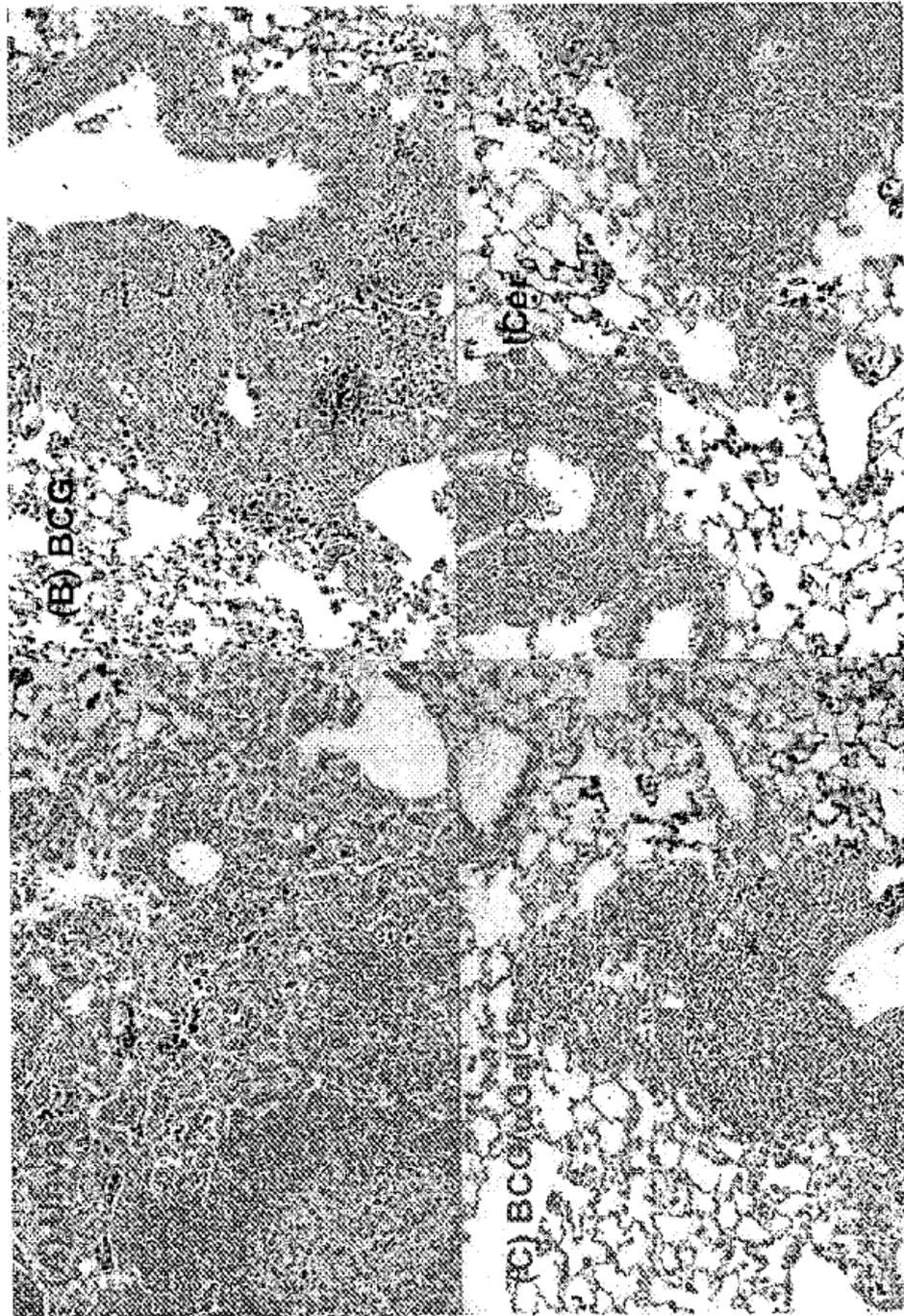


FIG. 8

