



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 862**

51 Int. Cl.:
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05770983 .4**
96 Fecha de presentación : **11.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1781708**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Materiales y procedimientos para la estimulación del sistema inmunitario.**

30 Prioridad: **09.07.2004 US 586548 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2011

73 Titular/es: **Variety Children'S Hospital D/B/A/ Miami
Children'S Hospital
3100 S.W. 62nd Avenue
Miami, Florida 33155, US**

72 Inventor/es: **Nair, P.K. Raveendran;
Melnick, Steven, J. y
Ramachandran, Cheppail**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 862 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

Materiales y procedimientos para la estimulación del sistema inmunitario.

5 **Antecedentes de la invención**

La posibilidad de bioterrorismo, la epidemia del síndrome respiratorio agudo grave (SARS) y el virus de la gripe aviar, la continuada propagación del VIH/SIDA, y la aparición de cepas patógenas resistentes a las medicaciones actuales apremian a los investigadores a buscar nuevas medidas de protección que comprenden las estrategias de biodefensa contra estas amenazas. La activación inmunitaria es una estrategia eficaz así como protectora para las estrategias de biodefensa destinadas a las enfermedades infecciosas emergentes (Hackett, C. J., *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 2003, 112:686-694). Aunque el sistema inmunitario humano presenta una red de detección microbiana amplia y mecanismos de defensa del hospedador, la evasión de patógenos de la vigilancia inmunitaria y del sistema de destrucción es la norma. La situación no es diferente para el cáncer ya que la mayoría de las células tumorales no se detectan y escapan a la vigilancia inmunitaria (Wajchman, H. J. *et al.*, *Cancer Res.*, 2004, 64:1171-1180).

Son los componentes del sistema inmunitario innato los que detectan los patógenos o los no autointrusos, con ayuda de los receptores específicos, y responden inmediatamente por activación de las células inmunitarias competentes, síntesis de citocinas y quimiocinas y liberación de mediadores inflamatorios para eliminar o contener a los intrusos. La activación inmunitaria innata también activa y allana el camino a la respuesta inmunitaria adaptativa por los linfocitos T y B específicos para el antígeno. Las células destructoras naturales (NK) desempeñan una función decisiva en la defensa inmunitaria innata contra las células infectadas por virus y malignas en virtud de su capacidad para reconocer y destruir células anormales, pendiente el desarrollo de inmunidad adaptativa (Smith, H. R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99:8826-8831; Moser, J. M. *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, 14:509-516).

Varios compuestos activan el sistema inmunitario, tales como los lipopolisacáridos (LPS) microbianos, los oligonucleótidos del ARN bicatenario y ADN que contienen motivos CpG no metilados se han descrito al principio (Hackett, C. J., *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 2003, 112:686-694; Kandimalla, E. R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100:14303-14308). Se informa de que la estimulación de múltiples receptores presenta efecto sinérgico en la producción de citocina (Gao, J. J. *et al.*, *J. Immunol.*, 2001, 166:6855-6860). La cascada de activación del complemento es otra parte integral del sistema inmunitario innato en el que los patógenos celulares, tales como las bacterias intracelulares, están recubiertos con componentes de complemento (opsonización) y experimentan fácilmente fagocitosis. Por tanto, la activación del complemento desempeña una función importante en la destrucción microbiana y es esencial para el transporte y la eliminación de complejos inmunitarios.

El tipo de respuesta inmunitaria adaptativa (conocida también como la respuesta inmunitaria específica o adquirida) que se genera a la infección u otra prueba de provocación antigénica puede generalmente distinguirse por el subconjunto de linfocitos T cooperadores (Th) implicados en la respuesta. La respuesta de Th1 (la respuesta celular o mediada por células) es responsable de las funciones clásicas mediadas por las células tal como la hipersensibilidad de tipo retardado y la activación de los linfocitos T citotóxicos (LTC), mientras que la respuesta de Th2 (respuesta humoral) funciona con más eficacia como cooperador para la activación de linfocitos B. El tipo de respuesta inmunitaria a un antígeno se determina generalmente por las citocinas producidas por las células que responden al antígeno. Las diferencias en las citocinas segregadas por los linfocitos Th1 y Th2 se cree que reflejan diferentes funciones biológicas de estos dos subconjuntos.

Resulta evidente que las citocinas desempeñan funciones cruciales en la regulación de varios aspectos de las respuestas inmunitarias. Entre las citocinas, la interleucina (IL)-12 desempeña una función central en la coordinación innata y en la inmunidad adaptativa mediada por las células (Watford, W. T. *et al.*, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003, 14:361-368). Se ha demostrado la protección profiláctica así como después de la exposición por estimulación inmunitaria (Walker, P. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1999, 96:6970-6975; Juffermans, N. P. *et al.*, *Infect. Immunol.*, 2002, 70:147-152). Habitualmente, estas medidas protectoras se correlacionan con la síntesis de IL-12 y del interferón (IFN)- γ , las citocinas de la ruta de Th1 de la diferenciación de los linfocitos T asociada con el sistema inmunitario adaptable (Gramzinski, A. M. *et al.*, *Infect. Immunol.*, 2001, 69:1643-1649).

El subconjunto Th1 puede ser particularmente adecuado para responder a las infecciones víricas y a patógenos intracelulares porque segrega IL-2 e IFN-gamma, que activan los LTC. El subconjunto Th2 puede ser más adecuado para responder a las bacterias vivas y a los parásitos helmínticos y puede mediar en reacciones alérgicas, ya que IL-4 e IL-5 son conocidos porque provocan la producción de IgE y la activación de eosinófilos, respectivamente. En general, los linfocitos Th1 y Th2 segregan distintos modelos de citocinas y, por lo tanto, un tipo de respuesta puede modelar la actividad del otro tipo de respuesta. Un cambio en el equilibrio Th1/Th2 puede producir una respuesta alérgica, por ejemplo, o, alternativamente, un aumento de la respuesta de LTC.

La inmunización de un animal hospedador contra un antígeno específico ha sido realizada tradicionalmente por vacunación repetida del hospedador con una forma inmunógena del antígeno. Aunque la mayoría de las vacunas actuales producen respuestas humorales eficaces (anticuerpo, o "tipo Th2"), no pueden provocar respuestas celulares (en particular, el complejo de histocompatibilidad mayor (CMH) LTC restringido de Clase I o respuestas de

“tipo Th1”) que están generalmente ausentes o son débiles. Para muchas enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis y la malaria, las respuestas de tipo Th2 son de poco valor protector contra la infección. Además, las respuestas del anticuerpo son inapropiadas en determinadas indicaciones, más en particular en alergia en la que una respuesta del anticuerpo puede producir un choque anafiláctico. Las vacunas propuestas que utilizan péptidos pequeños derivados del antígeno diana y otros agentes antigénicos utilizados actualmente han impedido la utilización de partículas víricas intactas potencialmente ineficaces, hacen que no siempre produzcan la respuesta inmunitaria necesaria para conseguir un efecto terapéutico. La falta de una vacuna de virus de inmunodeficiencia humana (VIH) terapéuticamente eficaz es un ejemplo desafortunado de esta insuficiencia.

La inmunidad innata mediada por macrófagos, neutrófilos y células destructoras naturales (NK) es la primera línea del mecanismo de defensa del hospedador contra la invasión microbiana. El sistema inmunitario innato se dirige a los modelos moleculares asociados a patógenos conservados estructuralmente (PAMP) mediante receptores codificados específicos de la línea germinal denominados receptores de reconocimiento del modelo (PRR) (Aderem, A. y Ulevitch, R. J., *Nature*, 2000, 406:782-787). El aumento del sistema inmunitario con estimuladores inmunitarios naturales así como sintéticos ofrece una ventaja distinta sobre las terapias convencionales especialmente con el sistema inmunitario debilitado y resistencia a antibióticos.

Varias investigaciones preclínicas y clínicas han indicado la utilidad de los β -glucanos, una clase de modificadores de la respuesta biológica (MRB), para la aceleración de la cicatrización de heridas y contra la orquestación del síndrome de la respuesta inflamatoria generalizada y el choque séptico (Ross, G. D. *et al.*, *Immunopharmacology*, 1999, 42:61-74; Williams, D. L., *Mediators Inflamm.*, 1997, 6:247-250; Hetland, G., *Curr. Med. Chem.*, 2003, 2:135-146). Los β -glucanos son potentes estimuladores del sistema inmunitario innato en los invertebrados, mientras que en los mamíferos son potentes activadores del sistema de complemento. Estos polímeros tienen potencial terapéutico debido a sus efectos sobre el sistema inmunitario que pueden incluir actividades antitumorales y anti-infecciosas, así como la protección contra infecciones por hongos, bacterias, virus y protozoos. Los β -glucanos solubles y en partículas interactúan con receptores afines en los macrófagos que estimulan la síntesis de citocinas, quimiocinas e intermedios del oxígeno reactivo (Ganter, B. N. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2003, 197:1107-1117). Los receptores mayores descritos para el reconocimiento/unión del β -glucano en macrófagos son el receptor 3 de complemento (CD11b/CD18 o CR3), Dectin-1 y receptores tipo Toll (TLR) 2 y 6. Aunque la lactosilceramida y los receptores del antioxidante están también identificados en el reconocimiento del β -glucano, su función no está bien documentada (Willment, J. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:43813-43823).

Los receptores tipo Toll (TLR) forman parte de la gran superfamilia de receptores de Toll-interleucina (IL)-1 (TIR) que poseen el motivo citoplásmico para la función de señalización intracelular. Estas moléculas proporcionan una primera línea de defensa del hospedador y han estado implicadas en las infecciones y enfermedades autoinmunitarias en varios organismos comprendidos entre moscas y mamíferos. Se acepta actualmente que los TLR son las principales moléculas de señalización mediante las cuales los mamíferos sienten la infección (Beutler, B. *et al.*, *J. Leukocyte Biol.*, 2003, 74:479-485). En los mamíferos, se han identificado 12 TLR diferentes que reconoce cada uno distintos PAMP (Akira, S. y Sato, S., *Scand. J. Infect. Dis.*, 2003, 35:555-562). Todos los TLR, el receptor de IL-1 y otros receptores que contienen el dominio TIR, a excepción de TLR3, comparten una ruta de señalización común que depende del factor 88 de diferenciación del adaptador mielóide (MyD88) (Ganter, B. N. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2003, 197:1107-1117; Mukhopadhyay, S. *et al.*, *Immunol.*, 2004, 112:521-530). Además de MyD88, varias moléculas adaptadoras se han descrito recientemente y la utilización diferenciada de estas moléculas adaptadoras puede proporcionar la especificidad para la señalización de TLR (Akira, S., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:38105-38108). Las pruebas para las interacciones físicas y/o funcionales entre los TLR, y entre TLR y otros receptores superficiales, han estado disponibles. Ganter, *et al.* han descrito la inducción colaboradora de Dectin-1 y TLR por estimulación de β -glucano así como la interacción sinérgica entre estos dos receptores en la activación de NF- κ B (Ganter, B. N. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2003, 197:1107-1117).

La producción de citocina mediada por TLR depende de sus mediadores corriente abajo tales como la cinasa asociada a IL-1R (IRAK)-4 al factor 6 asociado al receptor del TNF (TRAF-6) que activan a JNK y al factor nuclear (NF)- κ B (Akira, S., *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:38105-38108). El NF- κ B es un factor de transcripción omnipresente que regula la expresión génica de citocina en muchas células inmunitarias efectoras. En la mayoría de las células, NF- κ B está normalmente presente en el citoplasma latente, inactivo y unido a la proteína κ B inhibidora (I- κ B) (Ghosh, S y Karin, M., *Cell*, 2002, 109:S81-96). Es activado por varios estímulos tales como citocinas proinflamatorias, productos víricos, lipopolisacáridos, compuestos derivados de plantas tales como taxol, así como por β -glucanos, derivados de patógenos y no patógenos (Akira, S. y Sato, S., *Scand. J. Infect. Dis.*, 2003, 35: 555-562; Young, S. H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:20781-20787; Lebron, F. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:25001-25008). En estimulación, I- κ B se fosforila y se degrada rápidamente por mecanismos proteosomáticos que a su vez liberan la NF- κ B activa a fin de trasponer al núcleo y unirse a ADN para iniciar la transcripción génica de citocina/quimiocina (Ghosh, S. y Karin, M., *Cell*, 2002, 109:S81-96; Auphan, N. *et al.*, *Science*, 1995, 270:232-233).

Las propiedades inmunoestimulantes de los glucanos se han atribuido a que son debidas a los enlaces β -glucosídicos, al grado de ramificación y a la configuración de la solución (Mueller, A. *et al.*, *Glycobiology*, 2000, 10:339-346). Se han caracterizado y publicado las propiedades inmunoestimulantes de un 1,4(- α -D-glucano, RR1, un nuevo polisacárido que puede obtenerse de la planta medicinal *Tinospora cordifolia* (Nair, P. K. *et al.*, *Int.*

5 *Immunopharmacol.*, 2004, 4:1645-1659). Este nuevo α -glucano es soluble en agua y tiene enlaces (1,4)- α -D-glucosídicos en la cadena principal con cadenas laterales unidas por enlaces (1,6)- α -D-glucosídicos en un intervalo de 6 a 7 unidades de glucosa. Existen células no citotóxicas a normales así como estirpes de células tumorales (CEM, CEM/VLB) incluso por encima de 1000 μ g/ml y activa los subconjuntos de linfocitos humanos a niveles variables. La activación de las células NK, una de las principales ramas de la inmunidad innata, se demostró por el aumento de nivel de destrucción de las células diana por los linfocitos tratados con RR1 en un ensayo funcional. Las características de la citocina en la estimulación de RR1 demuestra la ruta Th1 muy deseada de la diferenciación de los linfocitos T colaboradores junto con el gran nivel de inducción de las citocinas reguladoras que pueden ser un mecanismo de autocontrol de la sobreproducción de la respuesta de Th1. Su solubilidad en agua, la naturaleza no citotóxica y su origen herbáceo indican el potencial clínico de RR1 para la estimulación inmunitaria.

Breve resumen de la invención

15 La presente invención se refiere a nuevos polisacáridos que estimulan el sistema inmunitario. Dicho compuesto ilustrado en la presente memoria ha sido aislado de la planta medicinal *Tinospora cordifolia* y caracterizado. En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura representada en la Figura 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En otro aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto aislado que tiene la estructura representada en la figura 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto de la figura 3 se denomina también en la presente memoria RR1, que es un polisacárido α -D-glucano compuesto de un eje central unido (1 \rightarrow 4) y ramificaciones unidas (1 \rightarrow 6), con una masa molecular superior a 550 kDa, presentando propiedades inmunoestimulantes exclusivas.

25 Las propiedades inmunoestimulantes de RR1 se determinaron por análisis de activación inducida por RR1 de linfocitos humanos, actividad funcional de células NK, actividad fagocítica, activación del complemento, síntesis de citocinas y quimiocinas, inducción de óxido nítrico sintasa inducible (ONSi), producción de óxido nítrico y mediciones de estrés oxidativo. Los resultados demostraron claramente el aumento de los componentes del sistema inmunitario innato mientras que el perfil de la citocina demostró la ruta de Th1 de diferenciación de los linfocitos T colaboradores de la inmunidad (adaptativa) mediada por células específicas para el antígeno. La estimulación con RR1 produjo un aumento de varias veces de la activación de las células destructoras naturales (NK), las células efectoras principales del sistema inmunitario innato y la activación de los complementos en la ruta alternativa, que se autoamplía y es importante en el reconocimiento y eliminación de patógenos en ausencia de anticuerpos. RR1 también aumenta la fagocitosis de las partículas de zimosan por los macrófagos. Tal como se describe con más detalle en la presente memoria RR1 reguló por incremento también la síntesis de las citocinas Th1, IL-12, IL-18, IL-1 β e IFN- γ . RR1 provocó además la producción de la citocina antitumoral TNF- α y MCP-1, pero no produjo ninguna inducción significativa de ONSi. La regulación por incremento de la síntesis de citocina se facilita por activación del factor de transcripción NF- κ B por fosforilación de la proteína κ B. El procedimiento de inmunoestimulación con RR1 conlleva receptores tales como el receptor tipo Toll (TLR)6 y dectin-1.

40 Un sistema inmunitario innato fortalecido por administración de RR1 permite a un paciente evitar la entrada de patógenos mientras que los linfocitos Th1 reforzados detectan y destruyen patógenos intracelulares, virus y células malignas. Por lo tanto, puede utilizarse RR1 como un agente inmunoestimulante, quimiopreventivo y terapéutico para varias enfermedades humanas y de animales. RR1 puede combinarse también con otro agente, tales como agentes anticancerígenos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) para el tratamiento quimioterapéutico de pacientes de cáncer.

50 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto aislado de la reivindicación 1 a las células *in vitro*. En una forma de realización, un compuesto RR1 (RR1 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable) se administra en una cantidad eficaz para proporcionar una estimulación general de una respuesta inmunitaria mediante el efecto pseudoadyuvante del compuesto RR1. La presente invención proporciona además la utilización de un compuesto RR1 de la invención en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente. Preferentemente, el compuesto RR1 proporciona una actividad pseudoadyuvante en la generación de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 al antígeno.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para obtener RR1 a partir del material de la planta *Tinospora cordifolia*, que comprende: (a) proporcionar material de la planta *Tinospora cordifolia*; y (b) extraer el compuesto de la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un diagrama de flujo que describe el aislamiento de RR1.

65 Las Figuras 2A y 2B representan (a) espectros RMN 13 C de RR1 en D₂O que presentan enlaces glucosídicos (1 \rightarrow 4) y (1 \rightarrow 6) (b) espectros de RMN de protones a 500 MHz de RR1 en D₂O que presenta configuración α .

La Figura 3 representa la estructura química de RR1 ((1,4)- α -D-glucano).

Las Figuras 4A y 4B representan el análisis citotóxico de RR1 linfocitos normales (a) y estirpes de células tumorales (b). Se trataron células (10^6) con RR1 durante 24 horas y se realizó el ensayo de citotoxicidad utilizando el kit de proliferación de células MTT (Roche Biochemicals). El porcentaje de células supervivientes en el control se representó frente a las concentraciones de RR1.

La Figura 5 representa el análisis citométrico de flujo de la activación de células NK, linfocitos T y B por RR1. Se trataron linfocitos normales con RR1 (0-100 μ g/ml) durante 24 horas a 37°C en una incubadora con CO₂. Se tiñeron las células con un panel de anticuerpos específicos para células conjugados con diferentes fluorocromos: CD3-FITC, CD16/56-PE, CD19-ECD, CD69-PC5 o CD8-FITC, CD4-PE, CD3-ECD, CD69-ECD. Se analizaron las células teñidas en un citómetro de flujo Coulter Elite en un ensayo de 4 colores. *** $p < 0,001$.

La Figura 6 representa el análisis citométrico de flujo para la citotoxicidad de linfocitos humanos activados por RR1. Se trataron linfocitos normales con RR1 (0-100 μ g/ml) durante 24 horas en medio RPMI. Se lavaron las células y se incubaron conjuntamente con células CEM leucémicas humanas marcadas con PKH26 durante 12 horas para que las células NK activas lisen las células tumorales. Las mezclas de células se tiñeron con anticuerpo monoclonal caspasa-3 activado y marcado con FITC. El porcentaje de células PKH26+ y Caspasa-3+ se cuantificó analizando en un citómetro de flujo Elite de Beckman-Coulter (** $p = 0,001$).

La Figura 7 representa el análisis de activación inducida por RR1 de las rutas del complemento. Se incubaron muestras de sangre normal de voluntarios sanos con RR1 (con 0-100 μ g) durante 24 horas. Los complementos humanos C3a des Arg y C4a des Arg correlaciona los kits de EIA (Assay Design Inc., Ann Arbor, MI) se utilizaron para la cuantificación de la ruta clásica y alternativa de activación del complemento utilizando un procedimiento ELISA. *** $p < 0,001$.

Las Figuras 8A a 8H representan la síntesis de citocinas y quimiocina en linfocitos normales inducidos por RR1. Los linfocitos normales de voluntarios sanos se trataron con RR1 (0-100 μ g) a 37°C durante 24 horas en una incubadora con CO₂ en medio RPMI. En el medio sobrenadante se analizó la producción de citocinas y quimiocina por un procedimiento ELISA utilizando kits de reactivo (BD Biosciences). RR1 indujo la síntesis de IL-1 β , IL-6, IL12p40, IL-12p70 e IL-18, TNF- α , IFN- γ y MCP-1 significativamente (*** $p < 0,001$).

La Figura 9 representa la síntesis de NO inducida por RR1 en linfocitos normales. Los linfocitos normales de voluntarios sanos se trataron con RR1 (0-100 μ g) a 37°C durante 24 horas en una incubadora con CO₂ en medio MEM. En el medio sobrenadante se analizó la producción de NO utilizando kit analítico de Active Motif Carlsbad, CA y los datos se analizaron utilizando ANOVA ($p = 0,109$).

La Figura 10 representa el efecto inhibitor de RR1 en el reconocimiento/enlace no opsónico de biopartículas de zimosan A marcadas con FITC en macrófagos RAW264.7. El RR1 inhibe el enlace y la interiorización del enlace no opsónico de las biopartículas de zimosan A en función de las dosis. Se incubaron las células con RR1 durante 1 hora en hielo (4°C) en DMEM que contenía FBS al 0,5% mediante biopartículas de zimosan A durante 1 hora en hielo. Se calentaron las células durante 7 minutos a 37°C para la interiorización de las biopartículas de zimosan A y se analizó por fluorescencia FITC intracelular en un citómetro de flujo Elite de Coulter.

La Figura 11 representa el efecto inhibitor de RR1 y laminarín sobre el enlace opsonizado y la interiorización (fagocitosis) de biopartículas de zimosan A marcadas con FITC en macrófagos RAW264.7. Se incubaron monocitos con RR1 a 37°C durante 1 hora seguido de biopartículas de zimosan A marcadas con FITC durante otra hora a 37°C. Se lavaron las células y se midió la fluorescencia intracelular en un citómetro de flujo Elite de Coulter.

La Figura 12 representa la síntesis de TNF- α por células RAW264.7 inducidas por RR1 en presencia o ausencia del éster fenólico del ácido cafeico (CAPE) inhibitor de NF- κ B. Se incubaron las células previamente con 10 μ g/ml de CAPE durante 1 hora en medio DMEM que contenía FBS al 0,5% y se sustituyeron con medio que contenía RR1 a concentraciones variables durante 4 horas a 37°C. Se analizó en el medio TNF- α segregado utilizando el protocolo ELISA.

La Figura 13 representa la actividad de enlace del ADN del factor de transcripción NF- κ B en macrófagos RAW 264.7 tratados con RR1 a lo largo del tiempo. Los macrófagos se trataron con 100 μ g de RR1 y la actividad de NF- κ B de los extractos nucleares se analizó 2, 4, 8, 14 y 20 horas después de la incubación utilizando el protocolo ELISA.

La Figura 14 representa la activación dependiente de la dosis del factor de transcripción NF- κ B en macrófagos RAW 264.7 tratados con RR1. La actividad de NF- κ B aumentó con dosis crecientes de RR1, alcanzando una fase estacionaria a 500 μ g/ml.

La Figura 15 representa la actividad de enlace del ADN del factor de transcripción NF- κ B en el extracto nuclear de las células RAW 264.7 por el ensayo de desplazamiento en gel EMSA. Un aumento en función de la dosis en la intensidad de la banda específica para NF- κ B es visible basándose en la intensidad de la banda no específica.

5 La Figura 16 demuestra que la estimulación de los macrófagos RAW 264.7 con RR1 produce degradación de I- κ B α citosólica. Se trataron las células con RR1 a intervalos de 15, 30 y 60 minutos. La degradación de los niveles de I- κ B α en lisados citoplásmicos se determinó por análisis de inmunotransferencia utilizando I- κ B α anti-ratón.

10 La Figura 17 representa la RT-RCP de los ARNm TLR2, TLR4 y TLR6 en células RAW 264.7 estimuladas con RR1. Se trataron las células (1×10^6) con RR1 (0, 10, 100, 500 y 1000 μ g/ml) a 37°C durante 24 horas en una incubadora con CO₂ y se amplió el ARNm con cebadores específicos de TLR de ratón.

15 La Figura 18 representa el análisis de la síntesis de IL-8 inducida por RR1 en células HEK293 transfectadas de manera estable con los genes para TLR2 y TLR6. Se trataron células HEK293/TLR2/TLR6 (1×10^6) con RR1 (0, 10, 50 y 100 μ g/ml) a 37°C durante 24 horas y se analizó la IL-8 segregada en el medio por el protocolo ELISA.

20 La Figura 19 representa el análisis de la síntesis de IL-8 inducida por RR1 en células HEK293 transfectadas de manera estable con el gen para TLR6. Se trataron células HEK293/TLR6 (1×10^6) con RR1 (0, 10, 50 y 100 μ g/ml) a 37°C durante 24 horas y se analizó la IL-8 segregada en el medio por el protocolo ELISA.

La Figura 20 representa la ruta de estimulación del sistema inmunitario de RR1 en macrófagos.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona un compuesto aislado (RR1), un nuevo polisacárido que presenta propiedades exclusivas de refuerzo inmunitario. RR1, que presenta la estructura representada en la Figura 3, es un polisacárido α -D-glucano compuesto por un eje central unido (1 \rightarrow 4) y ramificaciones unidas por (1 \rightarrow 6), con una masa molecular superior a 550 kDa. RR1 se ha aislado de una hierba medicinal, *Tinospora cordifolia* (familia *Minispermaceae*), que ha sido tema de estudio por sus propiedades medicinales (Singh, S. S. *et al.*, *Ind. J. Pharm.*, 2003, 35:83-91; Chintarwal, G. *et al.*, *Phytochemistry*, 1999, 52: 1089-1094; Manjerakar, P. N. *et al.*, *Fitoterapia*, 2000, 71:254-257; Desai, V. R. *et al.*, *Proc. Indian. Acad. Sci.*, 2002, 114: 713-719; Subramanyan, M. *et al.*, *Redox. Rep.*, 2002, 7:137-143).

