

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 028**

21 Número de solicitud: 201830628

51 Int. Cl.:

**A61K 39/04** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**22.06.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.12.2019**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
MARQUÉS DE VALDECILLA (100.0%)**

**Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n  
39011 Santander (Cantabria) ES**

72 Inventor/es:

**ÁLVAREZ DOMÍNGUEZ, Carmen;  
CALDERÓN GONZÁLEZ, Ricardo;  
TERÁN NAVARRO, Héctor;  
SALCINES CUEVAS, David;  
FRANDE CABANES, Elisabet;  
GARCÍA MARTÍN, Isabel;  
MARRADI, Marco y  
PENADÉS ULLATE, Soledad**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **VACUNA MULTIVALENTE PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS, LISTERIOSIS Y NEUMONÍA**

57 Resumen:

Vacuna multivalente para el tratamiento y prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonía.

La presente invención se refiere a una vacuna sintética multivalente eficaz en el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonías. Las vacunas terapéuticas de la presente invención están constituidas por gliconanopartículas de oro conjugadas a los péptidos 1-15 de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH<sub>1-15</sub>) de varios géneros bacterianos.

ES 2 736 028 A1

## DESCRIPCIÓN

### VACUNA MULTIVALENTE PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LA TUBERCULOSIS, LISTERIOSIS Y NEUMONÍA

5

El objeto de la invención es proporcionar una vacuna sintética multivalente eficaz en el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonías. Las vacunas terapéuticas de la presente invención están constituidas por gliconopartículas de oro conjugadas a los péptidos 1-15 de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH<sub>1-15</sub>) de varios géneros bacterianos.

10

### ESTADO DE LA TÉCNICA

En la actualidad existen especies bacterianas que, por diferentes motivos, están cobrando cada vez una mayor relevancia dentro del ámbito médico y farmacéutico, y entre las cuales se encuentran aquéllas pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*, por ser causantes de enfermedades como la tuberculosis, listeriosis y neumonías.

15

La tuberculosis está causada por bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que comprende a: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. microti*. Aunque *M. tuberculosis* es el principal agente causante de la tuberculosis, una pequeña parte de los casos son debidos a otras micobacterias destacando especialmente *M. africanum* responsable de un número significativo de casos en África.

20

25

La única vacuna aprobada para la prevención de tuberculosis es el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), que utiliza una cepa atenuada de *M. bovis*. Mientras que esta vacuna tiene una alta efectividad a la hora de prevenir la tuberculosis extra-pulmonar, su eficacia para prevenir la tuberculosis pulmonar presenta mucha variación entre estudios, mostrando entre 0-80% de efectividad, la cual, además, se ve reducida con la edad. Debido a esto existe un gran interés en el desarrollo de nuevas vacunas para la prevención de la tuberculosis. En 2016 había 13 nuevas vacunas contra la tuberculosis en distintas fases de ensayos clínicos.

30

35

Por otro lado, en los países desarrollados las infecciones neumocócicas ocurren tanto en niños donde la mortalidad no es muy alta y cursa principalmente con meningitis; como en ancianos donde suele cursar con neumonías. Además, individuos con algún tipo de inmunosupresión son también individuos de alto riesgo a infecciones por este patógeno como pacientes esplenectomizados, con agammaglobulinemia, leucosis aguda y crónica y mieloma múltiple.

La mayor parte de las pulmonías, así como posibles bronquitis, meningitis, otitis y septicemia están causadas por *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), una bacteria humana gram-positiva y patogénica conocida como neumococo.

La vacunación por el neumococo es de dos tipos, las vacunas que contienen polisacáridos puros (VNP23) y las que contienen polisacáridos conjugados a un "carrier" o transportador proteico (VNC10 y VNC13). En cuanto a la respuesta inmunológica de memoria, las vacunas VNC10 y VNC13 son las que generan mejor respuesta al contener antígenos T-dependientes y son bastante eficaces en niños, mientras que la VNP23 no genera respuesta memoria al basarse su composición en antígenos T-independientes. Ninguna de ellas es muy eficaz en los individuos adultos o ancianos, por lo que una vacuna que pudiera dar una buena respuesta memoria es muy necesaria para esta población.

En tercer lugar, la listeriosis es la enfermedad causada por *L. monocytogenes*, una bacteria patogénica gram-positiva que causa infecciones alimentarias y que su mejor característica es que es capaz de crecer a temperaturas bajas tanto a 4°C como a -20°C. *L. monocytogenes* aunque no es un patógeno intracelular estricto, sí se comporta como una bacteria patogénica intracelular, ya que es capaz de invadir célula a célula en un epitelio, sin tocar la matriz extracelular. Esta bacteria se encuentra con una distribución ubicua en la naturaleza, tanto en el suelo, agua o ensilado, lo que hace que existan una gran variedad de animales que se contaminen y puedan ser portadores.

En general los individuos inmunocomprometidos son los que presentan un alto riesgo a listeriosis, bien por una inmunosupresión natural como es el embarazo, los recién nacidos o los ancianos, o bien por una inmunosupresión patológica como son los

pacientes con cáncer, autoinmunes, con afecciones hepáticas o renales, pacientes en tratamiento con inmunosupresores o pacientes con SIDA.

5 Por otro lado, hasta la fecha, el péptido que comprende los aminoácidos 1-22 de la región N-terminal de la GAPDH (GAPDH<sub>1-22</sub>) de *L. monocytogenes* ha sido utilizado como antígeno en vacunas basadas en nanopartículas y en vacunas celulares, mostrando gran capacidad para generar respuesta inmune e inducir protección para la prevención de listeriosis. Además, este péptido tiene actividad enzimática, al ser capaz de ADP-ribosilar GTPasas de bajo peso molecular implicadas en el transporte  
10 intracelular de los fagosomas.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado ninguna GAPDH de los géneros *Streptococcus* y *Mycobacterium* capaz de producir una buena respuesta inmune. Tampoco se conoce si estas proteínas, además de su actividad enzimática realizada  
15 en la glicólisis, catalizan reacciones relacionadas con la virulencia del patógeno, si pueden interferir con la función de determinadas proteínas implicadas en los procesos de fusión endosoma-endosoma y regulación del tráfico de estos elementos celulares o si son capaces en general de dar lugar a una buena respuesta inmune. La confirmación de estas características haría posible que estas proteínas fuesen usadas  
20 como dianas terapéuticas o para el desarrollo de vacunas.

No existen vacunas eficaces frente todas las enfermedades infecciosas que causan estas especies bacterianas, infecciones tanto cutáneas como la lepra, el granuloma de las piscinas o el impétigo, infecciones meningíticas o granulomatosis cutáneas como  
25 la listeriosis o infecciones respiratorias como la faringitis bacteriana, la escarlatina, la tuberculosis o las neumonías, enfermedades que sobre todo afectan a personas con un sistema inmune disminuido como son los neonatos o las personas mayores de 60 años. Por ello, una vacuna que pudiera proteger frente a las especies patogénicas de los tres géneros bacterianos, no sólo supondría un ahorro para los sistemas  
30 nacionales de salud, sino que además sería una vacuna multivalente que evitaría sucesivas inoculaciones en las poblaciones de riesgo, con una sólo inoculación se podría proteger frente a todas. Además, si dichas vacunas fueran específicamente vacunas sintéticas con nanomateriales, tendrían la ventaja de presentar una toxicidad escasa, y, por tanto, su uso en humanos sería fácilmente aprobado como fármaco  
35 preventivo.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la invención es proporcionar una vacuna sintética multivalente eficaz en el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonía, compuesta por  
5 gliconanopartículas de oro conjugadas a la SEQ ID NO: 1 que comprende los aminoácidos 1-22 de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) de varios géneros bacterianos (*Mycobacterium*, *Listeria* y *Streptococcus*) que son capaces de proteger frente a las diferentes infecciones bacterianas generadas por estos patógenos, más preferiblemente la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 5 que comprende  
10 los aminoácidos 1-15 de la GAPDH de las especies bacterianas indicadas arriba.

La invención se basa en que dicha SEQ ID NO: 1 que comprende los aminoácidos 1-22 de las GAPDH de estos patógenos presentan una homología de secuencia, entre ellas, superior al 90%, más preferiblemente la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 5 que  
15 consiste en los aminoácidos 1-15 de la GAPDH de los géneros bacterianos seleccionados de entre *Mycobacterium* spp. *Listeria* spp. y *Streptococcus* spp. y que presentan una homología de secuencia entre ellas de un 99%. Esta alta homología de secuencia hace posible que la respuesta inmune generada sea común a los tres patógenos y por ello se obtenga protección multivalente.

20 Hasta la fecha no existen vacunas frente a ninguna de estas enfermedades infecciosas: tuberculosis, listeriosis o neumonías bacterianas que afectan a personas mayores de 50 años, que suelen además responder mal a las vacunas y, salvo las vacunas frente a neumonías bacterianas por *Streptococcus*, no existen tampoco  
25 vacunas para neonatos frente a infecciones causadas por los géneros *Mycobacterium* y *Listeria*.

Es posible que estas nanovacunas pudieran funcionar para otros patógenos donde la SEQ ID NO: 1 presente una homología inferior al 90%, como en el género  
30 *Pseudomonas*, y otros géneros bacterianos menos relacionados y frente a los que también podrían conferir cierta protección como *Staphylococcus*.

Se probaron varias terapias en el modelo murino con el fin de aportar datos comparativos que demuestran la eficiencia multivalente de las nanovacunas frente a

*Mycobacterium tuberculosis* (GNP-GAPDH<sub>MTB</sub>), *Streptococcus pneumoniae* (GNP-GAPDH<sub>SP</sub>) y *Listeria monocytogenes* (GNP-GAPDH<sub>LM</sub>).

Los resultados obtenidos indican que las nanovacunas que comprenden la SEQ ID  
 5 NO: 1 de *Listeria*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*, más preferiblemente la SEQ ID  
 NO: 5, tienen alta capacidad de protección multivalente frente a patógenos de los tres  
 géneros en modelos de ratón, como son *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*),  
*Mycobacterium marinum* (*M. marinum*) o *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)  
 y alta capacidad estimuladora *in vitro* de células dendríticas derivadas de monocitos  
 10 sanguíneos (MoDC) en pacientes con listeriosis para generar una buena respuesta  
 inmune innata necesaria para preparar vacunas pre-clínicas. Dada la secuencia  
 altamente homóloga entre las tres especies bacterianas y exacta dentro de las  
 especies patogénicas de cada género, los resultados en este estudio indican que las  
 nanovacunas que comprenden la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente la SEQ ID NO:  
 15 5, podrían ser candidatos muy adecuados para la protección multivalente frente a  
 listeriosis, tuberculosis y neumonías, cubriendo una necesidad en poblaciones de  
 riesgo a listeriosis, tuberculosis y neumonías.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un complejo  
 20 que comprende un núcleo de átomos de oro al que se une covalentemente al menos:  
 a. un primer ligando, que consiste en la SEQ ID NO: 5, y  
 b. un segundo ligando que consiste en un grupo de hidratos de carbono.

En una realización preferida, la SEQ ID NO: 5 se selecciona de la lista que consiste en  
 25 la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otra realización más preferida, la  
 SEQ ID NO: 5 y, por tanto, también las SEQ ID NOs: 6, 7 y 8, proceden de las  
 especies bacterianas *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis* y *S. pneumoniae*,  
 respectivamente.

30 La sustitución de cada posición alternativa en la SEQ ID NO: 1 genera péptidos con  
 una homología de secuencia superior al 95%. En una realización preferida, en la SEQ  
 ID NO: 5, el aminoácido en la posición 2 es una Treonina (T) y en la posición 4 es una  
 Lisina (K) dando lugar a la SEQ ID NO: 6. En una realización preferida, en la SEQ ID  
 NO: 5, el aminoácido en la posición 2 es una Treonina (T) y en la posición 4 es una  
 35 Arginina (R) dando lugar a la SEQ ID NO: 7. En una realización preferida, en la SEQ

ID NO: 5, el aminoácido en la posición 2 es una Valina (V) y en la posición 4 es una Lisina (K) dando lugar a la SEQ ID NO: 8.

5 En otra realización preferida, el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 5 es una secuencia aislada que procede de la proteína GAPDH de las bacterias seleccionadas de entre los géneros *Mycobacterium spp.*, *Listeria spp.*, y *Streptococcus spp.*, y más preferiblemente de sus especies patogénicas seleccionadas de entre *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y  
10 *Streptotoccus pneumoniae*.

En otra realización preferida, los hidratos de carbono del segundo ligando se seleccionan de la lista que comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa, manosa, xilosa, o fructosa. En una realización más preferida, este segundo ligando  
15 comprende glucosa, y más preferiblemente comprende  $\beta$ -D-glucosa (beta-D-glucosa).

En otra realización preferida, los complejos pueden tener un número medio de ligandos totales unidos al núcleo metálico de oro de al menos un ligando tipo péptido y de un ligando tipo hidrato de carbono, en total dos ligandos. Más preferiblemente de  
20 20 ligandos, más preferiblemente de 50 ligandos, más preferiblemente de 60 ligandos y, aún más preferiblemente, de 70 ligandos. En este sentido, el ratio glucosa:péptido puede estar comprendido entre 8:1 y 10:1 y más preferentemente entre 9:1.

Este ratio glucosa/péptido del complejo de la invención se determina  
25 cuantitativamente a través de espectros de RMN<sup>1H</sup> de las soluciones de las nanopartículas a 500 MHz para identificar señales inequívocamente pertenecientes a los componentes individuales de cada ligando confirmando que la intensidad de estas señales se corresponde con las previstas según la proporción de los diferentes ligandos en la solución original.

30

En una realización preferida, las poblaciones de complejos pueden tener densidades diferentes de los ligandos unidos al núcleo.

En otra realización preferida, los complejos de la invención pueden unirse a un tercer tipo de ligando que consiste en un adyuvante, o bien este adyuvante puede formar parte de una composición farmacéutica junto con los complejos de la invención.

- 5 En otra realización preferida, los complejos de la invención presentan un tamaño nanométrico, lo que permite su captación por las células y, por tanto, la presentación del antígeno en la superficie celular.

