

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 186**

51 Int. Cl.:

A61K 8/73

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2007 E 07861719 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2066294**

54 Título: **Composiciones inmunomoduladoras y métodos para su uso**

30 Prioridad:

06.11.2006 US 856834 P

16.01.2007 US 880384 P

11.07.2007 US 929755 P

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

05.03.2013

73 Titular/es:

WHITEHEAD INSTITUTE (25.0%)

5 CAMBRIDGE CENTER, ROOM 736

CAMBRIDGE, MA 02142, US;

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

(25.0%);

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

(25.0%) y

BOSTON UNIVERSITY (25.0%)

72 Inventor/es:

RUBIN-BEJERANO, IFAT;

FINK, GERALD R.;

ABEIJON, CLAUDIA;

KOHANE, DANIAL S.;

FULLER, JASON y

LANGER, ROBERT

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 186 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

Composiciones inmunomoduladoras y métodos para su uso.

Declaración sobre el interés del gobierno

5 Esta invención se realizó total o parcialmente con apoyo del gobierno, mediante la subvención nº GM035010-22 concedida a the National Institutes of Health. El gobierno puede tener ciertos derechos en la invención.

Antecedentes de la invención

10 Las paredes celulares de los hongos evocan una poderosa respuesta inmunoestimuladora, y se ha propuesto su uso como fármaco antiinfeccioso y antitumoral potencial. Las células fúngicas también pueden activar a las células dendríticas y cebar las respuestas de células T específicas de antígeno restringidas de clase II. La mayor parte de la pared celular (50-60%) de hongos patógenos (*Candida albicans*) y no patógenos (*Saccharomyces cerevisiae*) está compuesta por una capa interna de β -glucano (β -1,3- y β -1,6-glucano) unida covalentemente a una diversidad de manoproteínas de la superficie celular (Klis, F.M. *et al.*, Med. Mycol., 39, supl. 1, 1-8, 2001; Klis, F.M. *et al.*, FEMS Microbiol. Rev., 26, 239-256, 2002).

15 El reconocimiento de los β -glucanos por macrófagos se realiza principalmente a través de dectina-1 con la cooperación de TLR, incluyendo TLR2 (Brown, G.D. *et al.*, Nature, 413, 36-37, 2001). La actividad dectina-1 es inhibida por β -1,3-glucanos y β -1,6-glucanos, teniendo el mayor efecto las laminarinas de β -1,3-glucano. Sin embargo, los resultados de micromatrices de oligosacáridos demuestran que la dectina-1 se une de modo específico a β -1,3-glucanos. Los neutrófilos son asesinos profesionales, cuyo papel en la fagocitosis y la destrucción de bacterias y hongos está bien caracterizado. Los individuos neutropénicos son mucho más susceptibles a infecciones bacterianas y fúngicas, y el retorno a unos recuentos normales desempeña un papel importante en la resolución de la infección. Los neutrófilos, a diferencia de los macrófagos, requieren del suero para una fagocitosis y destrucción óptimas. Los principales receptores opsónicos son el receptor del complemento CR3 y el receptor de unión a inmunoglobulinas Fc γ R. El CR3 tiene un dominio de lectina (Brown, G.D. *et al.*, Immunity, 19, 311-315, 2003) que media en la mayor movilidad de los neutrófilos hacia una mezcla de β -1,3- y β -1,6-glucano (PGG-glucano) (Wakshull, E. *et al.*, Immunopharmacology, 41, 89-107, 1999). Aunque los neutrófilos expresan la dectina-1 (Taylor, P.R. *et al.*, J. Immunol., 169, 3876-3882, 2002,) su papel en el reconocimiento fúngico aún no está claro.

Sumario de la invención

30 Esta invención proporciona, en una realización, una composición que comprende β -1-6-glucano opcionalmente enriquecido en grupos O-acetilados, conjugado con una partícula o un soporte sólido, o con un resto de transporte dirigido. En una realización, el glucano contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado. En una realización, el glucano se aísla o se deriva de un líquen que, en una realización, pertenece al género *Umbilicariaceae*. En una realización, el glucano se aísla de un hongo. En una realización, el glucano se aísla de una levadura, o en otra realización el glucano se acetila o se sintetiza de modo químico. En otra realización, el glucano se conjuga con una partícula.

35 En otra realización, la composición comprende un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones.

En otra realización, esta invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados.

40 Según este aspecto de la invención, y en una realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende estimular dicha respuesta inmunológica que, en una realización, es una respuesta específica de antígeno. En una realización, la composición comprende también un compuesto inmunoestimulador, o en otra realización, un compuesto quimioterapéutico. En otra realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un agente infeccioso, un cáncer u otro tipo de tumor, una lesión preneoplásica, o sus combinaciones. En otra realización, la respuesta inmunológica no se dirige contra un cáncer u otro tipo de tumor.

50 En otra realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende inframodular o abrogar la respuesta inmunológica. Según este aspecto, y en una realización, la composición comprende además un inmunosupresor. En una realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un autoantígeno, o en otra realización, un alérgeno, o en otra realización, la respuesta inmunológica se dirige contra tejido transplantado, o en otra realización, células transplantadas. En una realización, la composición se administra a un sujeto que padece un trastorno autoinmunitario. En una realización, el trastorno autoinmunitario está asociado con una excesiva actividad de los neutrófilos, infiltración de neutrófilos, desgranulación de neutrófilos, etc. En una realización, el trastorno es un trastorno que afecta a la piel; la composición puede aplicarse directamente a la piel.

55 En otra realización, esta invención proporciona una composición que comprende β -1-6-glucano, en la que el glucano está conjugado con una partícula. Según este aspecto, y en una realización, el glucano está enriquecido en grupos

- 5 O-acetilados, y en una realización, contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado. En otra realización, el glucano se aísla o se deriva de un líquen o de una levadura. En una realización, el glucano se aísla o se deriva de *Umbilicariaceae*. En otra realización, el glucano se acetila o se sintetiza de modo químico. En una realización, el glucano se conjuga con una microesfera que, en una realización, tiene un diámetro de aproximadamente 0,1-15 micrómetros.
- En otra realización, la composición comprende un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones.
- 10 En otra realización, esta invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano, en el que el glucano está conjugado con un soporte sólido, tal como una partícula.
- 15 En otra realización, la invención proporciona una partícula que comprende β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, la partícula consiste en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de β -1-6-glucano en peso seco. En ciertas realizaciones, la partícula consiste fundamentalmente en β -1-6-glucano. Opcionalmente, en ciertas realizaciones, el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados. La invención proporciona además un método para modular la respuesta inmunológica de un sujeto mamífero, que comprende administrar cualquiera de las partículas mencionadas anteriormente, o una composición que contiene cualquiera de las partículas mencionadas anteriormente, al sujeto.
- 20 En una realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende estimular la respuesta inmunológica, que en una realización es una respuesta específica de antígeno. Según este aspecto de la invención y en una realización, la composición comprende además un compuesto inmunoestimulador, o en otra realización, un compuesto quimioterapéutico. En una realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un agente infeccioso, un cáncer u otro tipo de tumor, una lesión preneoplásica o sus combinaciones.
- 25 En otra realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende inframodular o abrogar la respuesta inmunológica. Según este aspecto de la invención, y en una realización, la composición comprende además un inmunosupresor. En una realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un autoantígeno, o en otra realización, un alérgeno, o en otra realización, tejido transplantado, o en otra realización, células transplantadas. En una realización, la composición se administra a un sujeto que padece un trastorno autoinmunitario. En una realización, el trastorno autoinmunitario está asociado con una excesiva actividad de los neutrófilos, infiltración de neutrófilos, desgranulación de neutrófilos, etc. En una realización, el trastorno es un trastorno que afecta a la piel; la composición puede aplicarse directamente a la piel.
- 30 En otra realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, prolongar la remisión, o reducir la incidencia o la gravedad de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano purificado. En otra realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, prolongar la remisión, o reducir la incidencia o la gravedad de un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano purificado.
- 35 En una realización, el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados, que en una realización contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un péptido, un compuesto inmunoestimulador, un compuesto quimioterapéutico o sus combinaciones.
- 40 En una realización, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor, o en otra realización, el péptido se deriva de un antígeno asociado a un tumor.
- En una realización, el sujeto tiene una lesión hiperplásica o preneoplásica. En otra realización, el sujeto tiene cáncer. En otra realización, el sujeto no ha sido diagnosticado de cáncer. En otra realización, el sujeto no ha sido diagnosticado de un tumor.
- 45 En otra realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, o reducir la incidencia o la gravedad de una infección en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que contiene β -1-6-glucano purificado.
- 50 En una realización, el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados, que en una realización contiene al menos 25% en peso del glucano O-acetilado. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un péptido, un compuesto inmunoestimulador, un compuesto quimioterapéutico o sus combinaciones.
- 55 En una realización, el antígeno o el péptido se deriva de la fuente de la infección. En una realización, el compuesto inmunoestimulador es una citoquina. En otra realización, el compuesto quimioterapéutico es un antibiótico o un compuesto antivírico. En una realización, la composición comprende un esteroide. En otra realización, la composición comprende β -1,3-glucanos que tienen ramificaciones de β -1,6-glucano (también denominados beta-1,3/1,6-glucanos o beta-1,3-glucano beta-1,6-ramificado), en los que al menos algunas de las ramificaciones de β -

1,6-glucanos están enriquecidas en grupos O-acetilados. En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende (i) β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados; y (ii) beta-1,3-glucano beta-1,6-ramificado.

5 En una realización, la invención proporciona un suplemento alimentario que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados. En una realización, la invención proporciona un producto alimentario que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados. En otra realización, la invención proporciona una composición cosmética que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados.

10 En otra realización, esta invención proporciona un método para inducir la expresión de proteínas de choque térmico en neutrófilos, comprendiendo dicho método poner en contacto neutrófilos con una composición que comprende β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en grupos O-acetilados. En otra realización, esta invención proporciona un método para inducir la fagocitosis y la producción de especies de oxígeno reactivas en neutrófilos, comprendiendo dicho método poner en contacto neutrófilos con una composición que comprende β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en grupos O-acetilados. En otra realización, esta invención proporciona un método para inducir la expresión de proteínas de choque térmico en neutrófilos, comprendiendo dicho método poner en contacto neutrófilos con una composición que comprende β -1-6-glucano, en el que al menos 25% de las unidades de glucosa en al menos 5% de las moléculas de glucano están enriquecidas en grupos O-acetilados.

15 En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el contacto puede producirse fuera del cuerpo de un sujeto o dentro del cuerpo. En una realización, se retiran células, que en algunas realizaciones son neutrófilos, de un sujeto, se ponen en contacto con la composición, y después se administran al sujeto en un momento posterior. En una realización, las células se ponen en contacto con la composición durante un tiempo suficiente para inducir la expresión de proteínas de choque térmico. En ciertas realizaciones, las células también se ponen en contacto con suero o con uno o más componentes del suero. En una realización, el sujeto recibe una terapia inmunosupresora antes de la administración de las células. Por ejemplo, un sujeto puede necesitar una terapia inmunosupresora para el trasplante de órganos o para otros fines, por ejemplo, quimioterapia o terapia de radiación para el cáncer, leucemia, linfoma, o cualquier tipo de tumor, en la que la terapia tiende a hacer que el individuo esté inmunocomprometido. En una realización de la invención, antes de administrar la terapia inmunosupresora, las células del sistema inmunológico se retiran del sujeto. Las células (que en algunas realizaciones son neutrófilos, o en otras realizaciones, otras células del sistema inmunológico, tales como células presentadoras de antígenos profesionales, tales como macrófagos, células dendríticas, monocitos, células NK, células B u otras) se ponen en contacto fuera del cuerpo con una composición de esta invención, y después se devuelven al sujeto un periodo de tiempo adecuado después de que el sujeto haya recibido la terapia inmunosupresora. El periodo de tiempo adecuado puede ser, por ejemplo, después de que la terapia haya sido administrada o cuando sus efectos citotóxicos hayan disminuido, cuando el sujeto está en peligro de una infección o muestra síntomas o señales de una infección, etc.

20 En una realización, la invención proporciona un método para inducir la expresión de proteínas de choque tóxico en un sujeto, que comprende administrar β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en glucano O-acetilado, a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir la expresión de proteínas de choque térmico en células, por ejemplo, neutrófilos, del sujeto. En una realización, la invención proporciona un método para inducir la producción de especies de oxígeno reactivas en un sujeto, que comprende administrar β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en glucano O-acetilado, a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir la producción de especies de oxígeno reactivas por células, por ejemplo, neutrófilos, del sujeto. En una realización, la invención proporciona un método para potenciar la fagocitosis en un sujeto, que comprende administrar β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en glucano O-acetilado, a un sujeto en una cantidad suficiente para potenciar la fagocitosis por células, por ejemplo, neutrófilos, del sujeto.