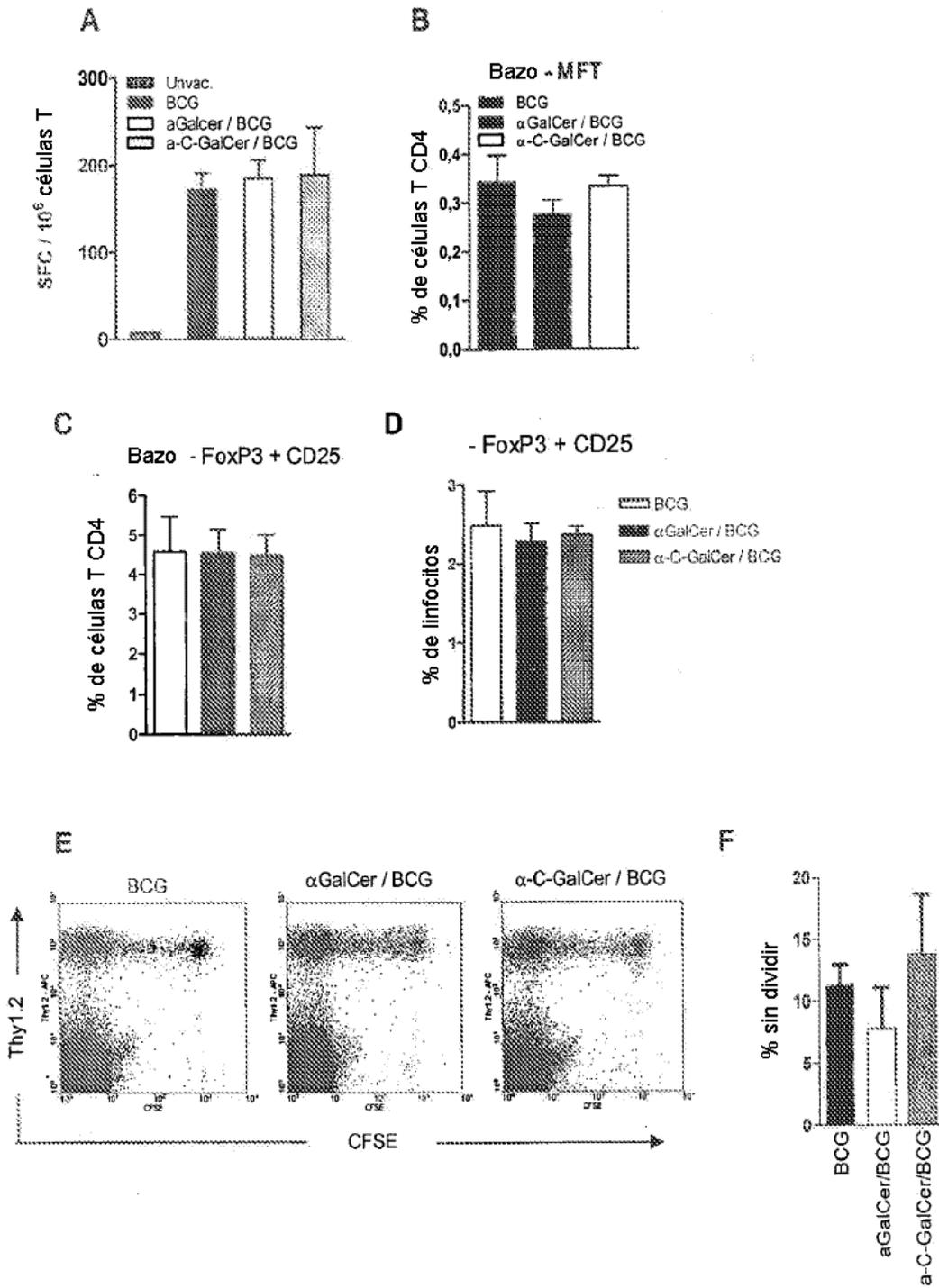


FIG. 9