Preferiblemente, estos complejos tienen núcleos de oro con diámetros medios de  
10 entre 1,5 y 2,5 nm, y más preferiblemente de entre 1,8 y 2,1 nm. El diámetro medio de los núcleos de oro puede medirse usando técnicas bien conocidas en la materia como un microscopio electrónico de transmisión. Cuando se considera, además del núcleo de oro el ligando carbohidrato (gliconanopartícula, GNP), el diámetro medio total de las partículas es de entre 4,5 y 5,5 nm, y finalmente el tamaño del complejo al  
15 incorporar el ligando aumenta el diámetro medio entre 9 y 11 nm.

De esta manera, en una realización preferida, el tamaño del complejo de la invención, que consiste en una gliconanopartícula de oro cargada con los distintos péptidos, según se describe en el presente documento, en proporción 9:1, se encuentra en el  
20 rango de entre 12,5 y 16,5 nm.

En otra realización preferida, los complejos de la invención son solubles en agua. Esto puede usarse en su purificación y, de manera importante, significa que pueden usarse en solución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula.  
25 El hecho de que los complejos sean solubles tiene la ventaja de que los ligandos se presentan en una conformación natural. Para las aplicaciones terapéuticas, los complejos no son tóxicas, son solubles y estables en condiciones fisiológicas.

En otra realización preferida, el complejo de la invención también puede comprender  
30 un marcador, como un grupo fluorescente o fluoróforo, un radionucleido, un marcador magnético, un colorante, un átomo activo en RMN o un átomo que es capaz de detectarse usando resonancia de plasmón superficial. Entre los marcadores magnéticos preferidos se incluyen los grupos paramagnéticos que comprenden  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>. Entre los átomos activos en

RMN preferidos se incluyen  $Mn^{+2}$ ,  $Gd^{+3}$ ,  $Eu^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $V^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  o lantánidos<sup>+3</sup>.

Se entiende por "fluoróforo" cualquier compuesto que puede emitir una señal luminosa o coloreada tras su excitación. Ejemplos de fluoróforos son, aunque sin limitarnos: 5 fluoresceína, rodamina, cumarina, cianina, y sus derivados, GFP, YFP y RFP, Oregon verde, eosina, rojo Texas, derivados de naftaleno, derivados de la cumarina, derivados de oxadiazol, derivados de pireno, derivados de oxacina (como rojo Nilo o azul Nilo), derivados de acridina, derivados de tetrapirrol, Alexa Flúor, DyLight Flúor, 10 CY5, TAMRA, JOE o biotina.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de la SEQ ID NO: 1 como vacuna multivalente para el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonía.

15 En una realización preferida, la SEQ ID NO: 1 consiste en una secuencia aislada que comprende una secuencia de aminoácidos común entre diferentes géneros bacterianos, preferiblemente *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*, y donde dicha SEQ ID NO: 1 es preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la proteína GAPDH: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En una realización más 20 preferida, la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 2.

En otra realización más preferida, la SEQ ID NO: 1 consiste en los aminoácidos 1 a 15 de la proteína GAPDH (SEQ ID NO: 5) de los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, y 25 *Streptococcus*. Mas preferiblemente, la SEQ ID NO: 5 es la SEQ ID NO: 6, 7 y 8. En otra realización más preferida, las SEQ ID NO: 5 es la SEQ ID NO: 6.

En otra realización preferida, dicha proteína GAPDH procede de las bacterias seleccionadas de entre *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*, y más 30 preferiblemente de sus especies patógenas seleccionadas de entre *M. marinum*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. leprae*, *L. monocytogenes*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*.

En otra realización preferida, la SEQ ID NO: 1 forma parte de un complejo que 35 comprende un núcleo de átomos de oro al que se une covalentemente; y en una

realización aún más preferida, este complejo comprende adicionalmente un ligando que consiste en un grupo de hidratos de carbono.

5 En una realización más preferida, los hidratos de carbono del segundo ligando se seleccionan de la lista que comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa, manosa, xilosa, o fructosa. En una realización más preferida, este segundo ligando comprende glucosa, y más preferiblemente comprende  $\beta$ -D-glucosa (beta-D-glucosa).

10 En otra realización preferida, los complejos de la invención pueden unirse a un tercer tipo de ligando que consiste en un adyuvante, o bien este adyuvante puede formar parte de una composición farmacéutica junto con los complejos de la invención.

15 En una realización particular, se diseñó un complejo que consiste en una gliconanopartículas de oro cargada con la SEQ ID NO: 1 en proporción 9:1 para la vacunación multivalente profiláctica y/o terapéutica frente a tuberculosis, listeriosis y neumonía.

20 En la presente invención, el término "vacunación" incluye una inmunización activa, es decir, una inducción de una respuesta inmunitaria específica debido a la administración, p. ej. por las vías subcutánea, intradérmica, intramuscular, oral o nasal, de pequeñas cantidades del péptido que es reconocido como extraño por el individuo vacunado y es, por tanto, inmunogénico en una formulación adecuada.

25 En la presente invención, el término "adyuvante" se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por sí mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Por ejemplo, péptidos o hidratos de carbono estimuladores de células T colaboradoras que estimulan la red inmunitaria innata. Cuando se usan adyuvantes adicionales, la invención permite el uso de un único vehículo de administración para administrar tanto el antígeno como los adyuvantes, o  
30 múltiples antígenos o adyuvantes. En una realización preferida el adyuvante se selecciona de entre Advax y DIO-1.

35 En otra realización preferida, los complejos de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas eficaces en el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonía.

Las pautas de administración de estas composiciones farmacéuticas incluyen las vías enteral o parenteral. La administración parenteral incluye la administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmico, ocular, rectal, nasal, 5 inhalación y aerosol), intragástrica, oral y vías sistémicas rectales. Más preferiblemente, los complejos de la invención o las composiciones farmacéuticas que las comprenden se administran por vía intravenosa, cutánea, subcutánea, o intraperitoneal.

10 En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas pueden estar en las formas de composiciones sólidas o líquidas. Estas composiciones comprenden generalmente un vehículo de determinado tipo, por ejemplo, un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte, o un vehículo líquido como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede 15 incluirse solución salina fisiológica, o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Estas composiciones y preparaciones generalmente contienen al menos el 0, 1% en peso del compuesto.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la 20 dolencia, el principio activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que no contenga pirógenos y tenga el pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia están bien capacitados para preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, p. ej., en solución salina fisiológica, una dispersión preparada 25 con glicerol, polietilenglicol líquido o aceites.

Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más de entre un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonizante, conservante o antioxidante, u otros materiales farmacéuticamente 30 aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Estos materiales deberán no ser tóxicos y no interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan típicamente para que tengan 35 un pH de entre aproximadamente 3,0 y 9,0; más preferiblemente entre

aproximadamente 4,5 y 8,5 y, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, empleando típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede ajustarse por otro lado usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

Generalmente, los conservantes se incluyen en las composiciones farmacéuticas para retrasar el crecimiento microbiano, extendiendo la vida de las composiciones y permitiendo el uso múltiple de la presentación. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen fenol, metacresol, alcohol de bencilo, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetronio. Típicamente, los conservantes se emplean en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1,0% (p/v).

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una cantidad profilácticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente efectiva (según sea el caso, prevención o tratamiento), siendo esto suficiente para que se muestre un beneficio para el individuo.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto sometido a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes del producto de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los

excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes. Ejemplos de excipientes son aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, endulzantes, saborizantes y colorizantes. Ejemplos más concretos no limitantes de excipientes aceptables son almidones, azúcares, xilitol, sorbitol, fosfato de calcio, grasas esteroideas, talco, sílice o glicerina entre otros.

La “forma galénica o forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

Un “vehículo” o portador es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. El vehículo es farmacéuticamente aceptable. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, 5 líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyectable, inhalante, gel, jarabe, nebulizador, microesfera o aerosol, preferiblemente en forma de comprimido, cápsula, polvo, gránulo, solución, supositorio o jarabe.

10

Las composiciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

15 En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la 20 invención y otro agente terapéutico. El término "principio activo" es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

En otra realización preferida, los complejos de invención, o las composiciones 25 farmacéuticas que las comprendan, pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

30 En una realización preferida, los complejos de la invención descritas pueden ser utilizados solas o en combinación con las terapias actuales para el tratamiento de la tuberculosis, listeriosis y neumonía.

Otro aspecto de la invención se refiere al método de tratamiento y/o prevención de la de la tuberculosis, listeriosis y neumonía, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la SEQ ID NO: 1.

5 En una realización preferida, la SEQ ID NO: 1 consiste en las secuencias que se seleccionan de la lista que consiste en: SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En otra realización más preferida, la SEQ ID NO: 1 se selecciona de la lista que consiste en la SEQ ID NOs: 2, 6, 7 y 8. En otra realización más preferida aún, la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 2 o 6.

10

En otra realización preferida, dicha proteína GAPGH procede de las bacterias seleccionadas de entre los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*, y más preferiblemente de sus especies patogénicas seleccionadas de entre *M. marinum*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. leprae*, *L. monocytogenes*, *S. pyogenes* y *S.*  
15 *pneumoniae*.

15

En otra realización preferida, la SEQ ID NO: 1 forma parte de un complejo que comprende un núcleo de átomos de oro al que se une covalentemente; y en una realización aún más preferida, este complejo comprende adicionalmente un ligando  
20 que consiste en un grupo de hidratos de carbono.

20

En una realización preferida, la SEQ ID NO: 1 consiste en una secuencia aislada que comprende una secuencia de aminoácidos común entre diferentes géneros bacterianos, preferiblemente *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*, y donde dicha  
25 SEQ ID NO: 1 es preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la proteína GAPDH: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En una realización más preferida, la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 2.

25

En otra realización más preferida, la SEQ ID NO: 1 consiste en los aminoácidos 1 a 15  
30 de la proteína GAPDH (SEQ ID NO: 5) de los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*. Mas preferiblemente, la SEQ ID NO: 5 es la SEQ ID NOs: 6, 7 y 8. En otra realización más preferida, las SEQ ID NO: 5 es la SEQ ID NO: 6.

30

En una realización más preferida, los hidratos de carbono del segundo ligando se  
35 seleccionan de la lista que comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa,

35

manosa, xilosa, o fructosa. En una realización más preferida, este segundo ligando comprende glucosa, y más preferiblemente comprende  $\beta$ -D-glucosa (beta-D-glucosa).

En otra realización preferida, estos complejos pueden unirse a un tercer tipo de  
5 ligando que consiste en un adyuvante, o bien este adyuvante puede formar parte de una composición farmacéutica junto con los complejos de la invención.

En una realización particular, se diseñó un complejo que consiste en una gliconanopartícula de oro cargada con la SEQ ID NO: 1 en proporción 9:1 para la  
10 vacunación multivalente profiláctica y/o terapéutica frente a tuberculosis, listeriosis y neumonía.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o  
15 pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Secuencias de péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> en especies patogénicas de los géneros *Mycobacterium*, *Listeria* y *Streptococcus* con homología de secuencia superior al 90% respecto al péptido que comprende la SEQ ID NO: 1, y del 99% respecto del péptido  
25 que comprende la SEQ ID NO: 5 que se corresponde en la figura con la parte subrayada del péptido de SEQ ID NO: 1.

**FIG. 2.** ADP-ribosilación de Rab5a con extractos bacterianos y reconocimiento con anticuerpos anti-GAPDH<sub>1-22</sub>. (Izda) Extractos de *L. monocytogenes* (Lm), *M. tuberculosis* (Mtb) y *S. pneumoniae* (Sp) ADP-ribosilan Rab5a, así como el péptido 1-  
30 22 de GAPDH-*L. monocytogenes* (E1), que reproduce la capacidad enzimática del extracto de *L. monocytogenes*. Otras bacterias como *E. coli* (Ec) no presentan esta actividad, ni péptidos sin actividad enzimática como el 23-42 (E2) o con otra actividad enzimática como el péptido C-terminal implicado en la unión a G3P y en glicolisis, el 314-336 (E). (Drcha) Reconocimiento de GAPDH (43 kDa) en extractos bacterianos  
35 de Lm, Mtb o Sp con un anticuerpo anti-GAPDH1-22 de *L. monocytogenes*.

**FIG. 3.** Actividad ADP-ribosilación de péptidos GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (Lm), *M. tuberculosis* (Mtb) y *S. pneumoniae* (Sp).

**FIG. 4.** Respuesta inmunológica que inducen distintos péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (Lm), *M. tuberculosis* (Mtb) y *S. pneumoniae* (Sp) comparado con  
5 lisados bacterianos.

**FIG. 5.** Alta capacidad de protección del péptido GAPDH<sub>1-22</sub> en vacunas dendríticas.

**FIG. 6.** Gliconanopartículas de oro con el ligando segundo ( $\beta$ -D-glucosa) y secuencias de péptidos 1-15 de GAPDH de géneros *Mycobacterium*, *Listeria* y *Streptococcus* en especies patógenas de éstas (A). Representación molecular de GNP-LLO<sub>91-99</sub> y  
10 GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> en la especie *L. monocytogenes* (B). Co-localización (fluorescencia amarilla) de GNP-LLO<sub>91-99</sub> y moléculas MHC-I en células dendríticas (C).

**FIG. 7.** Protección a listeriosis neonatal con GNP-LLO<sub>91-99</sub> y GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> y Advax como adyuvante.

**FIG. 8.** Protección a listeriosis neonatal y morbilidades con nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> y DIO-1 como adyuvante. Las morbilidades son cerebro, piel y pulmón.  
15

**FIG. 9.** Protección frente a *L. monocytogenes* con nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *Listeria* y *Mycobacterium* comparado con la protección con vacunas dendríticas cargadas con los péptidos, GAPDH<sub>1-15</sub>-Mtb o GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm.

**FIG. 10.** (A) Protección frente a infección por *M. marinum* con nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *Listeria* y *Mycobacterium* comparado con la protección con vacunas dendríticas cargadas con los péptidos GAPDH<sub>1-15</sub>-Mtb o GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm. (B) Protección frente a *M. smegmatis* con nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> como en A.  
20

**FIG. 11.** Características poblacionales de pulmones y bazo de la protección con nanovacunas frente a *M. marinum*.

**FIG. 12.** Protección frente a la infección con *L. monocytogenes* con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Sp comparadas con dendríticas cargadas con los péptidos GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm o GAPDH<sub>1-15</sub>-Sp.  
25

**FIG. 13.** Protección frente a la infección con *Streptococcus pneumoniae* (Sp) con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Sp comparadas con dendríticas cargadas con los péptidos GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm o GAPDH<sub>1-15</sub>-Sp.  
30

**FIG. 14.** Protección multivalente de las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm, GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Mtb y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Sp frente a infecciones con las especies patógenas: *L. monocytogenes*, *M. marinum* y *S.pneumoniae*.