25 La invención proporciona además un material revestido que comprende (a) un sustrato; y (b) un compuesto o una composición que comprende β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, el β -1-6-glucano está enriquecido en glucano O-acetilado. En ciertas realizaciones, el material revestido comprende una capa de revestimiento, por ejemplo, un gel o una película, que tiene el β -1-6-glucano físicamente asociado con ella. En ciertas realizaciones, la capa de revestimiento comprende un polímero, por ejemplo, un polímero orgánico, además del β -1-6-glucano, en la que el polímero está físicamente asociado con el β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, el polímero está unido covalentemente al β -1-6-glucano, mientras que en otras realizaciones, el polímero está mezclado o impregnado con el β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, la capa de revestimiento contiene entre 1% y 90% del β -1-6-glucano en peso seco. En ciertas realizaciones, la capa de revestimiento contiene al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% del β -1-6-glucano en peso seco. En ciertas realizaciones, la capa de revestimiento comprende menos del 10%, 20%, 30%, 40%, 50% del β -1-6-glucano en peso seco.

30 En la invención puede utilizarse una diversidad de polímeros diferentes. Algunos polímeros adecuados se describen en la presente. En ciertas realizaciones, el polímero es biodegradable. En estas realizaciones, el compuesto o la composición puede liberarse a medida que el polímero se degrada. En algunas realizaciones, el polímero es una poli(piranososa), poli(ácido hidroxílico), poli(lactona), poli(aminoácido), poli(anhídrido), poli(uretano), poli(ortoéster), poli(fosfazina), poli(fosfoéster), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico), poli(éter éster),

5 poli(aminoácido), poli(aminoácido) sintético, policarbonato, poli(hidroxialcanoato), poli(ϵ -caprolactona), o poli(sacárido), o una mezcla de cualquiera de los anteriores. En ciertas realizaciones, el polímero es un copolímero, que en ciertas realizaciones es un copolímero en bloque, en el que las subunidades son subunidades que se encuentran en cualquiera de los anteriores polímeros. En ciertas realizaciones, un polímero para su uso en la invención tiene un peso molecular medio (por ejemplo, un peso molecular numérico medio o medio ponderado) de al menos 10, 25, 50, 100, 200 o 300 kD, o un valor dentro de cualquier intervalo intermedio. En ciertas realizaciones, un polímero para su uso en la invención está compuesto por una media de entre 100 y 10.000 subunidades monoméricas, o cualquier número de subunidades dentro de cualquier intervalo intermedio. En ciertas realizaciones, el polímero se selecciona de polietileno, polipropileno, poli(cloruro de vinilo), poli(tereftalato de etileno), poliestireno y policarbonato.

10 En una realización, el sustrato es una parte o está en forma de una micropartícula, nanopartícula, venda, sutura, catéter, implante de estenosis, válvula, marcapasos, desfibrilador implantable, conducto, cánula, aparato, andamiaje, línea central (que puede ser un catéter central insertado de modo periférico (línea PICC o PIC)), pesario, tubo, drenaje, implante de derivación, trocar, tapón, u otro implante o dispositivo médico o quirúrgico. En una realización, el catéter es un catéter de la arteria pulmonar, pericárdico, pleural, urinario o intraabdominal. En una realización, el drenaje es un drenaje de fluido cerebroespinal. En una realización, el tubo es un tubo de traqueostomía, endotraqueal o del pecho. En otra realización, el sustrato es una parte o está en forma de un implante, una varilla (por ejemplo, una varilla espinal, tal como una varilla espinal posterior), una placa, un tornillo, un lavador, un cable, una pinza, dispositivos de fijación interna (por ejemplo, dispositivos de fijación de fracturas), u otros aparatos ortopédicos implantables conocidos por los expertos en la técnica.

15 La presente invención también proporciona métodos para utilizar el implante u otro dispositivo. Los implantes y dispositivos pueden utilizarse de cualquier manera en que se emplean sus homólogos convencionales (por ejemplo, homólogos que no comprenden y/o no están revestidos con un compuesto o una composición descritos en la presente), siendo estos métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, debe entenderse que un método de esta invención comprende el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno con el implante o el dispositivo de la invención. La presente invención también proporciona métodos para transportar un compuesto o una composición descritos en la presente que comprenden β -1,6-glucano a un sujeto, comprendiendo dicho método implantar o introducir un material revestido, implante u otro dispositivo que comprende un compuesto o una composición de la invención, en el interior del cuerpo del sujeto. La presente invención también proporciona métodos para transportar un agente terapéutico que no comprende β -1,6-glucano a un sujeto utilizando un implante u otro dispositivo (por ejemplo, un catéter, bomba implantable, línea intravenosa permanente, etc.) que comprende un β -1,6-glucano.

20 En otra realización, esta invención proporciona una composición que comprende β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, por ejemplo un resto que interaccione de modo específico o atraiga a una célula fagocítica. Según este aspecto de la invención y en una realización, el resto de transporte dirigido interacciona de modo específico con una célula infectada, una célula neoplásica, una célula preneoplásica, un patógeno o uno de sus componentes, o es un resto que recluta células fagocíticas, por ejemplo, hacia sitios de neoplasia, preneoplasia, infección, etc. Según este aspecto de la invención y en una realización, el resto de transporte dirigido interacciona de modo específico con una célula infectada, una célula neoplásica, una célula preneoplásica, un patógeno o uno de sus componentes. En una realización, el glucano está enriquecido en grupos O-acetilados, y en una realización, el glucano contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado. En otra realización, el glucano se aísla o se deriva de un líquen o una levadura, que en otra realización pertenece a *Umbilicariaceae*. En una realización, el glucano se acetila o se sintetiza de modo químico. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones. En otra realización, la célula fagocítica es una célula presentadora de antígenos profesional. En otra realización, la célula fagocítica es un neutrófilo.

25 En una realización, el resto de transporte dirigido es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

30 En otra realización, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende un β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, por ejemplo, en el que el resto de transporte dirigido interacciona con una célula fagocítica o atrae a una célula fagocítica, o comprende cualquier realización según se describe en la presente.

35 En una realización, la modulación de dicha respuesta del sistema inmunológico comprende estimular dicha respuesta inmunológica, que en una realización es una respuesta específica de antígeno. En una realización, la composición comprende además un compuesto inmunostimulador, o en otra realización, la composición comprende además un compuesto quimioterapéutico. En una realización, la respuesta inmunológica está dirigida contra un agente infeccioso, un cáncer, una lesión preneoplásica o sus combinaciones, y en otra realización, la respuesta inmunológica depende del complemento.

40 En una realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, o reducir la incidencia o la gravedad de una infección en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, por ejemplo un resto de transporte dirigido que interacciona de modo específico o que atrae a una célula fagocítica, o comprende cualquier

realización descrita en la presente. En una realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un péptido, un compuesto inmunoestimulador, un compuesto quimioterapéutico o sus combinaciones. En una realización, el antígeno o el péptido se derivan de la fuente de la infección. En otra realización, el compuesto inmunoestimulador es una citoquina. En otra realización, el compuesto quimioterapéutico es un antibiótico o un compuesto antivírico.

En una realización, esta invención proporciona un método para estimular o potenciar la expresión de proteínas de choque térmico en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula con una composición que comprende un β -1,6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, por ejemplo, en el que el resto de transporte dirigido interacciona de modo específico o atrae a una célula fagocítica, o comprende cualquier realización descrita en la presente.

En otra realización, esta invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende β -1,6-glucano, en el que dicho glucano está conjugado con una partícula, tal como se describe en la presente.

En otra realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, prolongar la remisión, o reducir la incidencia o la gravedad de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende un glucano según se describe en la presente, por ejemplo, un β -1,6-glucano purificado, una preparación enriquecida en β -1,6-glucano O-acetilado, un β -1,6-glucano conjugado con una partícula, o un β -1,6-glucano unido a un resto de transporte dirigido, o sus combinaciones.

En otra realización, esta invención proporciona una micela que comprende β -1,6-glucano, en la que dicho β -1,6-glucano está opcionalmente enriquecido en glucano O-acetilado. En otra realización, esta invención proporciona una composición que comprende β -1,6-glucano y un polímero biodegradable, en la que dicho polímero biodegradable se degrada para formar restos alfa-hidroxiácido o salicilato biológicamente activos, y dicho β -1,6-glucano está opcionalmente enriquecido en glucano O-acetilado. En otra realización, esta invención proporciona el uso de cualquier glucano, cualquier composición, cualquier micela o sus combinaciones, para cualquier método según se describe en la presente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El β -1,6-glucano estimula la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) en neutrófilos. La inducción de HSP se determinó mediante PCR a tiempo real cuantitativa. Los datos representan la media de dos (A) o al menos tres experimentos con desviación estándar. Se opsonizó a *Candida* (Ca) o esferas con suero humano reunido y se cultivó durante 2 horas con neutrófilos. (A) *Candida albicans* induce HSP en neutrófilos. La inducción en número de veces representa la proporción de neutrófilos + *Candida* a neutrófilos solos. (B) *Candida* inactivada por calor induce unos niveles mayores de HSP. Los resultados de *Candida* destruida por calor se normalizaron para *Candida* destruida por UV. (C-E) El β -1,6-glucano estimula la expresión de HSP. Se revistieron microesferas de 6,0 micrómetros de poliestireno Polybead (esferas) con una cantidad equivalente de uno de los siguientes glucanos: laminarina (lam, β -1,3-glucano de alga), β -1,6-glucano purificado de *Candida albicans* (Ca β -1,6-glucano), pustulano (pus, β -1,6-glucano de líquen), glucano de la cebada (bar, 30% de β -1,3-glucano y 70% de β -1,4-glucano), o dextrano (dex, α -1,6-glucano). Las esferas se opsonizaron con suero humano reunido, o con suero humano reunido inactivado por calor (IH) (D). La inducción en número de veces representa la proporción de neutrófilos + esferas revestidas con glucanos frente a neutrófilos + esferas sin tratar. (C) El β -1,6-glucano fúngico estimula la expresión de HPS. Las esferas se revistieron con β -1,3-glucano purificado de *Candida albicans* (Ca β -1,3-glucano), o con β -1,6-glucano purificado de *Candida albicans* (Ca β -1,6-glucano). (D) El β -1,6-glucano convencional estimula la expresión de HSP. Las esferas se revistieron con laminarina (lam, β -1,3-glucano de alga), o pustulano (pus, β -1,6-glucano de líquen). (E) El β -1,6-glucano soluble y otras esferas revestidas con glucano no estimulan la expresión de HSP. Las esferas se revistieron con β -glucano aislado de la cebada (bar, 30% de β -1,3-glucano y 70% de β -1,4-glucano), o con dextrano (dex, β -1,6-glucano). Los neutrófilos se cultivaron con 5 mg/ml de laminarina soluble (sol lam), 5 mg/ml de pustulano soluble (sol pus), o esferas. La inducción en número de veces representa la proporción de neutrófilos + glucanos solubles frente a neutrófilos solos, o neutrófilos + esferas revestidas con glucano frente a neutrófilos + esferas sin tratar.

Figura 2. La inducción de HSP por el pustulano es debida al β -1,6-glucano. Los neutrófilos se cultivaron con esferas opsonizadas durante 2 horas a 37 °C en A y F. (A) La endo- β -1,6-glucanasa reduce la inducción de HSP por el pustulano. Las esferas se revistieron con una cantidad equivalente de pustulano (pus) o pustulano digerido con endo- β -1,6-glucanasa. La inducción de HSP con el pustulano tratado con la enzima es relativa con respecto a la que se produce con el pustulano no tratado. Los datos representan la media de varios experimentos con desviación estándar. (B) Pustulano cromatografiado en una columna Biogel P6. (C) El pustulano digerido primero con endo- β -1,6-glucanasa y ensayado en una columna P6 genera un pico grande y un pico pequeño. El pico pequeño representa una minúscula fracción del pustulano original que es resistente a la digestión enzimática (V_0). (D) Se demostró mediante una cromatografía en capa fina que el pico grande en C son los productos de la degradación esperados, gentiobiosa y gentiotriosa. El carril 1 contiene oligosacáricos (G a G5) como control. El carril 2 es

pustulano sembrado con glucosa (G). El carril 3 es pustulano digerido con endo- β -1,6-glucanasa. Ori = origen. (E) Cromatografía de pustulano desacetilado. El inserto es una capa superpuesta de V_0 de C y E. (F) La desacetilación del pustulano, seguida de una digestión con endo- β -1,6-glucanasa, elimina la inducción de HSP. La inducción de HSP en pustulano desacetilado o pustulano desacetilado digerido con endo- β -1,6-glucanasa es relativa con respecto a la que se produce con el pustulano no tratado.