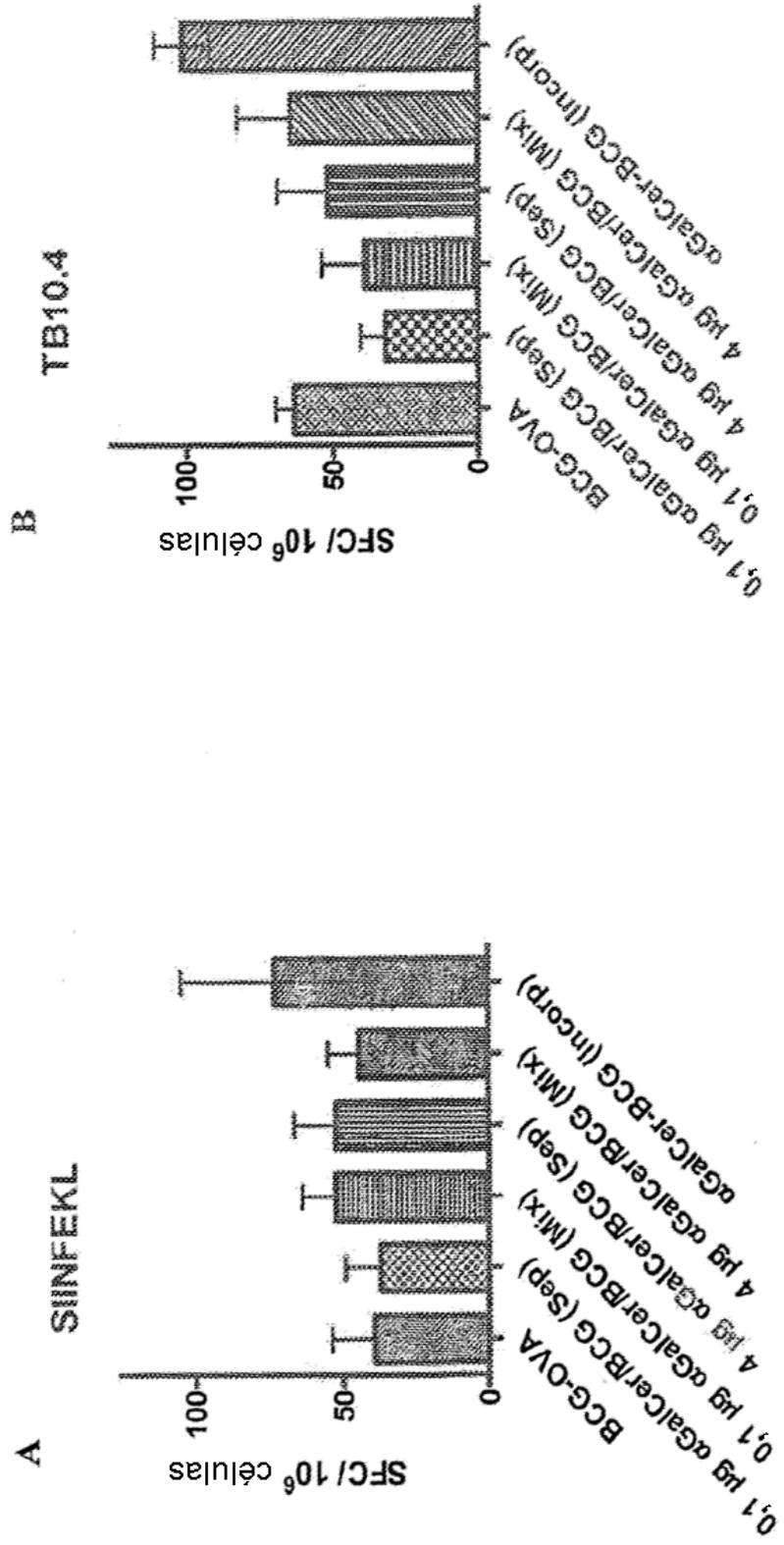


FIG. 10