35 El RR1 es no citotóxico y no proliferante para linfocitos normales, así como para estirpes de células tumorales incluso a 1.000 μ g/ml. Diferentes subconjuntos de linfocitos activados por RR1, tales como las células NK (331%), linfocitos T (102%) y linfocitos B (39%) a una concentración de 100 μ g/ml. La activación significativa de las células NK conduce a la destrucción en función de la dosis de las células tumorales por linfocitos normales activados en un ensayo funcional. La activación inmunitaria por RR1 en linfocitos normales produjo la síntesis de IL-1 β (1080 pg/ml), L-6 (21833 pg/ml), IL-12 p70 (50,19 pg/ml), IL-12 p40 (918,23 pg/ml), IL-18 (27,47 pg/ml), IFN- γ (90,16 pg/ml), TNF- α (2225 pg/ml) y MCP-1 (2307 pg/ml) a la concentración de 100 μ g/ml, aunque no indujo la producción de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- α y TNF- β . Este perfil de citocinas demuestra que la ruta de Th1 de la diferenciación de linfocitos T colaboradores, esencial para la inmunidad mediada por células, con un mecanismo autorregulador para el control de su sobreproducción.

45 El RR1 activó también los componentes del complemento en la ruta alternativa, como se demuestra por un aumento paso a paso en C3a de los componentes de Arg. De paso, la estimulación de RR1 no produjo estrés oxidativo en los linfocitos y solamente produjo un ligero aumento en la producción de óxido nítrico justificado por la inducción insignificante de ONSi. El hecho de que RR1 es soluble en agua, tiene una masa molecular elevada, activa los linfocitos (particularmente las células NK), activa el complemento, induce un perfil de citocinas asociado a la ruta Th1, junto con un bajo nivel de síntesis de óxido nítrico, y la ausencia de estrés oxidativo, confiere propiedades potenciales de biodefensa a este nuevo α -D-glucano.

55 Se investigó el mecanismo de señalización de RR1 en macrófagos para profundizar en la comprensión de sus propiedades inmunoestimulantes. Cuando se incubaron macrófagos RAW 264.7 con RR1 a 4°C, el RR1 inhibió el enlace no opsónico y la fagocitosis de las biopartículas de zimosan-A en función de la dosis. Sin embargo, tuvo muy poco efecto sobre el enlace opsónico y la interiorización de las biopartículas de zimosan-A. La incubación de macrófagos con mAb anti-CD11b seguida por RR1 no pudo presentar ningún efecto inhibitorio en la síntesis de NFT- α inducida por RR1 lo que confirmaba la falta de implicación de CR3 en el enlace opsónico y la interiorización de RR1 en macrófagos distintos de zimosan. El mAb anti-CD11b tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la síntesis de TNF- α producida por zimosan A. El RR1 indujo la síntesis de TNF- α en macrófagos en función de la dosis que puede ser completamente inhibida por el éster fenilico del ácido cafeico (CAPE) inhibidor de NF- κ B. RR1 activó NF- κ B en función del tiempo y de la dosis y esta modulación de la actividad nuclear de NF- κ B está asociada a la degradación de I- κ B- α facilitando así el desplazamiento de NF- κ B en el núcleo. La actividad de NF- κ B inducida por RR1 alcanza el máximo a las 8 horas de la estimulación por RR1 aunque la degradación de I- κ B- α ocurrió a la hora de la estimulación. La activación de NF- κ B inducida por RR1 ocurrió por señalización de TLR6 porque RR1 indujo la síntesis de IL-8 en las células HEK293 transfectadas con TLR6 y no en otros transfectantes. Estos resultados

demuestran que RR1 activa el sistema inmunitario mediante la activación de macrófagos que se produce por señalización con TLR6, transposición de NF- κ B y producción de proteínas inmunitarias. Un esquema de la ruta de transducción de señal de la estimulación inmunitaria por RR1 en monocitos/macrófagos se representa en la Figura 20.

5 Preferentemente, la respuesta inmunitaria estimulada por el compuesto RR1 según la invención está sesgada hacia el fenotipo tipo Th1 y lejos del fenotipo de tipo Th2. Haciendo referencia a la invención, la estimulación de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 puede determinarse *in vitro* o *ex vivo* midiendo la producción de citocinas en las células tratadas con un compuesto RR1 en comparación con las tratadas sin un compuesto RR1. Los procedimientos para determinar la producción de citocinas de las células comprenden de manera no limitativa los procedimientos descritos en la presente memoria, así como otros procedimientos conocidos en la técnica. Las citocinas producidas en respuesta al tratamiento con RR1 indican una respuesta inmunitaria sesgada de tipo Th1 o de tipo Th2 por las células.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión producción de citocinas “sesgada de tipo Th1” se refiere al aumento de producción mensurable de las citocinas asociadas a la respuesta inmunitaria de tipo Th1 en presencia de un estimulante en comparación con la producción de dichas citocinas en ausencia de estimulación. Los ejemplos de dichas citocinas sesgadas de tipo Th1 comprenden de manera no limitativa IL-2, IL-12 e IFN-gamma. En cambio, “citocinas sesgadas de tipo Th2” se refiere a las asociadas a una respuesta inmunitaria de tipo Th2, e comprenden de manera no limitativa IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las células útiles para la determinación de la actividad de RR1 incluyen las células del sistema inmunitario, las células primarias aisladas de un paciente y/o las estirpes celulares, preferentemente las APC y linfocitos, aún más preferentemente, los macrófagos y los linfocitos T.

25 La estimulación de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 puede medirse también en un paciente tratado con un compuesto RR1 y puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a: (1) una reducción de las concentraciones de IL-4 medidas antes y después de la prueba de provocación con antígeno; o la detección de niveles menores (o incluso con ausencia) de IL-4 en un paciente tratado con RR1 en comparación con una referencia cebada con antígeno o cebada y sometida a la prueba de provocación tratada con RR1; (2) un aumento en las concentraciones de IL-12, IL-18 y/o IFN (alfa, beta o gamma) antes y después de la prueba de provocación con antígeno; o detección de concentraciones mayores de IL-12, IL-18 y/o IFN (alfa, beta o gamma) en un paciente tratado con RR1 en comparación con una referencia tratada con RR1 cebada con antígeno o, cebada y sometida a la prueba de provocación; (3) producción de anticuerpo IgG2a en un paciente tratado con RR1 en comparación con una referencia tratada sin RR1; y/o (4) una reducción en las concentraciones de IgE específica para el antígeno medida antes y después de la prueba de provocación con antígeno; o detección de concentraciones menores (e incluso en ausencia) de IgE específica para el antígeno en un paciente tratado con RR1 en comparación con una referencia tratada con RR1 cebada con antígeno o, cebada y sometida a la prueba de provocación. Pueden realizarse varias determinaciones midiendo las citocinas preparadas por los APC y/o los linfocitos, preferentemente macrófagos y/o linfocitos T *in vitro* o *ex vivo* utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria o cualquiera conocido en la técnica. Los procedimientos para determinar la producción de anticuerpos incluyen cualquiera conocido en la técnica.

45 La inducción de citocina sesgada por Th1 que se produce como resultado de la administración de RR1 produce respuestas inmunitarias celulares aumentadas, tales como las realizadas por las células NK, células citotóxicas destructoras, los Th1 colaboradores y las células de memoria. Estas respuestas son particularmente beneficiosas para su utilización en vacunación protectora o terapéutica contra virus, hongos, parásitos protozoarios, bacterias, enfermedades alérgicas y asma, así como tumores.

50 Los compuestos RR1 de la presente invención son útiles para el tratamiento de procesos patológicos en seres humanos o en animales no humanos que necesitan inmunoestimulación, tales como los procesos que implican inmunosupresión. Los ejemplos de procesos para los que se desea inmunoestimulación incluyen, pero no se limitan a el tratamiento o la prevención de osteomielitis, bronquitis crónica, tuberculosis, infecciones del aparato respiratorio inferior, amigdalitis, otitis media, hepatitis, SIDA, diabetes mellitus, úlceras diabéticas y enfermedades pediátricas. Los compuestos RR1 de la presente invención son útiles también como patrones para evaluar la actividad de otros supuestos agentes inmunoestimulantes.

55 En virtud de las propiedades inmunoestimulantes de RR1, los compuestos para utilidades terapéuticas, y las composiciones de la presente invención pueden utilizarse para tratar numerosos trastornos de proliferación celular, tales como cánceres, que comprenden de manera no limitativa leucemias y linfomas, tales como la leucemia linfocítica aguda, leucemias no linfocíticas agudas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgking, linfomas no hodgkinianos y mieloma múltiple, tumores sólidos de la infancia, tales como tumores cerebrales, neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms, tumores óseos y sarcomas de tejido blando, tumores sólidos comunes de adultos tales como el cáncer pulmonar, cáncer de colon y recto, cáncer de mama, cáncer de próstata, cánceres urinarios, cánceres de útero, cánceres de vejiga, cánceres bucales, cáncer pancreático, melanoma y otros cánceres de piel, cáncer de estómago, cáncer de ovario, tumores cerebrales, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer tiroideo, cáncer de esófago y cáncer testicular. Las utilidades y

procedimientos de la presente invención pueden realizarse *in vivo* (para utilizaciones) o *in vitro* (para utilizaciones y procedimientos), para inhibir el crecimiento de las células cancerosas en mamíferos humanos y no humanos.

5 Algunas acciones específicas atribuidas a β -glucanos pueden también ser aplicables a RR1. Esto implica la inhibición de la activación de NF-kappaB producida por lipopolisacáridos (LPS) u otras endotoxinas/exotoxinas. La activación por NF-kappaB y otras rutas desempeña una importante función en el desarrollo de la septicemia y del choque séptico. El (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucano ha demostrado una disminución de la activación de NF-kappaB y un aumento de la supervivencia a largo plazo en ratones con septicemia (Williams, D. L. *et al.*, *Shock*, 2000, 13:446-452; Williams, D. L. *et al.*, *Surgery*, 1999, 126:54-65). Por consiguiente, la presente invención incluye la utilización de un compuesto de la presente invención que trata la septicemia o el choque séptico en un mamífero humano o no humano administrando por lo menos un compuesto RR1. En otro aspecto, el compuesto RR1 de la presente invención puede utilizarse en la reducción de la activación de NF-kappaB producida por LPS u otra endotoxina y/o exotoxina en un mamífero humano o no humano.

15 En virtud de su acción como modificador de la respuesta biológica, los compuestos RR1 de la invención pueden utilizarse también en el tratamiento de otros trastornos tales como las enfermedades pulmonares agudas y crónicas o cualquier otro trastorno que pueda estar asociado con una anomalía de los sistemas inmunitarios innato o adaptable. La presente invención incluye dichas utilizaciones para el tratamiento de dichos trastornos. Existen pruebas para apoyar una función para la quimioprevención del cáncer mediante polisacáridos vegetales además de un efecto antitumoral (Kim, H. S. *et al.*, *Carcinogenesis*, 1999, 20:1637-1640). La presente invención incluye la utilización del compuesto RR1 de la presente invención para la quimioprevención del cáncer, en el que por lo menos un compuesto RR1 de la invención se administra a un paciente.

25 Las utilizaciones de la presente invención pueden combinarse de manera ventajosa con por lo menos una utilización terapéutica adicional conocida por los expertos en la materia para el tratamiento o diagnóstico y tratamiento de trastornos de proliferación celular (por ejemplo, cáncer) u otros procesos patológicos (por ejemplo, enfermedades u otros trastornos) que pueden ser tratados o diagnosticados y tratados con inmunoestimulación o inmunosupresión. Ejemplos de dichas terapias complementarias comprenden de manera no limitativa quimioterapia, terapia de radiación y administración de fármacos contra el cáncer u otros agentes anticancerosos. La terapia complementaria puede ser alopática o no alopática, tal como la acupuntura, la terapia de masaje, las terapias energéticas, etc. El proceso patológico puede ser una enfermedad o trastorno agudo o crónico.

35 Aunque RR1 y análogos de RR1 pueden administrarse como compuestos aislados, resulta preferido administrar estos compuestos en forma de composición farmacéutica. La presente invención proporciona por tanto además composiciones farmacéuticas que comprenden RR1, como principio activo, o sal(es) fisiológicamente aceptable(s) del mismo, junto con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede adaptarse a varias vías de administración, tales como la enteral, parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica, subcutánea y demás.

40 La administración puede ser continua o a distintos intervalos, como puede determinar cualquier experto en la materia.

45 Los compuestos RR1 de la presente invención pueden formularse según procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones se describen en numerosas fuentes muy conocidas y a disposición de los expertos en la materia. Por ejemplo, *Remington Pharmaceutical Sciences* (Martin, E. W., Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19^a ed., 1995) describe formulaciones que pueden utilizarse en relación con la presente invención. Las formulaciones adecuadas para administración incluyen, por ejemplo, soluciones inyectables estériles acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes en suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solo la condición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyectables, antes de su utilización. Pueden prepararse soluciones y suspensiones inyectables improvisadas a partir de polvos estériles, gránulos, comprimidos, etc. Debe apreciarse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de formulación en cuestión.

60 Los compuestos RR1 de la presente invención incluyen todos los hidratos y sales de RR1 que pueden preparar los expertos en la materia. En las condiciones en las que los compuestos de la presente invención son suficientemente básicos o ácidos para formar sales ácidas o básicas estables no tóxicas, la administración de los compuestos en forma de sales puede ser apropiada. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de adición de ácido orgánico formadas con ácidos que forman un anión fisiológicamente aceptable, por ejemplo, tosilato, metansulfonato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, ascorbato, alfa-cetoglutarato y alfa-glicerofosfato. Pueden formarse también sales inorgánicas adecuadas, incluyendo las sales de hidrocioruro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato.

Pueden obtenerse sales farmacéuticamente aceptables de RR1 utilizando procedimientos habituales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto suficientemente básico tal como una amina con un ácido adecuado que proporciona un anión fisiológicamente aceptable. Pueden prepararse también sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio o litio) o de metales alcalinotérreos (por ejemplo calcio) de ácidos carboxílicos.

La aplicación terapéutica de los compuestos de RR1 y las composiciones que los contienen puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento y técnica terapéutica adecuada actualmente o eventualmente conocida por los expertos en la materia. Además, los compuestos RR1 de la invención son útiles como materiales de partida o productos intermedios para la preparación de otros compuestos y composiciones útiles.

Los compuestos RR1 de la invención y las composiciones inmunomoduladoras que contienen dichos compuestos pueden administrarse de forma generalizada (por ejemplo, por vía oral o intravenosa) en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto RR1 puede estar contenido en cápsulas de gelatina de carcasa dura o blanda, puede estar en forma de comprimidos o puede estar incorporado directamente en el alimento de la dieta del paciente. Para la administración terapéutica bucal, el compuesto RR1 puede combinarse con uno o más excipientes o utilizarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, grajeas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Los comprimidos, grajeas, píldoras, cápsulas y similares pueden contener además: aglutinantes tales como goma de tragacanto, goma de acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregador tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; pueden añadirse un lubricante tal como el estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, fructosa, lactosa o aspartamo o un agente saborizante tal como menta, aceite de gualteria o aroma de cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un excipiente líquido, tal como un aceite vegetal o un polietilenglicol. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar sino la forma física de la forma farmacéutica unitaria sólida. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertos con gelatina, cera, goma laca o azúcar y similares. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa o fructosa como agente edulcorante, metil y propil-parabenos como conservantes, un colorante y saborizante tal como aroma de cereza o de naranja. Desde luego, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma farmacéutica unitaria sería farmacéuticamente aceptable y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto RR1 de la presente invención puede incorporarse en preparaciones y dispositivos de liberación controlada.

El principio activo, un compuesto de RR1 de la presente invención (es decir, RR1 o las sales o análogos farmacéuticamente aceptables de RR1) puede administrarse también por vía intravenosa o intraperitoneal por infusión o inyección. Las soluciones del principio activo o sus sales pueden prepararse en agua, opcionalmente mezclarse con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y utilización, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas de dosificación farmacéutica adecuadas para inyectables o infusión pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden el principio activo que están adaptadas para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la forma de dosificación final puede ser estéril, fluida y estable en las condiciones de preparación y almacenamiento. El excipiente o vehículo líquido puede ser un disolvente o un medio de dispersión líquido, que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones o mediante la utilización de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser producida por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ocasionarse mediante la utilización en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto RR1 (es decir, RR1 o una sal o análogo de RR1 farmacéuticamente aceptable) en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización en filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación conocidos son secado al vacío y técnicas de secado con congelación, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones filtradas estériles previamente.

Para la administración tópica, los compuestos RR1 pueden aplicarse en forma pura, es decir, cuando son líquidos. Sin embargo, generalmente será deseable administrarlos a la piel en forma de composiciones, en combinación con un vehículo dermatológicamente aceptable, que puede ser sólido o líquido.

Los excipientes sólidos útiles incluyen sólidos finamente divididos tales como talco, arcilla, celulosa microcristalina, sílice, alúmina y similares. Los excipientes líquidos útiles incluyen agua, alcoholes o glicoles o mezclas de agua-alcohol/glicol, en las que el compuesto RR1 puede disolverse o dispersarse en cantidades eficaces, opcionalmente con ayuda de tensioactivos no tóxicos. Pueden añadirse adyuvantes tales como esencias y agentes antimicrobianos adicionales para optimizar las propiedades para una utilización dada. Las composiciones líquidas resultantes pueden aplicarse en almohadillas absorbentes, utilizadas para impregnar vendas y otros apósitos, o pulverizarse en el área afectada utilizando pulverizadores de tipo bomba o de aerosol.

Pueden utilizarse también espesantes tales como polímeros sintéticos, ácidos grasos, sales de ácidos grasos y ésteres, alcoholes grasos, celulosas modificadas o materiales minerales modificados con vehículos líquidos para formar pastas extensibles, geles, pomadas, jabones, y similares, para la aplicación directa a la piel del usuario. Los ejemplos de composiciones dermatológicas útiles que pueden utilizarse para administrar el compuesto RR1 a la piel se dan a conocer en Jacquet *et al.* (patente US nº 4.608.392); Geria (patente US nº 4.992.478); Smith *et al.* (patente US nº 4.559.157) y Woltzman (patente US nº 4.820.508).

Las dosis prácticas de las composiciones de la presente invención pueden determinarse comparando su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en modelos animales. Los procedimientos para la extrapolación de dosis eficaces en ratones, y otros animales, a seres humanos son conocidos en la materia; por ejemplo, véase la patente US nº 4.938.949.

Por consiguiente, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto RR1 (es decir, RR1 o la sal farmacéuticamente aceptable) en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, que es inmunomodulador. Las composiciones inmunomoduladoras adaptadas para la administración oral, tópica o parenteral, que comprenden una cantidad de compuesto RR1 constituyen una forma de realización preferida de la invención. La dosis administrada a un paciente, particularmente a un ser humano, en el contexto de la presente invención sería suficiente para conseguir una respuesta terapéutica en el paciente durante un marco temporal razonable. Un experto en la materia APRECIARÁ que la dosis depende de varios factores incluyendo el estado (salud) del paciente, el peso corporal del paciente, el tipo de tratamiento simultáneo, si existe, la frecuencia del tratamiento, la relación terapéutica, así como la gravedad y el estado del proceso patológico.

En el contexto del cáncer, una dosis adecuada es la que produzca una concentración del principio activo (un compuesto RR1 de la invención) en el tejido tumoral que es conocido que consigue la respuesta deseada. La dosis preferida es la cantidad que produce la máxima inhibición del crecimiento de las células cancerosas sin efectos secundarios intratables. La administración de un compuesto RR1, y las composiciones que contienen dichos compuestos, pueden ser continuas o a distintos intervalos, como puede determinar cualquier experto en la materia.

Para proporcionar la administración de dichas dosis para el tratamiento terapéutico deseado, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán de forma ventajosa entre aproximadamente 0,1% y 45%, y especialmente, 1 y 15% en peso del total de uno o más de los nuevos compuestos referido al peso de la composición total incluyendo vehículo o diluyente. De manera ilustrativa, las concentraciones de las dosis de los ingredientes activos administrados pueden ser: intravenosa, 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg; intraperitoneal, 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg; subcutánea, 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg; intramuscular, 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg; bucal, 0,01 a aproximadamente 200 mg/kg, y preferentemente de aproximadamente 1 a 100 mg/kg; instilación intranasal, 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg; y aerosol, 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso (corporal) del animal.

Las especies de mamífero que se benefician de los procedimientos, compuestos y composiciones dados a conocer, comprenden de manera no limitativa primates, tales como monos, chimpancés, orangutanes, seres humanos, monos; animales domésticos (por ejemplo, mascotas) tales como perros, gatos, cobayas, hámsteres, cerdos barrigudos vietnamitas, conejos y hurones; animales de granja domesticados tales como vacas, búfalos, bisontes, caballos, asnos, ovejas y cabras; animales exóticos que se encuentran por lo general en zoológicos, tales como osos, leones, tigres, panteras, elefantes, hipopótamos, rinocerontes, jirafas, antílopes, osos perezosos, gacelas, cebras, ñus, perros de la pradera, koalas, canguros, zarigüeyas, mapaches, osos panda, hienas, focas, leones marinos, elefantes marinos, nutrias, marsopas, delfines y ballenas. Otras especies que pueden beneficiarse de los procedimientos dados a conocer incluyen peces, anfibios, aves y reptiles. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan de manera indistinguible y se pretende que incluyan dichas especies humana y no humana. Así mismo, los procedimientos *in vitro* en la presente invención pueden realizarse en células dichas especies.

Los pacientes necesitados de tratamiento que utilizan la presente invención pueden identificarse utilizando técnicas habituales conocidas en la profesión médica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren al proceso patológico en mamíferos o describen éste que está típicamente caracterizado por el crecimiento celular descontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más específicos de dichos cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer

epidermoide, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, por ejemplo, carcinoma hepático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, cáncer renal y cáncer tiroideo.

5 Otros ejemplos no restrictivos de cánceres son el carcinoma basocelular; el cáncer del conducto biliar; el cáncer de huesos; el cáncer de cerebro y del SNC; coriocarcinoma, cáncer del tejido conectivo; cáncer de esófago, cáncer ocular; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico; neoplasma intraepitelial, cáncer de laringe; linfoma incluyendo el linfoma hodgkiniano y no hodgkiniano, melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad bucal (por ejemplo, de labios, lengua, boca y faringe); cáncer pancreático; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer rectal; 10 cáncer del sistema respiratorio, sarcoma; cáncer de piel; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer de útero; cáncer del sistema urinario, así como otros carcinomas y sarcomas.

El RR1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse a un paciente por sí mismo, o administrarse junto con otro agente; la administración conjunta puede realizarse simultánea (en la misma o en formulaciones separadas) o consecutivamente. Además, RR1, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, puede administrarse a un paciente como terapia complementaria. Por ejemplo, RR1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse a un paciente junto con quimioterapia.

Por lo tanto, los compuestos RR1 de la presente invención (RR1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) si se administran por separado, o como composición farmacéutica, pueden incluir otros varios componentes como aditivos. Los ejemplos de componentes o adyuvantes que pueden utilizarse en circunstancias oportunas incluyen antioxidantes, agentes antioxidantes para radicales libres, péptidos, factores de crecimiento, antibióticos, agentes bacteriostáticos, inmunosupresores u otros agentes inmunoestimulantes, anticoagulantes, agentes tamponantes, agentes antiinflamatorios, antipiréticos, aglutinantes de liberación lenta, anestésicos, esteroides y corticoesteroides. Dichos componentes pueden proporcionar utilidad terapéutica adicional, actuar para afectar la acción terapéutica del compuesto RR1 o actuar para impedir cualquier efecto secundario potencial que pueda plantearse como resultado de la administración del compuesto RR1. Los compuestos RR1 de la presente invención pueden conjugarse también con un agente terapéutico.

Agentes adicionales que pueden administrarse conjuntamente a un paciente, consecutiva o simultáneamente, en la misma formulación o en una formulación separada, incluyen los que modifican una respuesta biológica dada, tal como los inmunomoduladores. Por ejemplo, pueden administrarse proteínas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), interferón (tales como alfa-interferón y beta-interferón), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y activador de plasminógeno tisular. Pueden administrarse modificadores de la respuesta biológica, tales como linfocinas, interleucinas (tales como interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-6 (IL-6)), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento. Agentes anticancerosos, agentes citotóxicos y/o agentes quimioterapéuticos pueden administrarse a un paciente junto con un compuesto RR1 de la presente invención, consecutiva o simultáneamente, en la misma formulación o en formulaciones separadas. El compuesto RR1 de la invención puede administrarse junto con un antígeno. Preferentemente, el antígeno es un principio activo en una vacuna.

En una forma de realización, la invención proporciona composiciones que comprenden un compuesto RR1 como única sustancia inmunológicamente activa. Cuando se utiliza según la presente invención, el compuesto RR1 produce una estimulación del sistema inmunitario.

El compuesto RR1 puede administrarse junto con una u otras moléculas inmunomoduladoras más, tales como antígenos (que comprenden de manera no limitativa proteínas, glucoproteínas, polisacáridos y lípidos) y/o facilitadores inmunomoduladores tales como las moléculas coestimulantes (que comprenden de manera no limitativa citocinas, quimiocinas, ligando dirigido a proteína, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden un aminoácido modificado) y adyuvantes (que comprenden de manera no limitativa alúmina, emulsiones lipídicas y micropartículas de polilactida/poliglicolida). El término "inmunomodulador", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye efectos inmunoestimulantes así como inmunosupresores. Los efectos inmunoestimuladores comprenden de manera no limitativa los que aumentan directa o indirectamente las respuestas inmunitarias celulares o humorales. Ejemplos de efectos inmunoestimuladores comprenden de manera no limitativa el aumento de la producción de anticuerpos específicos para el antígeno; la activación o proliferación de una población de linfocitos tales como las células NK, linfocitos CD4⁺ T, linfocitos CD8⁺ T, macrófagos, y similares; incremento de la síntesis de citocinas inmunoestimulantes incluyendo, pero sin limitarse a IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IFN-gamma, TNF-alfa y similares. Los efectos inmunosupresores incluyen aquellos que directa o indirectamente disminuyen las respuestas inmunitarias celulares o humorales. Ejemplos de efectos inmunosupresores comprenden de manera no limitativa una reducción en la producción de anticuerpo específico para el antígeno tal como la producción reducida de IgE; la activación de linfocitos u otras poblaciones celulares que tienen actividades inmunosupresoras tales como los que se producen en tolerancia inmunitaria; y aumento de la síntesis de citocinas que tienen efectos supresores hacia determinadas funciones celulares. Un ejemplo de esto es IFN-gamma, que parece bloquear el intercambio de la clase inducida por IL-4 con IgE e IgG1, reduciendo de este modo las concentraciones de estas subclases de anticuerpos.