Figura 3. El β -1,6-glucano estimula la fagocitosis y la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) en neutrófilos. Se revistieron microesferas de 6 μ m de poliestireno Polybead (esferas) con una cantidad equivalente de los β -glucanos indicados y después se opsonizaron. (A) El β -1,6-glucano estimula la fagocitosis. La fagocitosis se evaluó mediante microscopía de larga duración para las esferas que se habían revestido con laminarina (a y b) o pustulano (c y d). Las imágenes de a y c se tomaron en el momento 0. Las imágenes b y d se tomaron después de cultivar con neutrófilos durante 40 minutos. (B) El β -1,6-glucano estimula la fagocitosis. La fagocitosis se evaluó mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) mediante el cambio en la dispersión lateral para neutrófilos con (a) esferas no tratadas, (b) esferas revestidas con β -1,3-glucano de *Candida*, (c) esferas revestidas con laminarina (lam, β -1,3-glucano), (d) esferas revestidas con glucano de la cebada (bar), (e) esferas revestidas con pustulano (pus, β -1,6-glucano), (f) pustulano soluble. (C) El β -1,6-glucano estimula la producción de ROS. La producción de ROS se ensayó mediante FACS utilizando DHR123. El β -1,3-glucano muestra sólo una estimulación modesta.

Figura 4. Se depositan fragmentos proteolíticos C3 sobre el β -1,6-glucano. Las esferas no se trataron (Esferas), o se revistieron con una cantidad equivalente de laminarina (lam, β -1,3-glucano), o pustulano (pus, β -1,6-glucano). Después de la opsonización, las esferas se suspendieron en SDS al 2%, tampón hidróxido de amonio 1 M, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. La disolución del sobrenadante se cargó sobre un gel de acrilamida al 4-20%-SDS. Se indica la migración de los patrones de peso molecular de proteínas. (A) El gel se incubó con tinte de plata, y las bandas se extrajeron para su análisis mediante espectrometría de masas. (B) Se realizó un análisis de la transferencia Western utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra (a) la cadena alfa, o (b) la cadena beta de C3.

Figura 5. La preincubación de suero con pustulano soluble (β -1,6-glucano) suprime la estimulación de neutrofilos, mientras que la laminarina soluble (β -1,3-glucano) no lo hace. (A) Se evaluó la fagocitosis de esferas revestidas con pustulano mediante FACS, por el cambio en la dispersión lateral. El suero no se trató (a), o se incubó durante 5 minutos a 37 °C con 1 mg (cuantificado mediante el método de fenol-ácido sulfúrico) de laminarina soluble (lam) (b) o pustulano (pus) (c). (B) Se evaluó la producción de especies de oxígeno reactivas en respuesta a esferas revestidas con pustulano mediante FACS utilizando DHR123. El suero no se trató (rojo), se incubó con laminarina soluble (verde), o con pustulano (azul). (C) El depósito de C3 sobre esferas revestidas con pustulano mediante una preincubación del suero fue eliminado por el pustulano soluble, pero no por la laminarina. El depósito de C3 se ensayó mediante un análisis de la transferencia Western utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra (a) la cadena alfa, o (b) la cadena beta de C3. El suero se preincubó con pustulano soluble (1), laminarina (2), o no se trató (3). Se indica el patrón de peso molecular de proteínas. (D) Una preincubación del suero con pustulano soluble reduce la destrucción de *Candida*. El suero no se trató, o se preincubó con pustulano o laminarina soluble antes de la opsonización de *Candida*. Se ensayó la viabilidad de *Candida* utilizando XTT tras una incubación durante 30 minutos con neutrófilos.

Figura 6. El CR3 media en la estimulación de β -1,6-glucano de neutrófilos. Se revistieron microesferas de 6,0 micrómetros de poliestireno Polybead (esferas) con el β -1,6-glucano pustulano (pus). Las esferas se opsonizaron con suero humano reunido y se cultivaron con neutrófilos durante 15 minutos. Los neutrófilos se preincubaron con anticuerpos de bloqueo de CR3 o con control de isotipo IgG durante 30 minutos en hielo antes de cultivar con esferas revestidas con pustulano. (A) Los anticuerpos de bloqueo de CR3 reducen la fagocitosis estimulada por β -1,6-glucano. La fagocitosis de esferas revestidas con pustulano se evaluó mediante FACS por el cambio en la dispersión lateral para neutrófilos preincubados con: (a) control de isotipo IgG, o (b) anticuerpos de bloqueo anti-CR3. (B) Los anticuerpos de bloqueo de CR3 reducen la producción de ROS estimulada por β -1,6-glucano. La producción de ROS en respuesta a esferas revestidas con pustulano se evaluó mediante FACS utilizando DHR123. Los neutrófilos se preincubaron con control de isotipo IgG (verde) o Ab de bloqueo anti-CR3 (rojo).

Figura 7. El β -1,6-glucano induce quimioquinas en monocitos. Se revistieron microesferas de 6,0 micrómetros de poliestireno Polybead (esferas) con una cantidad equivalente del β -1,3-glucano laminarina (lam), o del β -1,6-glucano pustulano (pus). Las esferas se opsonizaron con suero humano reunido. Los monocitos se cultivaron durante 2 horas con 5 mg/ml de laminarina o pustulano soluble, o con las esferas descritas anteriormente. Se determinó la inducción de quimioquinas mediante PCR a tiempo real cuantitativa. Los resultados se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar.

Figura 8. Representación esquemática de la actividad de quimeras de pustulano-anticuerpo en el transporte dirigido celular y el depósito del complemento, que conduce al atrapamiento por neutrófilos. El anticuerpo (Ab) está unido físicamente al polisacárido (PS). El depósito del complemento (C3) recluta a los neutrófilos hacia las células diana como un función de la especificidad del anticuerpo.

Figura 9. Producción de especies de oxígeno reactivas por neutrófilos humanos después de una exposición a quimeras de pustulano-anticuerpo monoclonal anti-*Candida albicans*. Los complejos de anticuerpo anti-*C. albicans* (Ab)-pustulano (pus) (Ab-pus) con un tamaño de 30-100 kDa o mayor que 100 kDa (>100) se cargaron sobre geles de poliacrilamida y se tñieron con plata (A). La producción de ROS se ensayó mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) utilizando DHR123 (B).

Figura 10. El β -1,6-glucano es necesario para una fagocitosis eficaz de *Candida albicans*, la producción de ROS, y la expresión de HSP. Células de *Candida albicans* se destruyeron con calor, se digirieron con una endo- β -1,6-glucanasa y se opsonizaron. (A) El β -1,6-glucano es necesario para una fagocitosis eficaz. La fagocitosis se evaluó mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) por el cambio en la dispersión lateral. (B) El β -1,6-glucano es necesario para una producción de ROS eficaz. La producción de ROS se ensayó mediante FACS utilizando DHR123. (C) El β -1,6-glucano es necesario para la inducción de HSP. Se determinó la inducción de HSP mediante PCR a tiempo real cuantitativa. Los resultados para *Candida* digerida con β -1,6-glucanasa se normalizaron frente a *Candida* sin digerir. Los datos representan la media de dos experimentos con desviación estándar.

Figura 11. (A) El suero de ratón activa el complemento. Las esferas no se trataron (1), o se revistieron con una cantidad equivalente de pustulano (β -1,6-glucano) (2) o laminarina (β -1,3-glucano) (3). Después de una opsonización con suero de ratón (C57Black/6), las esferas se suspendieron en SDS al 2%, tampón hidróxido de amonio 1M, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. La disolución del sobrenadante se cargó sobre un gel de acrilamida al 4-20%-SDS. Se indica la migración de los patrones de peso molecular de proteínas. Se realizó un análisis de la transferencia Western utilizando anticuerpos anti-C3 de ratón. (B) Las esferas revestidas con β -1,6-glucano protegen a los ratones frente a la infección fúngica sistémica. Se inyectaron células de *Candida albicans* (10^6) en la vena de la cola de ratones C57Black/6. Se inyectaron 10^5 esferas revestidas con β -1,6-glucano o esferas sin tratar al día siguiente en la vena de la cola de los mismos ratones. Se controló la supervivencia a diario.

Figura 12. Las esferas de PLGA que encapsulan al β -1,6-glucano provocan la producción de especies de oxígeno reactivas y protegen a los ratones frente a la infección fúngica sistémica. Las esferas de PLGA se fabricaron con 250 mg de polisacárido por mg de PLGA. (A) Imágenes de SEM de esferas de PLGA (a, d), o esferas de PLGA que encapsulan al β -1,3-glucano (b, e) o al β -1,6-glucano (c, f) en el día 0 (a-c) o después de 3 días (d-f). (B) Se detecta β -1,6-glucano sobre la superficie de esferas de PLGA en degradación. Se detecta β -1,6-glucano sobre esferas de PLGA en degradación después de 3 días de incubación en PBS, utilizando anticuerpos policlonales anti- β -1,6-glucano. (C) Las esferas de PLGA que encapsulan al β -1,6-glucano (7,17 microgramos de glucosa/mg de PLGA) (verde) inducen unos niveles mayores de especies de oxígeno reactivas que las esferas de PLGA que encapsulan al β -1,3-glucano (37,1 microgramos de glucosa/mg de PLGA) (rojo). (D) Las esferas de PLGA que encapsulan al β -1,6-glucano protegen a los ratones frente a la infección fúngica sistémica. Se inyectaron células de *Candida albicans* (10^6) en la vena de la cola de ratones C57Black/6. Se inyectaron 10^5 esferas de PLGA que encapsulan al β -1,6-glucano, esferas de PLGA que encapsulan al β -1,3-glucano, o esferas de PLGA al día siguiente en la vena de la cola de los mismos ratones. Se controló la supervivencia a diario.

Figura 13. Se detectan unos niveles altos de IgG sobre el β -1,6-glucano. Las esferas no se trataron (rojo), o se revistieron con una cantidad equivalente de laminarina (β -1,3-glucano) (verde) o pustulano (β -1,6-glucano) (azul). Tras la opsonización, se detectó el depósito de IgM e IgG utilizando anticuerpos anti-IgM e IgG humanas.

Se apreciará que para que los ejemplos sean más sencillos y claros, los elementos mostrados en las figuras no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden haberse exagerado con relación a otros elementos para que sea más claro. Además, cuando se considera apropiado, los números de referencia pueden repetirse en varias figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

Descripción detallada de la presente invención

En la siguiente descripción detallada se ofrecen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión profunda de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención puede practicarse sin estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito con detalle los métodos, los procedimientos y los componentes bien conocidos para no complicar la presente invención.

Los glucanos son polisacáridos que se encuentran en todas las especies estudiadas de hongos liquenizados. Los pustulanos parcialmente O-acetilados son típicos de *Umbilicariaceae*, y se han descrito para varias especies de *Umbilicaria*, tales como *U. pustulata* y *U. hirsute*, *U. anglulata*, *U. caroliniana*, y *U. polyphylla*.

Se ha descubierto que los β -1,6-glucanos inducen la expresión de genes específicos, en contraste con los β -1,3-glucanos, cuya actividad puede ser útil para modular las respuestas inmunológicas. Sin pretender ninguna limitación, se ha descubierto que los β -1,6-glucanos O-acetilados son útiles en este contexto. Sin pretender ninguna limitación, también se ha descubierto que los β -1,6-glucanos inducen la fagocitosis y la producción de especies de oxígeno reactivas por los neutrófilos. Las especies de oxígeno reactivas son un componente importante del mecanismo de destrucción en neutrófilos y, por tanto, esta actividad del β -1,6-glucano puede ser útil para modular respuestas inmunológicas. En una realización, la invención proporciona un método para inducir la producción de especies de

oxígeno reactivas en un sujeto, que comprende administrar β -1,6-glucano, opcionalmente enriquecido en glucano O-acetilado, a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir la fagocitosis y la producción de especies de oxígeno reactivas por células, por ejemplo, neutrófilos, del sujeto. Las especies de oxígeno reactivas (ROS) incluyen moléculas tales como iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos inorgánicos y orgánicos. En ciertas realizaciones, son moléculas pequeñas y son muy reactivas debido a la presencia de electrones de la cubierta de valencia desapareados. En una realización, la ROS es superóxido.