**FIG. 15.** Inducción de respuesta pro-inflamatoria (TNF- $\alpha$  e IL-12) en células dendríticas derivadas de monocitos sanguíneos (MoDC) de pacientes con listeriosis del HUMV incubadas con nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-Lm (24 horas).

**FIG. 16.** Protección frente a la infección con *L. monocytogenes*, *M. marinum* y  
 5 *S.pneumoniae* con vacunas dendríticas cargadas con los péptidos largos 1-22 de las GAPDH: GAPDH<sub>SP</sub>, GAPDH<sub>LM</sub> o GAPDH<sub>MTB</sub>.

**FIG. 17.** Protección frente a distintas infecciones con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> y GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> de *Listeria*.

## 10 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

## 15 Materiales y Métodos

*Bacterias, proteínas recombinantes y péptidos.*

Se utilizarán las siguientes bacterias: del género *Listeria*, *L. monocytogenes* fenotipo salvaje (cepa 1043S, obtenida del Dr. D.A. Portnoy, Berkeley University, CA) que se  
 20 cultiva en medio BHI durante 36 horas a 37°C y agitación y caracterizada con tinción de Gram y aglutinación con antisuero anti-*Listeria*; del género *Mycobacterium*, *M. smegmatis* (cepa salvaje cedida por los doctores, Dr. F. Sangari y Dra. A. Seoane, Dpto. Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander) y *M. marinum* (cepa cedida por el Dr. L. Martínez-Martínez, S. Microbiología, Hospital Reina Sofía,  
 25 Córdoba, obtenida de un aislado clínico de pacientes) se cultivan en medio LB líquido suplementado al 10% con Middlebrook ADC Growth Supplement y caracterizado mediante tinción de Kinyoun; y del género *Streptococcus*, *S. pneumoniae* (cepa salvaje cedida por el Dr. J. Calvo Montes, S. Microbiología, HUMV, Santander, obtenida de un aislado clínico de pacientes) se cultivan en medio de cultivo Todd-  
 30 Hewit (CTH) suplementado con 5% de suero de caballo y 0.5% de extracto de levaduras e incubadas 24 horas a 37°C. Las siguientes proteínas recombinantes producidas en *E. coli* fueron purificadas por métodos convencionales con sefarosa conjugada a glutatión: Rab5a, GAPDH-Lm (SEQ ID NO: 18), GAPDH-Mtb (SEQ ID NO: 19) y GAPDH-Sp (SEQ ID NO: 20). Los péptidos 1-22 y 1-15 de cada género  
 35 bacteriano, *Listeria* (SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, respectivamente), *Mycobacterium*

(SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 7, respectivamente) o *Streptococcus* (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, respectivamente) se compran a GenScript con pureza superior al 95%.

#### *Ratones.*

- 5 Para todos los experimentos de vacunación e infección se han utilizado ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8 semanas de edad.

#### *ADP-ribosilación.*

- Se utilizó el método de la incorporación de NAD-biotinilado en presencia de una alta concentración de ADP ribosa en el tampón enzimático, diferentes extractos bacterianos que pudieran contener el enzima capaz de realizar la ADP-ribosilación, en este caso la GAPDH con dicha actividad enzimática y distintos péptidos de la GAPDH para mapear la región de ADP-ribosilación, junto con Rab5a recombinante y purificada, que es la diana enzimática de la ADP-ribosilación y un extracto de citosol de células eucariotas como fuente de co-factores de ADPribosilación. La reacción implica la transferencia de la ADP-ribosa desde el anillo de NAD<sup>+</sup> a la proteína recombinante Rab5a mediante una reacción enzimática y no por adicción covalente de la ADP ribosa, lo que se observa porque no existe cambio en la ADP-ribosilación en presencia o ausencia de ADP ribosa, finalmente la reacción se detecta mediante un western-blot utilizando estreptoavidina conjugada a peroxidasa de rábano para su detección por quemiluminiscencia.
- 10  
15  
20

#### *Nanovacunas y adyuvantes.*

- Las gliconanopartículas (GNPs) conjugadas con los distintos péptidos en proporción 9:1 (LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9), GAPDH<sub>1-22</sub> (particularmente con la SEQ ID NO: 2, tal y como se describe en el Ejemplo 7), GAPDH<sub>1-15</sub> (particularmente con las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, tal y como se describe en el Ejemplo 8) se obtienen previamente mediante la adición de una solución de ácido tetracloroaurico (0,025 M) a una mezcla de glucosa (90%), el péptido (10%), y grupos tiol (0,012 M), diluidos en MeOH/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (3:3:1). A esta mezcla se le añadió NaBH<sub>4</sub> (1 M) y la mezcla se agita durante 2 horas a 25°C. El solvente se evapora y el residuo se lava con etanol, para re-disolverlo en agua milli-Q y purificarlo posteriormente mediante diálisis. Las nanopartículas se obtienen como un polvo de color marrón tras liofilización. La distribución del tamaño de las nanopartículas de oro se realiza mediante micrografías de la microscopía de transmisión electrónica (TEM), obteniéndose un análisis TEM de
- 25  
30  
35

tamaño medio y número de átomos de oro de  $2,1 \pm 0,5$  nm. La presencia de los ligandos, péptido y glucosa, se confirma por resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$ NMR y la cantidad de péptido concreto utilizado para cada ejemplo en las GNPs mediante NMR cuantitativa (qNMR). Los adyuvantes fueron los siguientes: Advax (Adv1) que se obtuvo de Vaxine cedido por el Dr. N. Petrovsky (Adelaida, Australia) y es un adyuvante polisacárido basado en la inulina y capaz de inducir respuestas de células T significativas, tanto de CD4+ como de CD8+. DIO-1 que se obtuvo de DIOMUNE S.A cedido por el Dr. M. Fresno (CBMSO, Madrid) y es un lipopolisacárido de *Ochrobactrum intermedium* capaz de estimular a las células dendríticas (DCs) y macrófagos (MØs), a través de los receptores de señalización: TLR-2 y TLR-4.

*Inmunogenicidad in vivo de distintos péptidos de la invención.*

Para averiguar la inmunogenicidad y respuesta de células T de los distintos péptidos que consisten en la SEQ ID NOs: 2, 3 y 4, que comprenden los aminoácidos 1 a 22 de las GAPDH de los diferentes microorganismos, se inocularon los cojinetes plantares de ratones C57BL/6 durante 7 días con 5 µg de cada péptido, así como igual cantidad de las GAPDH recombinantes correspondientes, GAPDH-Lm (SEQ ID NO: 18), GAPDH-Mtb (SEQ ID NO: 19) y GAPDH-SP (SEQ ID NO: 21), y de LLO recombinante de control (SEQ ID NO: 17) o lisados de dichas bacterias Lm, Mtb y SP. Posteriormente, se aíslan los ganglios poplíteos y se cultivan las células *in vitro* estimulándolas con distintas dosis de los péptidos, desde 0 a 500 µg/ml. La proliferación de las células T se analiza por la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina en el ADN de los linfocitos proliferantes y lectura de la radioactividad en un contador β (beta).

*Diferenciación de células dendríticas murinas (DC) y humanas (MoDC).*

Las DC murinas se obtienen de diferenciación de células de médula ósea murina tras cultivarlas en medios con 20% de suero y GM-CSF durante 7 días a 37°C y en presencia de CO<sub>2</sub> y seleccionadas positivamente con anticuerpos anti-CD11c conjugados a bolas magnéticas y separación en columnas magnéticas MACS™ (Miltenyi Biotech Inc). Las células CD11c<sup>+</sup>-DC se analizan mediante citometría de flujo para analizar su calidad y su fenotipo característico como MHC-II<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>CD11b<sup>low</sup>CD86<sup>-</sup>F4/80<sup>-</sup>Gr1<sup>-</sup>.

Igualmente, los monocitos humanos (Mo) se aíslan de los pacientes con listeriosis y controles sanos de una extracción sanguínea convencional y tras separación de

leucocitos en gradientes de Ficoll y selección positiva con anticuerpos anti-CD14 conjugados a bolas magnéticas en columnas MACSTM. Los Mo-CD14<sup>+</sup> se diferencian a DC (MoDC) *in vitro* tras cultivarse en medio de cultivo con 20% de suero, GM-CSF e IL-4 durante 7 días. Una vez diferenciadas, se comprueba mediante citometría de flujo

5 que el 98% de los MoDC diferenciados tengan un fenotipo homogéneo CD45<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>.

#### *Vacunación pre-natal en listeriosis.*

Hembras de ratones C57BL/6 preñadas fueron vacunadas o no en el día 9 de gestación en la vena lateral de la cola (*i.v*) con las diferentes nanovacunas (GNP-LLO<sub>91-99</sub> que comprende la SEQ ID NO: 9, GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> que comprende la SEQ ID NO: 6 o GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> que comprende la SEQ ID NO: 2, formuladas con los adyuvantes, bien Advax o DIO-1 (50 µg de nanovacunas y 2 µg de Advax o DIO-1). En el día 16 de gestación, todas las ratonas vacunadas o no son inoculadas *i.v* con una suspensión salina de 10<sup>3</sup>/ml UFC de *L. monocytogenes*. A día 20 de gestación, se

10 detectan 3 neonatos en las gestantes infectadas con *L. monocytogenes*, 9 neonatos en las gestantes vacunadas con GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> que comprende la SEQ ID NO: 6, o GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> que comprende la SEQ ID NO: 2, o no vacunadas y 8 neonatos en las gestantes vacunadas con GNP-LLO<sub>91-99</sub> que comprende la SEQ ID NO: 9. Se

15 aíslan las células de microglía del hipocampo de los cerebros de los neonatos por métodos ya descritos y tras lisar las células de microglía en PBS-0.05% Triton X-100, se cuentan las bacterias viables UFC en placas de BHI-agar.

20

#### *Inmunohistoquímica.*

Neonatos nacidos de hembras gestantes control, vacunados o no vacunados e inoculados con *L. monocytogenes* se introducen en formaldehído al 4% durante 24 horas, se embeden en parafina y procesan para realizar secciones de los distintos tejidos que son teñidos con hematoxilina-eosina y anticuerpos anti-CD31 que marca los endotelios vasculares para análisis de inmunohistoquímica con anticuerpos

25 secundarios conjugados a peroxidasa de rábano.

30

#### *Vacunación sistémica en ratones adultos.*

Hembras de ratones C57BL/6 de 8 semanas son *i.v* vacunadas o no con las diferentes nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> que comprende la SEQ ID NO: 6 o GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> que comprende la SEQ ID NO: 2 formuladas con DIO-1. A los 7 días post-vacunación,

35

todas las ratonas se inoculan i.v con una suspensión salina de  $10^3$ /ml UFC de *L. monocytogenes*,  $10^7$ /ml de *M. marinum* o *M. smegmatis* o  $10^4$ /ml de *S. pneumoniae* durante 10 días como media de los microorganismos rápidos como *L. monocytogenes* (3 días), medios como *S. pneumoniae* (14 días) o lentos como *M. marinum* (20 días).

5 Se obtienen los bazos de todos los ratones y tras homogenización y lisado de células en PBS-0,05% Triton X-100, se cuentan las bacterias viables UFC en placas de agar sangre (*L. monocytogenes* y *S. pneumoniae*) o placas 7H10 (*M. marinum* y *M. smegmatis*). En algunos experimentos con *M. marinum* también se obtienen 5 mm de las colas de los ratones en DMEM-0.1% Triton X-100 usando un homogenizador y

10 contando viables UFC en placas 7H10.

Ejemplo 1. Estudio bioinformático en las bases de datos de microorganismos del péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2).

15 Se ha llevado a cabo un estudio bioinformático en las bases de datos de microorganismos del péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2), observándose la existencia de una región dentro de este péptido que es altamente homologa en tres especies bacterianas de los géneros *Listeria*, *Mycobacterium* y *Streptococcus* (Figura 1).

20

Los datos indicaron que existe una homología de secuencia entre ellas superior al 90% en los 22 primeros aminoácidos. Además, se observó una variación en un aminoácido entre los 15 primeros de esta secuencia y variaciones puntuales en las posiciones 17-22 entre *Listeria* y *Mycobacterium*; mientras que ninguna variación entre

25 *Listeria* y *Streptococcus* en dichas posiciones. Las variaciones en las posiciones 1-15 correspondían a una Lisina (K) en *L. monocytogenes* en la posición 4 por una Arginina (R) en el género *Mycobacterium*; y una Treonina (T) en la posición 2 en *L. monocytogenes* por una Valina (V) en el género *Streptococcus*.

30 Por otro lado, la GAPDH de *Mycobacterium tuberculosis* tiene acción enzimática y se une a varios receptores celulares pudiéndose obtener anticuerpos específicos y por tanto generaban una buena respuesta inmune.

En cuanto al péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) en

35 comparación con el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> del género *Streptococcus* (SEQ ID NO: 4),

pese a presentar una homología superior al 90%, los aminoácidos (V) y (T) en la posición 2 de cada péptido no eran equivalentes, por lo que antes de postular una hipótesis teórica, realizamos estudios de alineamiento bioinformático para ver si presentaban homología estructural y conformacional. Los estudios de alineamiento se

5 realizaron con el programa MPsrch donde se alienaron las secuencias proteicas de GAPDH-L. *monocytogenes* (SEQ ID NO: 18) y GAPDH-S. *pyogenes* (SEQ ID NO: 20), una herramienta comparativa que mejora el algoritmo de veracidad de Smith y Watermann disponible en <http://www.ebi.ac.uk/MPsrch/>. Los modelos predictivos estructurales 3D para GAPDH-L. *monocytogenes* (SEQ ID NO: 18) y GAPDH-S.