El compuesto RR1 y el facilitador del antígeno y/o inmunomodulador puede administrarse conjuntamente en forma de conjugado o administrarse conjuntamente en una mezcla suficientemente próxima en el tiempo a fin de modular una respuesta inmunitaria. Preferentemente, el compuesto RR1 y la molécula inmunomoduladora se administran simultáneamente. La expresión “administración conjunta” tal como se utiliza en este contexto se refiere a la administración por lo menos de dos sustancias diferentes suficientemente próximas en el tiempo para modular una respuesta inmunitaria. Preferentemente, la administración conjunta se refiere a la administración simultánea de por lo menos de dos sustancias diferentes.

Tal como se utiliza en la presente memoria el término “conjugado” se refiere a un complejo en el que un complejo RR1 y una molécula inmunomoduladora están unidos. Dichos enlaces conjugados incluyen enlaces covalente y/o no covalentes.

Tal como se utiliza en la presente memoria el término “antígeno” significa una sustancia que es reconocida y está unida específicamente por un anticuerpo o por un receptor del antígeno de linfocito T. Los antígenos pueden incluir péptidos, proteínas, glucoproteínas, polisacáridos, gangliósidos y lípidos; fracciones de los mismos y combinaciones de los mismos. Los antígenos pueden ser aquellos que se encuentran en la naturaleza o pueden ser sintéticos. Los haptenos están incluidos en el alcance de “antígeno”. Un hapteno es un compuesto de bajo peso molecular que no es inmunógeno por sí mismo pero que se hace inmunógeno cuando se conjuga con una molécula inmunógena que contiene determinantes antigénicos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “adyuvante” se refiere a una sustancia que, cuando se añade a un agente inmunógeno, mejora o potencia de manera no específica una respuesta inmunitaria al agente en el hospedador receptor en la exposición a la mezcla.

En otras formas de realización, la invención proporciona composiciones que comprenden un compuesto RR1 y un antígeno. Los antígenos adecuados para la administración con compuestos RR1 incluyen cualquier molécula capaz de reproducir una respuesta específica para el antígeno del linfocito B o del linfocito T. Preferentemente, los antígenos producen una respuesta del anticuerpo específica para el antígeno. Una amplia variedad de moléculas son antígenos. Estos comprenden de manera no limitativa azúcares, lípidos y polipéptidos, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos, y polipéptidos. Puede ser necesario haptenizar pequeñas moléculas para que se vuelvan antigénicas. Preferentemente, los antígenos de la presente invención incluyen péptidos, lípidos (por ejemplo, esteroides, ácidos grasos y fosfolípidos), polisacáridos tales como los utilizados en las vacunas con *Hemophilus influenza*, gangliósidos y glucoproteínas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “péptido” incluye los péptidos y proteínas que tienen suficiente longitud y composición para conseguir una respuesta biológica, por ejemplo, producción de anticuerpos o actividad de citocina si el péptido es o no un hapteno. Por lo general, los péptidos tienen por lo menos seis restos de aminoácidos de longitud. El término “péptido” incluye además, aminoácidos modificados, tales como las modificaciones que comprenden de manera no limitativa fosforilación, glucosilación, pegilación, lipidización y metilación.

En una forma de realización, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un compuesto RR1 y un péptido antigénico. Los péptidos antigénicos pueden incluir péptidos naturales purificados, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, extractos de proteína en bruto, virus atenuados o inactivados, células, microorganismos o fragmentos de dichos péptidos.

Se conocen muchos péptidos y proteínas antigénicos, y están disponibles en la técnica; otros pueden identificarse utilizando técnicas convencionales. Los antígenos proteicos que pueden servir como facilitadores inmunomoduladores comprenden de manera no limitativa los ejemplos siguientes. Los antígenos naturales o recombinantes aislados pueden proceder del polen de las plantas (véase, por ejemplo, Rafnar *et al.* (1991), *J. Biol. Chem.*, 266:1299-1236; Breiteneder *et al.* (1989), *EMBO J.*, 8:1935-1938; Elsayed *et al.* (1991), *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 204:17-31 y Malley (1989), *J. Reprod. Immunol.*, 16:137-186), proteínas de los ácaros del polvo (véase, por ejemplo, Chua *et al.* (1988), *J. Exp. Med.*, 167:175-182; Chua *et al.* (1990), *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 91:124-129 y Joost van Neerven *et al.* (1993), *J. Immunol.*, 151: 2326-2335), caspa de animal (véase, por ejemplo, Rogers *et al.* (1993), *Mol. Immunol.*, 30: 559-568), saliva de animal, veneno de abejas y esporas fúngicas. Microorganismos vivos, atenuados e inactivados tales como VIH-1, VIH-2, virus del herpes simple, virus de la hepatitis A (Bradley *et al.* (1984), *J. Med. Virol.*, 14:373-386), rotavirus, virus de la poliomeilitis (Jiang *et al.* (1986), *J. Biol. Stand.*, 14:103-109), virus de la hepatitis B, virus del sarampión (James *et al.* (1995), *N. Engl. J. Med.*, 332:1262-1266), virus del papiloma humano y bovino y virus lentos del cerebro pueden proporcionar antígenos peptídicos. Para la inmunización contra la formación del tumor, los péptidos inmunomoduladores pueden incluir células tumorales (vivas o irradiadas), extractos de células tumorales o subunidades proteicas de antígenos tumorales. Pueden elaborarse vacunas para la anticoncepción inmunizada incluyendo las proteínas del esperma administradas con un compuesto RR1 (Lea *et al.* (1996), *Biochim. Biophys. Acta*, 1307:263).

Los antígenos que deben utilizarse en las composiciones y procedimientos de la invención no son críticos. Pueden utilizarse mezclas de diferentes antígenos según la presente invención. Preferentemente, se utilizan proteínas o péptidos procedentes de un patógeno vírico o bacteriano, o de hongos o parásitos, como dichos antígenos (incluyendo antígenos modificados, antígenos glucosilados o lipidados, polisacáridos o lípidos). Otra fuente preferida de antígenos son los antígenos tumorales. Se seleccionan los patógenos preferidos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), Virus de la hepatitis A y B, virus de la hepatitis C (VHC), virus del sarcoma de Rous (VSR), Virus de Epstein Barr (VEB), virus de la gripe, rotavirus, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium sp.* (*Pl. falciparum*, *Pl. vivax*, etc.), *Aspergillus sp.* o *Candida albicans*. Los antígenos pueden ser también moléculas expresadas por las células cancerosas (antígenos tumorales). El procedimiento de modificación puede incluir la purificación de una proteína específica procedente de las células patógenas/cancerosas, la inactivación del patógeno así como la modificación proteolítica o química o la estabilización de dicha proteína. De la misma manera, los antígenos tumorales (vacunas contra el cáncer) o los antígenos autoinmunitarios pueden utilizarse en las composiciones y procedimientos según la presente invención. Por lo tanto, puede realizarse una vacunación contra el tumor o un tratamiento para las enfermedades autoinmunitarias.

El compuesto RR1 y el antígeno pueden administrarse en forma de conjugado antígeno-RR1 y/o puede administrarse conjuntamente como complejo en forma de una mezcla, tal como en una emulsión. La asociación del compuesto RR1 y las moléculas de antígeno en un conjugado RR1-antígeno puede ser por interacciones covalentes y/o por interacciones no covalentes, incluyendo interacciones de alta afinidad y/o de baja afinidad. Ejemplos de interacciones no covalentes que pueden acoplar el compuesto RR1 y un antígeno en un conjugado RR1-antígeno comprenden de manera no limitativa enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y atracciones de van der Waals.

El compuesto RR1 puede administrarse junto con uno o más facilitadores inmunomoduladores. De este modo, la invención proporciona composiciones que comprenden un compuesto RR1 y un facilitador inmunomodulador. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "facilitador inmunomodulador" se refiere a moléculas que soportan y/o aumentan la actividad inmunomoduladora de un compuesto RR1. Ejemplos de facilitadores inmunomoduladores pueden incluir, moléculas coestimulantes, tales como citocinas y/o adyuvantes. El compuesto RR1 y el facilitador pueden administrarse como un conjugado RR1-facilitador y/o pueden administrarse conjuntamente como complejo en forma de mezcla, tal como en una emulsión. El compuesto RR1 y las moléculas de facilitador en un conjugado RR1-facilitador pueden asociarse mediante interacciones covalentes y/o mediante interacciones no covalentes, incluyendo las interacciones de alta afinidad y/o de baja afinidad. Ejemplos de interacciones no covalentes que pueden acoplar un compuesto RR1 y un facilitador en un conjugado RR1-facilitador comprenden de manera no limitativa enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y atracciones de van der Waals.

Los facilitadores inmunomoduladores comprenden de manera no limitativa moléculas coestimulantes (tales como citocinas, quimiocinas, ligando de proteína diana, factores de trasactivación, péptidos y péptidos que comprenden un aminoácido modificado) y adyuvantes (tales como alúmina, emulsiones de lípidos y micropartículas de polilactida/poliglicolida).

Entre los péptidos de citocina inmunomoduladores adecuados para administración con los compuestos RR1 están las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, etc.), interferones (por ejemplo, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma), eritropoyetina, factores estimulantes de colonias (por ejemplo, G-CFS, M-CFS, GM-CFS) y TNF-alfa. Preferentemente, los péptidos inmunomoduladores para su utilización junto con los compuestos RR1 son aquellos que estimulan respuestas inmunitarias tipo Th1, tales como IL-12 (Bliss *et al.* (1996), *J. Immunol.*, 156:887-894), IL-18, TNF-alfa, beta y gamma, y/o factor de crecimiento transformante (TGF)-alfa.

Los péptidos administrados con compuestos RR1 pueden también incluir secuencias de aminoácidos que median la unión de la proteína a un receptor específico o que median el direccionamiento a un tipo de célula o tejido específicos. Los ejemplos comprenden de manera no limitativa anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, hormonas peptídicas tales como la hormona de crecimiento humana, y enzimas. Los péptidos inmunomoduladores incluyen también hormonas peptídicas, neurotransmisores peptídicos y factores de crecimiento peptídicos. Las moléculas coestimulantes, tales como B7 (CD80), proteínas transactivadoras tales como factores de transcripción, quimiocinas tales como la proteína quimiotáctica del macrófago (MCP) y otros péptidos quimiotaxinas o quimiotácticos son también péptidos útiles para la administración con un compuesto RR1 de la invención.

El compuesto RR1 puede conjugarse además con otros antígenos tales como lípidos, polisacáridos, gangliósidos y similares, mediante un grupo enlazador tal como un péptido.

La invención proporciona además la utilización de un compuesto RR1 junto con un adyuvante para la preparación de un medicamento destinado a estimular un sistema inmunitario en un paciente. La administración de un antígeno con un compuesto RR1 y un adyuvante conduce a una potenciación de una respuesta inmunitaria a un antígeno y de este modo, puede producir un aumento de la respuesta inmunitaria en comparación con la que resulta de una composición que comprende el compuesto RR1 y un antígeno solo. Por lo tanto, en otra forma de realización, la

invencción proporciona composiciones que comprenden un compuesto RR1, un antígeno y un adyuvante con lo que el compuesto RR1/antígeno/adyuvante se administra conjuntamente. Preferentemente, la composición inmunógena contiene una cantidad de un adyuvante suficiente para potenciar la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Preferentemente, los adyuvantes comprenden de manera no limitativa emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, alúmina (sales de aluminio), liposomas y micropartículas, incluyendo pero sin limitarse a, poliestireno, almidón, polifosfaceno y polilactida/poliglucósidos. Más preferentemente, el compuesto RR1 se administra junto con alúmina. Más preferentemente, el compuesto RR1 y un antígeno se administran junto con liposomas. Aun más preferentemente, el compuesto RR1 y un antígeno se administran junto con una emulsión de aceite en agua.

Los adyuvantes adecuados comprenden además de manera no limitativa mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de la pared celular de micobacterium, monofosforil lípido A, derivados del ácido micólico, tensioactivos de copolímero de bloque no iónico, Quil A, subunidad B de la toxina del cólera, polifosfaceno y derivados y complejos inmunoestimulantes (ISCOM) tales como los descritos por Takahashi *et al.* (1990), *Nature*, 344:873-875, así como adyuvantes a base de lípidos y otros descritos en la presente memoria. Para utilización en veterinaria y para la producción de anticuerpos en animales, pueden utilizarse los componentes mitógenos del adyuvante de Freund (tanto completos como incompletos).

Como con todas las composiciones inmunógenas, pueden determinarse empíricamente las cantidades inmunológicamente eficaces de los componentes. Los factores a considerar incluyen la antigenicidad, si se acomplejará o no el compuesto RR1 y/o el antígeno con o unido por enlace covalente a un facilitador inmunomodulador, un adyuvante o proteína portadora u otro excipiente, la vía de administración y el número de dosis de inmunización para ser administrado. Dichos factores son conocidos en la técnica de vacunas y resultan conocidos por los inmunólogos para realizar dichas determinaciones sin demasiada experimentación.

Pueden proporcionarse composiciones en las que un compuesto RR1 y una(s) molécula(s) inmunomoduladora(s) están en asociación próxima en la distancia que son eficaces para aumentar la respuesta inmunitaria generada en comparación con la administración del compuesto RR1 y la molécula inmunomoduladora como una mezcla. De este modo, en una forma de realización, la invencción proporciona composiciones y la utilización de las mismas comprende un agente de encapsulación que puede mantener la asociación próxima del compuesto RR1 y la molécula inmunomoduladora hasta que el complejo esté disponible para la diana. Preferentemente, las composiciones que comprenden el compuesto RR1, la molécula inmunomoduladora y el agente de encapsulación están en forma de emulsiones de aceite en agua del adyuvante, micropartículas y/o liposomas, Más preferentemente, las emulsiones de aceite en agua del adyuvante, las micropartículas y/o los liposomas que encapsulan una molécula RR1 inmunomoduladora están en forma de partículas entre aproximadamente 0,04 μm y aproximadamente 100 μm de tamaño, más preferentemente, entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 20 μm , aun más preferentemente, entre aproximadamente 0,15 μm y aproximadamente 10 μm .

Los sistemas de dispersión coloidal, tales como microesferas, perlas, complejos macromoleculares, nanocápsulas y sistema a base líquidos, tales como emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas pueden proporcionar la encapsulación eficaz de composiciones que contienen el compuesto RR1.

Otro aspecto de la presente invencción proporciona un procedimiento para obtener RR1 de material vegetal de *Tinospora cordifolia*. Según una forma de realización preferida, RR1 se aísla de las partes aéreas (tallo y hojas) del material vegetal. 500 g del material vegetal secado y molido en polvo se extraen en un extractor soxlet durante 72 horas con metanol puro. El residuo se extrae en agua destilada caliente, se centrifuga y se recoge del sobrenadante. Se centrifuga otra vez y el polisacárido en bruto se precipita con 80% de alcohol procedente del sobrenadante. Se filtra el precipitado, se lava con alcohol, se disuelve en agua destilada y la solución transparente se trata con ácido tricloacético al 15%. La solución se centrifuga para eliminar cualquier residuo y el sobrenadante transparente se vuelve a precipitar con acetona. Se filtra el precipitado, se lava varias veces con acetona y se redisuelve en agua destilada. La solución transparente se dializa (membrana MWCO 60.000 Da) en agua corriente durante 72 horas y se liofiliza en tubos en una speedvac. En el diagrama de flujos de la Figura 1 se muestra una forma de realización ilustrativa del procedimiento. Un científico experto en materia de purificación de productos naturales puede adaptar fácilmente los procedimientos descritos y sustituir una variedad de disolventes y de fases estacionarias por las descritas en la forma de realización preferida de la invencción. La fracción acuosa de extracto de *Tinospora cordifolia* pueden separarse drenando, filtrando, decantando o por cualquier otro procedimiento conocido en la materia para separar partes acuosas de soluciones o mezclas. Además de la cromatografía, pueden utilizarse también procedimientos tales como cristalización y fraccionamiento para purificar los compuestos deseados. Varios reactivos alternativos pueden utilizarse para el aislamiento del compuesto RR1. Por ejemplo, pueden utilizarse alcoholes monohídricos en lugar de etanol. Puede sustituirse la acetona por etanol en el procedimiento aislado. Véase por ejemplo, Brown, G. G., *Unit Operations*; John Wiley & Sons, 1956; McCabe, W. L. y J. C. Smith, *Unit Operations of Chemical Engineering*; McGraw-Hill, 1956; Perry, R. H. y D. Green, *Perry's Chemical Engineer's Handbook*, 7ª ed., McGraw-Hill, 1997, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Opcionalmente, una vez obtenido, el compuesto RR1 aislado puede utilizarse como material de partida para sintetizar un análogo de RR1. Opcionalmente, el procedimiento puede incluir además, la etapa de evaluar el

compuesto RR1 aislado para actividad inmunomoduladora utilizando ensayos *in vitro* o *in vivo*, tales como los descritos en la presente memoria.

No existe ninguna limitación específica en cuanto al procedimiento para la extracción de RR1 del vegetal. Por ejemplo, es aplicable la extracción con varios disolventes o la extracción con fluido supercrítico. No hay ninguna limitación específica en cuanto a los disolventes utilizados para la extracción de RR1 del vegetal. Ejemplos de disolventes adecuados incluyen medios acuosos tales como agua, solución acuosa de sales inorgánicas, y soluciones tampón, y disolventes orgánicos tales como alcohol, hexano, tolueno, éter de petróleo, benceno, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, 1,1,2-tricloroetano, sulfóxido de dimetilo y acetona, entre los que se prefiere el alcohol. El agua puede ser agua no destilada, agua destilada, agua desionizada o agua pura. Ejemplos de solución tampón que pueden utilizarse incluyen tampón fosfato y tampón citrato.

En la extracción de RR1 del material vegetal, es apropiado utilizar un disolvente que sea adecuado para usos terapéuticos, tal como agua, etanol que contiene agua o etanol anhidro. Ejemplos del alcohol que pueden utilizarse incluyen alcoholes monohídricos tales como etanol, metanol, propanol y butanol y alcoholes polihídricos tales como propilenglicol y glicerol, entre los que se prefiere alcohol monohídrico, y particularmente se prefiere etanol. Estos disolventes pueden utilizarse solos y en mezcla. Como disolvente mezclado, se prefieren los alcoholes que contienen agua. Los alcoholes monovalentes que contienen agua son más preferidos, y el etanol que contiene agua es particularmente preferido.

Para la extracción, el disolvente puede utilizarse, por ejemplo, en una cantidad de 0,1 a 10.000 partes en peso, preferentemente, de 1 a 100 partes en peso referidas a una parte en peso de la planta. No existe ninguna limitación específica en cuanto a la temperatura de extracción, pero la extracción se lleva a cabo preferentemente entre 0 y 100°C, más preferentemente entre 20 y 90°C. No existe ninguna limitación específica en cuanto al tiempo de la extracción, pero puede realizarse preferentemente, por ejemplo, durante un periodo de 1 minuto a 1 semana, más preferentemente 30 minutos a 1 día.

No existe ninguna limitación específica en cuanto al aparato utilizado para la extracción, y puede utilizarse un depósito diseñado para la extracción eficaz, un agitador, un condensador de reflujo, un extractor soxlet, un homogeneizador, un agitador, un generador supersónico, etc. El extracto líquido puede tratarse por medio de varias separación sólido-líquido tal como sedimentación, filtración, filtración trasparente, filtración centrífuga, sedimentación centrífuga, separación por compresión o filtro prensa.

Para preparar el polvo vegetal, puede utilizarse la totalidad o parte de la planta que contiene RR1 tales como hojas, ramas, tallos, corteza del tronco, raíces, semillas, células cultivadas u órganos, o callo. Resultan preferidas las partes aéreas (tallo y hojas). El material vegetal puede utilizarse como tal o después de ser tratado física, química o biológicamente. Ejemplos del procedimiento de tratamiento física o químico son secado, liofilizado, rotura y extracción. La materia tratada física o químicamente incluye materia seca, materia liofilizada, materia rota y materia extraída. La materia extraída incluye el residuo de la planta obtenido después de la extracción.

Para preparar el polvo vegetal, el material vegetal de *Tinospora cordifolia* preferentemente seco puede triturarse con un triturador a compresión, tal como un triturador de mandíbulas, un triturador giratorio o un triturador cónico; máquina de cizallamiento tal como un molino cortador o una trituradora de papel; trituradora de impacto, tal como una trituradora de martillo; molino de rodillo, tal como un triturador de rodillo; molino rotatorio tal como un disgregador o un molino de jaula; molino de tornillo, tal como un molinillo de café; laminadora, tal como un molino de muelas verticales; molino de percusión, tal como un molino de pisones; molino de cilindros, tal como el molino centrífugo de cilindros; molino de bolas, machacadora de cuba giratoria, o molino zego; molino rotativo de alta velocidad, tal como el molino de martillos con balanceo, molino giratorio, molino de jaula, molino de tipo turbo o molino centrífugo; molino de recipiente vibratorio, tal como el molino de bolas rodantes, el molino vibratorio de bolas, molino planetario de bolas o molino CF; molino de chorro, tal como el molino tipo alimentación por tubería, molino de tanque en agitación, molino de tipo anular, molino de tipo succión con aire, molino de impacto o de placa de impacto o molino de lecho fluidizado; triturador, tal como el triturador ultrasónico; mortero de piedra o mortero. El producto obtenido por el procedimiento mencionado anteriormente puede procesarse más física o químicamente para dar el vegetal en polvo.

El polvo vegetal puede ser grueso o fino. El tamaño de partícula medio del polvo vegetal está comprendido preferentemente entre 0,1 μm y 1 mm, más preferentemente entre 1 y 100 μm , y particularmente entre 2 y 50 μm en estado anhidro. El tamaño de partícula medio del polvo vegetal en estado anhidro puede determinarse, por ejemplo, mediante un analizador de distribución de partículas de difracción por láser. Alternativamente, cuando el polvo vegetal se hincha con una mezcla 1:1 de glicerol y agua, el tamaño de partícula medio del polvo es preferentemente de 1 μm a 10 mm, más preferentemente de 10 μm a 1 mm y particularmente de 20 a 500 μm . El tamaño de partícula medio del polvo vegetal en estado hinchado puede determinarse, por ejemplo por observación al microscopio.

Los procedimientos de secado son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de secado puede implicar el secado bajo calentamiento y presión reducida, secado bajo calentamiento y presión atmosférica o secado con un

secador por pulverización o con un secador de tambor, o liofilizado, entre los que se prefieren el secado bajo calentamiento y presión reducida o la liofilización.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Por ejemplo un cáncer específico puede caracterizarse por una masa de tumor sólido. La masa de tumor sólido si existe puede ser una masa de tumor primario. Una masa de tumor primario se refiere a un crecimiento de células cancerosas en un tejido resultante de la transformación de una célula normal de ese tejido. En la mayoría de los casos la masa del tumor primario se identifica por la presencia de un quiste, que puede encontrarse por procedimientos visuales o de palpación o por irregularidades en la forma, la textura o el peso del tejido. Sin embargo, algunos tumores primarios no son palpables y pueden detectarse solamente por técnicas medicas de detección por la imagen tales como rayos X (por ejemplo, mamografía) o por aspiraciones con aguja. La utilización de estas técnicas posteriores es más común en la detección precoz. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tumor" incluye los neoplasmas no sólidos, tal como la leucemia. El análisis molecular y fenotípico de las células cancerosas en un tejido confirmará normalmente si el cáncer es endógeno al tejido o si la lesión es debida a metástasis procedente de otro lugar.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo consiste en prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el desarrollo o la extensión de un trastorno de proliferación celular, tal como el cáncer u otros procesos patológicos (por ejemplo, enfermedades u otros trastornos). Preferentemente, el proceso patológico es el que puede ser tratado o controlado con inmunostimulación o inmunosupresión. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados comprenden de manera no limitativa alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retardo o ralentización de la evolución de la enfermedad, mejora o paliación de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total) ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" puede significar también prolongación de la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. En los que necesitan tratamiento se incluyen los que tienen ya el proceso o trastorno, así como a los propensos que tienen el proceso o trastorno o a los que debe prevenirse del proceso o trastorno.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cantidad (terapéuticamente) eficaz" se refiere a una cantidad de un agente, tal compuesto un compuesto RR1 de la invención u otro agente, eficaz para tratar un proceso patológico (por ejemplo, una enfermedad u otro trastorno), tal como un trastorno de proliferación celular, en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor, inhibir (es decir, ralentizar en alguna medida y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en alguna medida y preferentemente detener) la metástasis del tumor; inhibir, en alguna medida el crecimiento del tumor; y/o aliviar, en alguna medida, uno o más de los síntomas asociados al cáncer. En la medida en que el agente puede impedir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede medirse por ejemplo, evaluando el tiempo para la evolución de la enfermedad (TTP) y/o determinando la velocidad de respuesta (RR).

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente anticanceroso" se refiere a una sustancia o tratamiento que inhibe la función de las células cancerosas, inhibe su formación y/o produce su destrucción *in vivo* o *in vitro*. Los ejemplos comprenden de manera no limitativa agentes citotóxicos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, TAXOL), y agentes anti- señalización (por ejemplo, inhibidor LY de P13K).