Esta invención proporciona una composición que comprende β -1-6-glucano purificado, en la que la composición es, en diversas realizaciones de la invención, una composición farmacéutica, un alimento o un producto alimentario, un suplemento alimentario, o una composición cosmética. La composición es, en algunas realizaciones, diferente de composiciones tales como el pustulano o preparaciones de paredes celulares fúngicas. En ciertas realizaciones de la invención, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o más del glucano contenido en la composición en peso es β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, entre 20% y 50% del glucano contenido en la composición es β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, entre 50% y 100% del glucano contenido en la invención, el glucano contiene de aproximadamente 15% a aproximadamente 30% en peso de β -1-6-glucano. En otra realización de cualquiera de las composiciones o de los métodos de la invención, el glucano contiene de aproximadamente 10% a aproximadamente 35% en peso de β -1-6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en peso de β -1-6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente 25% a aproximadamente 60% en peso de β -1-6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente 35% a aproximadamente 80% en peso de β -1-6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente 18% a aproximadamente 35% en peso de β -1-6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente 15% a aproximadamente 75% en peso de β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones de la invención, "peso" se refiere a "peso seco". En otras realizaciones, "peso" se refiere al peso total. En ciertas realizaciones de la invención, el β -1-6-glucano está procesado. Este procesamiento puede comprender, por ejemplo, una desacetilación, un tratamiento con enzimas que digieren glucanos distintos al β -1-6-glucano, una digestión limitada con enzimas que digieren al β -1-6-glucano, la selección de intervalos de pesos moleculares concretos, etc. En ciertas realizaciones, el procesamiento comprende la separación de otros glucanos, por ejemplo, β -glucanos, β -1-3-glucanos, etc. En ciertas realizaciones, el procesamiento comprende eliminar las cadenas laterales de β -1-6-glucano de β -1-3-glucanos, y opcionalmente separar las cadenas laterales de β -1-6-glucanos. En ciertas realizaciones, la composición comprende β -1-6-glucano procesado, en la que el β -1-6-glucano procesado muestra una mayor capacidad para modular, de modo deseable, la respuesta inmunológica con respecto a glucanos sin procesar o con relación a β -1-6-glucanos sin procesar.

Esta invención proporciona, en una realización, una composición que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados. En una realización de cualquiera de las composiciones o de los métodos de la invención, el glucano contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado. En una realización de cualquiera de las composiciones o de los métodos de la invención, el glucano contiene de aproximadamente 15% a aproximadamente 30% en peso de glucano O-acetilado. En otra realización de cualquiera de las composiciones o de los métodos de la invención, el glucano contiene de aproximadamente 10% a aproximadamente 35% en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50% en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente 25% a aproximadamente 60% en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente 35% a aproximadamente 80% en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente 18% a aproximadamente 35% en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente 15% a aproximadamente 75% en peso de glucano O-acetilado. En otras realizaciones, el glucano contiene entre aproximadamente 75% y 100% en peso de glucano O-acetilado, por ejemplo, entre 75% y 90%, o entre 90% y 100% en peso de glucano O-acetilado. En una realización de cualquiera de las composiciones o de los métodos de la invención, el glucano contiene aproximadamente el porcentaje de unidades de glucosa O-acetilada (en peso o número, en diversas realizaciones de la invención) que se produciría tras la digestión de un β -1-6-glucano natural (por ejemplo, pustulano o cualquier otro β -1-6-glucano mencionado en la presente) con una β -1-6-endoglucanasa durante un tiempo suficiente para digerir al menos 90% en peso del β -1-6-glucano para producir oligosacáridos que comprenden 5 o menos unidades de glucosa, seguido de (i) la eliminación de los oligosacáridos que comprenden 5 o menos restos glucosa de la composición, o (ii) el aislamiento de una porción de la composición resultante que tiene un peso molecular mayor que 5 kD, o en algunas realizaciones, mayor que 10, 20, 30, 50 o 100 kD.

En algunas realizaciones, la expresión "enriquecidos en restos O-acetilados" se refiere a una mayor proporción de sitios O-acetilados en las unidades de glucosa individuales dentro de la molécula de glucano, una mayor proporción de unidades de glucosa O-acetilada dentro de la molécula de glucano, o sus combinaciones, comparado con una molécula de glucano nativa. En una realización, la referencia a preparaciones de glucano enriquecidas en glucano O-acetilado en un porcentaje de peso concreto se refiere a preparaciones que comprenden una mayor proporción de sitios O-acetilados en unidades de glucosa individuales dentro de la molécula de glucano, una mayor proporción de unidades de glucosa O-acetilada dentro de la molécula de glucano, o sus combinaciones, comparado con una molécula de glucano.

5 Los glucanos derivados de diferentes fuentes pueden comprender cantidades diversas de O-acetilación, en términos de sitios O-acetilados en unidades de glucosa individuales, unidades de glucosa O-acetilada dentro de la molécula de glucano, o sus combinaciones. Según este aspecto de la invención, la expresión “enriquecido en glucano O-acetilado” se refiere, en algunas realizaciones, a una mayor O-acetilación, según se describe en la presente, entre la fuente de referencia de la cual se deriva el glucano, y puede no representar un enriquecimiento global comparado con cualquier fuente de glucano.

10 En una realización, la expresión “enriquecido en glucano O-acetilado” se refiere a un enriquecimiento de al menos 25% en peso de las cadenas de glucano, que están O-acetiladas en al menos una unidad de glucosa, o al menos 25% de las unidades de glucosa presentes en el glucano en la composición están O-acetiladas, o sus combinaciones. En algunas realizaciones, al menos 25% de las unidades de glucosa en al menos 1%, o en otra realización, al menos 5% de las cadenas-beta del glucano están O-acetiladas. En otras realizaciones, entre 25% y 35%, entre 25% y 50%, entre 25% y 75%, entre 15% y 45%, entre 20% y 60%, entre 35% y 80%, u otras de las unidades de glucosa en al menos 5% de las cadenas-beta del glucano está O-acetiladas, etc. En otras realizaciones, entre 25% y 35%, entre 25% y 50%, entre 25% y 75%, entre 15% y 45%, entre 20% y 60%, entre 35% y 80%, u otras de las unidades de glucosa en al menos 10% de las cadenas-beta del glucano, o en otra realización, en al menos 15% de las cadenas-beta del glucano, o en otra realización, en al menos 20% de las cadenas-beta del glucano están O-acetiladas.

20 En una realización, el glucano se aísla o se deriva de un líquen, que en una realización pertenece al género *Umbilicariaceae*. En una realización, el glucano se aísla de un hongo. En una realización, el hongo es una seta comestible, entre otras, *Grifola frondosa* (maitake), *Cordyceps sinensis*, *Agaricus brasiliensis*, *Inonotus obliquus* (chaga). En una realización, el glucano se aísla de una levadura, o en otra realización, el glucano se acetila o se sintetiza de modo químico. En una realización, los polímeros de β -1-6-glucano sintéticos cortos se unen a través de conectores (por ejemplo, diamina) para formar polímeros largos. En otra realización, el glucano se conjuga a un soporte sólido.

25 Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa que se encuentran, entre otros, en las paredes celulares de hongos. Los α -glucanos incluyen uno o más enlaces- α entre las subunidades de glucosa, y los β -glucanos incluyen uno o más enlaces- β entre las subunidades de glucosa.

30 Los β -1,6-glucanos aparecen con frecuencia en hongos pero son poco frecuentes fuera de este reino. El glucano utilizado según la invención comprende β -1,6-glucano. En algunas realizaciones, los β -glucanos se derivan de *Umbilicariaceae*, tales como *U. pustulata* y *U. hirsute*, *U. angulata*, *U. caroliniana*, y *U. polyphylla*.

35 En algunas realizaciones, los β -glucanos se derivan de *Candida*, tal como *C. albicans*. Otros organismos cuyos β -glucanos pueden utilizarse incluyen *Coccidioides immitis*, *Trichophyton verrucosum*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, y *Pythium insidiosum*. En algunas realizaciones, los β -glucanos se sintetizan de modo químico o enzimático, tal como se conoce en la técnica, o en otras realizaciones, los β -glucanos se derivan de cualquier especie que los produzca, y se alteran de modo químico o enzimático, por ejemplo, para aumentar la O-acetilación de la molécula.

40 En algunas realizaciones, los β -glucanos son glucanos fúngicos. Un glucano “fúngico” en general se obtiene de un hongo, pero cuando una estructura de glucano concreta se encuentra en hongos y en organismos que son hongos (por ejemplo, en bacterias, plantas inferiores o algas), entonces el organismo que no es un hongo puede utilizarse como fuente alternativa.

45 Los β -glucanos nativos de longitud completa son insolubles y tienen un peso molecular en el intervalo de los megadaltons. En algunas realizaciones, esta invención proporciona β -1,6-glucano soluble. En otras realizaciones, esta invención proporciona β -1,6-glucano O-acetilado soluble. La solubilización puede lograrse fragmentando glucanos insolubles largos, en algunas realizaciones. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante hidrólisis, o en algunas realizaciones, mediante digestión con una glucanasa (por ejemplo, con β -1,3-glucanasa, o una digestión limitada con β -1,3-glucanasa). En otras realizaciones, los glucanos pueden prepararse de modo sintético, por ejemplo, y en algunas realizaciones, uniendo bloques constituyentes de monosacáridos. La O-acetilación de estos glucanos puede realizarse con facilidad mediante métodos conocidos en la técnica. Estos métodos pueden incluir la acetilación química y/o enzimática, tal como se conoce en la técnica.

50 Existen diversas fuentes de β -glucanos fúngicos. Por ejemplo, están disponibles en el mercado β -glucanos puros, por ejemplo, el pustulano (Calbiochem) es un β -1-6-glucano purificado a partir de *Umbilicaria papulosa*. Los β -glucanos pueden purificarse a partir de las paredes celulares fúngicas de diversas maneras, por ejemplo, tal como se describe en Tokunaka *et al.*, (1999), Carbohydr. Res., 316:161-172, y el producto puede enriquecerse en restos β -1,6-glucano, o en restos β -1,6-glucano O-acetilados, mediante métodos conocidos en la técnica.

55 Los expertos en la técnica serán capaces de identificar o seleccionar métodos apropiados para enriquecer en restos β -1,6-glucano y/o β -1,6-glucano O-acetilado. En una realización, la O-acetilación del beta-glucano se realiza de modo químico. Por ejemplo, se secan polisacáridos (50 mg) en una centrífuga Speed-Vac, y se resuspenden en 1,5

ml de anhídrico acético (Mallindcrokdt). Después de la resuspensión, se añaden unos cuantos cristales de 4-dimetilaminopiridina (Avocado Research Chemist, Ltd.) como catalizador. Se deja que la reacción se desarrolle a temperatura ambiente durante 5, 20 o 120 minutos, y después se detiene con 2 volúmenes de agua. Después las muestras se dializan durante la noche frente a agua. Se apreciará que este proceso puede variar o escalarse, tal como será evidente para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, los métodos para separar el β -1,6-glucano O-acetilado incluyen una o más de las siguientes etapas, que pueden realizarse en diverso orden: (a) una separación basada en la mayor hidrofobicidad, tal como la unión a cualquier resina/matriz hidrófoba; (b) una separación basada en la digestión, con una endo- o exoglucanasa apropiada, o sus combinaciones, en la que el β -1,6-glucano O-acetilado es resistente a la digestión; (c) una separación por afinidad utilizando anticuerpos u otros restos que se unen al β -1,6-glucano o a los grupos O-acetilo que porta; (d) una separación basada en el peso molecular. En una realización, el β -1,6-glucano se digiere con una enzima que digiere el β -1,6-glucano no acetilado y/o ligeramente acetilado. El material resultante se separa basándose en el tamaño o en el peso molecular, y se aísla una porción que comprende el glucano muy acetilado. En algunas realizaciones, se obtienen preparaciones de β -1,6-glucano, se digieren y se separan los oligosacáridos O-acetilados, o en otra realización, se aíslan y se utilizan para la preparación de nuevas composiciones. Estas composiciones representan realizaciones de las preparaciones de β -1,6-glucano enriquecidas en restos O-acetilados de esta invención.

Debe entenderse que los productos de cualquier proceso para preparar preparaciones enriquecidas en β -1,6-glucano O-acetilado se consideran parte de esta invención.

En algunas realizaciones, los glucanos para su uso en las composiciones, las preparaciones, las micelas y/o según los métodos de esta invención pueden comprender modificaciones estructurales, no presentes en las preparaciones de glucano nativas. Estas modificaciones pueden comprender la O-acetilación, según se describe en la presente. En otras realizaciones, estas modificaciones pueden comprender la metilación, la alquilación, la alcoilación, la sulfación, la fosforilación, la conjugación de lípidos u otras modificaciones, tal como conocen los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la modificación comprende la modificación (por ejemplo, esterificación) con un ácido, tal como el ácido fórmico, succínico, cítrico u otro ácido conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, la conjugación de lípidos a cualquiera o a todos los grupos hidroxilo libres puede realizarse mediante cualquiera de una serie de medios conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Drouillat B., *et al.*, enero de 1998, 87(1):25-30; B.N.A. Mbadugha, *et al.*, *Org. Lett.*, 5(22), 4041-4044, 2003.

En algunas realizaciones, la metilación puede realizarse y verificarse según cualquiera de una serie de medios conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Mischnick *et al.*, 1994, *Carbohydr. Res.*, 264, 293-304; Bowie *et al.*, 1984, *Carbohydr. Res.*, 125, 301-307; Sherman y Gray, 1992, *Carbohydr. Res.*, 231, 221-235; Stankowski y Zeller, 1992, *Carbohydr. Res.*, 234, 337-341; Harris, P.J., *et al.* (1984), *Carbohydr. Res.*, 127, 59-73; Carpita, N.C. y Shea, E.M. (1989), Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates, en *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS* (Biermann, C.J. y McGinnis, G.D., eds.), pp. 157-216, CRC Press, Boca Ratón, FL.