10 *pyogenes* (SEQ ID NO: 20) se realizaron utilizando el servidor SWISS MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISSMODEL.html>). Los resultados indican que el análisis estructural (InterPro análisis de los dominios de GAPDH-L.*monocytogenes* y GAPDH (SEQ ID NO: 18)-S.*pyogenes* (SEQ ID NO: 20) (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/ISpy?mode=single&ac=Q8Y4I1> y

15 <http://www.ebi.ac.uk/interpro/ISpy?mode=single&ac=Q4W638>), postulaba la existencia de dos dominios enzimáticos, un dominio de unión a NAD (dominio “Rossmann fold” en el N-terminal definido por la entrada Pfam PF00044 (aminoácidos 3-151) y una región C-terminal con el dominio de unión al sustrato G3P involucrado en glicolisis y que corresponde a la entrada Pfam 02800 (aminoácidos 156-314).

20

Ambas proteínas fueron positivas para las mismas firmas y perfiles de InterPro. Cuando se alinearon ambas secuencias usando el MPsrch, se confirmó la homología de secuencia del 95% en los 15 primeros aminoácidos de la región N-terminal con 14

25 identidades completas, para las proteínas GAPDH-L. *monocytogenes* (SEQ ID NO: 18) y GAPDH-S. *pyogenes* (SEQ ID NO: 20). También se confirmó la única diferencia, una T en la GAPDH-L. *monocytogenes* (SEQ ID NO: 18) por una V en la GAPDH-S. *pyogenes* (SEQ ID NO: 20). Cuando se realizaron las predicciones 3D de las estructuras de ambos péptidos GAPDH-L. *monocytogenes* (SEQ ID NO: 18) y GAPDH-S. *pyogenes* (SEQ ID NO: 20), específicamente para los aminoácidos en la

30 posición 1 a 22 de cada péptido, se observó que son iguales, presentando una estructura en hélice, con una estructura  $\beta$ -plegada seguida de dos  $\alpha$ -hélices, siendo en ambas proteínas iguales dichas estructuras 3D.

Estos resultados indicaban no sólo una actividad enzimática igual para ambos

35 dominios NAD, sino también estructuras similares que bien podrían interactuar con

proteínas de unión de forma parecida, o bien podrían ser reconocidas por anticuerpos y moléculas de histocompatibilidad de forma similar; lo que predecía que pudieran dar respuestas inmunológicas similares.

5 Ejemplo 2. Actividad enzimática de los péptidos

Para analizar la actividad enzimática de ADP-ribosilación de Rab5a, se utilizaron tanto extractos de los 3 géneros de patógenos, *Listeria*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*, como el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) y otros péptidos  
 10 controles en este patógeno como un péptido contiguo, la GAPDH<sub>23-42</sub> (SEQ ID NO: 10 y un péptido C-terminal que contenía la actividad enzimática glicolítica, característica de todas las GAPDH bacterianas, GAPDH<sub>314-336</sub> (SEQ ID NO: 11).

Los resultados indican que tanto los extractos de los 3 patógenos, como el péptido  
 15 GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) fueron capaces de ADP-ribosilar la proteína Rab5a específicamente, reproduciendo la estrategia de bloqueo del transporte fagosomal previamente descrito en *L. monocytogenes* (Figura 2, izquierda).

20 Ejemplo 3. Reconocimiento de los péptidos de la invención mediante anticuerpos

Para examinar el reconocimiento por anticuerpos de los péptidos descritos en el presente documento se preparó un anticuerpo policlonal en conejo que reconocía la GAPDH<sub>1-22</sub> del género *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) y se probó si este anticuerpo era capaz de reconocer extractos proteicos de los 3 patógenos bacterianos. Los  
 25 resultados indican que el anticuerpo policlonal de conejo anti-GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2), es capaz de reconocer esta proteína GAPDH en los extractos bacterianos de los tres patógenos, *L. monocytogenes* (Lm), *M. tuberculosis* (Mtb) y *S. pyogenes* (Sp); mientras que no es capaz de reconocer la GAPDH de otras bacterias cuya secuencia no tiene homología ni de secuencia ni estructural con la de  
 30 Lm, como es la GAPDH de *E. coli* (Ec) (Figura 2, derecha).

Un estudio más detallado para acotar la acción del péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2), indicó que el péptido mínimo con actividad enzimática y capaz de ofrecer protección en listeriosis, era el péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) (Figura 3). De hecho, el péptido que consiste en la  
 35

SEQ ID NO: 5 es 99% homólogo al péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) y a los péptidos GAPDH<sub>1-15</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 7) y *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 8). Es más, el péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) es incluso 99% homólogo al péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de otras especies  
 5 patogénicas de *Mycobacterium spp.* tales como *M. avium*, *M. leprae*, *M. marinum* o *M. chelonate* (Figura 1) y de *Streptococcus spp.*, tales como *S. pyogenes* o *S. pneumoniae*, entre otras.

Ejemplo 4. Respuestas inmunológicas de los péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 1) de  
 10 la invención frente a distintas especies bacterianas.

La respuesta inmunológica se examinó en los ganglios poplíteos de los ratones tras inoculación con los péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> de la invención: GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2), GAPDH<sub>1-22</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 3) o  
 15 GAPDH<sub>1-22</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 4), en los cojinetes plantares de ratones C57BL/6 y re-estimulación *in vitro* con distintas concentraciones de dichos péptidos desde 0,05-500 µM.

Los resultados indican que los péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2), GAPDH<sub>1-22</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 3) o GAPDH<sub>1-22</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 4), inducen una buena respuesta inmunológica, expresada en cpm (cuentas por minuto) por la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en los linfocitos T proliferantes (eje Y, Figura 6) y con una clásica cinética de dosis-respuesta, resultando la concentración de 500 µM tóxica y 50 µM la mejor concentración (eje X,  
 25 Figura 6). Comparado con la proteína inmunogénica listeriolisina O (LLO) de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 17) o lisados totales bacterianos, los péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2), GAPDH<sub>1-22</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 3) o GAPDH<sub>1-22</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 4) inducen mejores respuestas inmunológicas, reflejando alta inmunogenicidad (Figura 4).

30

Ejemplo 5. Capacidad de protección del péptido GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 1) en ratones vacunados con células dendríticas cargadas con dicho péptido.

La eficiencia de la vacunación se detectó mediante el contaje del número de bacterias viables (UFC: unidades formadoras de colonias), en los bazo de ratones vacunados comparados con las UFC de los no vacunados (salino).

Los resultados indican que las vacunas dendríticas cargadas con los péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) o GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 6) de *L. monocytogenes* confieren mayor protección frente a listeriosis que las vacunas dendríticas cargadas con proteínas completas, bien GAPDH-Lm (SEQ ID NO: 18) o LLO-Lm (SEQ ID NO: 17) (Figura 5). siendo además la formulación que confiere mayor protección frente a listeriosis, por encima de la protección superior con esta formulación del péptido LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9), el cual también confiere buena protección mientras que otros péptidos de la LLO no confieren protección alguna, como el péptido LLO<sub>189-201</sub> (SEQ ID NO: 16).

Ejemplo 6. Eficacia del péptido GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) de la invención en protección frente a listeriosis

Se evaluó si el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) era tan eficaz como el péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) en protección frente a listeriosis y se observó que tanto el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) como el péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) en vacunas dendríticas, eran capaces de conferir protección en rangos parecidos; mientras que un péptido aún más corto, GAPDH<sub>1-12</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 22) no confería buena protección (Figura 5, barras GAPDH1-12/DC). Estos resultados indicaban que el péptido GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) era la unidad más pequeña de la proteína GAPDH de *L. monocytogenes* capaz de conferir una protección adecuada en listeriosis adulta.

Aunque las vacunas celulares dendríticas cargadas con péptidos son muy eficaces como vectores vacuna profilácticos, su uso para la prevención de infecciones es controvertido dado el alto coste que supondría vacunar a la población de forma personalizada. Por ello se buscaron diseños de vacunas sintéticos que puedan

5 escalarse en su producción para ofrecerse a toda la población y que pudieran sustituir a las células dendríticas como vectores vacuna. En este contexto, las nanopartículas son nanomateriales que cumplen estas expectativas, carecen de toxicidad, tienen un tamaño molecular que permite su liberación en el interior de las células, son estables y se pueden biofuncionalizar bien con péptidos o carbohidratos y se pueden dirigir a distintos tipos celulares. Así, para diseñar vacunas sintéticas que pudieran proteger frente a listeriosis adulta y neonatal y que tuvieran una capacidad similar a las vacunas dendríticas, se prepararon vacunas basadas en GNPs de oro acopladas a dos ligandos: (1) un ligando peptídico con el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) o el péptido LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) (estructura en Figura 6, imágenes izquierda y centro), este último con buena capacidad de protección en listeriosis adulta; y (2) un ligando carbohidrato como la β-D-glucosa que le confiere direccionalidad al diseño al dirigirse a las células con receptores glucano como son los macrófagos y las células dendríticas (Figura 6). La direccionalidad de las células dendríticas y su localización en el compartimiento de presentación antigénica cruzada se observa mediante fluorescencia y microscopía confocal (Figura 6, imagen derecha) al co-localizarse la fluorescencia roja de los anticuerpos anti-LLO con la fluorescencia verde de los anticuerpos anti-MHC de clase I.

20 Ejemplo 7. Vacunación con nanovacunas GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) y GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2).

25 Los resultados de vacunación se han realizado con formulaciones de nanovacunas GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) o GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) en listeriosis neonatal usando como adyuvantes Advax o DIO-1 y mediante vacunación intravenosa (i.v) de hembras preñadas con una sola dosis de nanovacunas (50 µg/ratona preñada) en el día 9 de gestación (Figura 7).

30 Posteriormente, todas las ratonas se han inoculado *i.v* con *L. monocytogenes* (10<sup>3</sup> UFC/ratón) en el día 16 de gestación, durando la infección 3 días. Para análisis de listeriosis adulta, se han vacunado *i.v* ratonas de 8-12 semanas con una sola dosis de nanovacunas (50 µg/ratón) y 7 días después, se les ha inoculado *i.v* con *L. monocytogenes* (10<sup>4</sup> UFC/ratón) durante 3 días (Tabla 1).

**Tabla 1.-** Protección a listeriosis sistémica adulta con nanovacunas GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) o GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) y DIO-1 como adyuvante.

Condición	UCF/mg proteína
Bazos-No vacunados	$2.48 \times 10^4 \pm 0.2$
Bazos-Vacunados GNP-GAPDH <sub>1-22</sub>	$2.2 \times 10 \pm 0.1$
Bazos-Vacunados GAPDH <sub>1-22</sub> /DC	$2.2 \times 10^2 \pm 0.2$
Bazos-Vacunados GNP-LLO <sub>91-99</sub>	$8.2 \times 10 \pm 0.1$
Bazos-Vacunados LLO <sub>91-99</sub> /DC	$6.2 \times 10^2 \pm 0.4$

5 Los resultados indican que la vacunación de hembras preñadas con las nanovacunas, GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) o GNP-GAPDH<sub>1-22</sub>(SEQ ID NO: 2), protegían frente a la listeriosis neonatal y por lo tanto estas nanovacunas podían atravesar tanto la barrera placentaria en las ratonas preñadas, como la barrera hematoencefálica de los neonatos, ya que se observaban números inferiores de bacterias viables, UFC, en la  
10 microglía de los cerebros de neonatos nacidos de hembras vacunadas con GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) y GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) comparado con las UFC en la microglía de los ratones nacidos de hembras no vacunadas (Tabla 2).

**Tabla 2.-** Protección a listeriosis neonatal con GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) y GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) y Advax como adyuvante  
15

Condición	UFC/mg proteína
Microglía-No vacunados	$6.2 \times 10^2 \pm 0.01$
Microglía- Vacunados GNP-GAPDH <sub>1-22</sub>	$2.2 \pm 0.02$
Microglía- Vacunados GNP-LLO <sub>91-99</sub>	$6.2 \pm 0.02$

Sin embargo, las UFC en la microglía de los neonatos eran mucho más bajas tras la vacunación con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) que con las  
20 nanovacunas GNP-LLO<sub>91-99</sub>(SEQ ID NO: 9). Además, las morbilidades clásicas asociadas a la listeriosis neonatal, como son la inducción de abortos y la disminución del 65-70% en el número de ratones recién nacidos (imágenes P0 del grupo no vacunados, NV de Figura 7), son aún detectables tras la vacunación con GNP-LLO<sub>91-99</sub>; (SEQ ID NO: 9) siendo lo más claro la disminución del 12,5% en el número de  
25 ratones recién nacidos.

Por otro lado, es importante mencionar que no se observa ninguna morbilidad en neonatos nacidos de ratonas vacunadas con las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2), y el número de recién nacidos es igual al del grupo control, sin vacunar y sin infectar (control en Figuras 7 y 8).

Además, el análisis exhaustivo de las morbilidades en los neonatos de ratonas vacunadas con GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2), indicó que tanto la disminución de la celularidad observada en la listeriosis neonatal, como la apoptosis de los melanocitos de la piel, la inmadurez de los pulmones reflejado en la falta de tabicación o la falta de vascularización de cerebro y pulmones (imágenes anti-CD31, Figura 8), morbilidades que desaparecían tras la vacunación con GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) (Figura 8). Estos resultados indicaban que las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) eran las mejores formulaciones para proteger frente a listeriosis neonatal.

Además, cuando se exploró la protección con las nanovacunas GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) y GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) en listeriosis sistémica adulta, observamos que la protección conferida por estas vacunas sintéticas era  $10^3$ - $10^4$  veces mejor que las que conferían las vacunas dendríticas cargadas con los péptidos correspondientes, bien LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) o GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) (Tabla 1). También se observa una protección 10 veces mejor en los ratones vacunados con GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) que en los vacunados con GNP-LLO<sub>91-99</sub> (SEQ ID NO: 9) (Tabla 1). Por lo que se ha concluido que las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) eran las mejores formulaciones para conferir protección tanto en listeriosis neonatal, como en listeriosis sistémica adulta, independientemente del adyuvante utilizado en la formulación bien Advax (Figura 7) o DIO-1 (Figura 9, Tabla 1).

Ejemplo 8. Diseño de una vacuna multivalente frente a microorganismos de los géneros *Listeria*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*.