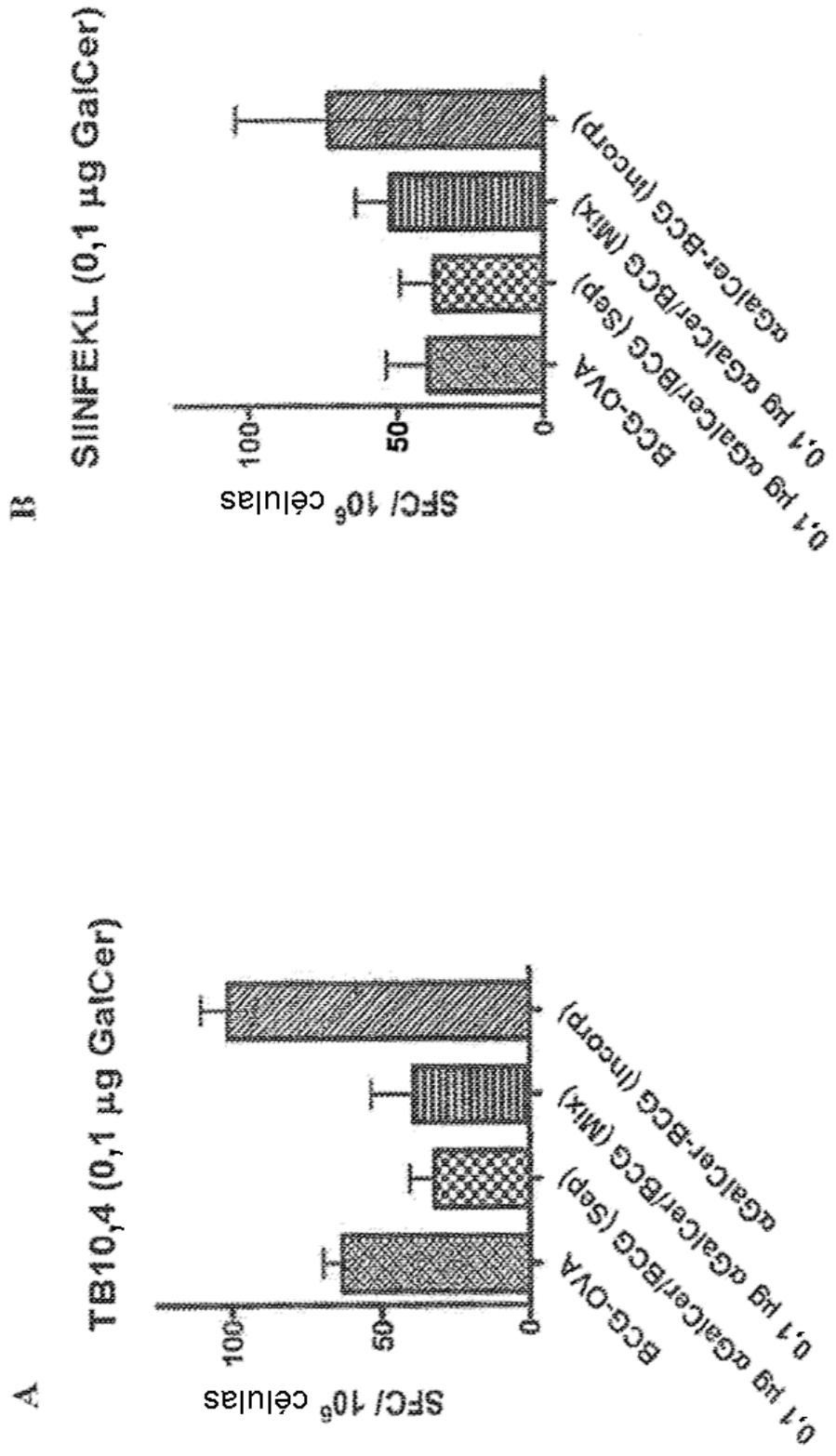


FIG. 11