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente citotóxico", se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o produce la destrucción de las células *in vivo* o *in vitro*. El termino pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, de origen vegetal o animal y anticuerpos, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, tales como, por ejemplo, los taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL, BRISTOL- MYERS SQUIBB Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia), clorambucilo, vincristina, vimblastina, antiestrógenos incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston) y anti-andrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina, etc.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "compuesto RR1" pretende referirse a RR1, como se muestra en la Figura 3, o a una sal farmacéuticamente aceptable de RR1. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aislado" con respecto a RR1 o a un compuesto de RR1 se refiere al compuesto sustancialmente exento del medio en el que se produce en forma natural, por ejemplo, de material de la planta *Tinospora cordifolia* o del extracto de la planta. Sin embargo, un compuesto RR1 aislado puede obtenerse también por reacciones de síntesis químicas apropiadas para los expertos en la materia (Greene, T. W y Wuts, P. G. M.

“Protective Groups in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 3ª ed., pág. 819, 1999; Honda, T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, 7:1623-1628; Honda, T. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8:2711-2714; Konoike, T. *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1997, 62:960-966; Honda, T. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2000, 43:4233-4246).

5 La terminología “que comprende”, “compuesto por” y “compuesto esencialmente de” se definen según su significado habitual. La terminología puede sustituirse una por otra mediante la presente solicitud con objeto de adjuntar el significado específico asociado a cada término.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares “un”, “una”, “el”, “la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto lo estipule claramente de otra manera. Así, por ejemplo, una referencia a un “compuesto RR1” incluye más de uno de dicho compuesto RR1. Una referencia a “una molécula inmunomoduladora” incluye más de una molécula inmunomoduladora o tipo de molécula inmunomoduladora. Una referencia a “un antígeno” se utiliza para referirse a más de un antígeno, o tipo de antígeno, y similar.

15 La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), de microbiología, de biología celular, de bioquímica e inmunología, están comprendidas en la experiencia en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como en, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª edición, (Sambrook *et al.*, 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Handbook of Experimental Immunology” (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); “Gene Transfer Vector for Mammalian Cells” (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987); “PCR: The Polymerase Chain Reaction” (Mullis *et al.*, eds., 1994) y “Current Protocols in Immunology” (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991).

25 Los ejemplos siguientes ilustran materiales, métodos y procedimientos para la puesta en práctica de la invención. Los ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

Materiales y métodos

30 Aislamiento y caracterización de RR1. Las investigaciones preliminares con extractos de polvo de *Tinospora cordifolia*, comercializados por GARRY and SUN, Inc., Reno, Nevada) pusieron de manifiesto que el principio inmunoestimulante está confinado en la fracción acuosa. El procedimiento adaptado para el aislamiento se ilustra en el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1. El compuesto RR1 final, mostrado en la Figura 3, se aisló con aproximadamente 0,1% del rendimiento del material anhidro total utilizado para la extracción en forma de un sólido hinchado que se disolvió en agua. El análisis inicial del producto final y los espectros de ¹³C RMN pusieron de manifiesto que es un polisacárido. Por consiguiente, el análisis de polisacáridos detallado tal como la composición de glucosilo, el enlace, el peso molecular y al configuración de las unidades de glucosa en el centro anomérico se realizó en el Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens). El análisis de la composición de glucosilo fue realizado por cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (GC/MS) de los derivados de per-*O*-trimetilsililo de los metilglucósidos de monosacárido obtenidos a partir de RR1 por metanólisis ácida según el procedimiento de York *et al.* (York, W. S. *et al.*, *Methods Enzymol.*, 1985, 118:3-40). Se utilizó inositol como patrón interno en este análisis. Se identificaron los derivados de monosacáridos por su tiempo de retención característico y se validaron más con su espectro de masas. Para realizar el análisis del enlace glucosilo, se permitió tres veces la muestra por el método de Ciakanu y Kereck (Ciucanu, I. y F. Kereck, *Carbohydr. Res.*, 1984, 131:209-217), se hidrolizó con ácido trifluoroacético 2 M, se redujo con NaBD₄ y se acetiló con anhídrido acético/piridina y los acetatos de alditol parcialmente metilados resultantes (PMAA) se analizaron por GC/MS. Los restos de azúcar se identificaron por sus tiempos de retención característicos y los datos del espectro de masas. Las configuraciones en el centro anomérico de las unidades de glucopiranosilo se obtuvieron en base a los espectro de RMN de protón a 500 MHz registrados en D₂O y por comparación con las señales de protones anoméricas de las muestras patrón. Se obtuvo la masa molecular por cromatografía de exclusión de tamaño utilizando la columna de sílice SUPELCO (1,0 x 30 cm), eluyendo con tampón de formiato amónico 50 mM, a un caudal de 0,5 ml/min y se detectó por el índice de refracción. Se utilizaron muestras de dextrano como patrones y se obtuvo la masa molecular comparando el tiempo de retención del pico eluido con los patrones.

55 Propiedades inmunoestimulantes. Para medir la propiedad inmunoestimulante de RR1, se analizó la activación de diferentes subconjuntos de linfocitos, las síntesis de citocinas tales como interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, p70 y p40, interferón (IFN)- α y γ , factor de necrosis tumoral (TNF)- α y β , proteína quimiotaxina de monocitos (MCP)-1, síntesis del óxido nítrico (NO) y la medida del estrés oxidativo producido en linfocitos humanos. Se aislaron linfocitos normales por el método histopaque del gradiente de densidad de la extracción de sangre fresca de voluntarios sanos y se utilizó para varios ensayos. Las estirpes celulares multirresistentes (CEM/VLB) se cultivaron en medio RPMI enriquecido con suero bovino fetal al 10% y antibióticos en una incubadora con CO₂ al 5% a 37°C.

65 Activación de linfocitos. Se trataron linfocitos normales (10⁶/ml) con 0 a 100 μ g de RR1 durante 24 horas en una incubadora con CO₂ mantenida a 37°C en medio RPMI. Se tiñeron a continuación las células con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo específicos durante 30 minutos a temperatura ambiente y se analizaron

en un citómetro de flujo Elite de Coulter por cuatro y cinco colores del protocolo de ensayo de inmunotipado de Alamo y Melnick (Alamo, A. L. y S. J. Melnick, *Cytometry*, 2000, 42:363-370) y se calcularon los porcentajes de activación del subconjunto de linfocitos tales como las células NK y los linfocitos T y B.

5 Citotoxicidad de los linfocitos tratados con RR1. Para evaluar la citotoxicidad aumentada de los linfocitos activados, se adoptó un ensayo funcional utilizando linfocitos activados por RR1 como células efectoras y células leucémicas humanas (CEM) como dianas (Liu, L. *et al.*, *Nat. Med.*, 2002, 8:185-189; Jerome, K. R. *et al.*, *Nat. Med.*, 2003, 9:4-5). En resumen, se trataron linfocitos normales (10^6 /ml) con diferentes concentraciones de RR1 en medio RPMI durante 24 horas en una incubadora con CO₂ a 37°C. Al día siguiente, se marcaron las células diana (CEM 1 x 10^6 /ml) con colorante PKH26 (SIGMA) marcador de membrana 4,6 µM en 1 ml de PBS a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se interrumpió el marcado añadiendo un volumen igual de suero bovino fetal (GIBCO, Life Sciences, MD) durante un minuto. Las células de tumor marcadas se incubaron a continuación con linfocitos tratados con RR1 en una relación efector a diana 1:1 durante 4 horas y los linfocitos sin tratar se utilizaron como referencia. El porcentaje de células destruidas por las células NK activadas se determinó fijando la mezcla con 1 ml de solución de paraformaldehído al 2% durante 30 minutos en hielo seguido de suspensión en Tween 20 al 0,5% en PBS. La mezcla celular se tiñó con 7,5 µl de anticuerpo FITC con anti-caspasa-3 activa (BD Biosciences, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se analizó en un citómetro de flujo Elite de Coulter.

20 Análisis cuantitativo de citocinas y síntesis de quimiocinas. Se analizaron cuantitativamente por el procedimiento ELISA citocinas tales como IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, IFN-γ y TNF-α, β y quimiocinas, MCP-1 utilizando kits de BD Biosciences, según los protocolos del fabricante. Se analizó IFN-α utilizando el kit ELISA de RESEARCH DIAGNOSTICS, Inc. (New Jersey). En resumen, se pipetea 50 µl de diluyente ELISA en pocillos recubiertos de anticuerpo de placa de 96 pocillos seguido de 100 µl de cada patrón y muestras de ensayo, agitadas durante 5 segundos para mezclar los contenidos en los pocillos, se cubrieron con una lámina selladora y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, los contenidos de los pocillos se aspiraron y lavaron cinco veces con solución de lavado. Después de la eliminación completa de la solución de lavado en el lavado final, se añadieron 100 µl de solución de detección, se cubrieron con lámina selladora y se incubaron durante 1 hora. Se lavaron los pocillos 7 veces con solución de lavado y se añadieron 100 µl del reactivo del sustrato de un paso y se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad. El desarrollo del color se interrumpió añadiendo 50 µl de solución de interrupción y se registró la absorbancia a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 570 nm en un lector de placas BIO-RAD Benchmark.

35 Ruta de activación del complemento. Se utilizaron kits EIA asociado al complemento humano C3a des Arg y C4a des Arg (ASSAY DESIGN Inc., Ann Arbor, MI) para medir los componentes del complemento escindido (C3a des Arg y C4a des Arg) según los protocolos del fabricante. En resumen, 1 ml de sangre normal, extraída de voluntarios sanos se incubó con 0 a 100 µg/ml de RR1 en una incubadora con CO₂ a 37°C durante 24 horas. Las muestras de sangre tratadas se centrifugaron a 2.000 x g a 4°C y se añadieron 225 µl de reactivo "A" de complemento a un volumen igual del sobrenadante de la muestra y se agitaron intensamente. A esta mezcla, se le añadieron 50 µl de HCl 10 N, se agitó de nuevo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm en una microcentrifugadora a temperatura ambiente durante 5 minutos, se transfirieron 180 µl del sobrenadante a un tubo de 15 ml, se añadieron 20 µl de NaOH 9 N y se agitaron intensamente. A esta mezcla se le añadieron 600 µl del reactivo "B" de complemento seguido de 10,7 ml de tampón de ensayo, se agitó y se utilizaron para el análisis. Se pipeteó la muestra analítica (100 µl) en los pocillos en una microplaca de 96 pocillos seguido de 50 µl de conjugado azul y 50 µl de anticuerpo amarillo. Se agitaron las placas en un agitador de plataforma a 500 rpm durante 2 horas. Se aspiraron los pocillos para eliminar los materiales no unidos, se lavaron tres veces con 200 µl de solución de lavado y se añadieron 200 µl de solución de sustrato p-Npp. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora sin agitación, se añadieron 50 µl de solución de interrupción y se midió la absorbancia a 405 nm con una longitud de onda de referencia de 570 nm en un lector de placas Bench Top de BIO-RAD.

50 Inducción de óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) y síntesis de óxido nítrico (NO). La liberación mayor y de larga duración de NO es producida por la enzima NOSi durante la estimulación con arginina en estimulación. La inducción por NOSi por estimulación de RR1 se analizó por el kit de inmunoanálisis QUANTIKINE iNOS (R & D Systems, Minneapolis, MN) que utiliza una técnica de inmunoanálisis con enzima en sándwich. Se analizó NOSi procedente del extracto citoplásmico de las células tratadas con diferentes concentraciones de RR1. Se pipetearon las muestras y patrones en los pocillos de una placa de 96 pocillos y cualquier NOSi presente se unió al anticuerpo inmovilizado. Después de quitar lavando, las sustancias no unidas, se añadió un anticuerpo monoclonal unido a la enzima específico para NOSi. Después de quitar lavando el reactivo enzimático del anticuerpo no unido, se añadió solución del sustrato para desarrollo de color, se interrumpió el desarrollo del color con solución de interrupción y se leyó la absorbancia a 450 nm con una longitud de referencia de 570 nm en el lector de placas Bio-Rad.

60 Se analizó cuantitativamente el NO con el kit de cuantificación de óxido nítrico (ACTIVE MOTIF, Carlsbad, CA) como por el protocolo del fabricante. En resumen, se incubaron linfocitos (10^6 /ml) con concentraciones variables de RR1 (0-100 µg/ml) durante 24 horas en un medio sin nitrato (medio esencial mínimo de DULBECO) a 37°C. el sobrenadante del cultivo celular (70 µl) se pipeteó en los pocillos de una placa de 96 pocillos junto con 20 µl de cofactor reconstituido y con 10 µl de solución de la enzima nitrato reductasa. Se agitó la placa a 150 rpm en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los reactivos A y B de Griess (50 µl de cada uno) se

añadieron en cada pocillo, se dejó desarrollar el color durante 20 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm con una longitud de referencia de 620 nm en el lector de placas BIO-RAD.

Estrés oxidativo (concentraciones de GSH/GSSG). La medición de las concentraciones de (GSH) reducida así como de (GSSG) oxidada de glutatión y su relación son indicadores útiles del estrés oxidativo. Las concentraciones de GSH y GSSG se analizaron por un método colorimétrico utilizando el kit GSH/GSSG-412 de Biotech (Oxis Research, Portland, OR) según el protocolo del fabricante. En resumen, muestras de sangre normal de donantes sanos se incubaron con diferentes concentraciones de RR1 en una incubadora con CO₂ al 5% a 37°C. Para GSSG, se congelaron a -70°C durante 4 horas 100 µl de cada una de las muestras tratadas, se descongelaron y se añadieron 290 µl de ácido metafosfórico al 5% (MPA). Se agitaron las muestras durante 15 a 20 segundos y se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos. Se añadió extracto de MPA (50 µl) a 700 µl de tampón GSSG que se utilizó para el análisis colorimétrico. Para la medición de GSH 50 µl de sangre completa se congelaron a -70°C, se descongelaron y se añadieron 350 µl de MPA al 5%, se agitaron durante 15 a 20 segundos y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos. Se añadió extracto de MPA (50 µl) a 3 ml del tampón de análisis y se utilizaron para análisis posterior. La mezcla de tampón MPA (200 µl) de cada patrón y la muestra se transfirió a una cubeta de espectrofotómetro, se añadieron 200 µl de cromógeno seguido de 200 µl de enzima en este orden y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de esto, se añadieron 200 µl de NADPH en la cubeta y se registraron los cambios en la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro BECKMAN. Se representaron las velocidades de reacción utilizando los valores de la absorbancia y se determinaron las concentraciones de GSH y de GSSG.

Análisis estadístico. Se utilizó ANOVA de un solo factor para el análisis de los datos.

Estirpes celulares. Se adquirieron estirpes celulares de monocitos de ratón (RAW 264.7) y de riñón embrionario humano (HEK293) en American Type Culture Collection, Manassas, VA para la investigación. Las células HEK293 transfectadas con los genes TRL2, TRL2/6 y TRL4/CD14/MD2 se adquirieron en INVIVOGEN Corporation, San Diego, CA. Se cultivaron las células en medio DMEM enriquecido con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina (2 mM) y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) en matraces de cultivo tisular en una incubadora con CO₂ al 5%. Se aisló RR1 del polvo de *Tinospora cordifolia* adquirido en GARRY and SUNS (Reno, Nevada, USA) según el procedimiento de extracción descrito en Nair, P. K. *et al.* (Nair, P. K. *et al.*, *Int. Immunopharmacol.*, 2004, 4:1645-1659). El contenido en endotoxina de la muestra se analizó mediante el Lymulus Amoebocyte Lysate Assay (Cambrex, MA), que presentaba concentraciones insignificantes (0,0008 ng/ml). Se tomaron las precauciones necesarias para evitar la contaminación por endotoxinas en toda la investigación, utilizando tampones, reactivos y agua esterilizada exentos de endotoxinas.

Reactivos. Biopartículas de Zymosan A y de Zymosan A marcadas con FITC se adquirieron en Molecular Probes Inc., Eugene, OR. Laminarina y el éster fenílico del ácido cafeico (CAPE) eran de SIGMA Chemical Co; St. Louis, MO. El anticuerpo monoclonal CD11b anti-ratón (mAb) se adquirió en BD, BIOSCIENCES, San José, CA. Los anticuerpos TLR2 marcado con FITC y TLR4 marcado con PE se adquirieron en eBioscience, San Diego, CA.

Unión no opsonizada de RR1. Para determinar el efecto inhibitorio de RR1 en la unión no opsonizada de biopartículas de Zymosan A, se incubaron monocitos de ratón/células de macrófago (0,5 x 10⁶) con 0, 100, 500 y 1000 µg/ml de RR1 a 4°C para evitar la liberación local de opsoninas incluyendo el complemento (Ezekowit, R. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1985, 76:2368-2376; Brown, G. D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2000, 196:407-412). Después de 1 hora de incubación en hielo, se lavaron las células tres veces con medio de cultivo preferentemente enfriado, se añadieron partículas de zymosan A conjugadas con FITC a una proporción de 25 partículas/célula y se mantuvieron en hielo durante otra hora. Se lavaron las células con PBS dos veces y se incubaron en DMEM a 37°C durante 30 minutos en una incubadora con CO. Las partículas de zymosan no unidas se eliminaron mediante lavado intensivo con medio y la fluorescencia intracelular de zymosan-FITC se analizó en un citómetro de flujo de Elite de Coulter.

Unión opsonizada y fagocitosis. Para determinar el efecto de RR1 y laminarina sobre la unión opsonizada y la fagocitosis de las partículas de zymosan A, se trataron células RAW 264.7 con RR1 o laminarina (0 y 500 µg/ml) en DMEM a 37°C durante 1 hora). Esto garantizará la liberación de opsoninas y facilitará la unión opsonina. Se lavaron las células con PBS dos veces y se incubaron con biopartículas de zymosan A-FITC en una proporción de 25 partículas/célula a 37°C durante 1 hora. Las células se pusieron en suspensión en PBS después de eliminar las partículas de zymosan no unidas mediante un extenso lavado con el medio, y la fluorescencia intracelular se analizó en un citómetro de flujo de Elite de Coulter. La intensidad de fluorescencia se expresó como porcentaje de la referencia.

Síntesis de TNF-α inducido por RR1. Células RAW 264.7 (0,5 x 10⁶/ml) se colocaron en placas de 6 pocillos con medio DMEM que contenía FBS al 0,5% (inanición). Una vez se acoplaron las células, se sustituyó el medio, se añadió RR1 en dosis de 0, 100, 500 y 1000 µg/ml y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se analizó en el medio TNF-α segregado utilizando el kit ELISA (kit BD BIOSCIENCES, San José, CA) basándose en el protocolo del fabricante.

Para determinar el efecto del inhibidor CAPE de NF- κ B en la síntesis de TNF- α , se trataron las células RAW 264.7 con 10 μ g/ml de CAPE durante 1 hora a 37°C seguido de tratamiento con RR1 (0-1000 μ g/ml) durante la noche en la incubadora. El TNF- α , segregado en el medio se analizó utilizando ELISA (BD BIOSCIENCES, San José, CA).

5 Actividad de NF- κ B. Se incubaron células RAW 264.7 con 0, 100, 500 y 1.000 μ g/ml de RR1 durante 8 horas y se extrajeron las proteínas nucleares utilizando el kit de actividad de NF- κ B de Active Motif, CA, siguiendo las instrucciones de ELISA del fabricante. Para observar la activación adicional de NF- κ B se llevó a cabo el ensayo de desplazamiento por movilidad electroforética (EMSA) (Ghosh, S. y Karin, M., *Cell*, 2002, 109:S81-96; Young, S. H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:20781-20787; Lebron, F. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:25001-25008) con la proteína nuclear. Una sonda bicatenaria que se une a NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGC-3', SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Santa Cruz, CA) se radiomarcó con 32 P-ATP, y se llevó a cabo EMSA con 5 μ g de extracto nuclear. Se incubaron las mezclas de reacción EMSA durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se separaron los complejos ADN-proteína en geles de poliacrilamida al 6% y se observaron por auto-radiografía. Para determinar la activación en función del tiempo de NF- κ B, se prepararon extractos nucleares de células tratadas con RR1 (100 μ g/ml) a diferentes periodos de tiempo (0, 4, 8, 14, 20 horas tras la estimulación). Se analizaron en los extractos nucleares el contenido en proteína y la actividad de NF- κ B se analizó utilizando el kit ELISA de ACTIVE MOTIF, Carlsbad, CA.

20 Degradación de I- κ B α . La degradación de I- κ B α es un requisito previo para la activación de NF- κ B. Para determinar el efecto de RR1 sobre las concentraciones celulares de I- κ B α y su degradación, se realizó análisis de inmunotransferencia con los lisados citosólicos de los macrófagos RAW 264.7 tratados con RR1 en diferentes periodos de tiempo (0,15 minutos, 30 minutos, 1 hora). Se separaron los lisados por SDS-PAGE en geles al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato TransBlot (BIO-RAD, Hercules, CA). Se hibridaron las membranas con anticuerpos monoclonales específicos para I- κ B α (1:1000) mediante el protocolo de hibridación de inmunotransferencia Western (Lebron, F. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:25001-25008) utilizando anticuerpo anti-I- κ B α de ratón (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, Inc., Beverly, MA) utilizando el sistema de detección de color (BIO-RAD, Hercules, CA).

30 Efecto de bloqueo de CR3 con CD11b mAb en enlace osonizado. Para examinar si los receptores CR3 específicos para glucano están implicados en el reconocimiento/unión osonizado de RR1 en macrófagos, se utilizaron anticuerpos monoclonales (mAb) específicos para CR3 (CD11b anti-ratón en rata de BD BIOSCIENCES, San José, CA) para bloquear el CR3. Se trataron células RAW 264.7 ($0,5 \times 10^6$) con 5 μ g/ml de anticuerpo monoclonal durante 1 hora a 37°C en la incubadora de CO₂ antes de incubar con RR1 (0 a 100 μ g/ml) durante 3 horas. Se analizó TNF- α liberado por los macrófagos en el medio con el kit ELISA (BD Biosciences, San José, CA) (Brown, G. D. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2002, 196:407-412; Brown, G. D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2003, 197:1119-1124).

40 Señalización de TLR. Para determinar la implicación de la señalización de TLR, se utilizaron células HEK293 madre, así como HEK293 transfectadas con genes humanos para TLR2, TLR6, TLR2/6 o TLR4/CD14/MD2 (clonados en el plásmido pDUO). Estas células ($0,5 \times 10^6$ /ml) se incubaron con 0 a 100 μ g/ml de RR1 durante 24 horas. Como estas células producen muy baja concentración de TNF- α y concentraciones detectables de IL-8 en la activación, la IL-8 segregada en el medio se analizó utilizando el procedimiento ELISA. Ocasionalmente, la síntesis de IL-8 está también bajo el control del factor de transcripción NF- κ B.

45 Concentraciones de TLR ARNm y de proteínas. Se analizaron las concentraciones de TLR2, 4 y 6 ARNm por RT-PCR utilizando los ARN completos extraídos de las células tratadas con RR1. Se extrajo ARN completo procedente de células RAW 264.7 tratadas con RR1 y sin tratar y 0,5 μ g/ml de ARN se transcribieron a la inversa utilizando los cebadores para RCP específicos para TLR2, 4 y 6 de ratón (R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN). Se amplió también como referencia el gen para GAPDH de ratón como referencia. Los productos de la RCP se separaron en gel de agarosa.

50 **Ejemplo 1 - Caracterización de RR-1**

Los resultados de la composición de glucosilo y los análisis de enlace corroboraron los descubrimientos iniciales y los datos del espectro RMN de 13 C en la composición de carbohidratos de RR1. El análisis de la composición de glucosilo presentó glucosa como único componente en RR1 mientras que el análisis del enlace ponía de manifiesto tres tipos de restos de glucopiranosilo correspondientes a tres tipos de enlaces: restos de glucopiranosilo unido en 4 (80%), resto de glucopiranosilo unido en 4,6 (12%) y resto de glucopiranosilo terminal (8%). Los espectros RMN de 13 C (Figura 2A) presentaban señales bien resueltas para los átomos de carbono en los restos C1 de glucopiranosilo (δ 99,97 ppm), C2 (δ 73,68 ppm), C3 (δ 71,89 ppm), C4 (δ 77,09 ppm), C5 (δ 69,67 ppm) y C6 (δ 60,83 ppm). Los desplazamientos campo abajo en las señales C1 y C4 confirman el enlace (1 \rightarrow 4) mientras que la señal en δ 71,53 ppm puede ser debida al C6 del enlace (1 \rightarrow 6). Las señales a δ 5,44 ppm (no bien resueltas) y a δ 5,00 ppm en los espectros RMN de protones a 500 MHz (Figura 2B) son debidos al protón en α asociado con el carbono anomérico de las unidades de glucopiranosilo. Por otra parte, la señal muy débil en δ 4,66 ppm puede ser debida a la del anómero en β . Sin embargo, la relación de las señales de α -D-glucosa a β -D-glucosa es aproximadamente 99,9:1 y por consiguiente casi todas las unidades de glucosa parecen estar en la configuración α . Por consiguiente RR1 es un α -D-glucano con unidades de glucopiranosilo unidas por (1 \rightarrow 4) en la cadena principal con ramificaciones de la

unidad de glucopiranosilo unidas por (1→6) y un grado 0,15 de ramificación (Figura 3). En la cromatografía por exclusión de tamaño, RR1 eluyó como un solo pico a los 12,32 minutos con una gran proximidad al pico para la muestra de dextrano de 511 kDa (tiempo de retención: 12,72 minutos). Por consiguiente, se asignó a RR1 un peso molecular > 550 kDa.

5

Ejemplo 2- Efecto de proliferación de células no citotóxicas

Los resultados del ensayo del MTT presentados en las Figuras 4A y 4B, demuestran que RR1 presenta efecto citotóxico indirecto o de proliferación celular ya sea en linfocitos normales o en estirpes de células tumorales (CEM y CEM/VLB) a concentraciones hasta de 1000 µg/ml.