Se prepararon nanovacunas sintéticas con el péptido GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 6), capaz de conferir protección en listeriosis, tal y como se ha demostrado en el Ejemplo 7. Este péptido GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 5) presenta 99% de homología de secuencia en los tres géneros patogénicos bacterianos *Listeria*, *Mycobacterium* y

*Streptococcus* (Figura 1). Para ello se prepararon tres formulaciones de nanovacunas con el adyuvante DIO-1, GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6), GNP-GAPDH<sub>1-15</sub>-de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 7) y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 8) y se vacunan *i.v* 3 grupos distintos de ratones con estas nanovacunas. Posteriormente, se infectan *i.v* cada grupo de ratones, vacunados o no, con sus correspondientes patógenos: *L. monocytogenes* (10<sup>3</sup> UFC/ratón), *S. pneumoniae* (10<sup>5</sup> UFC/ratón) y *M. marinum* (10<sup>4</sup> UFC/ratón), respectivamente, este último también se infectó subcutáneo en la cola (s.c).

Los resultados indican que las formulaciones GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 7) protegen con buena eficiencia frente a listeriosis sistémica adulta, analizando las UFC en bazos (Figura 9).

Además, las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 7) podían también proteger en un 80-95% frente a una infección con la especie patogénica *M. marinum*, tras analizar UFC de bazos (Figura 10A) y colas (datos no mostrados) y UFC de bazos tras infección con una especie no patogénica como *M. smegmatis* (Figura 10B).

Además, se analizaron también las poblaciones linfocitarias tanto en bazos como en pulmones, ya que *M. marinum* es un patógeno poco estudiado en el modelo murino y los efectos inmunológicos no son conocidos frente a los modelos con *M. smegmatis* de los que si se conocen sus efectos inmunológicos. Los datos indican un aumento de los linfocitos B tanto en los bazos como en los pulmones, un aumento de macrófagos y células dendríticas en bazos y pulmones y un aumento de las NKs, sólo en los pulmones (Figura 11). Estos datos son similares a los publicados en el modelo no patogénico con *M. smegmatis*.

Así mismo, también se comparó la protección obtenida frente a infecciones *i.v* con *L. monocytogenes* y *S. pneumoniae*, con las mismas vacunas que en las Figuras 9 y 10.

Los resultados sugieren, tras examinar las UFC de los bazos de los ratones vacunados y no vacunados, que las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 8)

protegen frente a listeriosis en un 90-95%, comparadas con vacunas dendríticas cargadas con los péptidos GAPDH<sub>1-15</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 8) o GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) que ofrecen una protección del 55-76%, respectivamente (Figura 12).

5

Además, también se observó que las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 8), eran capaces de conferir 85-90% de protección frente a infecciones con la especie patogénica *S. pneumoniae* (i.v), tras el contaje de UFC en bazo de ratones vacunados y no vacunados (Figura 13) y pulmones (datos no mostrados).

10

En conjunto, estos resultados (Figuras 9-13) indican que las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 5), particularmente las SEQ ID NOs: 6, 7 y 8, formuladas con el adyuvante DIO-1, tienen capacidad de protección multivalente frente a infecciones con especies patogénicas de los géneros *Listeria*, *Mycobacterium* y *Streptococcus*. Especialmente, porque son capaces de conferir protección específica frente a infecciones con *L. monocytogenes*, *M. marinum* o *S. pneumoniae* en rangos de protección superiores al 85% de protección (Figura 14), lo que en vacunación es un porcentaje excelente, si se compara con la eficiencia de las vacunas dendríticas cargadas con dichos péptidos: GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6)/DC, GAPDH<sub>1-15</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 7)/DC o GAPDH<sub>1-15</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 8)/DC; que confieren una protección máxima del 72.6%, siendo esta protección muy significativa y efectiva; mientras que los péptidos solos no confieren ninguna protección en absoluto.

15

20

25

#### Ejemplo 9. Preparación de vacunas preclínicas

El último grupo de experimentos se realizó para poder preparar vacunas preclínicas para pacientes con estas infecciones y explorar biomarcadores de inmunogenicidad en sus células sanguíneas, que permita ajustar los diseños de nanovacunas, de forma que se obtengan las mejores respuestas inmunes posibles.

30

Para ello, se obtuvieron células dendríticas derivadas de monocitos sanguíneos (MoDC) de pacientes con listeriosis (pacientes: HUMV-1, HUMV-2, HUMV-3, HUMV-4 y HUMV-5) y de individuos control (CONT-1) y se estimularon con las nanovacunas

35

- GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) formuladas con DIO-1 y se analizó la respuesta inmune innata *in vitro* mediante la producción de citocinas pro-inflamatorias (Th1). Los resultados preliminares indican que la nanovacuna GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 6) confiere una buena respuesta
- 5 inmune innata *in vitro*, dado que tras la estimulación de las MoDC de los pacientes se obtienen niveles 10-20 veces superiores de TNF-alfa e IL-12, con respecto a los niveles producidos por MoDC de controles (Figura 15) y teniendo en cuenta que estas citocinas tienen alta capacidad de protección frente a listeriosis.
- 10 Los datos mostrados en el presente documento ponen de manifiesto que nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> que comprenden el péptido de SEQ ID NO: 1, preferiblemente las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> que comprenden los péptidos que consisten en las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, tienen alta capacidad de protección multivalente frente a patógenos de dichos géneros, tales como, por ejemplo, *L. monocytogenes*, *M.*
- 15 *marinum* o *S. pneumoniae* y alta capacidad estimuladora *in vitro* de MoDC en pacientes con listeriosis para generar una buena respuesta inmune innata necesaria para preparar vacunas pre-clínicas. Dada la alta homología entre las secuencias GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 5) entre las tres especies bacterianas, los resultados obtenidos evidencian que las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 5) podrían
- 20 ser candidatos muy adecuados para la protección multivalente frente a listeriosis, tuberculosis y neumonías, tanto en la población infantil, mujeres embarazadas o en la población anciana, cubriendo una necesidad del sistema de salud en poblaciones de riesgo a listeriosis, tuberculosis y neumonías.
- 25 Ejemplo 10. Protección de las vacunas dendríticas cargadas con péptidos GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) o GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 6) comparado con la protección de las vacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 6) de *L. monocytogenes*.
- 30 La protección con los distintos tipos de vacunas dendríticas (DC) cargadas con el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> (SEQ ID NO: 2) de la presente invención se detalla en la Figura 16.
- Se observa que las vacunas dendríticas (DC) con el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *L.*
- 35 *monocytogenes* (SEQ ID NO: 2) confieren una protección superior al 95-100% frente a

cualquiera de los géneros de bacterias analizados, 100% frente a *Listeria*, 97% frente a *M. marinum* y 95% frente a *S. pneumoniae*. Las vacunas dendríticas DC con el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 3) confieren protección significativamente buena entre 80-100%, siendo la más alta frente a *M. marinum* (100%), seguida frente a *Listeria* (97%) y por último frente a *S. pneumoniae* (80%).  
 5 Las vacunas dendríticas DC con el péptido GAPDH<sub>1-22</sub> de *S. pneumoniae* (SEQ ID NO: 4), confieren una muy buena protección del 100% frente a *S. pneumoniae* y de un 80% frente a *M. marinum* o *Listeria* (Figura 16).

10 Las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes* (SEQ ID NO: 2 y 6, respectivamente) fueron capaces de conferir muy buena protección frente a una infección por *L. monocytogenes* (100%), por *M. marinum* (95%) y frente a *S. pneumoniae* (92%), lo que sugería alta capacidad como vacunas multivalentes (Figura 17), siendo más eficaces las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *L. monocytogenes*  
 15 (Figura 14 y Figura 17).

Las nanovacunas GNP-GAPDH<sub>1-22</sub> y GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> de *Listeria* (SEQ ID NO: 2 y 6, respectivamente) formuladas con el adyuvante DIO-1 son capaces de conferir una buena protección superior al 80% en infecciones con *L. monocytogenes*, *M. marinum*  
 20 y *Streptococcus*, siendo más eficaces las GNP-GAPDH<sub>1-15</sub> (SEQ ID NO: 6).

**REIVINDICACIONES**

1. Complejo que comprende un núcleo de átomos de oro al que se une covalentemente al menos:
  - 5 a. un primer ligando, que consiste en una secuencia peptídica definida por la SEQ ID NO: 5; y
  - b. un segundo ligando que consiste en un grupo de hidratos de carbono.
- 10 2. Complejo según la reivindicación 1, donde la SEQ ID NO: 5 procede de bacterias seleccionadas de entre los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, y *Streptococcus*.
- 15 3. Complejo según la reivindicación anterior, donde la SEQ ID NO: 5 procede de especies patogénicas seleccionadas de entre *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*,  
15 *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*.
- 20 4. Complejo según la reivindicación anterior donde la SEQ ID NO: 5 procede de especies patogénicas seleccionadas de entre *Listeria monocytogenes*,  
20 *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*.
- 25 5. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la SEQ ID NO: 5 se selecciona de la lista que consiste en las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 30 6. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los hidratos de carbono del segundo ligando se seleccionan de la lista que comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa, manosa, xilosa, o fructosa.
- 35 7. Complejo según la reivindicación 6 donde el hidrato de carbono es una glucosa.
8. Complejo según la reivindicación 7 donde el hidrato de carbono es una beta-D-glucosa.
9. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 donde el ratio glucosa:péptido está comprendido entre 8:1 y 10:1, y más preferentemente entre 9:1.

10. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que adicionalmente se une a un tercer tipo de ligando que consiste en un adyuvante.
- 5 11. Secuencia SEQ ID NO: 1 para uso como vacuna multivalente para el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonía.
12. Secuencia para uso según la reivindicación 11 donde la SEQ ID NO: 1 procede de bacterias seleccionadas de entre los géneros *Mycobacterium*, *Listeria*, y  
10 *Streptococcus*.
13. Secuencia para uso según la reivindicación anterior donde SEQ ID NO: 1 procede de especies patógenas seleccionadas de entre *Mycobacterium marinum*,  
*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*,  
15 *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*.
14. Secuencia para uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde la SEQ ID NO: 1 se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID  
20 NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
15. Secuencia para su uso según la reivindicación anterior donde la SEQ ID NO: 5 se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO:  
25 8.
16. Secuencia para uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 donde la SEQ ID NO: 1 forma parte de un complejo que comprende un núcleo de átomos de oro al que se une covalentemente.
- 30 17. Secuencia para uso según la reivindicación 16 donde el complejo comprende adicionalmente un ligando que consiste en un grupo de hidratos de carbono.
18. Secuencia para uso según la reivindicación 17 donde los hidratos de carbono se seleccionan de la lista que comprende N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa,  
35 manosa, xilosa, o fructosa.
19. Secuencia para uso según la reivindicación 18 donde el hidrato de carbono es una beta-D-glucosa.

20. Secuencia para uso según la reivindicación 19, donde el complejo consiste en una gliconanopartícula de oro que comprende la SEQ ID NO: 1 en proporción 9:1 para la vacunación multivalente profiláctica y/o terapéutica frente a tuberculosis, listeriosis y neumonía.
- 5
21. Secuencia para uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20, donde el complejo se encuentra en una forma adecuada para su administración por una vía seleccionada de entre intravenosa, cutánea, subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal, tópica, intragástrica, oral y vías sistémicas rectales.
- 10
22. Composición farmacéutica que comprende el complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 15
23. Composición farmacéutica según la reivindicación 22 para uso en el tratamiento y/o prevención de la tuberculosis, listeriosis y neumonía.

MXVXVGINGFGRIGRXXXRXXX (SEQ ID NO: 1)

<i>L. monocytogenes</i>	<u>MTVKVGINGFGRIGRLAFRR IQ</u> (SEQ ID NO: 2)
<i>M. tuberculosis</i>	<u>MTVRVGINGFGRIGRNFYRA LL</u> (SEQ ID NO: 3)
<i>M. avium</i>	<u>MTVRVGINGFGRIGRLAFRR IQ</u> (SEQ ID NO: 12)
<i>M. bovis</i>	<u>MTVRVGINGFGRIGRLAFRR IQ</u> (SEQ ID NO: 13)
<i>M. leprae</i>	<u>MTVRVGINGFGRIGRLAFRR IQ</u> (SEQ ID NO: 14)
<i>S. pneumoniae</i>	<u>MVVKVGINGFGRIGRLAFRR IQ</u> (SEQ ID NO: 4)
<i>S. aureus</i>	<u>MAVKVAINGFGRIGRLAFRR IQ</u> (SEQ ID NO: 15)