En algunas realizaciones, la metilación puede confirmarse mediante GLC de éteres, acetatos u otros ésteres derivados también con TMS, acoplada con MS, o digestión para producir monosacáridos, des-O-metilación y análisis mediante derivatización y GLC/MS, por ejemplo, según se describe en Pazur, 1986, *Carbohydrate Analysis - A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, pp. 55-96; Montreuil *et al.*, 1986, *Glycoproteins*, en M.F. Chaplin y J.F. Kennedy (eds.), *Carbohydrate Analysis - A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, pp. 143-204; Sellers *et al.*, 1990, *Carbohydr. Res.*, 207, C1-C5; O'Neill *et al.*, 1990, Pectic polysaccharides of primary cell walls, en P.M. Dey (ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, volumen 2, *Carbohydrates*, Academic Press, Londres, pp. 415-441; Stephen *et al.*, 1990, *Methods in Plant Biochemistry*, volumen 2, *Carbohydrates*, Academic Press, Londres, pp. 483-522; o Churms, 1991, *CRC Handbook of Chromatography, Carbohydrates*, volumen II, CRC Press, Boca Ratón, Florida, EEUU.

En algunas realizaciones, la fosforilación, que incluye opcionalmente la introducción de otras modificaciones, y la verificación del producto obtenido puede realizarse por medios muy conocidos por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Brown, D.H., *Biochem. Biophys. Acta*, 7, 487 (1951); Roseman, S., y Daffner, I., *Anal. Chem.*, 28, 1743 (1956); Kornberg, A., y Horecker, B.L., en *Methods in enzymology*, vol. I, Academic Press, Nueva York, 1955, p. 323; patente de EEUU nº 4.818.752.

En algunas realizaciones, la sulfación del glucano y la verificación del producto obtenido puede realizarse por medios muy conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en Alban, S., y Franz, G. (2001), *Biomacromolecules*, 2, 354-361; Alban, *et al.* (1992), *Arzneimittelforschung*, 42, 1005-1008; o Alban, S., *et al.* (2001), *Carbohydr. Polym.*, 47, 267-276.

La invención también proporciona una micela que comprende β -1,6-glucano. En ciertas realizaciones, la micela comprende un complejo compuesto de moléculas de tensioactivo que comprenden β -1,6-glucano, que pueden estar dispersadas en un coloide líquido. En ciertas realizaciones, las moléculas de tensioactivo son anfílicas, es decir, contienen grupos hidrófobos (sus "colas") y grupos hidrófilos (sus "cabezas"). En ciertas realizaciones, el componente hidrófilo comprende β -1,6-glucano, opcionalmente modificado según una cualquiera o más de las maneras descritas en la presente. En ciertas realizaciones, una micela en disolución acuosa forma un agregado con las regiones de

“cabeza” hidrófilas en contacto con el disolvente circundante, secuestrando las regiones de cola hidrófobas en el centro de la micela. La micela puede tener una forma globular y más o menos esférica, pero en ciertas realizaciones, la micela es un elipsoide, cilindro, o bicapa. En algunas realizaciones, la micela es una micela polimérica, tal como la descrita en la publicación de EEUU nº 20020035217. En algunas realizaciones, la micela encapsula a un agente activo, por ejemplo, una molécula hidrófoba. Los ejemplos de agentes activos incluyen agentes antiinfecciosos, tales como agentes antibacterianos, antivíricos, antifúngicos, antiparasitarios; agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer; compuestos inmunoestimuladores, antígenos, adyuvantes, etc.

La invención también proporciona un β -1,6-glucano que está modificado mediante su conjugación con un lípido, en el que la modificación, en algunas realizaciones, permite la creación de una micela que comprende un β -1,6-glucano que tiene el lípido unido a él. El lípido puede ser un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el lípido comprende un ácido graso. En algunas realizaciones, el lípido, por ejemplo, un ácido graso, contiene entre 4 y 26, o entre 4 y 40 átomos de carbono.

La presente invención también proporciona una partícula que comprende β -1,6-glucano unido covalente o no covalentemente a una partícula que comprende o que consiste fundamentalmente en glucano de levadura. También se proporciona un β -1,6-glucano que comprende un resto reactivo capaz de reaccionar con un grupo funcional de un glucano de levadura para formar un enlace covalente. El glucano de levadura comprende β -1,6-glucano, β -1,3-glucano, otros glucanos, o sus combinaciones.

La invención también proporciona una composición que comprende β -1,6-glucano y un polímero biodegradable. En algunas realizaciones, el polímero biodegradable comprende subunidades biológicamente activas. El término “biodegradable” se refiere a un material que se degrada, es decir, se rompe en fragmentos más pequeños, en el entorno biológico de la célula o del sujeto en el que se encuentra. En una realización, la biodegradación implica la degradación de un polímero en sus subunidades componentes a través, por ejemplo, de una hidrólisis enzimática o no enzimática, digestión, etc. En una realización, la biodegradación puede implicar la ruptura de enlaces (covalentes u otros) en el esqueleto del polímero. En otra realización, la biodegradación puede implicar la ruptura de un enlace (covalente u otro) interno en una cadena lateral o el enlace que conecta una cadena lateral con el esqueleto del polímero. En algunas realizaciones, los productos de la degradación son metabolizables por el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto puede utilizar los productos de la degradación para la síntesis de biomoléculas más grandes. En algunas realizaciones, los productos de la degradación son excretados o eliminados de otra forma por el sujeto. En algunas realizaciones, el polímero y/o sus productos de degradación son biocompatibles porque son sustancialmente no tóxicos y no producen una respuesta inflamatoria o inmunológica inaceptable cuando se administran o se introducen de otro modo en el cuerpo de un sujeto en cantidades coherentes con la presente invención.

En algunas realizaciones, un polímero biodegradable que encapsula a los glucanos de esta invención comprende partículas de esta invención. En algunas realizaciones, estos polímeros pueden comprender poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polímeros bioabsorbibles hidrófobos, tales como poliglicólido, polilactida (D, L, DL), polidioxanonas, poliéstercarbonatos, polihidroxialconatos, policaprolactona (polilactonas), polietilenglicol, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato acetato de celulosa, y la serie de Ludragit R, L y E de polímeros y sus mezclas de copolímeros, y copolímeros preparados a partir de dos o más precursores de los anteriores, por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en las patentes de EEUU nº 7.060.299, 6.998.115, 6.048.551.

La expresión “agente biológicamente activo” incluye agentes terapéuticos que proporcionan un efecto terapéuticamente deseable cuando se administran a un animal (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) en cantidades eficaces, entendiendo que no todos los sujetos se beneficiarán del agente. En algunas realizaciones, el polímero es un polianhídrido, que comprende opcionalmente alfa-hidroxiácidos y salicilatos biológicamente activos. La degradación del polímero libera dichos alfa-hidroxiácidos y salicilatos biológicamente activos. En algunas realizaciones, el β -1,6-glucano está unido covalente o no covalentemente al polímero biodegradable. Los polímeros y los métodos para su fabricación adecuados se describen, por ejemplo, en las publicaciones de EEUU nº 20030035787 y 20050053577. En ciertas realizaciones, el polímero comprende entre 10 y 1000, o entre 50 y 500, o aproximadamente 100 monómeros. En una realización, el polímero es polyaspirin®. Los métodos para preparar un compuesto en el que un β -1,6-glucano está unido covalentemente al polímero serán evidentes para los expertos en la técnica. El β -1,6-glucano puede unirse covalentemente a un monómero antes de la polimerización, o puede conjugarse con un grupo funcional del polímero después de la polimerización. En algunas realizaciones, el β -1,6-glucano se une covalentemente a través de un grupo conector. Los ejemplos de grupos conectores se describen en la publicación de EEUU nº 20050053577, y otros serán evidentes para los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la composición comprende una partícula que comprende β -1,6-glucano y el polímero biodegradable. En algunas realizaciones, la partícula se reviste o se impregna con β -1,6-glucano. En algunas realizaciones, el β -1,6-glucano está unido covalentemente al polímero. En algunas realizaciones, la composición reviste un implante u otro dispositivo médico o quirúrgico, según se describe en otro punto en la presente.

También se proporcionan métodos para administrar un β -1,6-glucano y un alfa-hidroxiácido o salicilato biológicamente activo a un sujeto, comprendiendo dicho método administrar una composición que comprende β -1,6-

glucano y un polímero biodegradable que comprende dichos alfa-hidroxiácidos y/o salicilatos biológicamente activos al sujeto, o implantar o introducir un dispositivo que comprende dicho polímero y dichos alfa-hidroxiácidos y/o salicilatos biológicamente activos en un sujeto.

5 En algunas realizaciones, esta invención proporciona glucanos de bajo peso molecular, que tienen un peso molecular menor que 100 kDa (por ejemplo, menor que 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 o 15 kDa). En algunas realizaciones, esta invención proporciona oligosacáridos, por ejemplo, que contienen 85 o menos (por ejemplo, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4) unidades del monosacárido glucosa.

10 En algunas realizaciones de cualquiera de las composiciones, partículas, materiales revestidos, o dispositivos de la invención que comprenden β -1,6-glucano, el β -1,6-glucano comprende o consiste fundamentalmente en un glucano de bajo peso molecular. En algunas realizaciones de cualquier método de la invención en el que se utiliza β -1,6-glucano, el β -1,6-glucano comprende o consiste fundamentalmente en un glucano de bajo peso molecular. Opcionalmente, al menos una parte del β -1,6-glucano de bajo peso molecular en cualquiera realización de la
15 invención está enriquecida en grupos O-acetilados.

Una técnica habitual para determinar el tipo de enlace y la estructura en glucanos es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C). El número y las intensidades relativas de las señales de ^{13}C en un espectro concreto pueden utilizarse para determinar las posiciones y las configuraciones de enlaces en
20 polímeros de glucano. Por ejemplo, los desplazamientos químicos (señales) de átomos de carbono implicados en un enlace glicosídico se desplazan mucho campo abajo (hasta 9 ppm), comparado con los correspondientes carbonos fuera del enlace.

Esta invención proporciona, en algunas realizaciones, una composición que comprende β -1-6-glucano, en el que el glucano está conjugado con un soporte sólido. En una realización, el soporte sólido es una esfera o una partícula.

25 En una realización, las esferas o las partículas a las cuales se conjugan los glucanos comprenden proteínas desnaturalizadas (por ejemplo, albúmina de suero humana (Benacerraf *et al.*, 1957, Brit. J. Exp. Path., 38:35), materiales insolubles (por ejemplo, negro de carbono, sílice, dióxido de silicio, poliestireno, látex), óxidos metálicos (por ejemplo, óxidos de titanio, óxidos de hierro), y tinta de India (es decir, una suspensión de partículas de carbono coloidales) (descrita en Reichard y Filkins, 1984, The Reticuloendothelial System: A Comprehensive Treatise, pp. 73-101 (Plenum Press), y las referencias en ello), hidrogeles (por ejemplo, según se describe en la publicación de
30 patente de EEUU nº 20050191361), esferas o micropartículas de sefaroza o agarosa. En algunas realizaciones, las esferas o las micropartículas se forman a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, poli(α -hidroxiácido), tales como poli(lactida-co-glicólido), un poli(ácido hidroxibutírico), un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.). Las esferas o las partículas de la presente invención pueden comprender eritrocitos (RBC) que han sido purgados del citoplasma, conocidos como RBC "fantasma", bacterias (bacterias que son eliminadas por RES; véase, por ejemplo, Benacerraf y Miescher, 1960, Ann. NY Acad. Sci., 88:184-195),
35 fragmentos celulares, liposomas, bacteriófagos, fragmentos de bacteriófagos, y cápsidas víricas sin los ácidos nucleicos víricos (por ejemplo, partículas de antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B), etc.

En una realización, la conjugación a la partícula o al soporte sólido es a través de la reticulación por medios químicos de la partícula/sólido a los glucanos de esta invención. La química de la reticulación es muy conocida en la
40 técnica. La naturaleza del reactivo de reticulación utilizado para conjugar el glucano y el sólido (por ejemplo, esfera o partícula) puede ser cualquier reactivo conocido en la técnica. Debe entenderse que cualquier agente reticulante adecuado puede utilizarse, teniendo cuidado de que se mantenga la actividad del glucano.