10

Ejemplo 3 - Activación de linfocitos

Los linfocitos son células efectoras clave del sistema inmunitario de los mamíferos y estos estudios demuestran que las diferentes subpoblaciones de linfocitos están activadas por RR1 en varios niveles. El 39% de los linfocitos B, el 102% de los linfocitos T y el 331% de las células NK están activados con 100 µg/ml de RR1 (Figura 5). La activación de las células NK superior a 3 veces es de gran significación, ya que las células NK son los principales efectores del sistema inmunitario propio que se ponen en contacto con antígenos/mitógenos antes de la producción de anticuerpos y el reconocimiento por el sistema inmunitario adaptable. El aumento de actividad de las células NK por RR1 es muy evidente a partir de los resultados del ensayo citotóxico funcional mostrado en la Figura 6. Los linfocitos normales tratados con RR1 pueden destruir un porcentaje mayor de células tumorales en comparación con las células no tratadas y fue evidente un aumento de la citotoxicidad de los linfocitos activados en función de la dosis.

15

20

Ejemplo 4 - Ruta de activación del complemento

25

Se percibió un aumento paso a paso en los niveles de C3a des Arg de la ruta alternativa al aumentar las concentraciones de RR1, como se muestra en la Figura 7. Esta observación es análoga a la de varios artículos sobre activación del complemento por otros polisacáridos. C3a y C4a son productos bioactivos de escisión liberados de los componentes C3 y C4 del plasma durante la cascada de activación del complemento en la ruta alternativa y clásica (Ember, J. A. *et al.*, The human complement system in Health and Disease. Ed. Volnakis, J. E y M. M. Frank, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1998, págs. 241-248), que se convierten rápidamente en las formas menos activas C3a-des Arg y C4a-des Arg y están implicadas en la mediación de las respuestas inmunitarias celulares. La ruta alternativa se autoamplía y es importante en la eliminación y en el reconocimiento de patógenos en ausencia de anticuerpos (Stahl, G. M. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2003, 162:449-455). Se informa que los β-glucanos activan la ruta alternativa y la actividad antitumoral mediada por el hospedador presentada por estos polímeros se correlacionó con la activación del sistema del complemento (Hamuro, J. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 1978, 93:526-617). Los lipopolisacáridos activan el sistema del complemento por la vía alternativa así como las rutas clásicas; la parte lipídica activa la ruta clásica mientras que el resto de polisacárido activa la ruta alternativa (Morrison, D. C. y R. J. Ulevitch, *Am. J. Pathol.*, 1978, 93:526-617).

30

35

40

Ejemplo 5 - Síntesis de citocinas

Como se muestra en las Figuras 8A-8H, RR1 produjo la síntesis de IL-1β (1080 pg), IL-6 (21833 pg), IL-12 p40 (918,23 pg), IL-12 p70 (50,19 pg), IL-18 (27,47 pg), IFN-γ (90,16 pg), MCP-1 (2307 pg) y TNF-α (2225 pg), que no indujo la producción de IL-2, IL-4, IL-10, TNF-β e IFN-α. En general, se observó un aumento en función de la dosis en la producción de citocinas con RR1 excepto para IL-12 (p40), en que el máximo se registró a 10 µg/ml y un aumento adicional en el RR1 presentaba una tendencia decreciente, como se muestra en la Figura 8C. La producción de MCP-1 fue muy significativa hasta 10 µg/ml de RR1 y la concentración mayor de RR1 produjo solamente un ligero aumento, como se muestra en la Figura 8H. En general, las citocinas proinflamatorias, IL-1β, IL-6 y TNF-α y la citocina reguladora IL-12 p(40) presentaban mayores niveles de producción en comparación con otras citocinas.

45

50

El sistema inmunitario de los mamíferos reconoce antígenos, patógenos y no automoléculas, que desencadenan mecanismos de defensa mediante la activación de células inmunocompetentes, la producción de mensajeros químicos (las citocinas y las quimiocinas), la activación de la ruta de la cascada del complemento y la síntesis del óxido nítrico (NO). Las citocinas son un grupo de proteínas no anticuerpo reguladoras de bajo peso molecular segregadas por las células inmunocompetentes en respuesta a la estimulación. Se unen a receptores específicos de células diana que desencadenan rutas de transducción de señal que conducen por último a la expresión génica de las células diana. Las citocinas regulan la intensidad y duración de las respuestas inmunitarias estimulando o inhibiendo la activación, proliferación y/o diferenciación de varias células y regulando la secreción de anticuerpos o de otras citocinas. La pleiotropía, redundancia, sinergia y antagonismo presentado por las citocinas les permite coordinar y regular actividades celulares. Las respuestas inflamatorias son cruciales en el control y eliminación de agentes infecciosos así como en favorecer la cicatrización de heridas para la restauración de la integridad del tejido.

55

60

IL-1β y TNF-α favorecen la producción entre sí, así como la de IL-6 y actúan sinérgicamente y regulan varias acciones biológicas, siendo además IL-1 autoinductiva (Horai, R. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2000, 191:313-320). La

65

producción de IL-1 β y TNF- α en los linfocitos tratados con RR1 es coherente con la de las estirpes celulares de monocitos humanos estimulados por LPS (THP-1) (Baqui, A. A. *et al.*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1998, 5:341-347). IL-12 (p70) es la isoforma bioactiva de IL-12 y es un factor importante en la diferenciación de los linfocitos T naturales en los linfocitos T colaboradores efectores de tipo I (Th), linfocitos CD4+ que segregan IFN- γ (Trinchieri, G. *et al.*, *Prog. Growth Factor Res.*, 1992, 4:355-368). Además, se informa que tienen efectos estimulantes sobre las células NK (Wajchman, H. J. *et al.*, *Cancer Res.*, 2004, 64: 1171-1180). Recientemente, IL-12 (p70) ha surgido como una citocina antitumoral eficaz y mínimamente tóxica debido a su capacidad para producir la respuesta de Th (Hiscox, S. y Jiang, W. G. *In Vivo*, 1997, 11:125-132). Más allá del sistema inmunitario, esta citocina se informa también de que tiene capacidad para inhibir la apoptosis inducida por UV y la iniciación de la reparación del ADN en queratinocitos dañados por UV que en última instancia protegen las células del cáncer (Schwarz, A. *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2002, 4:26-31). IL-12 (p40), la isoforma homodimérica, es un antagonista receptor de la isoforma heterodimérica bioactiva p70 en ratones (Gillesen, S. *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25:200-206). En las células tratadas con RR1, IL-12 (p40), la citocina reguladora, se produce en exceso de muchas veces para la forma bioactiva que puede ser un mecanismo natural para controlar la sobreproducción de la forma p70 bioactiva. IL-18 es otro potente inductor de IFN- γ y, aparentemente, las células NK (Micallef, M. J. *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1996, 26:1647-1651). La inducción por RR1 de la producción de IL-18 puede ser una respuesta precoz en el desarrollo de la respuesta de Th actuando en consonancia con IL-12 e IFN- γ .

MCP-1 es una potente quimiotaxina para los monocitos y los linfocitos T CD4 y CD8 activados que se informa que producen la liberación de gránulos de las células NK y CD8+, activan la función de NK en las células CD56+ y actúan como un potente factor de liberación para la histamina proveniente de los basófilos (Rollins, B. J., *Blood*, 1997, 90:909-928) se informa que presentan efectos antitumorales aumentando la inmunidad específica del tumor, supuestamente en función de los linfocitos T (Laning, J. *et al.*, *J. Immunol.*, 1994, 153:4625-4635). Las observaciones realizadas indican que RR1 favorece significativamente la producción de esta citocina a 10 μ g/ml. La síntesis significativa de TNF- α por estimulación de RR1 puede desempeñar una función crítica en la resistencia del hospedador a las infecciones y al desarrollo del cáncer. TNF- α y sus receptores son esenciales para la protección contra la tuberculosis y para síntesis de NO en macrófagos inicialmente en la infección (Lipton, S. A. *Neurochem. Int.*, 1996, 29:111-114). La producción de IFN- γ inducida por RR1 puede funcionar en parte para favorecer la actividad de los componentes del sistema inmunitario mediado por células tal como los linfocitos T citotóxicos (LTC), los macrófagos y las células NK además de su función inhibidora en respuesta a Th₂. Estimula la actividad bacteriana de las células fagocíticas y, por consiguiente, refuerza la respuesta inmunitaria innata (Watford, W. T. *et al.*, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003, 14:361-368). Además, puede modular la síntesis de MCP-1 en macrófagos como en LPS (Munder, M. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1998, 187:2103-2108).

Los linfocitos T CD4+ contribuyen a la regulación del sistema inmunitario específico (adaptable) para el antígeno mediante el reconocimiento de antígenos y la consiguiente producción de citocinas. El distinto modelo de producción de citocinas por los linfocitos CD4+ forma una dicotomía, tipo 1 (Th₁) caracterizada por la producción de IFN- γ y estimula la eliminación de patógenos intracelulares y tipo 2 (Th₂) caracterizada por la producción de IL-4, requiere IgE y eosinófilos adecuados para la eliminación de patógenos extracelulares. Las citocinas actúan directamente sobre los linfocitos T durante la activación primaria y parecen ser el mediador más directo entre los factores que influyen en la diferenciación terminal. La presencia de IL-12 conduce a la respuesta de Th₁ mientras que IL-4 conduce al desarrollo de Th₂ y las dos rutas expresan mutuamente también el efecto supresor. IL-1 se identifica como inductor de IL-12 (Rollins, B. J., *Blood*, 1997, 90:909-928) mientras que IL-18 es una respuesta precoz en el desarrollo de los linfocitos Th₁ por inducción de IFN- γ . El perfil de las citocinas, IL-12, IL-18, IFN- γ junto con IL-1 por estimulación de RR1 y la síntesis en función de la dosis de estas citocinas demuestra evidentemente que la ruta de Th₁ es esencial para la inmunidad celular y la destrucción de los patógenos intracelulares y de las células malignas. Esta observación está en conformidad con el desarrollo de linfocitos T dependiente de IFN- γ , inducido por IL-12 para linfocitos Th₁ y las células efectoras citotóxicas CD8+ (Russo, D. M. *et al.*, *Expt. Parasitol.*, 1999, 93:161-170; Yoshimoto, T. *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 161:3400-3407; Russo, D. M. *et al.*, *Infect. Immun.*, 2000, 68:6826-6832). La señalización simultánea así como la acción sinérgica por IL-12 e IL-18 induce la producción prolongada de IFN- γ y la expresión continua fuerte de IL-18R ARNm en los linfocitos T (Yoshimoto, T. *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 161:3400-3407). Los episodios inflamatorios precoces tales como la adherencia de los linfocitos T a zonas inflamatorias fueron descritos también para IL-12 e IL-18 (Ariel, A. *et al.*, *J. Leuk. Biol.*, 2002, 72:192-198). El nivel superior de la síntesis de la isoforma reguladora de IL-12 (p40) puede ser un mecanismo natural para contener la excesiva producción de la respuesta de Th₁.

Se informa además de que las concentraciones de NO desempeñan una función importante en la modulación de la diferenciación y polarización de los linfocitos Th Yamasaki *et al.* (Yamasaki, A. *et al.*, *Yonago Acta Medica*, 1998, 44:7-15) y Taylor-Robinson *et al.* (Taylor-Robinson, A. W. *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24:980-984) dieron cuenta de una función inhibidora de NO en las citocinas Th₁ mientras que Bauer *et al.* (Bauer, H. *et al.*, *Immunol.*, 1997, 90:205-211) dieron cuenta de lo mismo para Th₁ así como para las citocinas Th₂ por NO procedente de linfocitos T activados. En el presente estudio, el tratamiento con RR1 produjo solamente un aumento \leq 21% en NO (Figura 9). La enzima NOSi produjo un alto rendimiento de NO procedente de macrófagos durante la estimulación. Se puso de manifiesto que RR1 no estimulaba la inducción de NOSi de manera significativa. La ausencia de inducción de NOSi por RR1 apoya la conclusión de que existe un aumento insignificante en la producción de NO. Las presentes investigaciones con monocitos aislados de células mononucleares de la sangre periférica mediante el kit II para

aislamiento de monocitos (Miltenyi, Biotec, Alemania) o con la estirpe celular THP-1 de monocitos humanos (ATCC) no produjo tampoco cantidades superiores de NO con el tratamiento con RR1. El bajo nivel de síntesis de NO por RR1 no parecía ejercer ninguna inhibición de la ruta Th1. IFN- α , IFN- γ y TNF- α son conocidos reguladores por incremento de la síntesis de NO (Shin, J. Y. *et al.*, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2002, 24:469-482; Hirazumi, A. y Furusawa, E., *Phytother. Res.*, 1999, 13:380-387). Dado que la estimulación de RR1 produjo la síntesis de IFN- γ y TNF- α , y muy poco IFN- α , es razonable suponer que el cebado de IFN- α pueda ser una etapa necesaria para activar la producción de altas concentraciones de NO por polisacáridos (Ring, A. *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 2002, 186:1518-1521).

La estimulación de RR1 no produce ningún estrés oxidativo en linfocitos, indicado por las concentraciones de GSH, GSSG y su relación (Tabla 1), correspondiente a los datos de síntesis de NO. No se observó ninguna elevación significativa en la cantidad de peróxido de hidrógeno (datos no representados). La baja concentración de la síntesis de NO sugiere una función mediadora inmunitaria para NO. La naturaleza no citotóxica de RR1, aún a concentraciones bastante elevadas (1000 $\mu\text{g/ml}$) puede atribuirse al bajo nivel de producción de NO junto con la capacidad de este polisacárido para no provocar estrés oxidativo en las células.

Tabla 1 –GSH, GSSG y relación GSH/GSSG de linfocitos normales tratados con RR1

RR1 ($\mu\text{g/ml}$)	GSH (μM)	GSSG (μM)	GSH/GSSG
0	367,09 \pm 4,4	22,60 \pm 0,44	14,56 \pm 0,69
5	365,08 \pm 3,81	22,77 \pm 0,58	14,05 \pm 0,41
10	366,10 \pm 0,97	22,67 \pm 0,41	14,34 \pm 0,35
50	364,43 \pm 0,10	22,75 \pm 0,55	14,25 \pm 0,40

La estimulación inmunitaria por inducción de citocinas y la síntesis de NO, la activación de macrófagos, la inducción de actividades fagocíticas, citotóxicas y antitumorales se han descrito recientemente en polisacáridos o polisacáridos que contienen fracciones de *Phanax ginseng*, *Morinda citrifolia* y *Echinacea* (Shin, J. Y. *et al.*, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2002, 24:469-482; Hirazumi, A. y Furusawa, E. *Phytother. Res.*, 1999, 13:380-387; Goel, V. *et al.*, *J. Nutri. Biochem.*, 2002, 13:487-492). RR1 es un α -D-glucano con estructura distinta de la amilopectina ya que este último no puede provocar estimulación inmunitaria. La similitud de su estructura con el “modelo molecular conservado” de los componentes de la pared celular de los β -glucanos fúngicos puede ser la razón de la activación del sistema inmunitario, aunque las diferencias (es decir, la configuración α y los enlaces (1 \rightarrow 4)) puede justificar el bajo nivel de producción de NO y la consiguiente falta de citotoxicidad. Este α -glucano neutro y soluble en agua tiene una masa molecular y una secuencia con ramificación comprendida dentro de la gama de los polisacáridos que presentan propiedades inmunoestimulantes significativas (Bohn, J. A. y N. BeMiller, *Carbohydr. Polymers*, 1995, 28:3-14; Brown, G. D. y S. Gordon, *Immunity*, 2003, 19:311-315; Kulicke, W. M. *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 1997, 295:135-143; Bao, X. *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 2001, 336:127-140). La solubilidad en agua puede superar las formaciones de granuloma presentadas por los β -glucanos en partículas mientras que la elevada masa molecular, que está en el intervalo más potente, permite que se mantenga por los órganos del hospedador durante un periodo mayor sin degradación (Williams, D. L. *et al.*, *Clin. Immunotherapy*, 1996, 5:392-396; Nono, I. *et al.*, *Pharmacobiodyn.*, 1991, 14:9-19; Suda, M. *et al.*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996, 15:93-100).

La naturaleza no citotóxica, la significativa activación de los linfocitos, especialmente las células NK, y la ruta alternativa de activación del complemento, demuestran claramente la estimulación del sistema inmunitario innato, mientras que las propiedades de la citocina procedentes de la activación ponen de manifiesto de manera inequívoca la estimulación de la inmunidad (adaptativa) mediada por las células específicas para el antígeno (ruta de Th₁) con un mecanismo de autorregulación de su exceso de producción. La ausencia de síntesis de IL-4 (citocina supresora de Th₁) y de IL-10 (inhibidor de IL-12) en la estimulación con RR1 está completamente de acuerdo con la ruta de Th₁ de la diferenciación de linfocitos T. La producción de IFN- γ por la señalización simultánea de IL-12 e IL-18 puede servir como potente agente contra el ántrax, desprovisto de efectos secundarios, si existen, también del tratamiento con IFN exógeno. Un sistema inmunitario innato estimulado puede combatir la entrada de algunos patógenos en el hospedador y tiene capacidad para evitar infecciones primarias procedentes de la enfermedad que se produce realmente (Parham, P. *Nature*, 2003, 423:20). Las únicas propiedades de estimulación inmunitaria de RR1, sin ejercer estrés oxidativo y cualquier efecto citotóxico directo, descrito mucho más de este modo, puede hacerlo un potente agente de biodefensa contra numerosos patógenos y cánceres humanos.

Ejemplo 6 - Efecto de RR1 sobre la unión no opsónica de biopartículas de zymosan A FITC

La Figura 10 presenta el efecto inhibitorio de RR1 sobre el reconocimiento no opsónico y la unión de biopartículas de zymosan A marcadas con FITC a macrófagos. Una inhibición en función de la dosis en la intensidad de la

fluorescencia se observa con aumento en la concentración de RR1 con aproximadamente 65% de inhibición a la concentración de 1000 µg/ml de RR1. La incubación de las células a 4°C durante la experimentación impedirá la liberación de opsonina, facilitando de este modo la unión no opsonica.

5 Ejemplo 7 – Efecto de RR1 sobre la unión opsonizada y la fagocitosis

El efecto inhibitorio de RR1 y laminarina sobre la fagocitosis de las biopartículas de zymosan A a 37°C se presenta en la Figura 11. Laminarina, un β-glucano con estructura definida, presenta un efecto inhibitorio absoluto sobre la fagocitosis, en la que RR1 no pudo mostrar ningún efecto significativo. La fagocitosis implica la unión e interiorización de las partículas por los macrófagos.

15 Ejemplo 8 – Implicación de CR3 en el efecto de RR1

CR3 es un receptor específico de β-glucano implicado en la unión opsonizada de polisacáridos en monocitos que conducen a la activación de macrófagos y a la respuesta inflamatoria. La incubación de monocitos con anticuerpos monoclonales específicos para CR3 (CD11b) a razón de 5 µg/ml seguido de incubación con RR1 no pudo inhibir o reducir la síntesis con TNF-α de las células RAW 264.7. Sin embargo, se observó reducción significativa (41,31%) en la síntesis de TNF-α cuando se trataron macrófagos RAW 264.7 con anticuerpo CD11b seguido de zymosan soluble (Tabla 2)

20 Tabla 2. Síntesis de TNF-α en macrófagos RAW 264.7 después de la inhibición con anti-CD11b (específico para CR3) de la unión opsonizada de glucanos.

Glucano	% de reducción de TNF-α segregado
Referencia	0
Zymosan A (100 µg/ml)	41,31 ± 6,90**
RR1 (100 µg/ml)	4,25 ± 3,66
RR1 (500 µg/ml)	1,89 ± 0,50

Se incubaron células con CR3 (5 µg/ml) durante 2 h seguido de tratamiento con glucano durante 1 h a 37°C.

*** p < 0,05*

25 Ejemplo 9 – Síntesis de TNF-α

La Figura 12 presenta la síntesis de TNF-α producida por RR1 con y sin el inhibidor NF-κB, éster fenílico del ácido cafeico (CAPE). Un aumento en función de la dosis de la síntesis de TNF-α fue evidente con dosis escalonadas de RR1. Cuando se incubaba CAPE a razón de 10 µg/ml durante 1 hora antes del tratamiento con RR1 de los monocitos, la síntesis de TNF-α se inhibía completamente a todas las concentraciones de RR1.

Para determinar la cinética de activación de NF-κB, se analizó en varios intervalos de tiempo la actividad de NF-κB en los macrófagos tratados con RR1 utilizando el protocolo ELISA (Figura 13). La actividad de NF-κB aumentó con el tiempo de estimulación, se produjo un pico a las 8 horas seguido de una disminución en la actividad posterior. Basándose en estos resultados, todos los demás estudios de activación de NF-κB se realizaron con 8 horas de estimulación y se observó un aumento en función de la dosis de la actividad de NF-κB al aumentar las concentraciones de RR1 y que alcanzaba una estabilización entre 500 y 1.000 µg/ml de dosis RR1 (Figura 14). La observación del desplazamiento en la banda heterodimérica de NF-κB por EMSA corrobora la cuantificación del experimento ELISA como evidente en el aumento en la intensidad de la banda superior (banda heterodimérica p65) en función de la concentración (Figura 15).

45 Ejemplo 10 – Degradación de IκB-α

La fosforilación y degradación de IκB-α es un prerrequisito para la activación de NF-κB que facilita el desplazamiento de NF-κB del citoplasma al núcleo. La inmunotransferencia Western de I-κBα presenta los resultados de las concentraciones de IκB-α durante varios intervalos de estimulación después del tratamiento con RR1. Una disminución estacionaria en I-κBα es evidente a los 30 minutos de incubación con RR1 con una eliminación completa de su expresión después de 60 minutos de tratamiento con RR1 a razón de 100 µg/ml (Figura 16).

Ejemplo 11 – ARNm de TLR y proteínas

Las concentraciones de ARNm de los genes TLR2, 4 y 6 (Figura 17) permanecieron similares a las concentraciones entre 0 y 1000 µg/ml de RRI. Por consiguiente, la transcripción de los TLR parecía no alterarse por el tratamiento con RRI.

Función de los TLR en la señalización de RR1. Para probar las funciones desempeñadas por diferentes TLR en la señalización de RR1, se incubaron células madre HEK293 así como transfectantes receptores (TLR2, TLR4/CD14/MD2, TLR6/ o TLR2/TLR6) con RR1 y seguido de la producción de IL-8 después de 24 horas. RR1 no indujo producción de IL-8 en células madre HEK así como en células HEK transfectadas con genes para TLR2 o TLR4/CD14/MD2. Sin embargo, las células HEK transfectadas con TLR6 así como los genes para TLR2-6 mostraban copiosa inducción de IL-8 y una inducción en función de la dosis fue visible en su síntesis (Figuras 18 y 19). Es también interesante observar que las células transfectadas con TLR2 no produjeron ninguna IL-8 con tratamiento con RR1 (0-100 µM).

La *Tinospora cordifolia* es una hierba inmunoestimulante utilizada extensamente en un sistema de medicina ayurvédico (Indú) (Chopra, R N., I.C. Chopra, K.D., Handa, L. D., Kanpur (Editores), 1982, Glossary of Indian Medicinal Plant; Council of Scientific and Industrial Research, Nueva Delhi, Dhar VN & Sons, Kolkata, India). Se ha descrito el aislamiento y caracterización de un nuevo 1,4- α -D-glucano (RR1) procedente de esta hierba medicinal, que se descubrió que posee propiedades inmunoestimulantes. Este polisacárido soluble en agua tiene enlaces (1,4)- α -D-glucosídicos en la cadena principal con cadenas laterales unidas por (1,6)- α -D-glucosídicos en un intervalo de 6,7 unidades de glucosa. Esta investigación se emprendió para entender más el mecanismo de la estimulación del sistema inmunitario. Los resultados descritos en la presente memoria demuestran que RR-1 presenta solamente un pequeño efecto inhibitorio en la unión e interiorización de biopartículas de zymosan A opsonizadas (fagocitosis). Esto contrastaba con el efecto de laminarina, β -glucano derivado fúngico soluble que presentaba aproximadamente el 90% de inhibición de la interiorización de biopartículas de zymosan (Brown, G. D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412; Czop, J. K. y Austem, K.F., *J. Immunol.*, 1985, 134:2588-2593; Goldman, R., *Exp. Cell Res.*, 1988, 174:481-490).

El receptor 3 del complemento (CR3) es una glucoproteína transmembranaria heterodimérica que pertenece a la familia de la β 2-integrina constituida por CD11b asociada por enlace no covalente a CD18. Se han identificado distintos dominios funcionales en las fracciones extracelulares de la subunidad CD11b de CR3 (Diamond, M. S. *et al. J. Cell. Biol.*, 1993, 120:1031-1043; Thornton, B.P. *et al. J. Immunol.*, 1996, 156:1235-1246; Lu, C. *et al. J. Biol. Chem.*, 1998, 273:15138-15147; Dana, N. *et al. J. Immunol.*, 1986, 137:3259-3263). En la señalización del β -glucano, CR3 actúa como receptor de leucocitos para partículas (Ross, G.D. *et al. Complement*, 1987, 4:61-74) y glucanos soluble (Thornton, B.P. *et al. J. Immunol.*, 1996, 156:1235-1246). Este receptor funciona como un receptor de glucano por la zona de lectina con terminal COOH que actúa para cebar el receptor. Se informa de que el dominio I o A de CR3 es esencial para la unión y la fagocitosis de las partículas recubiertas con C3bi (Diamond, M.S. *et al. J. Cell Biol.*, 1993, 120:1031-1043; Dana, N. *et al. J. Immunol.*, 1986, 137:3259-3263) y el dominio de lectina situado en el terminal C para el dominio I (Thornton, B.P. *et al. J. Immunol.*, 1996, 156:1235-1246), es responsable de propiedades de la unión no opsónica de CR3 (Balsam, L.B. *et al. J. Immunol.*, 1998, 160:5058-5065; Ross, G. D. *et al. J. Immunol.*, 1985, 134:3307-3315). La capacidad de los polisacáridos para sondear CR3 puede ser imitada por los anticuerpos que se unen cerca de la zona de la lectina (Thornton, B. P. *et al. J. Immunol.*, 1996, 156:1235-1246). Cabec *et al.* (Cabec, V.L. *et al. Infect. Immunity*, 2000, 68:4736-4745) demostraron que en condiciones no opsónicas, la fagocitosis de zymosan requiere de distintos determinantes moleculares del receptor y que la fagocitosis no opsónica se produce independientemente de la zona de lectina con terminal C. Brown *et al.* (Brown, G. D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412) presentaba inhibición de la unión de zymosan opsonizado a macrófagos con mAb 5C6 específico para CR3 y los niveles de inhibición eran similares a los informes previos (Xia, Y. *et al. J. Immunol.*, 1999, 162:2281-2290). Sin embargo, la inhibición de CR3 con 5C6 mAb no pudo inhibir la unión no opsonizada de partículas de zymosan. Los experimentos de inhibición de CR3 con células RAW 264.7 utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD11b presentaba una reducción de 41% en la síntesis de TNF- α inducida por zymosan en condiciones opsonizadas (37°C). Sin embargo la incubación de anticuerpos no pudo inhibir la síntesis de TNF- α inducida por RR1 de las células RAW264.7 en condiciones opsónicas así como no opsónicas. Por consiguiente, parece que el receptor de CR3 en macrófagos puede que no esté implicado en el reconocimiento y cebado de RRI que conduce a la síntesis de citocinas.