FIG. 1



FIG. 2

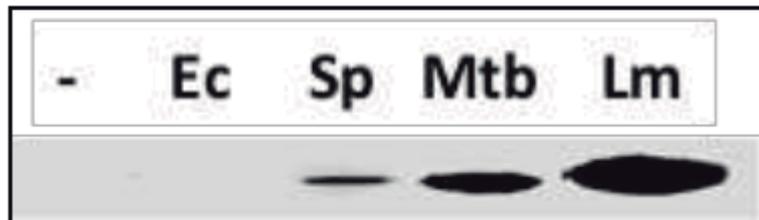


FIG. 3

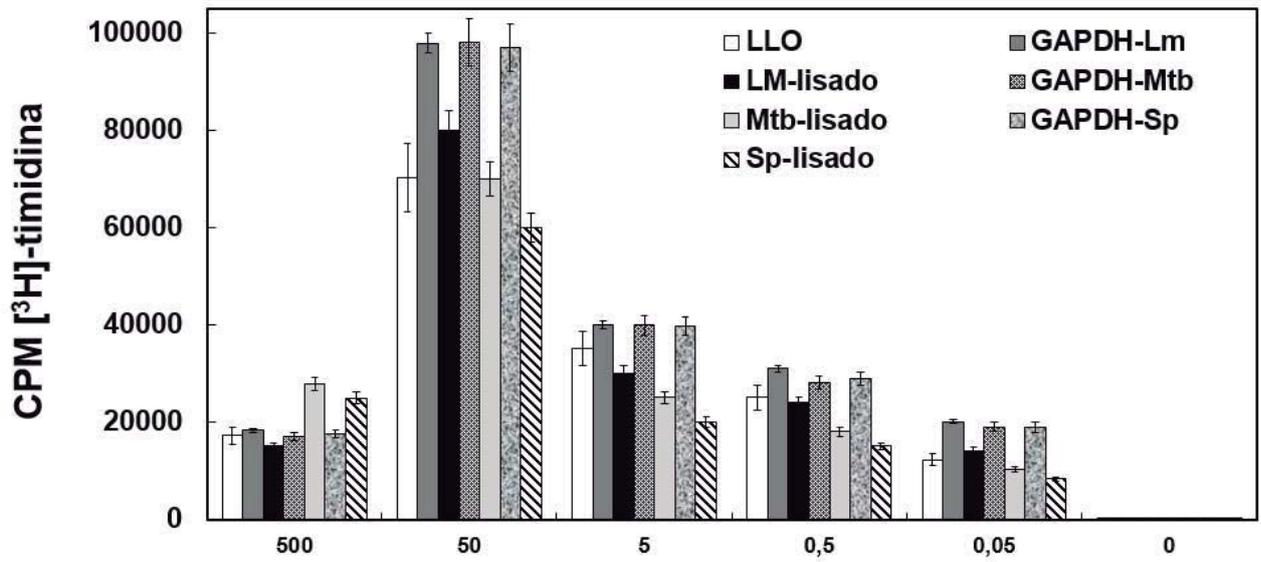


FIG. 4

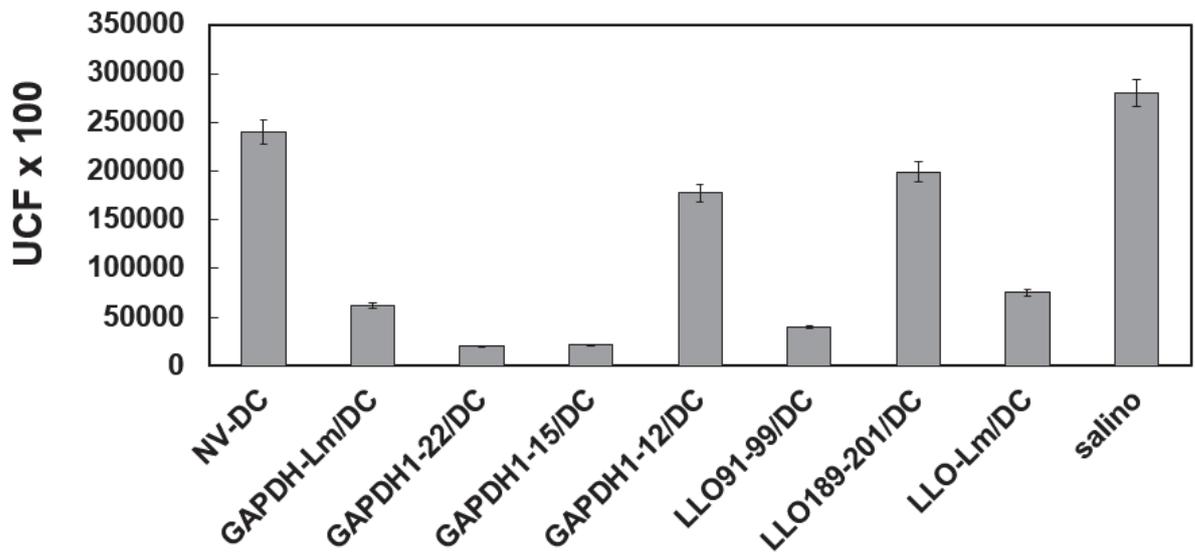
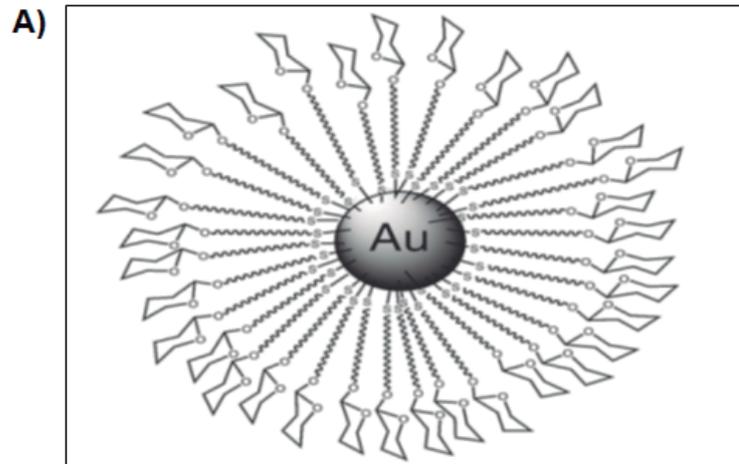
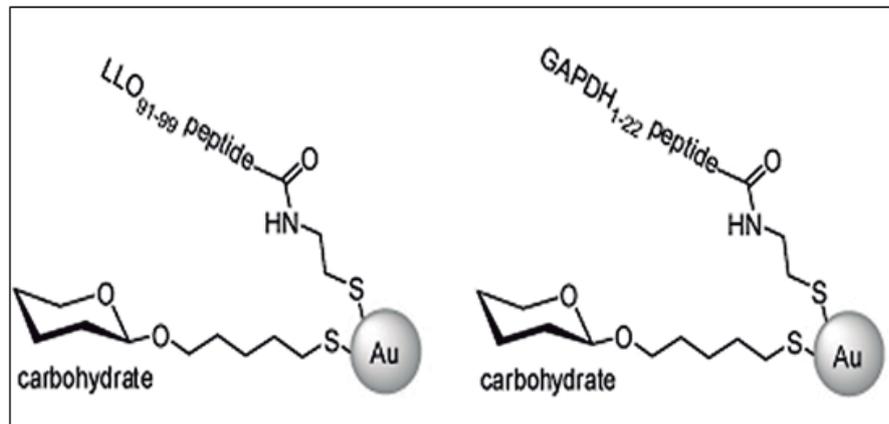


FIG. 5



B)



C)