En algunas realizaciones, el glucano se une a un resto de transporte dirigido, tal como se describe más a fondo en la presente. En algunas realizaciones, el término "conjugado", "unido" o "enlazado" y sus formas gramaticales se refieren a cualquier asociación entre las moléculas indicadas. En algunas realizaciones, este enlace es covalente, y en algunas realizaciones, este enlace no es covalente. En algunas realizaciones, este enlace es directo, y en algunas realizaciones, se realiza a través de una molécula conectora.
45

En algunas realizaciones, este enlace se realiza a través de cualquier medio conocido en la técnica, y tal como se describe en la presente. Por ejemplo, y en algunas realizaciones, el enlace puede ser a través de la formación de un enlace amida, uretano, imina o disulfuro entre las respectivas moléculas, o entre un resto conector con las respectivas moléculas. Debe entenderse que no existe limitación con respecto al esqueleto químico de las moléculas conectoras. En algunas realizaciones, el esqueleto del conector puede ser biocompatible, no inmunogénico y/o hidrosoluble. En algunas realizaciones, el conector puede comprender polietilenglicol (PEG), que también comprende grupos químicos activos que favorecen el enlace, tal como se describe en la presente.
50

55 En algunas realizaciones, otros conectores que pueden utilizarse con facilidad para este fin comprenden alcanos, poliésteres, poliiminas, poliácidos, proteínas, péptidos, ADN, ARN, otros glucanos, lípidos, sacáridos, polisacáridos, nanotubos de carbono, dendrímeros, o partículas sólidas, tales como, por ejemplo, polímeros, metales, sales, materiales inorgánicos, etc.

La partícula puede ser un fragmento de un bacteriófago o de una bacteria.

En ciertas realizaciones, el tamaño de la partícula es el apropiado para su ingestión por los macrófagos, los neutrófilos, o ambos. La partícula puede tener cualquiera de las composiciones descritas en la presente. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una población de partículas, en la que al menos 50% de las partículas tienen un tamaño apropiado para su ingestión por los macrófagos, los neutrófilos, o ambos. La invención proporciona poblaciones de partículas, en las que al menos 50%, 75% o 90% de las partículas se encuentran dentro de un intervalo de tamaño deseado. En ciertas realizaciones, los intervalos de tamaño deseados están dentro de $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$, $\pm 40\%$ o $\pm 50\%$ de un valor concreto. El valor puede ser, por ejemplo, 20 nm, 100 nm, 500 nm, 1, 5, 10, 20, 50 micrómetros, etc. Las partículas en cualquiera de estas realizaciones pueden tener cualquiera de las composiciones descritas en la presente. La población puede comprender partículas que tienen diferentes composiciones, en cualquier proporción. Las poblaciones de partículas pueden utilizarse para cualquiera de los fines descritos en la presente, y los métodos para este uso son un aspecto de esta invención.

Los reactivos reticulantes que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a p-azidobenzoil hidrazida, N-(4-[p-azidosalicilamido]butil)-3'-(2'-piridilditio)propionamida, bis(beta-[4-azidosalicilamido]etil)disulfuro, 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxi-butano, 1,6-bismaleimidohexano, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobeneno, adipimidato de dimetilo-2HCl, suberimidato de dimetilo-2HCl, adipodimidato de dimetilo-2HCl, pimelimidato de dimetilo-2HCl, glutarato de disuccinimidilo, tartrato de disuccinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilanonopropil]carbodiimida, ácido (N-hidroxisuccinimidil)-4-azidosalicílico, 2-[7-azido-4-metilcumarin -3-acetamidometil-1,3-aminopropionato de sulfosuccinimidilo, N-succinimidil-4-yodoacetilaminobenzoato, N-succinimidil-3-[2-piridilitio]propionato, y 6-[3-(2-piridilatio)propionamida]hexanoato de succinimidilo (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). En una realización, los glucanos se derivatizan según se describe en Nature Methods, vol. 2, nº 11, p. 845, 2005, o una estrategia similar. En una realización, los glucanos se derivatizan con un resto que proporciona una amina primaria reactiva libre utilizando un reactivo tal como 2,6-diaminopiridina (DAP). La base de Schiff de azometina puede reducirse, por ejemplo, mediante cianoborohidruro de sodio para producir una amina secundaria estable. En una realización, el glucano derivatizado entonces se hace reaccionar con un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), tal como NHS-biotina.

Otros reactivos reticulantes comprenden grupos funcionales aldehído, imida, ciano, halógeno, carboxilo, carboxilo activado, anhídrido y maleimida. En algunas realizaciones, el reactivo reticulante puede comprender reactivos reticulantes heterobifuncionales, tales como ABH, M2C2H, MPBH y PDPH (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Véase, por ejemplo, Hermanson, G.T. (1996), Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., para un análisis más a fondo de reactivos y métodos de reticulación.

En otra realización, la conjugación del glucano a las esferas o a las partículas puede realizarse a través del uso de esferas que comprenden grupos funcionales que pueden conjugarse según métodos como los descritos, por ejemplo, en Brumeau *et al.*, Genetic Engineering News, 1 de octubre, 1995, p. 16.

También es posible conjugar las esferas/partículas/sólido/resto de transporte dirigido al glucano por medios no covalente. Una manera conveniente para lograr una conjugación no covalente comprende la utilización de anticuerpos contra el glucano, que se unen covalente o no covalentemente a la partícula, esfera, etc. En otra realización, la conjugación no covalente se logra utilizando biotina-avidina (en la que "avidina" se refiere a cualquier forma de avidina). Por ejemplo, esferas conjugadas o revestidas con avidina pueden ponerse en contacto con el glucano derivatizado con un resto biotina.

En algunas realizaciones, la preparación de glucanos conjugados incluye la purificación del conjugado final sustancialmente exento de reactantes no conjugados. La purificación puede lograrse mediante afinidad, filtración en gel, cromatografía hidrófoba, ultrafiltración tangencial, diafiltración, o cromatografía de intercambio iónico, basándose en las propiedades de cualquiera de los componentes del conjugado. Por ejemplo, una purificación puede reducir la cantidad de uno o más de los reactantes no conjugados (por ejemplo, glucano o soporte sólido) hasta 10% o menos, 5% o menos, o 1% o menos de la cantidad de reactante no conjugado que estaba presente en un principio.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una partícula que comprende β -1-6-glucano, que en algunas realizaciones está enriquecido en grupos O-acetilados. En algunas realizaciones, la partícula comprende al menos 50% de β -1-6-glucano en peso. En algunas realizaciones, el β -1-6-glucano está distribuido de forma homogénea en la partícula. Debe entenderse que las partículas que comprenden β -1-6-glucano de esta invención pueden, a su vez, abarcar cualquier realización apropiada para ellas, tal como se describe en la presente.

En una realización, el glucano conjugado está enriquecido en grupos O-acetilados, y en una realización, contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado, o cualquier realización relacionada tal como se describe en la presente. En una realización, el glucano se conjuga con una microesfera que, en una realización, tiene un diámetro de aproximadamente 1-100 micrómetros. En una realización, la microesfera tiene un diámetro que varía de aproximadamente 10-50 micrómetros. En otra realización, la microesfera tiene un diámetro que varía de aproximadamente 5-40 micrómetros. En otra realización, el diámetro que varía de aproximadamente 0,1 a 5 micrómetros. En otra realización, el diámetro que varía de aproximadamente 0,5 a 1 micrómetros. En otra realización, la partícula o la esfera están en un intervalo nanométrico, por ejemplo, de 100 a 500 nm.

- En una realización, el término “esfera” o “partícula” o la expresión “soporte sólido” se refieren a un material que es esférico. En otra realización, el término “esfera” o “partícula” o la expresión “soporte sólido” se refieren a un material que no es esférico. En una realización, las esferas o las partículas no esféricas poseen un eje más largo o una dimensión más larga entre dos puntos cualquiera sobre su superficie dentro de los intervalos mencionados anteriormente. En una realización, las dimensiones de la partícula (por ejemplo, el diámetro) se selecciona para estimular la fagocitosis de las partículas por células fagocíticas, tales como neutrófilos, macrófagos o células dendríticas.
- En una realización, el término “esfera” o “partícula” o la expresión “soporte sólido” se refieren a cualquier sólido o material gelificado, o basado en sol-gel, al cual puede adherirse el glucano, con un tamaño y una composición para que pueda ser captado por células fagocíticas.
- En una realización, las composiciones de esta invención comprenden, o los métodos de esta invención utilizan esferas o partículas que tienen las dimensiones y la densidad superficial del glucano (por ejemplo, β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en grupos O-acetilados), que es fagocitado con eficacia por células presentadoras de antígenos, comparado, por ejemplo, con partículas que tienen unas dimensiones y/o densidad superficial diferentes del glucano.
- En una realización, la conjugación al soporte sólido puede lograrse con un enlace directo a través de una reacción con soportes sólidos que comprenden un grupo funcional reactivo.
- Las químicas de unión para unir el conector al β -1-6-glucano y/o para unir el conector al anticuerpo incluyen, entre otras, la formación de enlaces amida, uretano, imina o disulfuro.
- El esqueleto químico de las moléculas conectoras no está limitado. En una realización, el esqueleto es biocompatible, no inmunogénico y/o hidrosoluble. En una realización, el conector es polietilenglicol (PEG). Otros conectores incluyen, entre otros, alcanos, poliésteres, poliiminas, poliácidos, proteínas, péptidos, ADN, ARN, otros glucanos, lípidos, sacáridos, polisacáridos, nanotubos de carbono, o dendrimeros. En una realización, el conector es una partícula sólida, que puede ser, entre otros, un polímero, un metal, una sal, un material natural o un material inorgánico, tal como sílice.
- Los enlaces a través de un grupo conector pueden realizarse utilizando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 6.642.363, 4.882.317, o 4.695.624. Un tipo de enlace útil es con un conector de ácido adípico, que puede formarse acoplado un grupo -NH_2 libre sobre un glucano aminado, con el ácido adípico (utilizando, por ejemplo, una activación de diimida), y después acoplado una proteína al intermedio de sacárido-ácido adípico resultante. Otro tipo de enlace es con un conector de carbonilo, que puede formarse mediante la reacción de un grupo hidroxilo libre de un glucano modificado, con CDI, seguido de una reacción con una proteína para formar un enlace carbamato. Otros conectores incluyen B-propionamido, nitrofeniletilamina, haluros de haloacilo, enlaces glicosídicos, ácido 6-aminocaproico, ADH, restos C4 a C12, etc.
- En otra realización, la invención proporciona una partícula que comprende β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, la partícula consiste en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de β -1-6-glucano en peso seco. En ciertas realizaciones, la partícula consiste fundamentalmente en β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, la partícula consiste fundamentalmente en β -1-6-glucano, excluyendo cualquier componente disolvente, tal como agua. En ciertas realizaciones, el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados. En ciertas realizaciones, la partícula contiene menos de 50%, 40%, 30%, 30%, 10% o 5% de β -1-3-glucano en peso seco. La invención proporciona además una composición que contiene cualquiera de las partículas mencionadas anteriormente que comprenden o que consisten fundamentalmente en β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en grupos O-acetilados. La composición puede contener también un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además un método para modular la respuesta inmunológica de un sujeto mamífero, que comprende administrar cualquiera de las partículas mencionadas anteriormente, o una composición que contiene cualquiera de las partículas mencionadas anteriormente, al sujeto. La partícula puede prepararse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Las partículas pueden triturarse o tamizarse para lograr un tamaño adecuado. En ciertas realizaciones, el β -1-6-glucano se distribuye de modo uniforme u homogéneo en la partícula. En ciertas realizaciones, “distribuido de modo uniforme” significa que el β -1-6-glucano no está encapsulado dentro de un material diferente, que no reviste simplemente la superficie de una partícula formada por un material diferente, o que no está unido covalente o no covalentemente a la superficie de una partícula formada por un material diferente. En lugar de esto, en ciertas realizaciones, el β -1-6-glucano, opcionalmente mezclado con otro material, se conforma en una partícula de modo que el β -1-6-glucano se localiza a través de sustancialmente el volumen completo de la partícula. Se apreciará que la densidad del β -1-6-glucano puede variar, pero en general variará gradual y continuamente a través de la partícula, en lugar de ser una variación abrupta.
- En otra realización, esta invención proporciona una composición que comprende un β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, que en otra realización interacciona de modo específico o atrae a una célula fagocítica.

Según este aspecto y en una realización, la expresión “asociado físicamente” se refiere a la formación de un enlace

covalente. En una realización, la expresión “físicamente asociado” se refiere a enlaces no covalentes fuertes. En algunas realizaciones, estos enlaces puede realizarse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, incluyendo algunos ejemplificados y descritos en la presente a continuación. Pueden aplicarse con facilidad agentes conectores para este fin, que están disponibles en el mercado, en algunas realizaciones.

5 El β -1-6-glucano está unido a un resto de transporte dirigido, según este aspecto de la invención, y una de sus realizaciones. Este resto de transporte dirigido puede comprender cualquier molécula, que interaccione de modo específico con una diana deseada, que en una realización estimula la interacción con una célula fagocítica, o en algunas realizaciones, atrae o recluta una célula fagocítica.