La Zymosan es una partícula procedente de levadura compuesta principalmente por polisacáridos cuyos constituyentes principales son el β -glucano y manano. Se ha utilizado como modelo para las investigaciones de unión al receptor en macrófagos empleando agentes de bloqueo selectivos específicos para los receptores. Se demostró la no implicación de los receptores de β -glucano, CR3 y el receptor de manosa, en la unión no opsonizada de zymosan en macrófagos de ratón ya en la falta de cualquier efecto inhibitorio para dimetilglucósido y manano, respectivamente (Brown, G.D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412). Por otra parte, laminarina, β -glucano soluble en agua con estructura definida, presentaba una inhibición muy potente en la unión no opsónica en macrófagos demostrando la implicación de los receptores de β -glucano (Brown, G.D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412; Ross, G.D. *et al. Complement*, 1987, 4:61-74). El fuerte efecto inhibitorio en función de la concentración de RR1 en la fluorescencia de las partículas de zymosan-FITC no opsonizadas demuestra la implicación del mismo

tipo de receptores en zymosan y RR1 para el reconocimiento no opsónico y la unión coherente con la producción de TNF- α y su bloqueo por el fosfato de glucano puede inhibir la activación de macrófagos (Ganter, B.N. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2003, 197:1107-1117). El fuerte efecto inhibitorio de laminarina sobre la unión opsonizada y la consiguiente producción de TNF- α puede atribuirse a la implicación del mismo tipo de receptores para la unión e interiorización de partículas de zymosan y laminarina ya que ambas tienen un modelo molecular y configuración similares (polímeros de glucosa lineales debido al enlace β -glucosídico). Por otra parte RR1 es un α -glucano que tiene una configuración molecular diferente (espiral debida al enlace α -glucosídico) y puede por lo tanto implicar diferentes tipos de receptores para la unión/interiorización.

Brown *et al.* (Brown, G.D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412; Brown, G.D. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2003, 197:1119-1124; Brown, G. D. y Gordon, S., *Nature*, 2001, 413:36-37) describieron el receptor de dectin-1, responsable exclusivamente del reconocimiento no opsónico de zymosan por los macrófagos primarios. Estos autores demostraron que dectin-1 mAb 2A11 específico para el receptor dectin-1 pueden inhibir la unión de zymosan no opsonizado en un nivel comparable a la inhibición obtenida con los β -glucanos exógenos, fosfato de glucano o laminarina, lo que indica que mAb está unido al punto de fijación del β -glucano o cerca del mismo. Además Adachi *et al.* (Adachi, Y. *et al.*, *Infect. Immun.*, 2004, 72:4159-71) han demostrado recientemente que las células HEK293 transfectadas con ADN con dectin-1 de ratón podría unirse a un gel que forma β -glucano, esquizofilán, y la unión puede inhibirse por pretratamiento con otros β -glucanos pero no mediante α -glucanos lo que demuestra la especificidad de dectin-1 para β -glucanos.

Para identificar al o a los receptores responsables del cebado de RR1, se investigó la síntesis de citocina inducida por RR1 en células HEK 293 transfectadas con varios TLR. Las células HEK293 no producen TNF- α bajo estimulación de polisacáridos; por consiguiente, se analizaron otras citocinas. Ya que estas células producen IL-8 durante la estimulación y además se basan en el hecho de que la producción de IL-8 está bajo el control de la activación de NF- κ B, se analizaron IL-8 en transfectantes de HEK293 (Wang, Q. *et al.*, *Infect. Immun.*, 2001, 69:2270-2276; Torok, A.M. *et al.*, *Infect. Immun.*, 2005, 73:1523-1531). Los TLR son proteínas transmembranarias de tipo I y hasta la fecha se han descrito 12 miembros de TLR en seres humanos. Las células HEK 293 son deficitarias en estos receptores y se da cuenta de que TLR1, TLR2 y TLR6 se recuperan todas para fagosomas que contienen partículas de zymosan A (Underhill, D.M. *et al.*, *Nature*, 1999, 401:811-815; Ozinsky, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 2000, 97:13766-13771). Tanto TLR2 como TLR6 se necesitan para la activación de NF- κ B y para la producción de citocinas inflamatorias tales como TNF- α por partículas de zymosan A. En el presente estudio RR1 indujo la producción de IL-8 en células HEK 293 transfectadas con TLR6 así como TLR2/6 y no en otros transfectantes. Se observó también un aumento en función de la dosis en la síntesis de IL-8. El tratamiento con RR1 no ha inducido ninguna inducción de IL-8 en células HEK 293 transfectadas con el gen para TLR2 o TLR4.

El sistema inmunitario innato reconoce y responde a diversos productos microbianos y a no automoléculas mediante los TLR y otros receptores y produce respuestas muy específicas (Netea, M.G. *et al.*, *Trends Microbiol.*, 2004, 12:484-488). La especificidad para el ligando del pequeño número de receptores sugiere la cooperación entre ellos tal como la homo-hetero-dimerización y la colaboración con receptores distintos de TLR tal como CD14, MD2 y dectin-1 para conseguir la especificidad de las pruebas de provocación (Ganter, B.N. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2003, 197:1107-1117; Wright, S. D. *et al.*, *Science*, 1990, 252:1321-1322; Medzhitov, R. *Nature Reviews Immunol.*, 2001, 1:135-145; Brown, G.D. y Gordon, S. *Cell. Microbiol.*, 2005, 7:471-479; Shimazu, R. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1999, 189:1777-1782). Underhill *et al.* (Underhill, D.M. *et al.*, *Nature*, 1999, 401:811-815) han demostrado que la interiorización de partículas no se necesita para la respuesta inflamatoria en la activación de macrófagos inducida por zymosan ya que la respuesta está mediada por los TLR.

Los estudios del β -glucano han demostrado que la activación de NF- κ B en macrófagos es una de las etapas críticas para la síntesis de citocinas y quimiocinas que conduce a la estimulación inmunitaria (Brown, G.D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412; Brown, G.D. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 2003, 197:1119-1124). NF- κ B no activado está situado en el citoplasma unido a la proteína inhibidora I κ B- α . La I κ B- α se fosforila y degrada en respuesta a estímulos inflamatorios, lo que conduce a la activación de NF- κ B. La NF- κ B activada se transpone en el citoplasma dentro del núcleo, donde se une a las regiones activadoras de los genes diana y regula su transcripción. Cuando los genes diana son activados por NF- κ B se produce la síntesis de ARNm y la expresión de la proteína continúa. Los estudios de activación de NF- κ B realizados en el presente estudio han confirmado que la activación de NF- κ B es el mecanismo subyacente para las propiedades de estimulación del sistema inmunitario de RR1.

RelB o la proteína NF- κ B comprende una familia de factores de transcripción eucarióticos relacionados estructuralmente que están implicados en el control de gran número de procesos de organización y celulares incluyendo las respuestas inmunitarias e inflamatorias y la apoptosis además de la activación persistente de numerosos procesos patológicos tales como cáncer, artritis, inflamación crónica, asma, enfermedades neurodegenerativas y cardíacas (Beyaert, R. (ed.), 2004, "Nuclear Factor- κ B: Regulation and Role in Disease" Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, Holanda; Ghosh, S. *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, 16:225-260). Estas proteínas están relacionadas por un dominio de fijación/dimerización del ADN muy conservado denominado la homología de RelB. NF- κ B se refiere al heterodímero p50-RelA (p65), el principal complejo RelB/NF- κ B en la mayoría de las células. El factor de transcripción RelB/NF- κ B unido a las zonas del ADN de 9 a 10 pares de bases denominado κ B en el dímero. Los dímeros individuales tienen distintas especificidades de unión al ADN para una

serie de zonas de κ B relacionadas. La completa inhibición de la síntesis de TNF- α con preincubación de macrófagos con CAPE seguido de RR1 demuestra inequívocamente la implicación de NF- κ B en la ruta de señalización celular de RR1. El CAPE presenta la inhibición de NF- κ B impidiendo el desplazamiento de la subunidad p65 al núcleo y la inhibición es específica para el desplazamiento del heterodímero p65 (Natarajan, K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 1999, 199693:9090-9095). La expresión de NF- κ B pendiente de la concentración en las mediciones por ELISA y la banda heterodimérica de NF- κ B en los geles EMSA confirman más la participación activa de NF- κ B en la regulación de la transcripción de la producción de citocinas. La degradación de la I κ B- α antes de la expresión de NF- κ B es un requisito esencial para la activación de NF- κ B en la ruta de señalización y en la degradación de la I κ B- α citosólica en los primeros 60 minutos de estimulación de RR1 justifica la ruta de NF- κ B. Los experimentos a lo largo del tiempo demuestran que la activación de la NF- κ B comienza después de la degradación de I κ B- α y alcanza un pico a las 8 horas de estimulación seguido por una disminución. La naturaleza transitoria de la activación de NF- κ B es evidente a lo largo del experimento que a su vez impide la activación continua y persistente de NF- κ B y la consiguiente sobreproducción de citocinas inflamatorias.

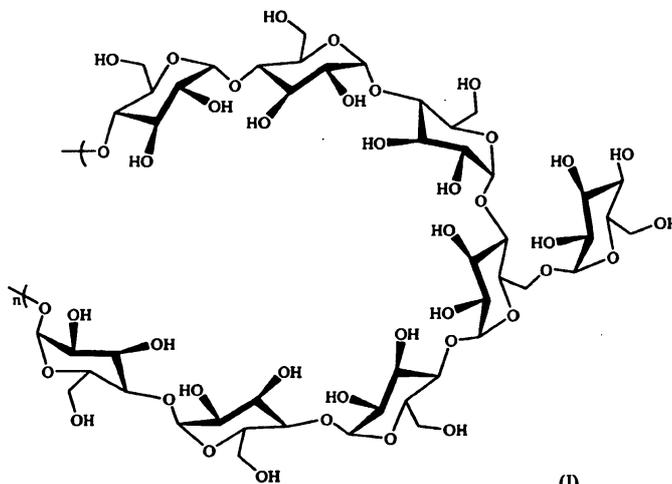
Uno de los genes dianas activado por NF- κ B puede ser que codifique la I κ B- α . La I κ B- α recién sintetizada se introduce en el núcleo y elimina la NF- κ B del ADN y vuelve a exportar el complejo al citoplasma y restablece el estado latente original y de este modo impide la activación continua. La disminución en la actividad de NF- κ B en el extracto nuclear después de 8 horas puede atribuirse a este transporte inverso y de este modo la activación de NF- κ B se mantiene como un proceso temporal que dura solamente unas pocas horas.

El β -glucano de la pared celular de *Pneumocystis carinii* se informa que activa macrófagos murinos provocando el desplazamiento de los heterodímeros p65 NF- κ B en el núcleo lo que tiene lugar de manera detectable en función del tiempo tan temprano como 1 hora de estimulación, alcanza el máximo entre 2 y 4 horas y comienza a disminuir después de 6 horas de estimulación continua (Lebron, F. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:25001-25008). Estudios similares con LPS dieron como resultado una transposición rápida del p65 NF- κ B en 10 a 30 minutos coherente con un artículo anterior (O'Connell, M. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273:30410-30414). Sin embargo la degradación de I κ B- α se percibió solamente después de 2 horas de estimulación que se completó en 4 horas. En los macrófagos estimulados por zymosan Young *et al.* dieron cuenta de la activación de NF- κ B a las 2 horas de estimulación que alcanzó el pico a las 8 horas y disminuyó después (Brown, G. D. *et al.*, *J. Expt. Med.*, 2002, 196:407-412). Se ha observado casi una tendencia similar en la cinética del desplazamiento de NF- κ B durante la estimulación de RR1 que se detectó a las 4 horas, alcanzó un pico a las 8 horas y disminuyó en la estimulación durante un período mayor. La degradación de NF- κ B- α en el extracto citosólico se observa como mínimo a los 30 minutos y se completa en 1 hora de estimulación. La diferencia en la extensión y duración del desplazamiento de NF- κ B en el núcleo en comparación con LPS o glucano de *Pneumocystis carinii* puede ser uno de los factores contribuyentes para las propiedades de defensa de RR1 y β -glucano. La cinética más lenta de la degradación del I κ B- α y el desplazamiento nuclear mucho más lento de la NF- κ B con un período temporal prolongado en comparación con LPS puede contribuir a las propiedades de defensa del hospedador de RR1 y β -glucanos; además, la estimulación con RR1 en leucocitos humanos produce altas concentraciones de citocina reguladora, IL-12 p(40) y citocinas antiinflamatorias IL-10 y MCP-1 también (Nair, P. K. *et al.*, *Int. Immunopharmacol.*, 2004, 4:1645-1659). En resumen, estos resultados demostraron que RR1 estimula el sistema inmunitario activando los macrófagos mediante la señalización con TLR6 y el mecanismo de activación de NF- κ B lo que conduce a la producción de proteínas inmunitarias. La activación latente y prolongada de NF- κ B acoplada con la degradación repentina de I κ B- α puede diferenciar su activación de otras moléculas activadoras tales como LPS y los glucanos de la pared celular de hongos.

REIVINDICACIONES

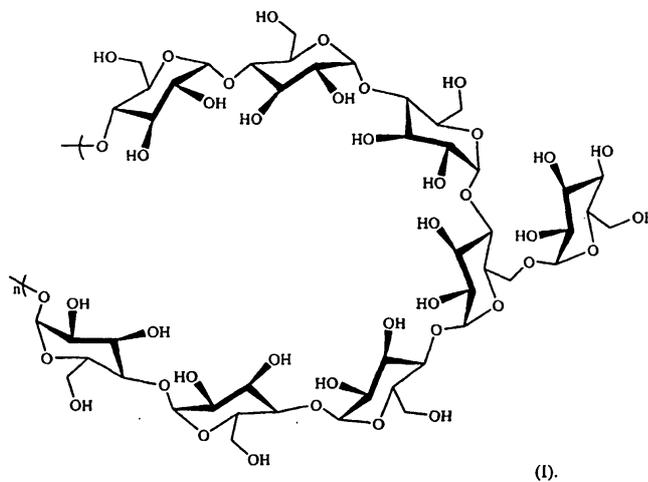
1. Compuesto aislado que presenta la estructura química siguiente (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5



2. Composición farmacéutica que comprende un compuesto aislado que presenta la estructura química siguiente (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable:

10



3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende además un facilitador inmunomodulador.

15

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, que comprende además un antígeno.

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, que comprende además un adyuvante.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 2 ó 3, que comprende además un antígeno y un adyuvante.

7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, que comprende además un agente anticanceroso.

8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende además un agente citotóxico.

25

9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende además un agente quimioterapéutico.

30

10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, que comprende además un inmunomodulador seleccionado de entre el grupo constituido por el factor de necrosis tumoral (TNF), interferón, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y activador de plasminógeno tisular.
- 5 11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, que comprende además un modificador de la respuesta biológica seleccionado de entre el grupo constituido por linfocina, interleucina y factor de crecimiento.
- 10 12. Procedimiento para la estimulación de una respuesta inmunitaria, que comprende administrar una cantidad eficaz del compuesto aislado según la reivindicación 1 a células *in vitro*.
13. Utilización de un compuesto según la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para estimular un sistema inmunitario en un paciente.
- 15 14. Utilización según la reivindicación 13, en la que el sistema inmunitario del paciente se estimula por activación de los macrófagos.
15. Utilización según la reivindicación 13 ó 14, en la que el sistema inmunitario del paciente se estimula por una o más de las maneras siguientes:
- 20 (a) aumento en la activación de las células destructoras naturales (NK);
 (b) aumento en la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa en macrófagos;
 (c) aumento en la síntesis de la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP)-1;
 (d) activación de NF-κB;
- 25 (e) aumento en la producción de citocina Th1; y
 (f) aumento en la cantidad de C3a des Arg de la ruta de activación del complemento alternativa.
16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que el paciente padece un trastorno de proliferación celular.
- 30 17. Utilización según la reivindicación 16, en la que el trastorno de proliferación celular es el cáncer.
18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en la que el paciente padece una infección.
- 35 19. Procedimiento para la obtención de RR1 del material de la planta *Tinospora cordifolia*, que comprende: (a) proporcionar material de la planta *Tinospora cordifolia*; y (b) extraer el compuesto según la reivindicación 1.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, que comprende además mezclar el compuesto extraído con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica.