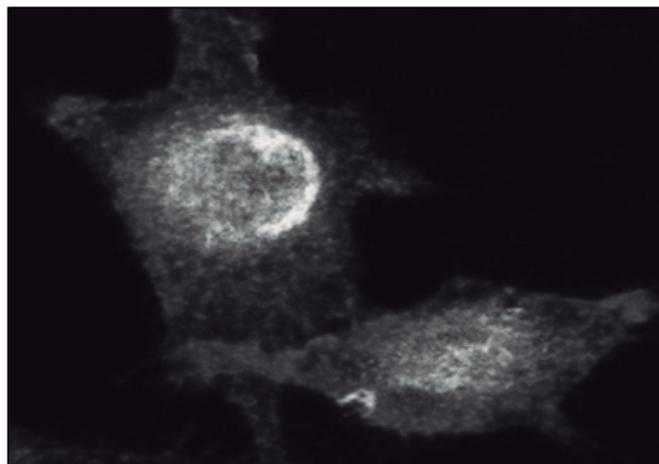


FIG. 6

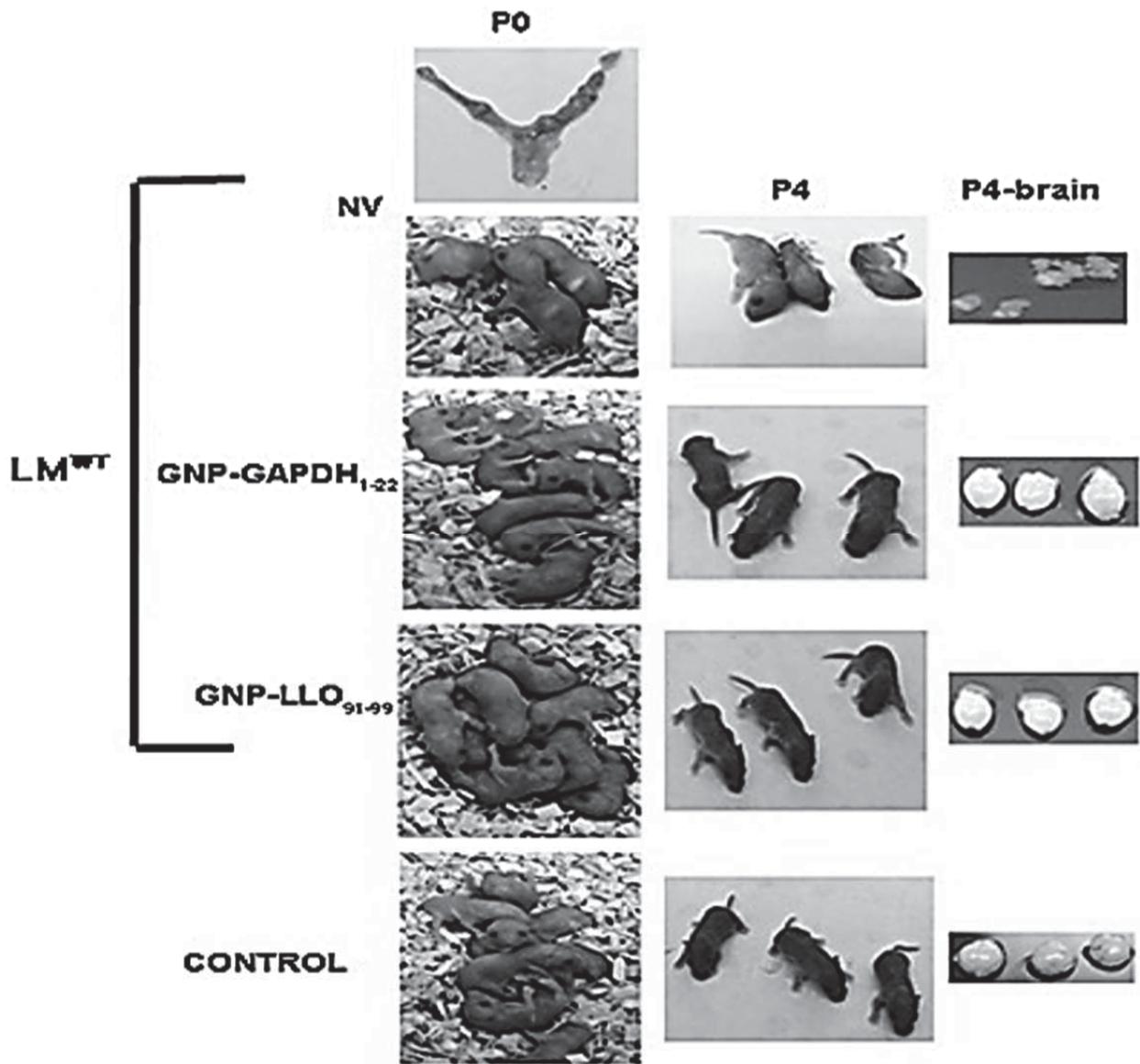


FIG. 7

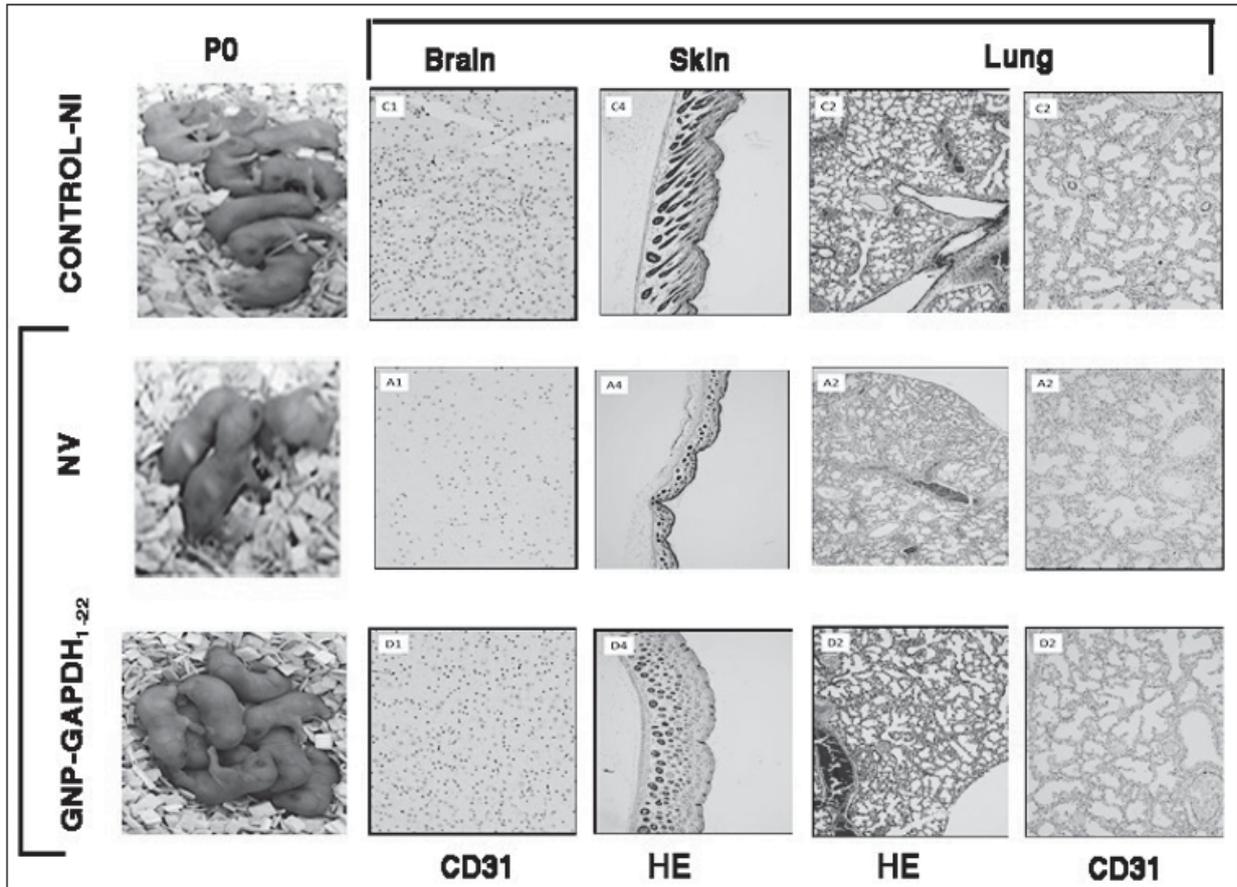


FIG. 8

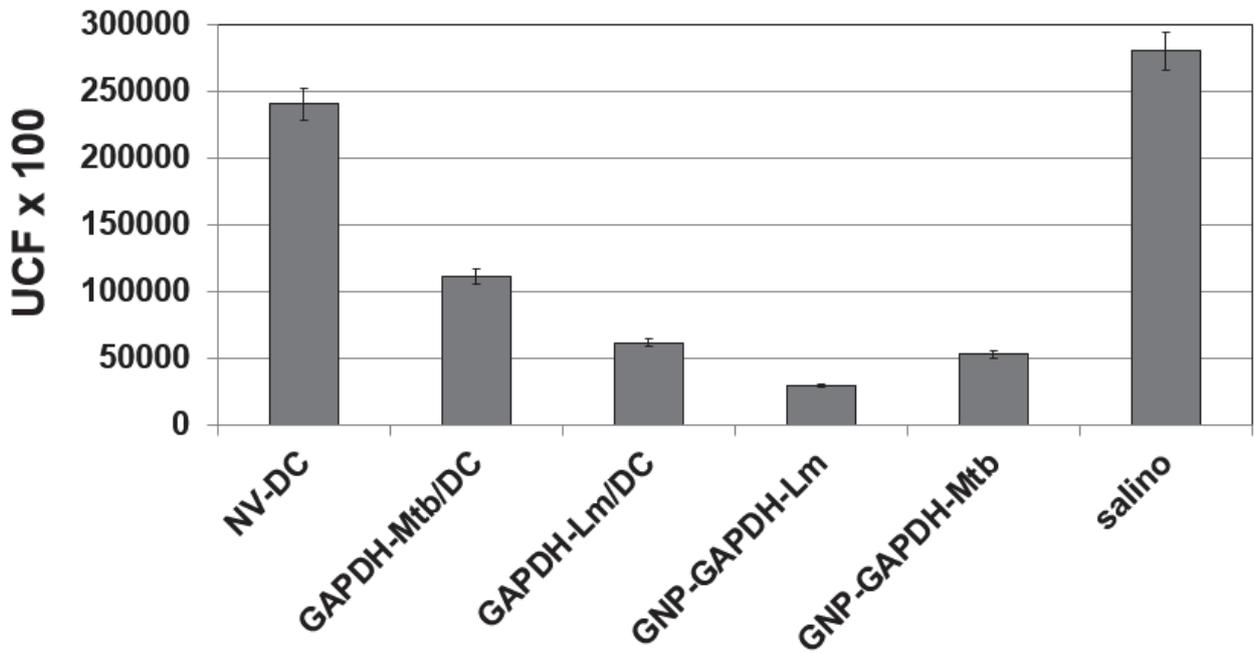


FIG. 9

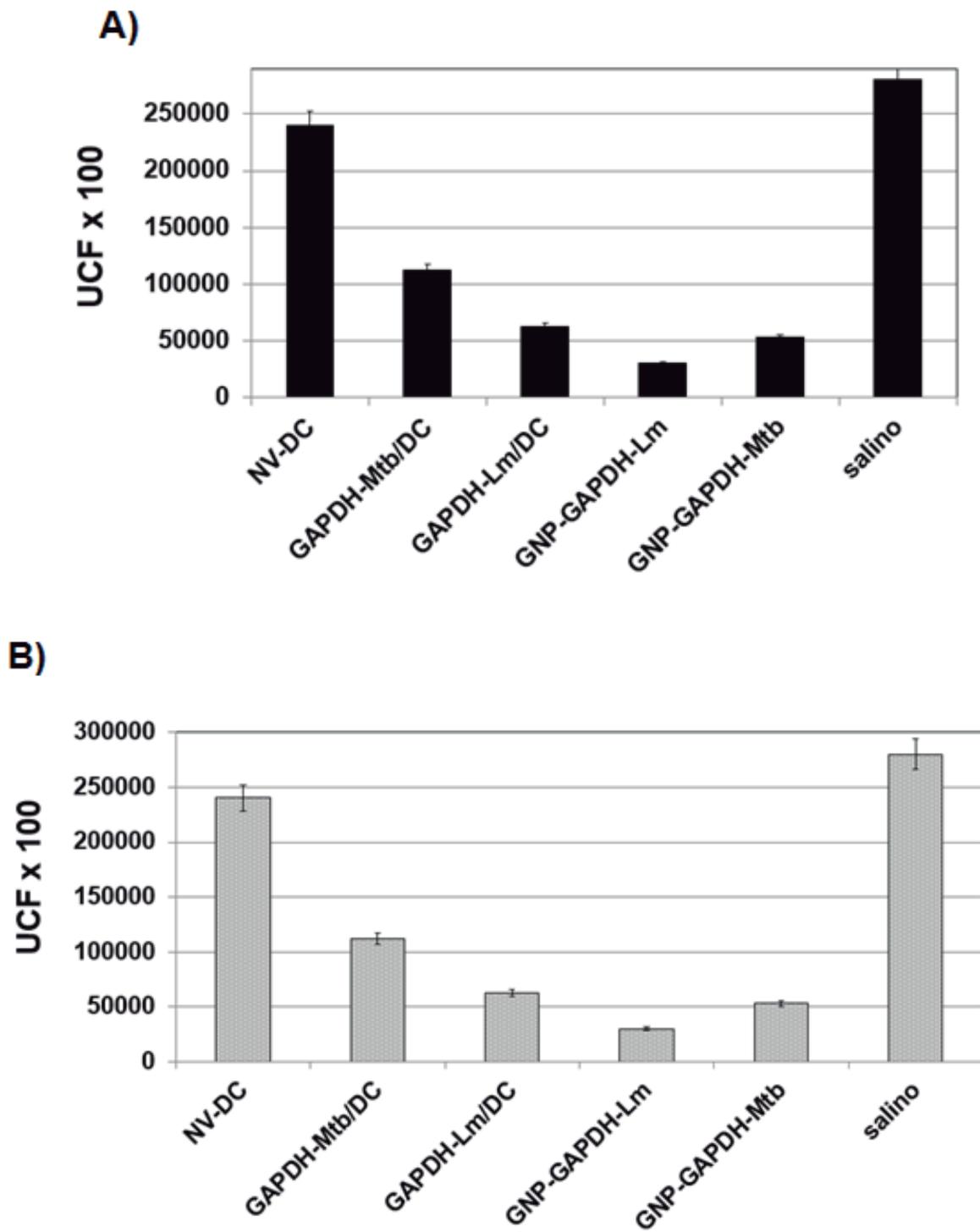


FIG. 10

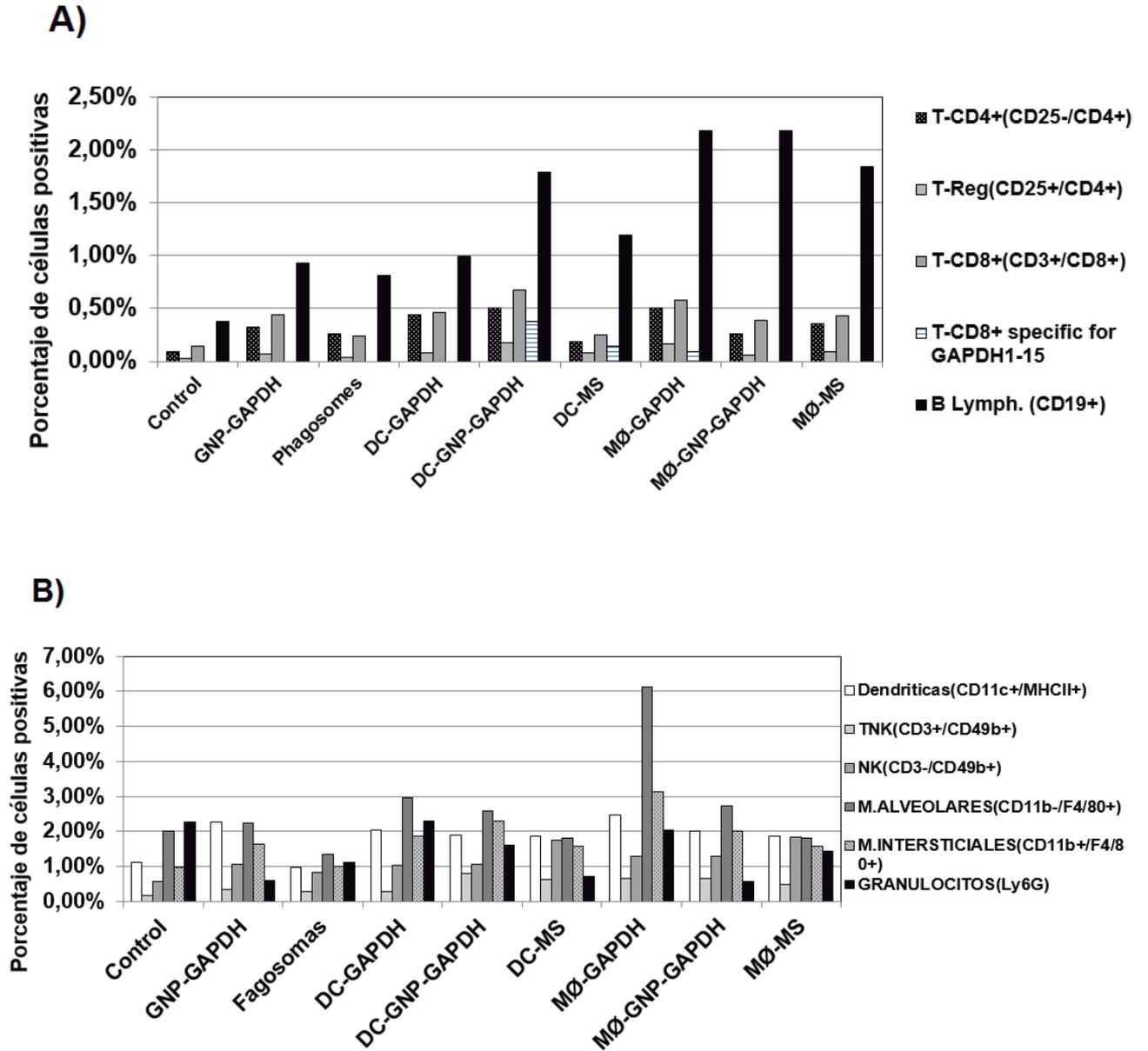


FIG. 11

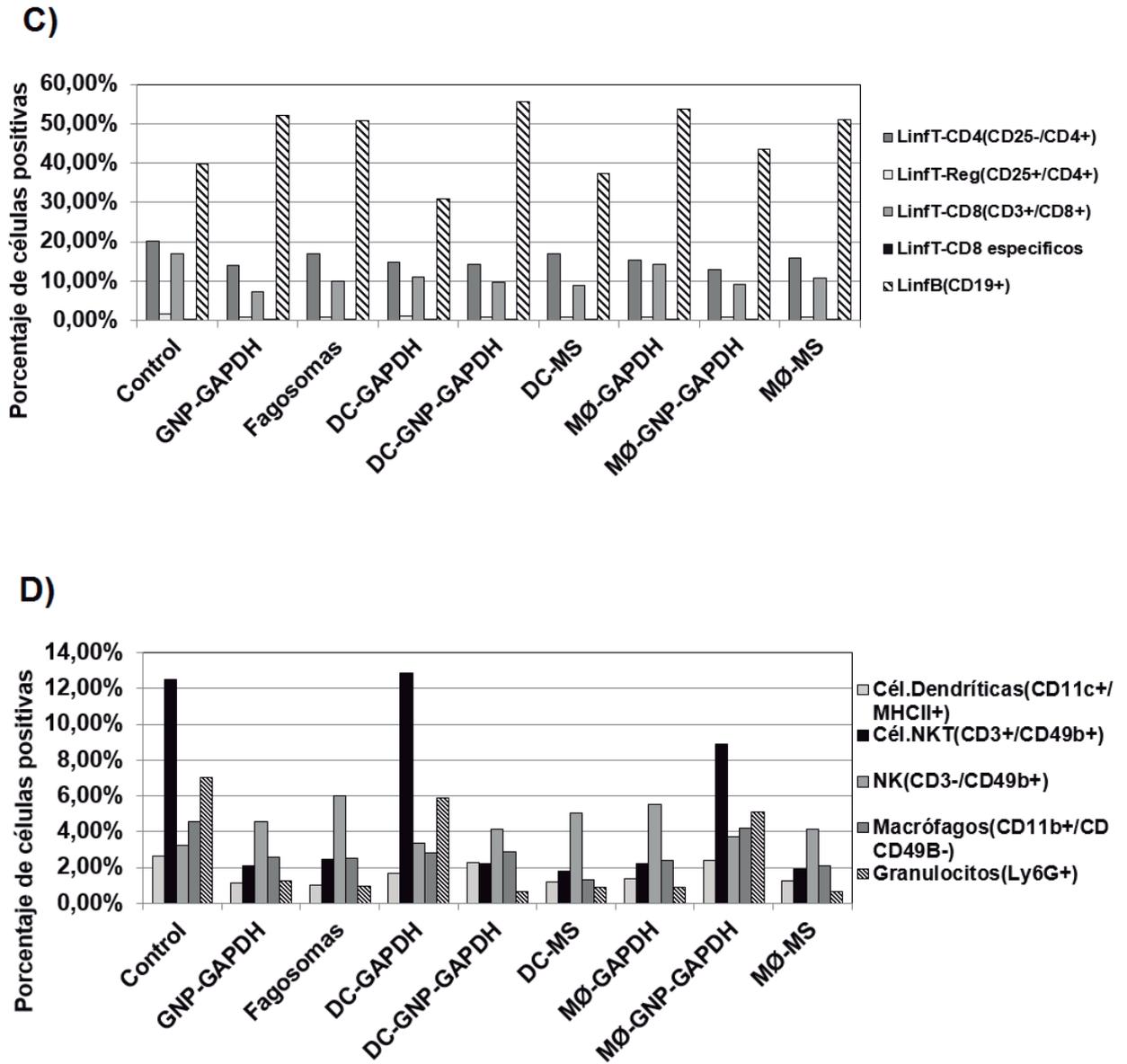


FIG. 11 (Cont.)