10 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido es para un tipo concreto de célula fagocítica, o en algunas realizaciones, para una célula fagocítica concreta, por ejemplo, una célula infectada, o en algunas realizaciones, una célula neoplásica, o en algunas realizaciones, una célula preneoplásica. En algunas realizaciones, por ejemplo, el transporte dirigido a una célula infectada por un virus puede lograrse mediante la unión del glucano a un correceptor vírico. En algunas realizaciones, los restos de transporte dirigido pueden incluir integrinas o moléculas de clase II de MHC, que pueden estar sobreexpresadas en células infectadas, tales como células presentadoras de antígenos profesionales.

15 En algunas realizaciones, el transporte dirigido a una célula infectada produce mayores respuestas terapéuticas frente a una infección en el sujeto. Por ejemplo, y en algunas realizaciones, el transporte dirigido a una célula infectada potencia la fagocitosis y/o respuestas citotóxicas al patógeno, o en algunas realizaciones, potencia la lisis mediada por el complemento del patógeno. En algunas realizaciones, el transporte dirigido a una célula infectada potencia la respuesta inmunológica al patógeno.

20 En algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido interacciona de modo específico con una célula neoplásica o preneoplásica, según se describe en la presente, y comprende cualquiera de sus realizaciones. En algunas realizaciones, el uso de un β -1-6-glucano unido a un resto de transporte dirigido, que se dirige a una célula neoplásica o preneoplásica, estimula las respuestas anticáncer del hospedante. En algunas realizaciones, este transporte dirigido estimula la lisis de células tumorales, o en algunas realizaciones, potencia las respuestas antitumorales del hospedante.

En algunas realizaciones, y sin limitación, el uso de los glucanos, del β -1-6-glucano unido a un resto de transporte dirigido y/o de composiciones de esta invención es adecuado, entre otras cuestiones, para tratar tumores que son resistentes a la lisis mediada por el complemento.

30 En algunas realizaciones, y sin limitación, el uso de los glucanos, del β -1-6-glucano unido a un resto de transporte dirigido y/o de composiciones de esta invención, dirige el polisacárido a un antígeno expresado de modo específico sobre células de cáncer y, así, potencia la lisis mediada por el complemento de las células.

35 En algunas realizaciones, el transporte dirigido a tejido o células neoplásicas o preneoplásicas, o a tumores, puede lograrse realizando el transporte dirigido a un antígeno tumoral, tal como se describe en la presente. En algunas realizaciones, estas células pueden expresar receptores de adrenomedulina (ADMR), un receptor de tipo receptor de calcitonina (CRLR), CD117 o cualquier combinación de antígenos asociados a tumores, tal como se describe en la presente.

40 En una realización, el resto de transporte dirigido es un péptido que se une a una proteína de mucina-1 infraglicosilada. La mucina-1 (MUC-1) es una molécula transmembrana, que se sobreexpresa sobre la superficie celular y en compartimentos intracelulares de casi todos los adenocarcinomas de células epiteliales humanos, incluyendo más del 90% de cánceres de mama, de ovario, pancreáticos, colorrectales, de pulmón, de próstata, de colon y carcinomas gástricos humanos. La expresión de una forma infraglicosilada, que expone un epítipo inmunogénico que normalmente está oculto, se ha demostrado en líneas de células cancerosas no epiteliales (por ejemplo, astrocitoma, melanoma, y neuroblastoma), así como en malignidades hematológicas, tales como mieloma múltiple y algunos linfomas de células B no hodgkinianos, que constituyen más del 50% de todos los cánceres en seres humanos.

45 Según este aspecto, y en una realización, mediante el establecimiento como diana de células que expresan receptores de adrenomedulina o de células que expresan mucina-1 por medio de los glucanos unidos de esta invención, pueden tratarse cánceres de pulmón, páncreas, ovario, mama y otros cánceres relacionados. En algunas realizaciones, mediante el establecimiento como diana de células que expresan CRLR y/o CD117, por medio de los glucanos unidos de esta invención, pueden tratarse tumores vasculares, gliomas y/u otros cánceres relacionados.

50 En algunas realizaciones, la referencia en la presente a un resto de transporte dirigido debe entenderse que incluye un anticuerpo, o cualquiera de sus fragmentos según se describe en la presente, un ligando peptídico natural para el receptor mencionado, o una de sus formas modificadas, tales como, por ejemplo, un producto truncado. En algunas realizaciones, la referencia en la presente a un resto de transporte dirigido debe entenderse que incluye péptidos artificiales, moléculas pequeñas, y similares.

55 En algunas realizaciones, se emplean muchos anticuerpos monoclonales (mAb) en diversas terapias, que pueden

- comprender, por ejemplo, alemtuzumab (campath), bevacizumab (avastatina), cetuximab (erbitux), gemtuzumab (mylotarg), ibritumomab (zevalina), panitumumab (vectibix), rituximab (rituxano), tositumomab (bexxar), trastuzumab (herceptina), palivizumab (synagis). Cualquiera de estos mAb puede unirse a un glucano de esta invención, o comprender una composición según se describe en la presente, y comprenden un resto de transporte dirigido o un compuesto inmunoestimulante para su uso en cualquiera de los métodos, según se describe en la presente. Debe entenderse que cualquier anticuerpo monoclonal u otro resto de transporte dirigido, o compuesto inmunoestimulador, puede unirse a los glucanos de esta invención, o comprender composiciones de esta invención, y que dichos materiales se consideran como parte de esta invención y se incluyen para su uso en cualquiera de los métodos de esta invención.
- En algunas realizaciones, esta invención proporciona el uso de los glucanos, de los β -1-6-glucanos unidos a un resto de transporte dirigido y/o de composiciones de esta invención (según se describe en la presente, incluyendo cualquiera de sus realizaciones) como un medio para determinar la respuesta de un tejido o célula neoplásica o preneoplásica a un régimen de tratamiento. En algunas realizaciones, este método incluye obtener una muestra del tumor procedente del sujeto, o un material de biopsia que contiene las células neoplásicas o preneoplásicas, y evaluar la sensibilidad o la resistencia de las células a la lisis *in vitro* y/o determinar el nivel de expresión y/o secreción de una proteína de control del complemento endógena.
- En algunas realizaciones, la célula tumoral expresa o sobreexpresa (por ejemplo, con relación a una célula normal del tipo celular o del tejido de origen de esa célula) una proteína de control del complemento endógena, tal como el receptor del complemento 1 (CR1 o CD35), el factor acelerante de la descomposición (DAF o CD55), la proteína del cofactor de membrana (MCP o CD46), el factor del complemento H (fH o FHL-1) y/o la proteína de unión a C4b (C4BP).
- En algunas realizaciones, esta invención proporciona el uso de los glucanos, de los β -1-6-glucanos unidos a un resto de transporte dirigido y/o de composiciones de esta invención (según se describe en la presente, incluyendo cualquiera de sus realizaciones) como un medio para dirigirse a la vasculatura patológica, tal como, por ejemplo, la vasculatura aterosclerótica, o en algunas realizaciones, dirigirse a la neovasculatura patológica, tal como la neovasculatura asociada a tumores para potenciar la eliminación de dicha vasculatura.
- Según este aspecto de la invención, y en algunas realizaciones, el resto de transporte dirigido comprende, entre otros, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un ligando que interacciona de modo específico con un componente de dicha vasculatura, por ejemplo, un agente que interacciona de modo específico con VEGF, un factor de un tejido, un factor de coagulación, moléculas de adhesión celular vasculares, integrinas, selectinas, o cualquier otro marcador expresado sobre la superficie de células endoteliales.
- En una realización, el resto de transporte dirigido es un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor, proteína A, proteína G, proteína L, biotina, avidina, estreptavidina, un quelado de ion metálico, un cofactor de una enzima, un ácido nucleico o un ligando.
- En algunas realizaciones, este resto de transporte dirigido puede comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, este anticuerpo o fragmento de anticuerpo reaccionará de modo específico con una diana deseada, tal como se describe en la presente, por ejemplo, interaccionando con un fagocito, de modo que la unión de dicho anticuerpo o fragmento con el glucano no inhibe dicha interacción.
- En algunas realizaciones, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas intactas, así como a sus fragmentos funcionales, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv, que son capaces de interaccionar de modo específico con una diana deseada tal como se describe en la presente, por ejemplo, uniéndose a células fagocíticas. En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos comprenden:
- (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, que puede producirse mediante la digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
 - (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de una reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
 - (3) (Fab')₂, el fragmento de anticuerpo puede obtenerse tratando un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro;
 - (4) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y
 - (5) un anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula genéticamente modificada que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente condensada.

Los métodos para preparar estos fragmentos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

5 En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos pueden prepararse mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo, o mediante la expresión en *E. coli* o en células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino, u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento.

10 Los fragmentos de anticuerpos, en algunas realizaciones, pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpos por ruptura enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede romperse aún más utilizando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulhidrilo que surgen de la ruptura de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una ruptura enzimática que utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Goldberg, patentes de EEUU nº 4.036.945 y 4.331.647, y las referencias contenidas en ellas, incorporándose estas patentes en la presente como referencia en su totalidad. Véase también Porter, R.R., *Biochem. J.*, 73:119-126, 1959. Otro métodos para romper anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, una posterior ruptura de los fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas también pueden utilizarse, con la condición de que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

20 Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, tal como se describe en Inbar *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 69:2659-2662, 1972. Como alternativa, las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticularse mediante productos químicos, tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH yVL conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectadas por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que después se introduce en una célula hospedante, tal como *E. coli*. Las células hospedantes recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido conector que enlaza los dos dominios V. Los métodos para producir sFv se describen, por ejemplo, en Whitlow y Filipula, *Methods*, 2:91-105, 1991; Bird *et al.*, *Science*, 242:423-426, 1988; Pack *et al.*, *Bio/Technology*, 11:1271-1277, 1993; y Ladner *et al.*, patente de EEUU nº 4.946.778.

30 Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") pueden obtenerse construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Estos genes se preparan, por ejemplo, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry, *Methods*, 2:106-110, 1991.

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos o los fragmentos descritos en la presente pueden comprender "formas humanizadas" de los anticuerpos. En algunas realizaciones, la expresión "formas humanizadas de anticuerpos" se refieren a anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), que son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos que forman una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, una rata o un conejo que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de marco o CDR importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de modo óptimo también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Stuct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

55 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácidos introducidos procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos aminoácidos no humano a menudo se denominan restos de importación, que generalmente se obtienen de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse fundamentalmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de EEUU nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la

práctica, los anticuerpos humanizados generalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y quizás algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de reodora.

También pueden producirse anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bancos de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)). De modo similar, pueden fabricarse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Tras la exposición se observa producción de anticuerpos humanos, que se parece en gran medida a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14, 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13, 65-93 (1995).

En una realización, el resto de transporte dirigido es un anticuerpo o cualquiera de sus fragmentos, que es reconocido de modo específico por un neutrófilo, por ejemplo, y un anticuerpo que reconoce de modo específico la L-selectina, las β 2-integrinas, el receptor del complemento 1 (CR-1), el factor acelerante de la descomposición (DAF), el receptor de C5a, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), ICAM-3 y otros, según apreciarán los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, las células fagocíticas se establecen como diana o se captan a través de una molécula que interacciona con receptores de Fc, receptores de quimioquinas, CD40, CD80, CD86, moléculas de clase II de MHC, CD69, ADAM8, CD14, CD163, CD33, CD63, CD68, CD74, CHIT1, CHST10, CSF1R, DPP4, FABP4, FCGR1A, ICAM2, IL1R2, ITGA1, ITGA2, S100A8, TNFRSF8, y otros, según apreciarán los expertos en la técnica.

En otra realización, el resto de transporte dirigido puede ser cualquier resto apropiado, por ejemplo, aptámeros, ligandos naturales o artificiales, o las proteínas de unión modificadas pueden comprender los restos de transporte dirigido según se describe en la presente, y su asociación física con un glucano tal como se describe en la presente puede realizarse con facilidad mediante una serie de medios conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en la presente a continuación, o sus variaciones, para ajustarse a la naturaleza concreta del resto de transporte dirigido elegido.

En una realización, el resto de transporte dirigido potencia la unión a la célula, o en otra realización, potencia el transporte hacia la célula. En una realización, el resto de transporte dirigido potencia la unión tras el suministro de una fuente de energía. En una realización, el resto de transporte dirigido está unido de modo químico al glucano a través de un grupo reticulante químico, o en otra realización, forma una asociación estable con el glucano, o en otra realización, forma una asociación con el glucano, que se disocia tras cambios en las condiciones ambientales, tales como, por ejemplo, la concentración salina o el pH.

En una realización, el resto de transporte dirigido puede ser un anticuerpo, que reconoce de modo específico una molécula de interés, tal como una proteína o un ácido nucleico. En otra realización, el anticuerpo puede reconocer de modo específico una molécula indicadora unida a una molécula de interés. En otra realización, el resto de transporte dirigido puede ser un fragmento de anticuerpo, proteína A, proteína G, proteína L, biotina, avidina, estreptavidina, un quelado de ion metálico, un cofactor de una enzima, o un ácido nucleico. En otra realización, el resto de transporte dirigido puede ser un receptor, que se une a un ligando cognado de interés, o está asociado con una célula o una molécula de interés, o en otra realización, el resto de transporte dirigido puede ser un ligando que se utiliza para unirse a una célula, a través de la interacción con su receptor cognado.