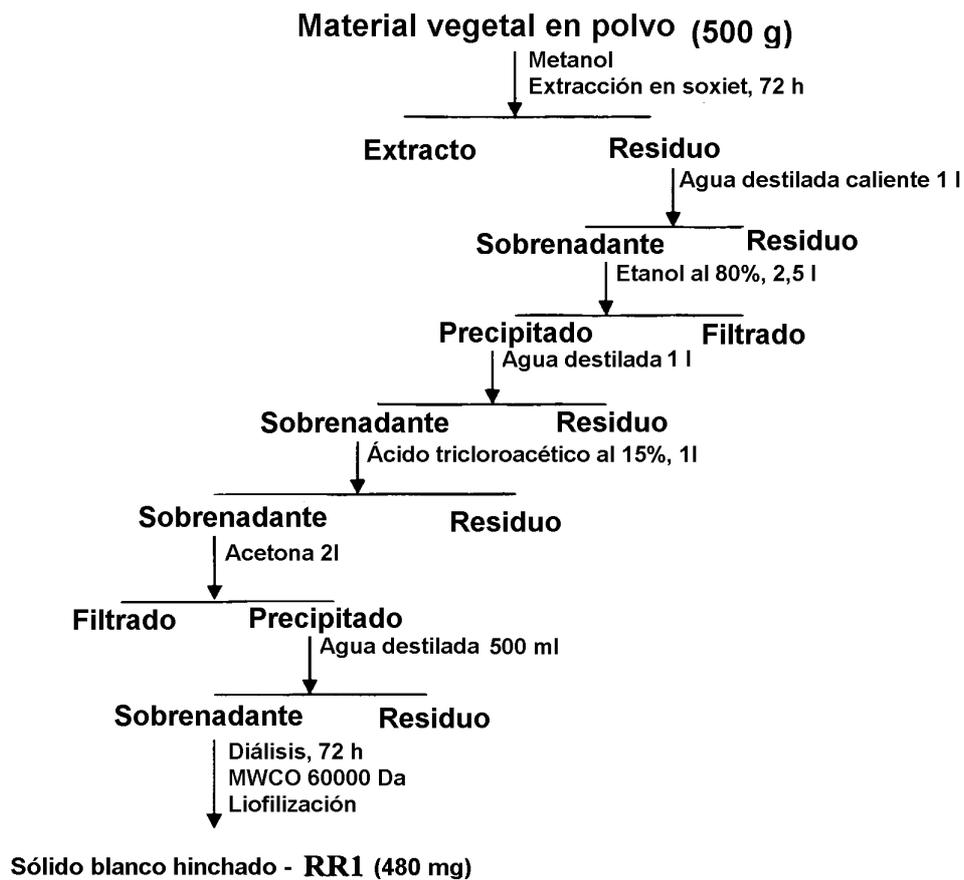


FIG. 1

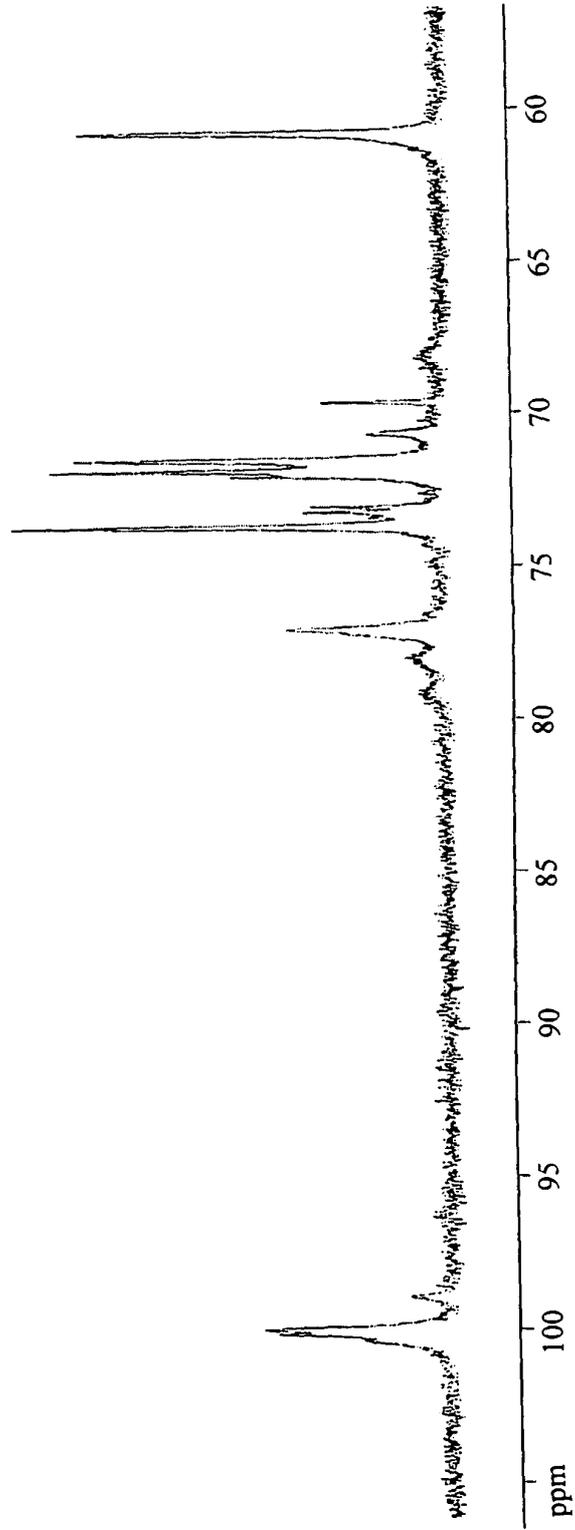


FIG. 2A

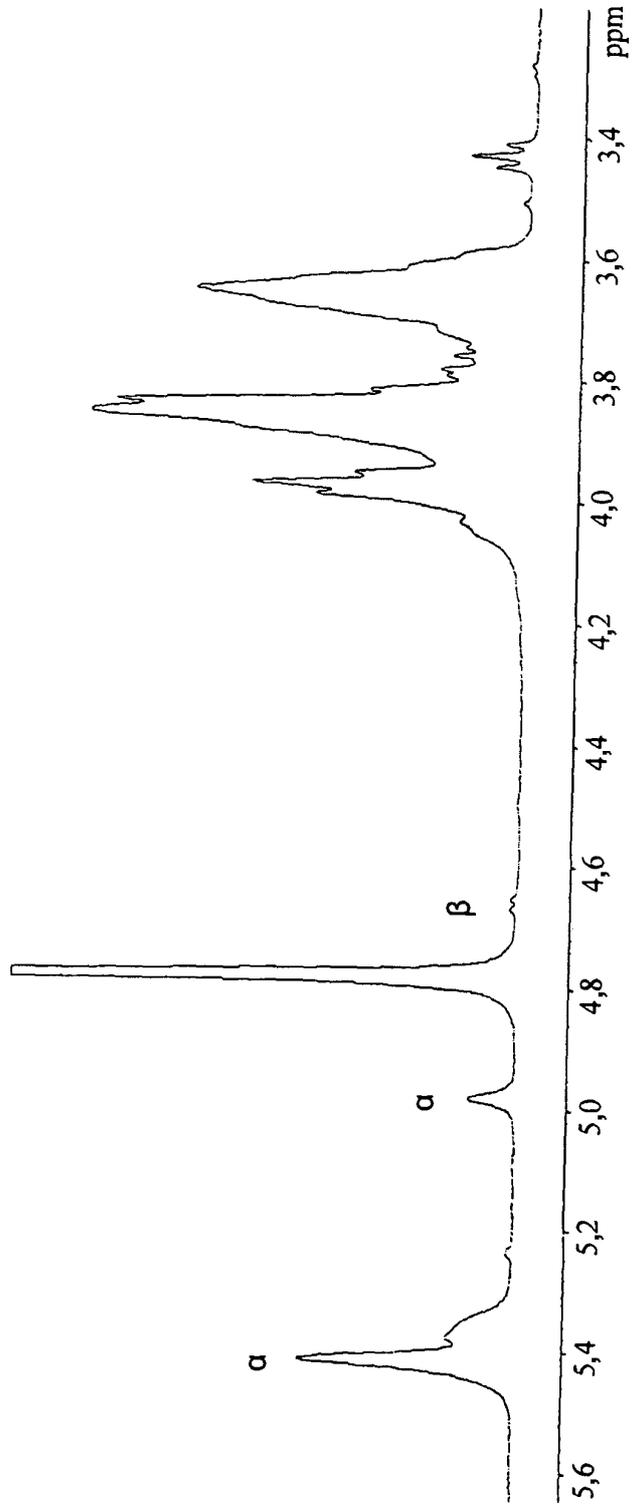


FIG. 2B

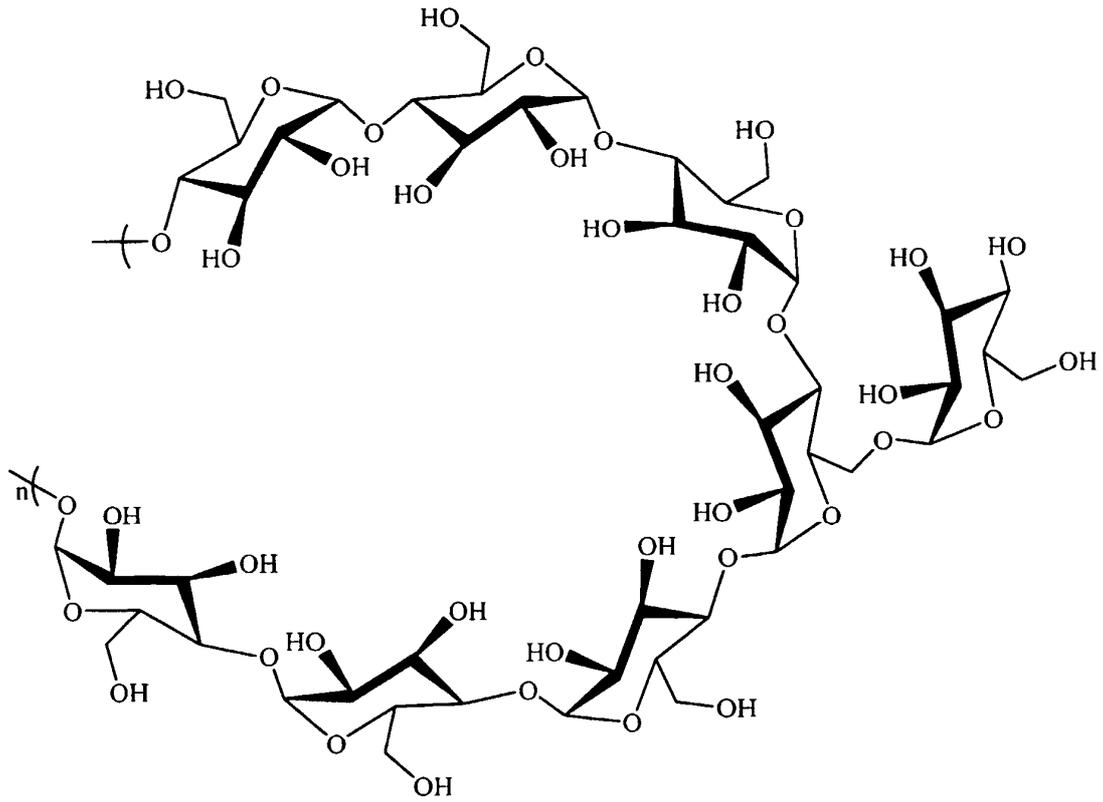


FIG. 3

FIG. 4A

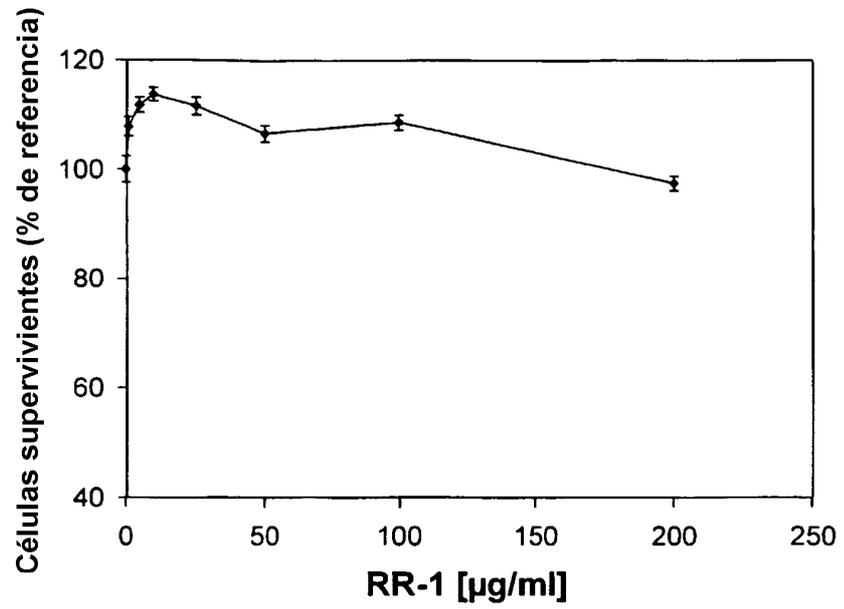
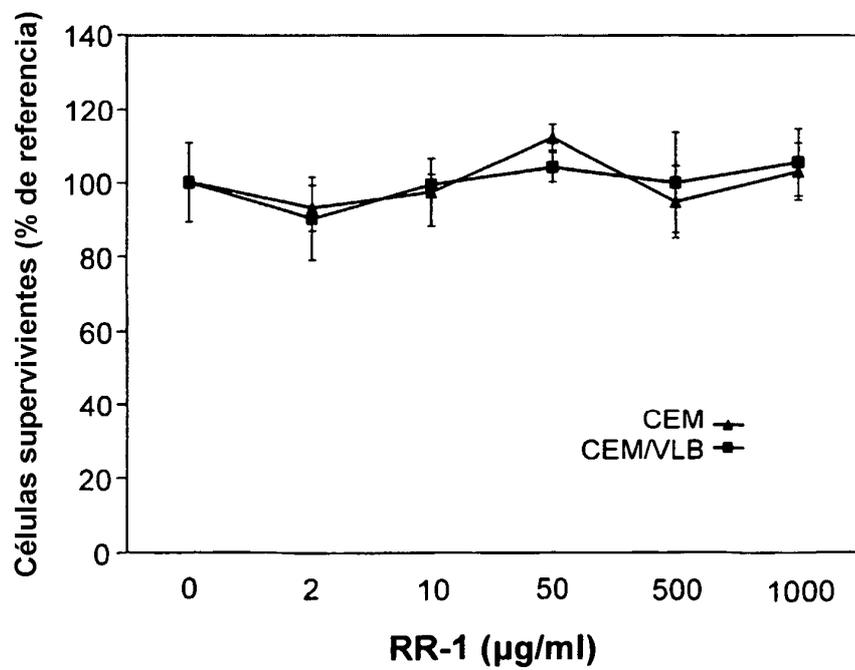