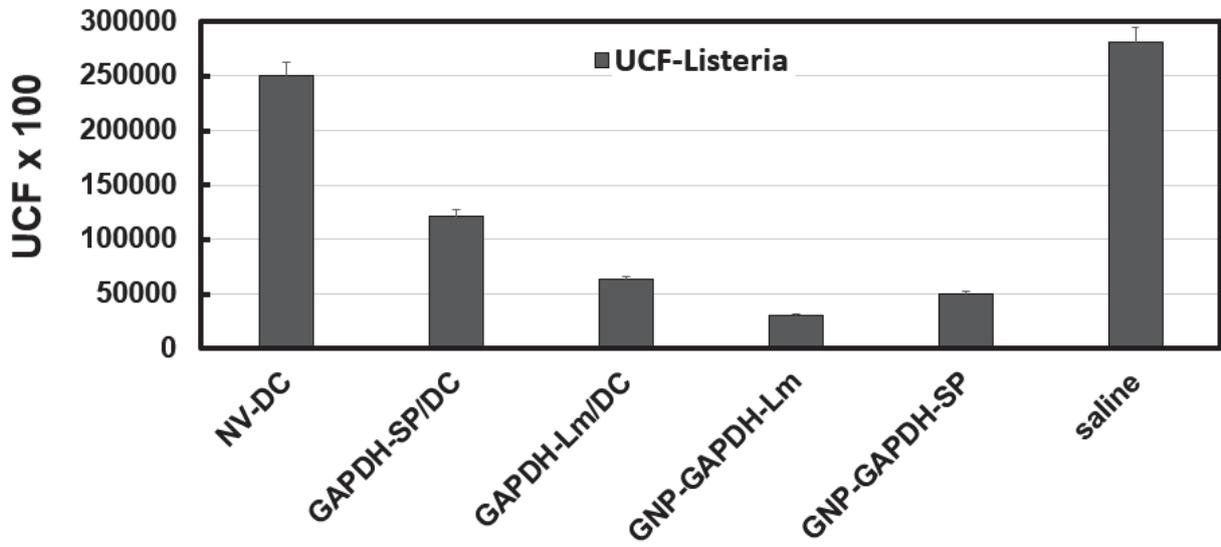


FIG. 12

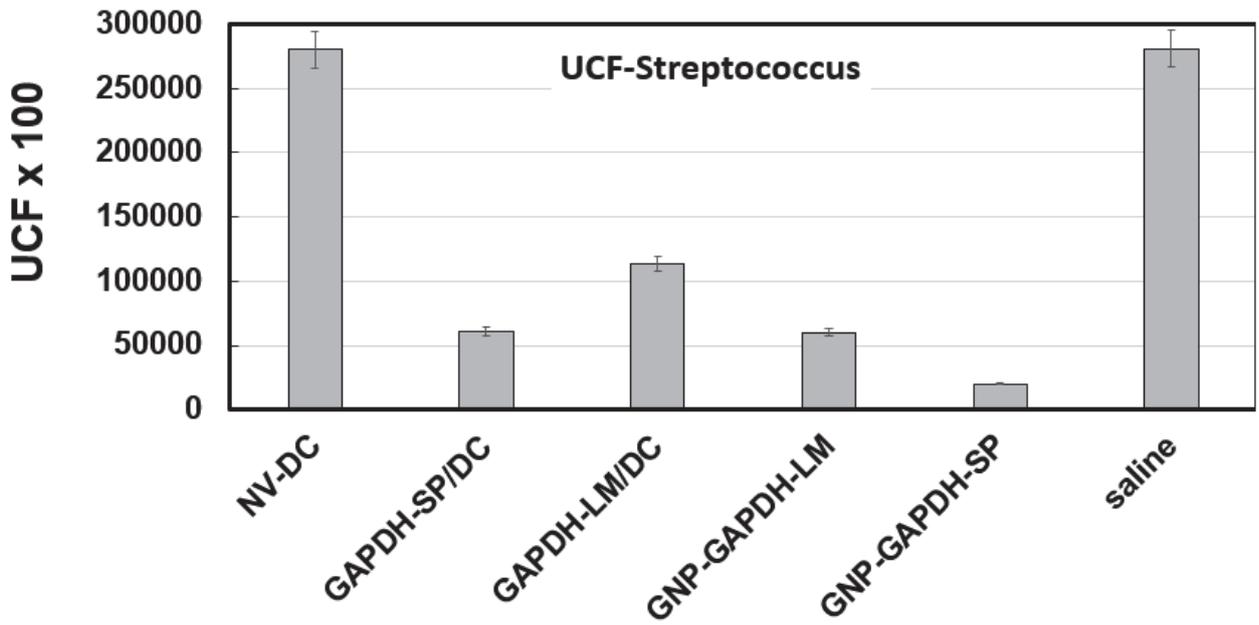


FIG. 13

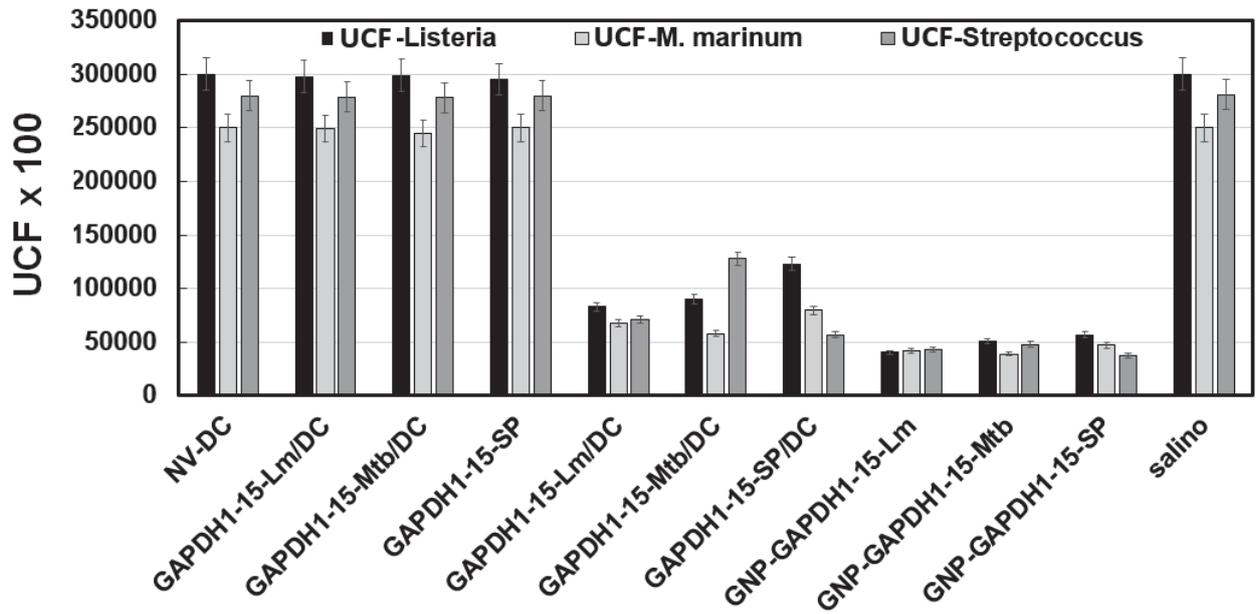


FIG. 14

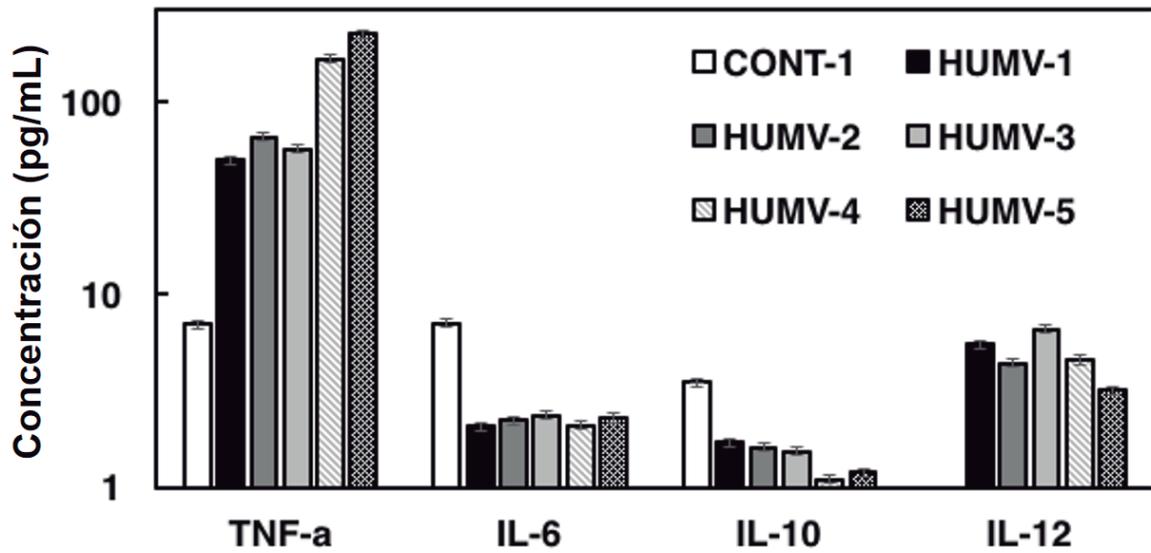


FIG. 15

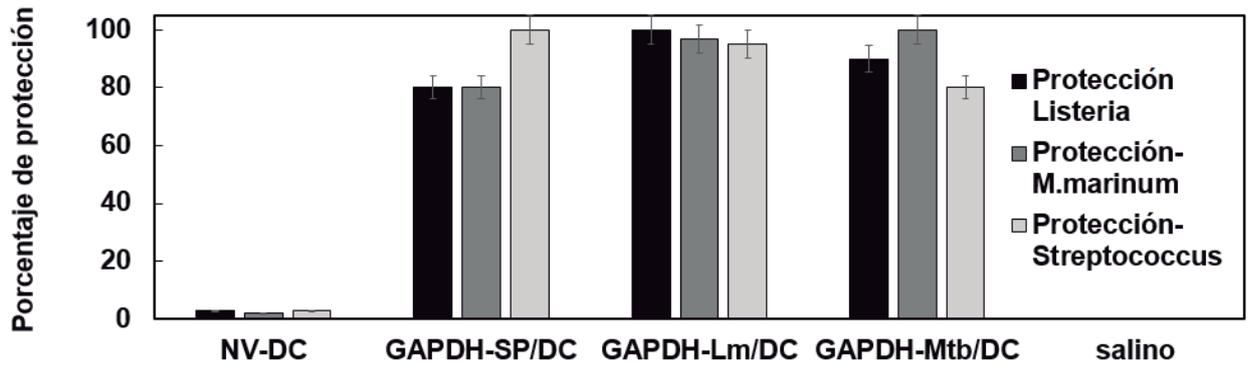


FIG. 16

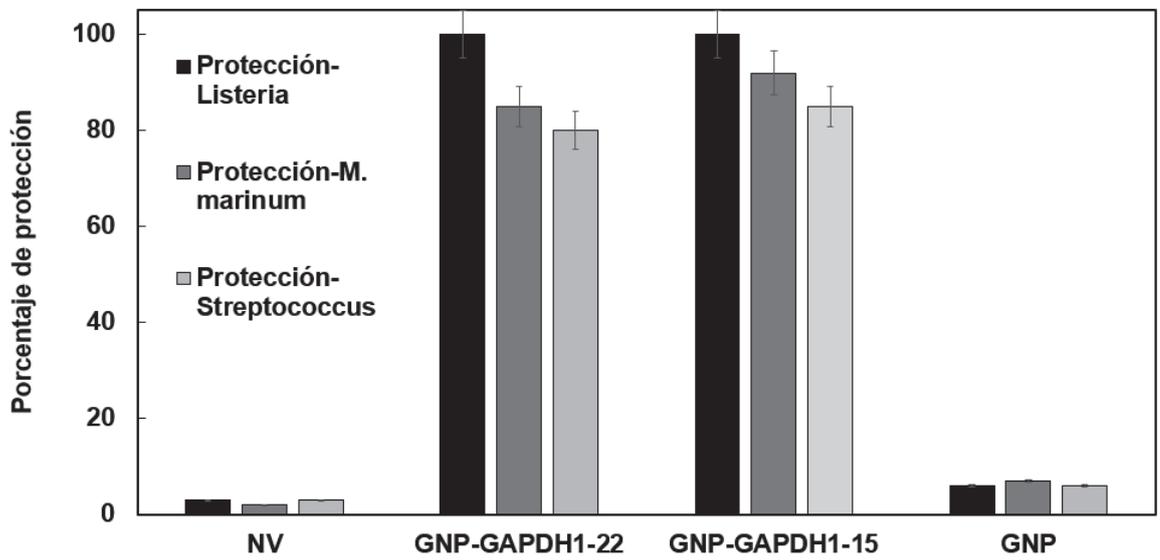


FIG. 17



②① N.º solicitud: 201830628

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.06.2018

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K39/04** (2006.01)  
**A61K39/09** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CALDERÓN-GONZALEZ, Ricardo, et al. Pregnancy vaccination with gold glyco-nanoparticles carrying <i>Listeria monocytogenes</i> peptides protects against listeriosis and brain-and cutaneous-associated morbidities. <i>Nanomaterials</i> , 2016, Vol. 6, Nº 8, Páginas 151. Página 2, 6, 8, figura 1 y tablas 1, 2 y 3.	1-7, 10 y 22
X	CALDERON-GONZALEZ, RICARDO, et al. GNP-GAPDH <sub>1-22</sub> nanovaccines prevent neonatal listeriosis by blocking microglial apoptosis and bacterial dissemination. <i>Oncotarget</i> , 2017, Vol. 8, Nº 33, Páginas 53916. Páginas 53917, 53919 y 53929.	1-7, 10 y 22
A	CALDERON-GONZALEZ, RICARDO, et al. Novel nanoparticle vaccines for Listeriosis. <i>Human vaccines &amp; immunotherapeutics</i> , 2015, Vol. 11, Nº 10, Páginas 2501-2503. Todo el documento.	1-21 y 23
A	CALDERÓN-GONZÁLEZ, RICARDO, et al. Cellular vaccines in listeriosis: role of the <i>Listeria</i> antigen GAPDH. <i>Frontiers in cellular and infection microbiology</i> , 2014, Vol. 4, Páginas 22. Todo el documento.	1-21 y 23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
13.03.2019

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, EMBL ALL, INTERNET