FIG. 4B



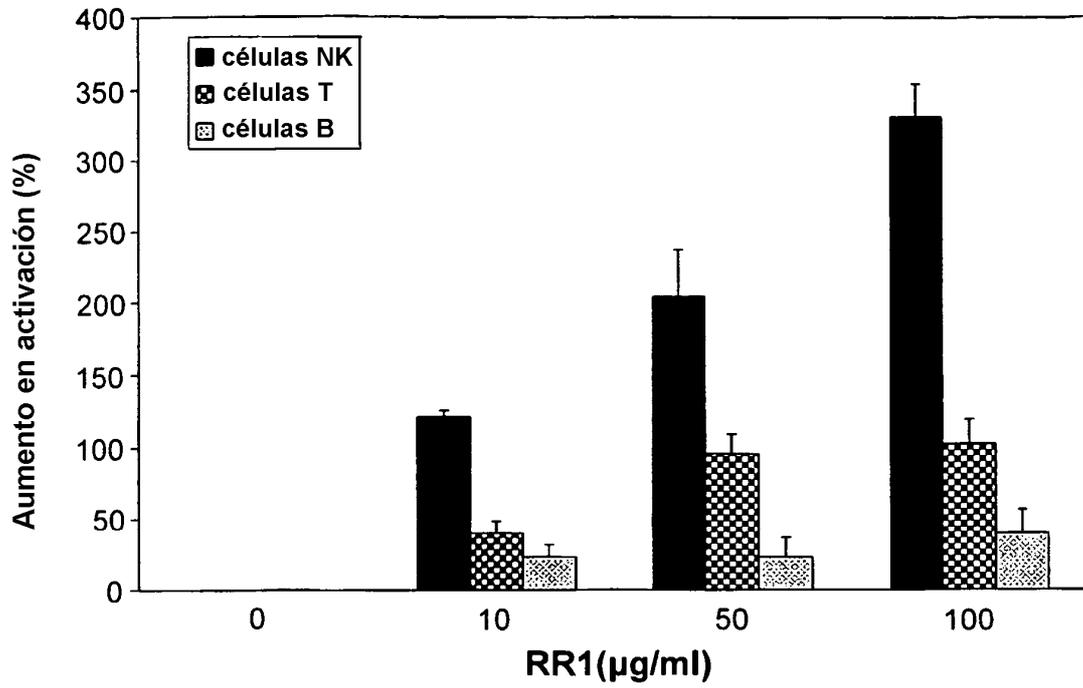


FIG. 5

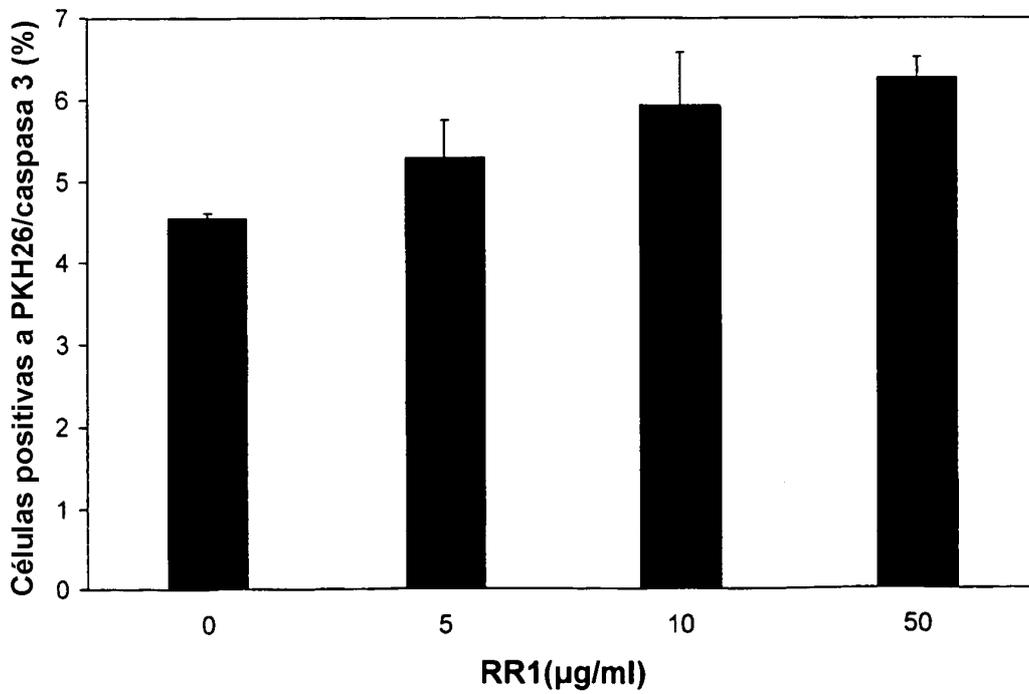


FIG. 6

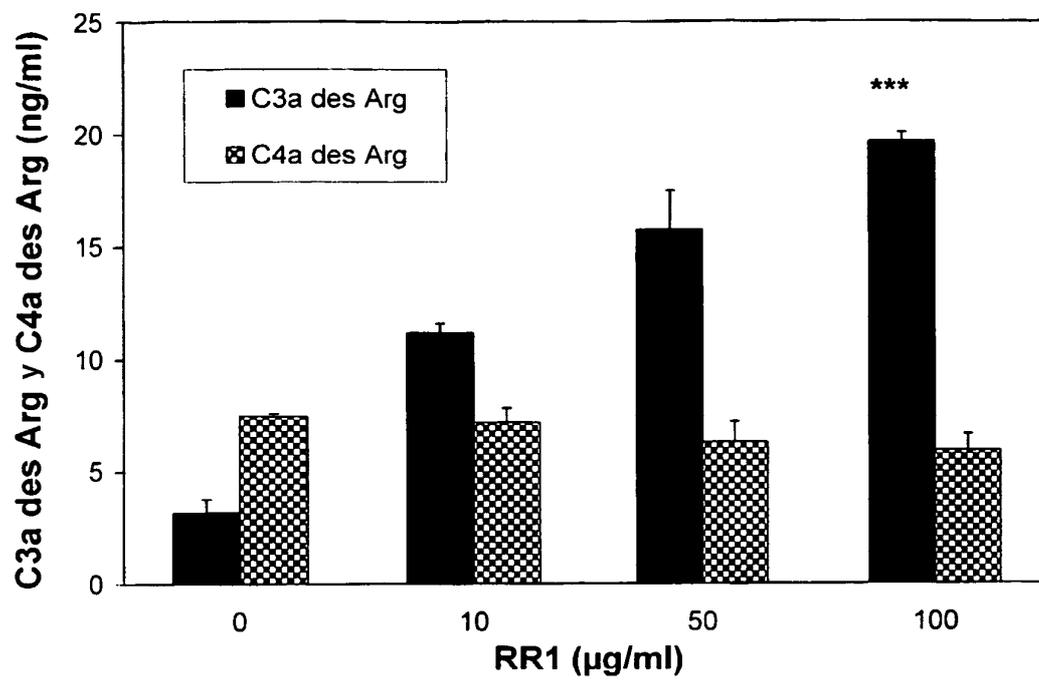


FIG. 7

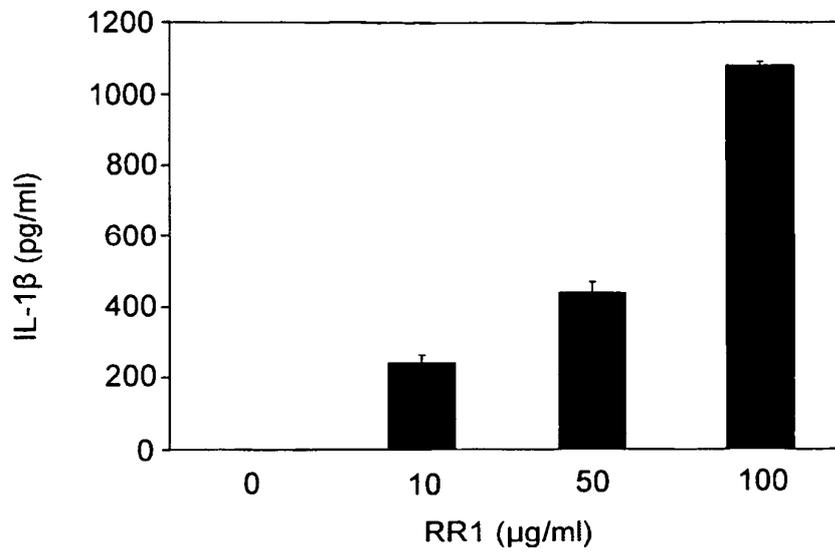


FIG. 8A

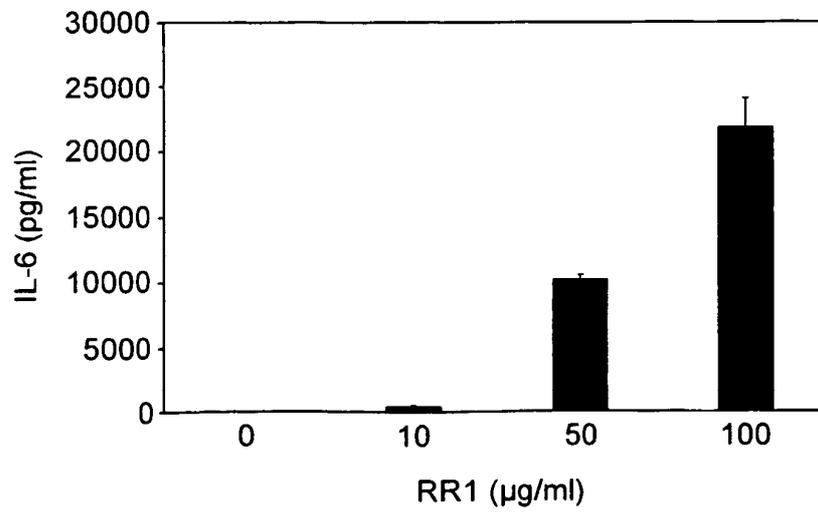


FIG. 8B

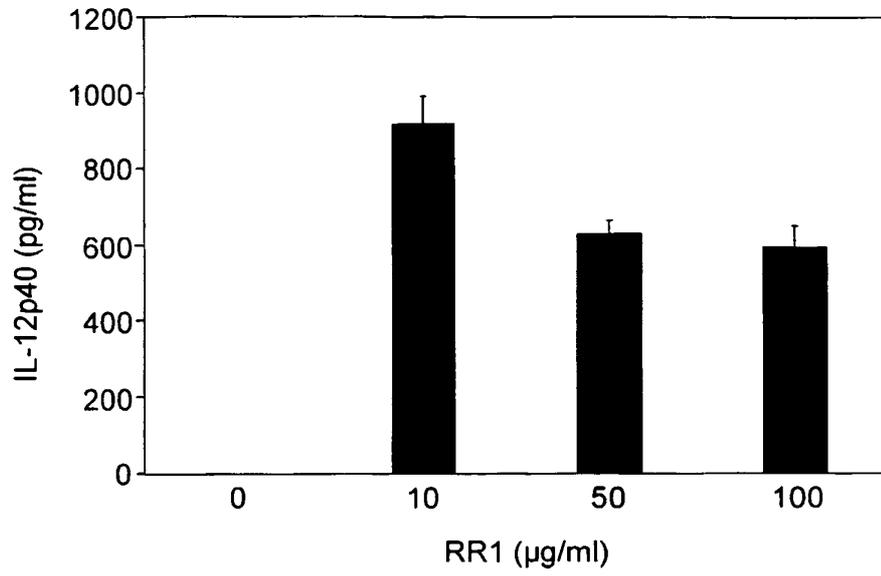


FIG. 8C

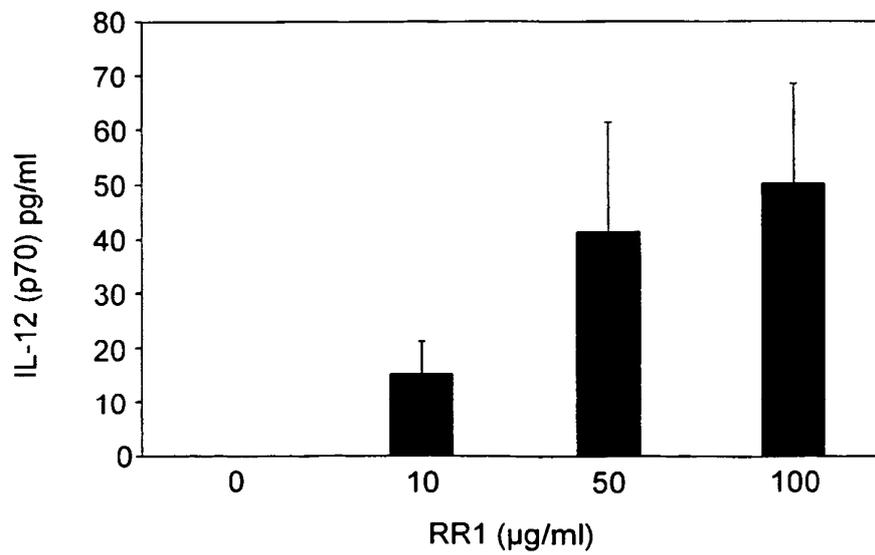


FIG. 8D

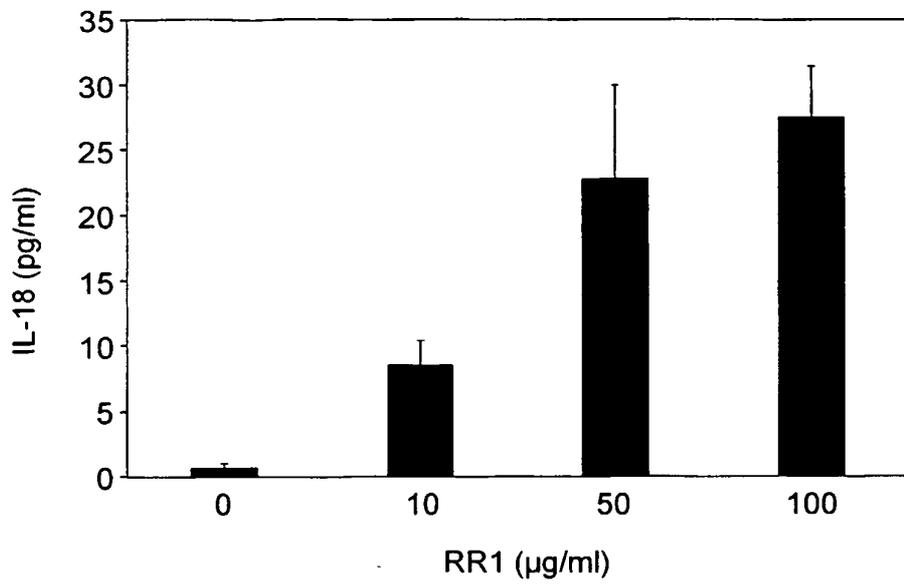


FIG. 8E

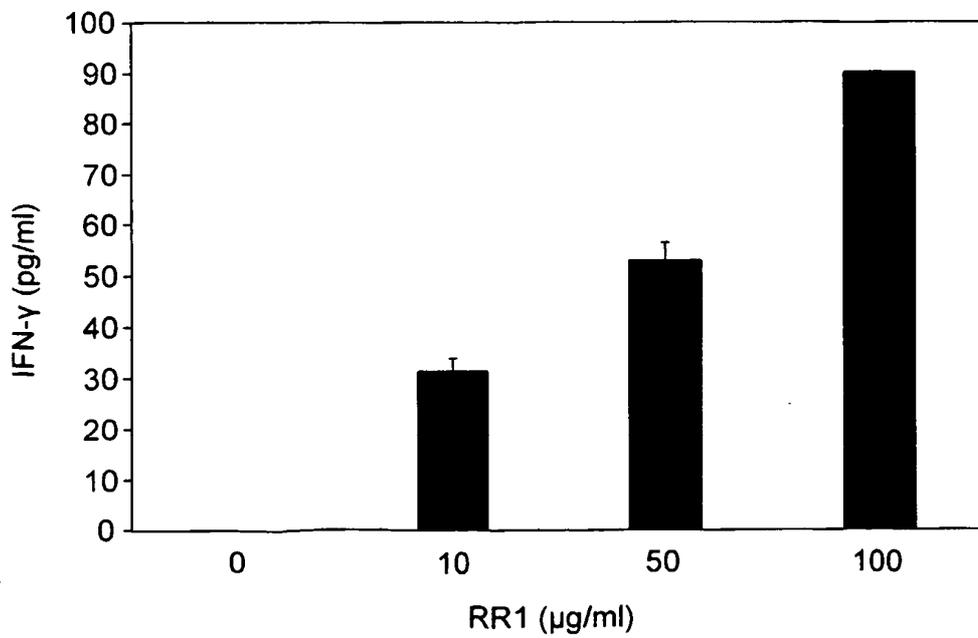


FIG. 8F

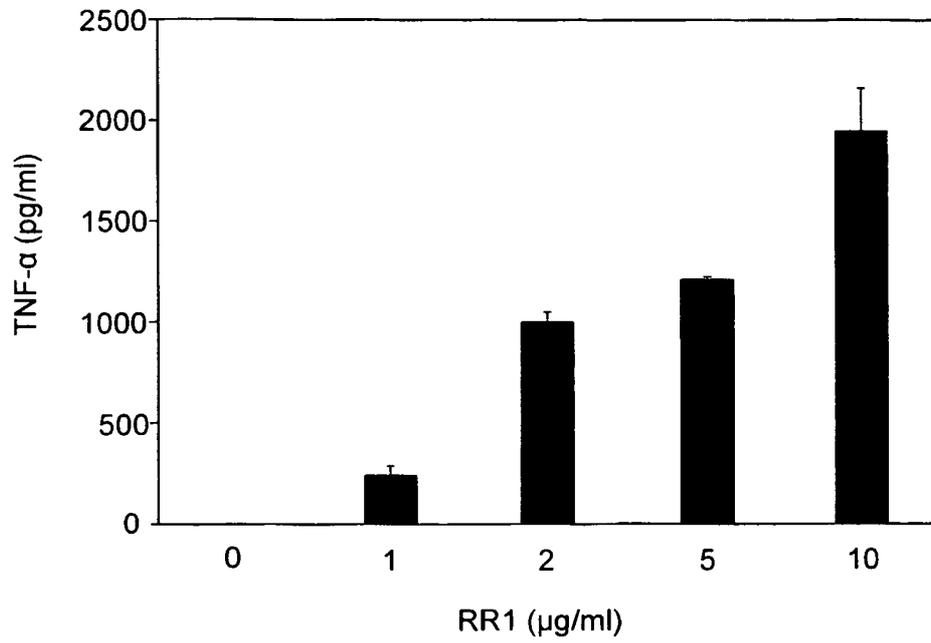


FIG. 8G

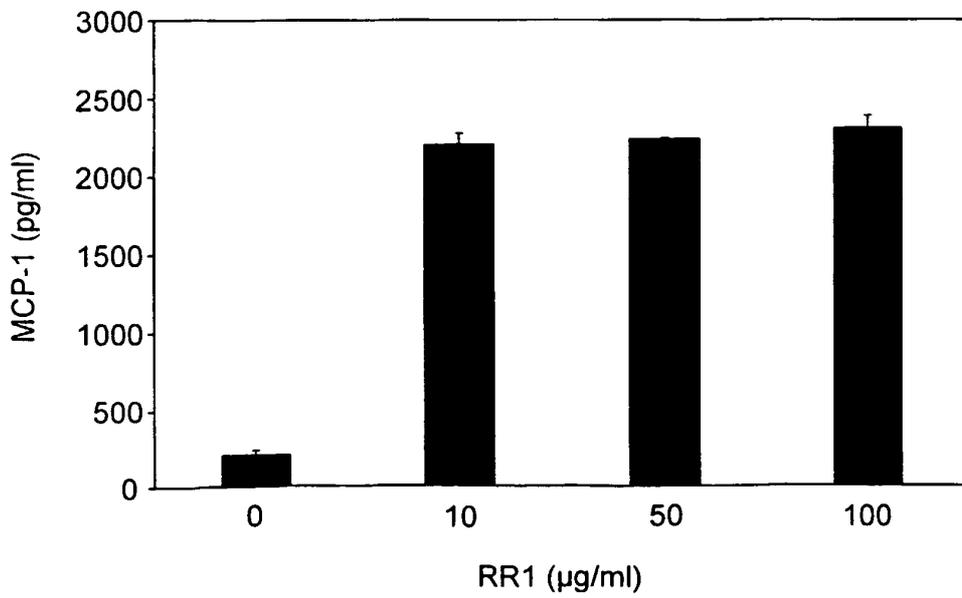


FIG. 8H

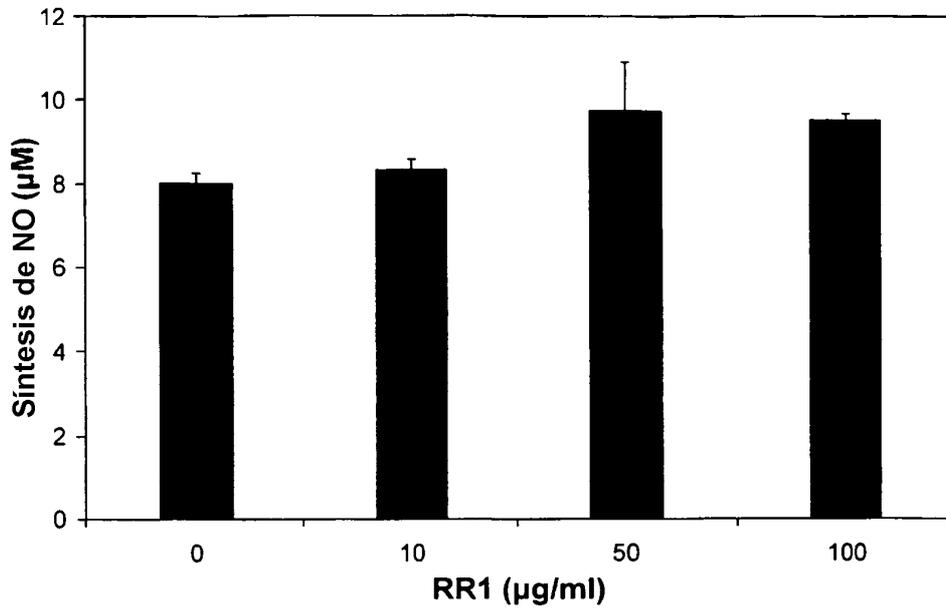


FIG. 9

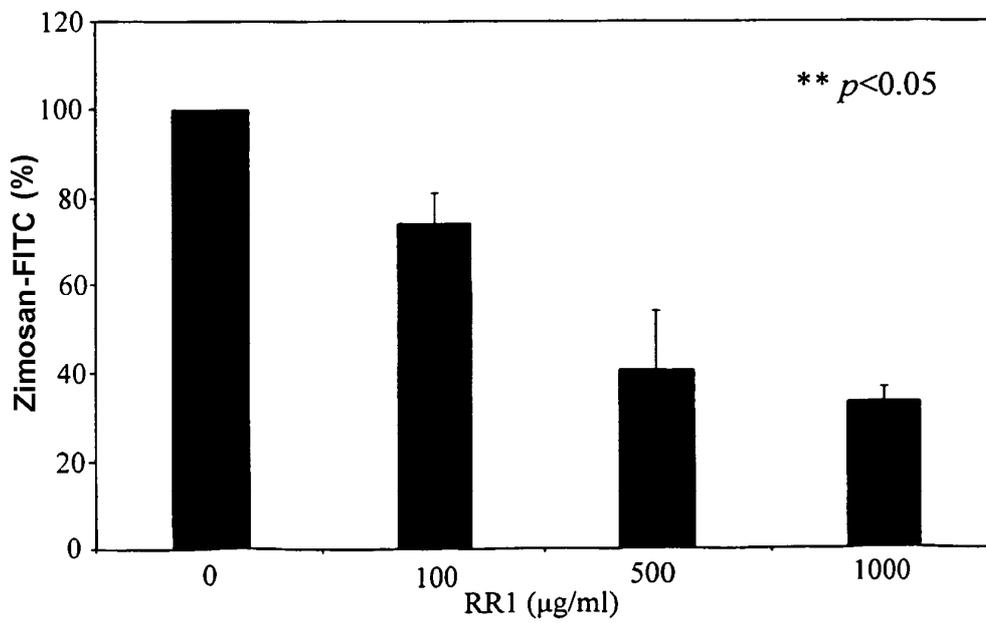


FIG. 10

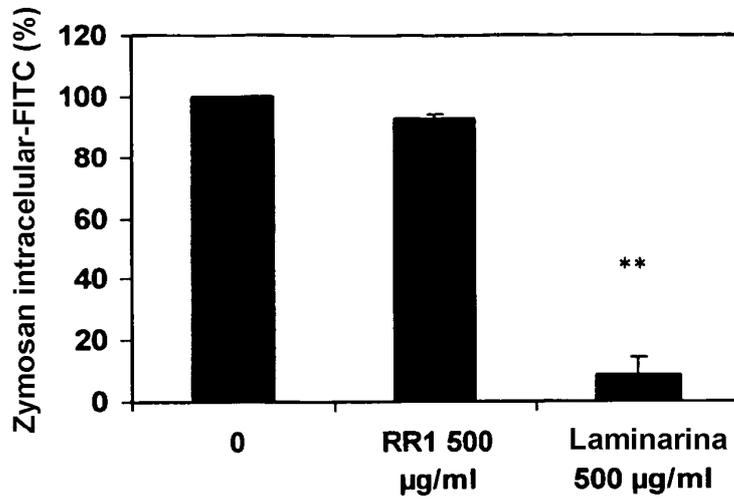


FIG. 11

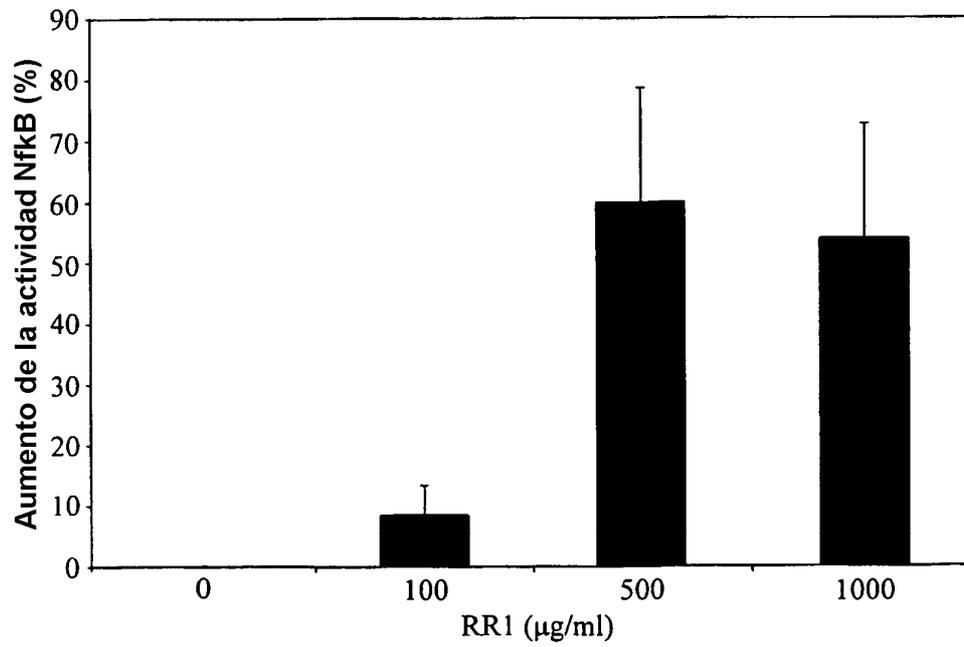


FIG. 14

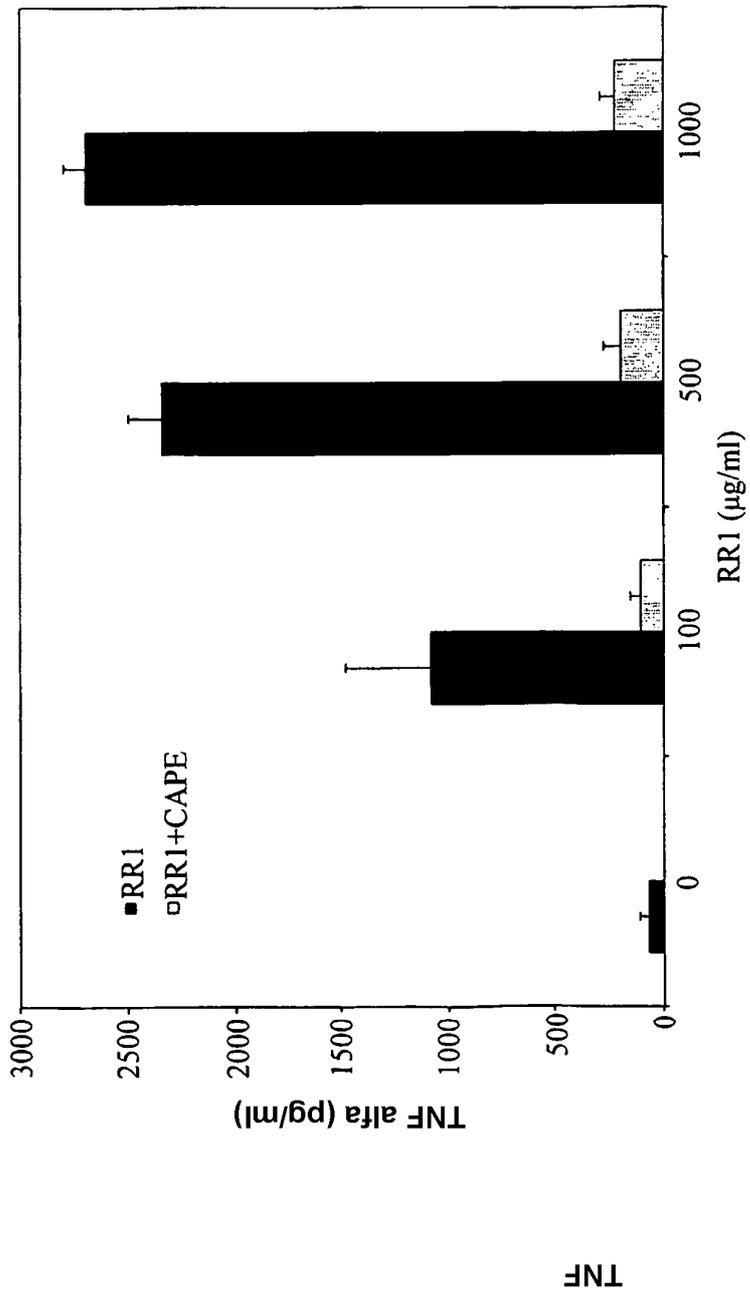


FIG. 12

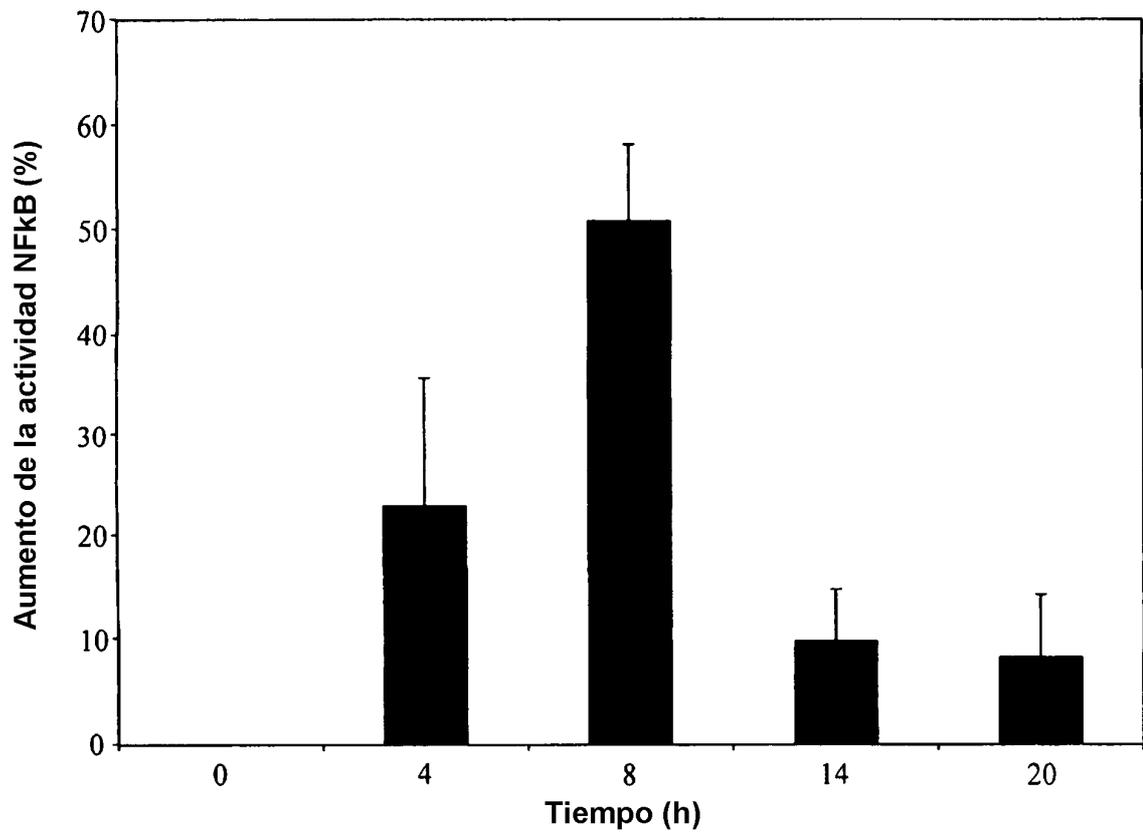


FIG. 13

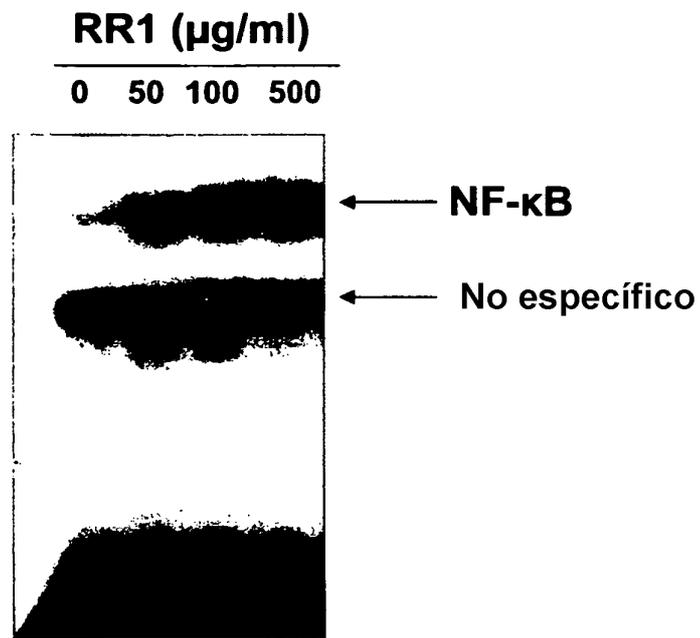


FIG. 15

0 15' 30' 60'

I- κ B α →

FIG. 16

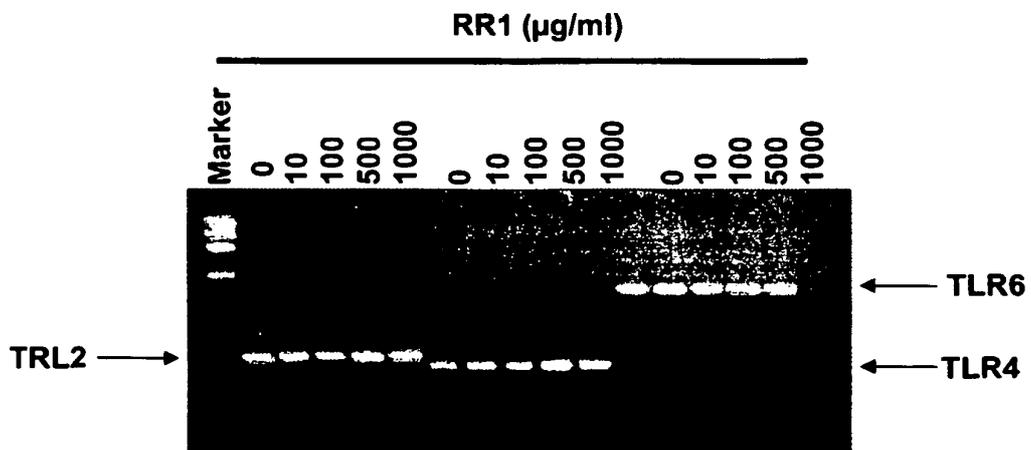


FIG. 17

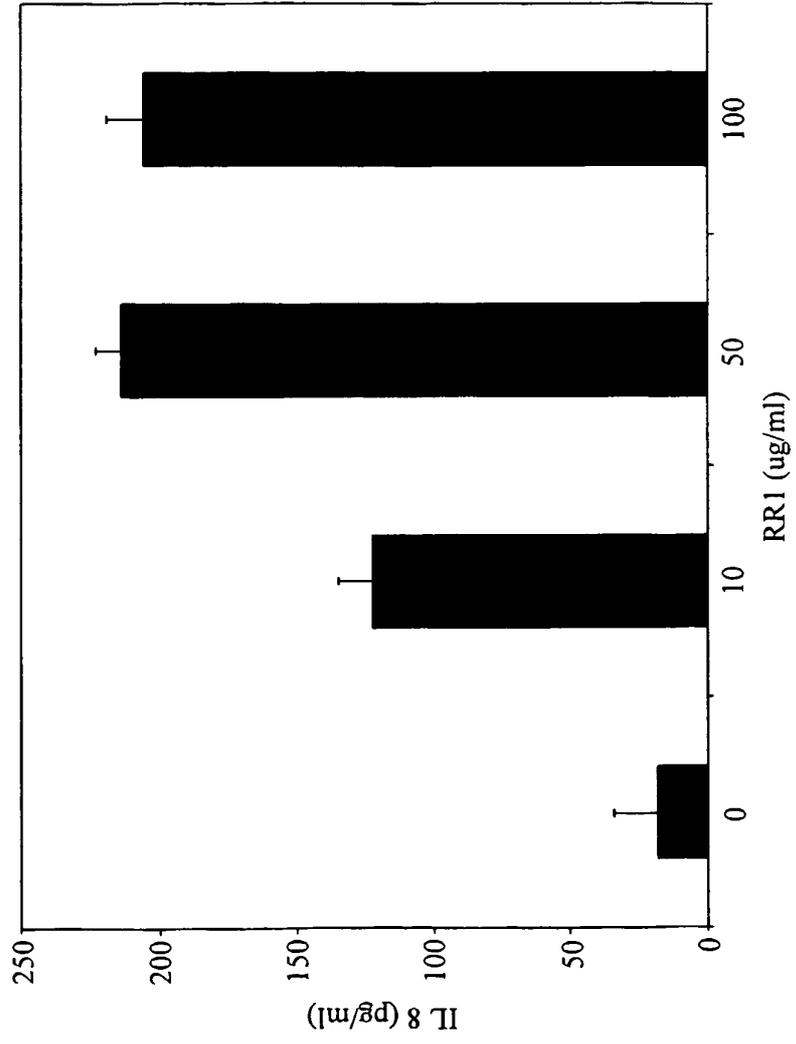


FIG. 18

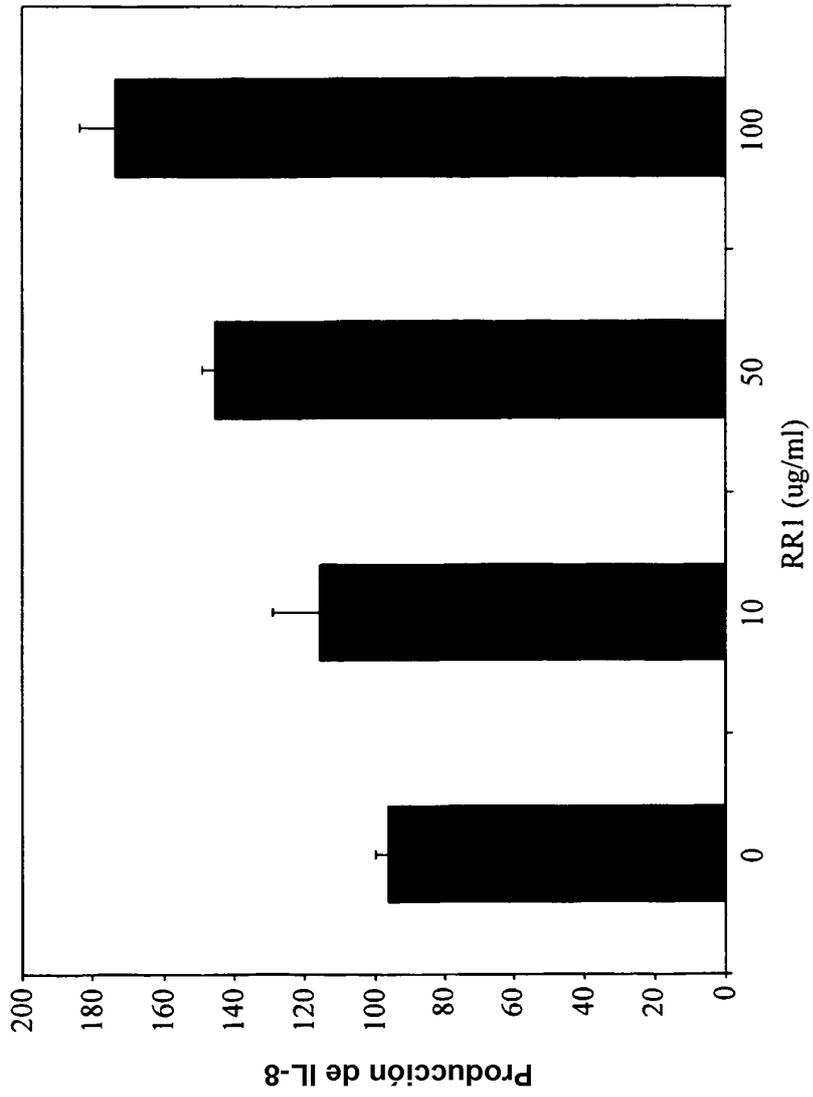


FIG. 19

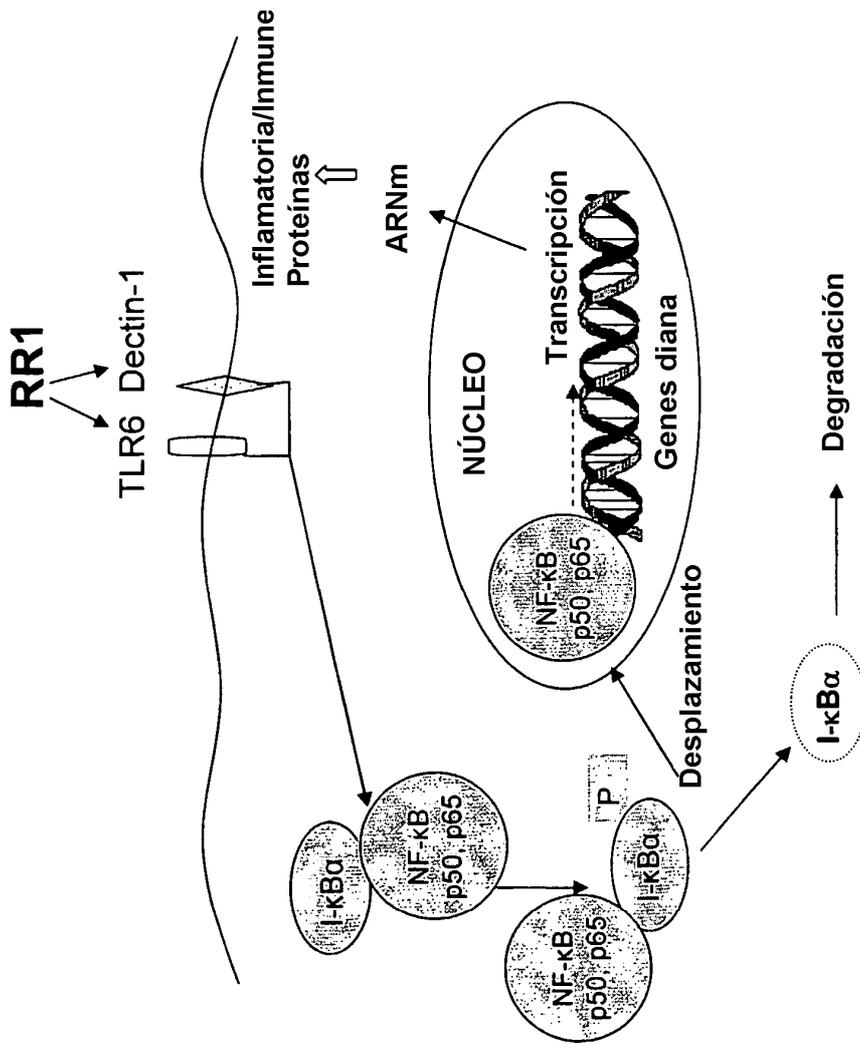


FIG. 20