La unión del resto de transporte dirigido al glucano de esta invención puede realizarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, según se describe con más detalle en la presente en el ejemplo 7 o, por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU nº 5.965.714, o en la publicación de patente de EEUU nº 20070141084, o en Schneerson *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 22 de julio de 2003, 100(15):8945-8950; Lees *et al.*, *Vaccine*, febrero de 1996, 14(3):190-198, o mediante el uso de un agente reticulante según se describe en la presente, u otros métodos, tal como apreciarán los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, se utilizan anticuerpos glicosilados, y el β -1-6-glucano está unido al resto glicosilado del anticuerpo, o en otra realización, las uniones pueden ser múltiples e implicar múltiples sitios sobre el anticuerpo o el resto de transporte dirigido, según entenderán los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, la unión del glucano al resto de transporte dirigido produce una mayor fagocitosis y/o destrucción del organismo o célula diana. En algunas realizaciones, esta lisis puede estar mediada por cualquier célula presentadora de antígenos profesional o célula asesina, tales como, por ejemplo, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales, linfocitos T citotóxicos, y otros.

En algunas realizaciones, cualquier glucano O-acetilado puede asociarse físicamente con un resto de transporte dirigido, y comprende los glucanos o las composiciones de esta invención, representando una realización de esta. El uso de estos glucanos O-acetilados, por ejemplo, β -1-3-glucanos que se han O-acetilado, para modular las respuestas inmunológicas, tratar el cáncer o lesiones precancerosas, estimular la resolución de una infección, o cualquier método según se describe en la presente, se debe considerar parte de esta invención.

En algunas realizaciones, cualquiera de las preparaciones de glucanos de esta invención puede unirse a un agente marcador, de modo que la detección del glucano puede realizarse con facilidad. En una realización, la expresión "un agente marcador" se refiere a una molécula que hace que sea fácilmente detectable aquello que se pone en contacto con un agente marcador. En una realización, el agente marcador es un polipéptido marcador. El polipéptido marcador puede comprender, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), DS-Red (proteína fluorescente roja), fosfatasa alcalina segregada (SEAP), beta-galactosidasa, luciferasa, o cualquier otra proteína indicadora conocida por los expertos en la técnica. En otra realización, el agente marcador puede conjugarse con otra molécula que proporciona mayor especificidad para la diana que se va a marcar. Por ejemplo, y en una realización, el agente marcador es un fluorocromo conjugado con un anticuerpo que se une de modo específico con una molécula diana dada, o en otra realización, que se une de modo específico con otro anticuerpo unido a una molécula diana, tal como apreciarán con facilidad los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, el glucano unido a un anticuerpo incorpora un fluorocromo en el anticuerpo, tal como apreciarán los expertos en la técnica.

En una realización, el glucano está enriquecido en grupos O-acetilados, y en una realización, el glucano contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado. En otra realización, el glucano se aísla o se deriva de un líquen o de una levadura, que en una realización pertenece a *Umbilicariaceae*. En una realización, el glucano se acetila o se sintetiza de modo químico. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones. En otra realización, la célula fagocítica es una célula presentadora de antígenos profesional. En otra realización, la célula fagocítica es un neutrófilo.

En una realización, el resto de transporte dirigido es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

La invención proporciona un material revestido que comprende (a) un sustrato; y (b) un compuesto o una composición que comprende β -1-6-glucano. En ciertas realizaciones, el β -1-6-glucano está enriquecido en glucano O-acetilado. En ciertas realizaciones, el material revestido está en forma, o es un componente de un implante u otro dispositivo quirúrgico o médico. En ciertas realizaciones, el material revestido es un material revestido descrito en la solicitud de patente provisional USSN 60/817.075, expedida el 29 de junio de 2006, titulada "Revestimiento de dispositivos con compuestos efectores", en la que el "compuesto efector" es o comprende β -1-6-glucano.

La invención proporciona implantes y dispositivos quirúrgicos o médicos que comprenden un material revestido de la invención. Tal como se emplea en la presente, la expresión "dispositivo médico" incluye implantes y cualquier dispositivo utilizado en el tratamiento quirúrgico o médico de un sujeto, en la que el dispositivo se pone en contacto o se introduce en el cuerpo durante al menos un periodo de 2 horas, por ejemplo, al menos 4, 8, 12 o 24 horas. En ciertas realizaciones, el término "dispositivo" se refiere a un dispositivo completo o a cualquier parte o componente del mismo. Por ejemplo, en muchas aplicaciones, una parte para un dispositivo se tratará según la presente invención y después se ensamblará con las otras partes para formar un dispositivo completo.

En ciertas realizaciones, el periodo es entre 1 día y 1 semana, 1-4 semanas, 4-8 semanas, 1-6 meses, 6-12 meses, o mayor. En ciertas realizaciones, el dispositivo está previsto para permanecer en contacto con el cuerpo, o para permanecer dentro del cuerpo durante el resto de la vida del sujeto (a menos que el dispositivo falle o tenga que retirarse, por ejemplo, como resultado de una infección). En ciertas realizaciones, la invención proporciona implantes y dispositivos quirúrgicos o médicos, tales como catéteres, líneas arteriales o intravenosas permanentes, implantes de estenosis, e injertos, revestidos o contruidos de otra forma para que contengan y/o liberen cualquiera de los compuestos o de las composiciones descritos en la presente que comprende β -1-6-glucano. Opcionalmente, el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados. En ciertas realizaciones, el dispositivo revestido con β -1-6-glucano o que contiene β -1-6-glucano de otra forma es más resistente a la formación de biopelículas (por ejemplo, por un hongo o una bacteria) que otro dispositivo por lo demás idéntico que no esté revestido ni contenga el compuesto o la composición. En ciertas realizaciones, el implante u otro dispositivo es como describe en la solicitud de patente provisional USSN 60/817.075, expedida el 29 de junio de 2006, titulada "Revestimiento de dispositivos con compuestos efectores", en la que el "compuesto efector" es o comprende β -1-6-glucano.

En ciertas realizaciones, el material revestido, implante u otro dispositivo se fabrica como se describe en la solicitud de patente provisional USSN 60/817.075, expedida el 29 de junio de 2006, titulada "Revestimiento de dispositivos con compuestos efectores", en la que el "compuesto efector" es o comprende β -1-6-glucano.

En una realización, el β -1-6-glucano se libera lentamente, a lo largo de un periodo de tiempo (por ejemplo, a lo largo de un día a 1 semana, 1-4 semanas, 4-12 semanas, 12-24 semanas, 24-36 semanas, 36-48 semanas, etc.). En ciertas realizaciones, al final del periodo de tiempo la liberación ha cesado sustancialmente. En ciertas realizaciones, al final de periodo de tiempo la velocidad de liberación es menor que aproximadamente 5% del máximo de velocidad de liberación, o menor que 5% de la media de la velocidad de liberación durante el periodo de tiempo y/o menos del aproximadamente 5%, 10% o 20% del compuesto permanece asociado al sustrato. En otras realizaciones, el β -1-6-

glucano se libera con rapidez, por ejemplo, al menos aproximadamente 50% del β -1-6-glucano se libera durante las primeras 24 horas. En ciertas realizaciones, la liberación es mínima a lo largo de un periodo de tiempo de interés, por ejemplo, un día a 1 semana, 1-4 semanas, 4-12 semanas, 12-24 semanas, 24-36 semanas, 36-48 semanas, etc. En ciertas realizaciones, al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más del β -1-6-glucano permanece asociado con el sustrato al final de un periodo de tiempo de interés. La liberación puede medirse *in vitro*, por ejemplo, bajo condiciones de concentración salina, pH y temperatura que se aproximen a las condiciones fisiológicas en el cuerpo de un sujeto mamífero y/o *in vivo*. En ciertas realizaciones, la velocidad de liberación es controlable, por ejemplo, mediante la selección apropiada de los componentes de una capa de revestimiento y/o su concentración. En ciertas realizaciones, el espesor de una capa de revestimiento se selecciona para lograr la liberación a lo largo de una duración deseada. Por ejemplo, puede seleccionarse un dispositivo que tiene una capa de revestimiento con un espesor o una composición deseados para que proporcione la liberación durante la duración de uso esperada, por ejemplo, el tiempo durante el cual se espera que el dispositivo esté en contacto intermitente o continuo con el cuerpo de un sujeto.

Cualquiera de los materiales revestidos, implantes, u otros dispositivos descritos en la presente puede comprender un β -1-6-glucano y uno cualquiera o más agentes terapéuticos útiles para tratar un trastorno médico del sujeto. Un "trastorno médico" incluye cualquier enfermedad, trastorno o lesión adquirido o heredado, etc., para el cual está justificada una intervención médica y/o quirúrgica.

Los ejemplos de implantes de la invención y otros dispositivos quirúrgicos o médicos incluyen dispositivos cardiovasculares (por ejemplo, catéteres venosos implantables, puertos venosos, catéteres venosos tunelizados, líneas o puertos de infusión crónica, incluyendo catéteres de infusión de la arteria hepática, cables de marcapasos, desfibriladores implantables); dispositivos neurológicos/neuroquirúrgicos (por ejemplo, implantes de derivación peritoneal ventricular, implantes de derivación atrial ventricular, dispositivos estimuladores nerviosos, parches durales e implantes para evitar la fibrosis epidural poslaminectomía, dispositivos para infusiones subaracnoides continuas); dispositivos gastrointestinales (por ejemplo, catéteres permanentes crónicos, tubos de alimentación, implantes de derivación portosistémicos, implantes de derivación para ascitis, implantes peritoneales para la administración de fármacos, catéteres de diálisis peritoneal, mallas implantables para hernias, suspensiones o implantes sólidos para evitar adhesiones quirúrgicas, incluyendo mallas); dispositivos genitourinarios (por ejemplo, implantes uterinos, incluyendo dispositivos intrauterinos (DIU) y dispositivos para evitar la hiperplasia endometrial, implantes de tubos de Falopio, incluyendo dispositivos de esterilización reversible, implantes de estenosis de tubos de Falopio, esfínteres artificiales e implantes periuretrales para la incontinencia, implantes de estenosis uretéricos, catéteres permanentes crónicos o temporales, aumentos de vejiga, o envolturas o tablillas para vasovasostomía); implantes oftalmológicos (por ejemplo, implantes de Molteno y otros implantes para el glaucoma neovascular u otros trastornos oculares, lentes de contacto que eluyen un fármaco para el pterigio, tablillas para una dacrocistalrinostomía fallida, lentes de contacto que eluyen un fármaco (por ejemplo, para la neovascularidad corneal), implantes para la retinopatía diabética, lentes de contacto que eluyen un fármaco para implantes corneales de alto riesgo); dispositivos de otolaringología (por ejemplo, implantes osculares, tablillas para el tubo de Eustaquio o implantes de estenosis para el oído adhesivo o la otitis crónica); implantes de cirugía plástica, e implantes ortopédicos (por ejemplo, varillas espinales, tornillos, prótesis ortopédicas). Otros dispositivos implantables de interés en la presente incluyen bombas, por ejemplo, para la administración de insulina, medicaciones para el dolor, etc. La bomba puede ser una bomba intratecal. También se incluye cualquier tipo de prótesis, por ejemplo, cualquier sustituto para una parte del cuerpo que falta. También se incluyen los materiales útiles para suturas.

En ciertas realizaciones, el implante u otro dispositivo médico o quirúrgico se lista en Hunter, T.B. y Taljonovic, M.S., Glossary of Medical Devices and Procedures: Abbreviations, Acronyms, and Definitions, Radiographics, 23:195-213, 2003), que proporciona un conjunto no limitante de definiciones que se aceptan habitualmente en la técnica.

En ciertas realizaciones, el dispositivo comprende una estructura con forma de tubo que tiene un lumen, en el que la pared de la estructura tiene una superficie interna y una superficie externa, estando cualquiera de las dos o ambas revestidas con un compuesto o una composición descrita en la presente que comprende β -1,6-glucano, o adaptadas de otra forma para comprender, y opcionalmente, liberar dicho compuesto o dicha composición.

Los implantes y otros dispositivos quirúrgicos o médicos pueden revestirse (o adaptarse de otra forma para comprender, y opcionalmente liberar) con composiciones de la presente invención en una diversidad de maneras que incluyen, por ejemplo: (a) fijar al implante o al dispositivo un compuesto o una composición (por ejemplo, pulverizando el implante o el dispositivo con una composición que comprende un compuesto o una composición de la invención, sumergiendo el implante o el dispositivo en una disolución que comprende el compuesto o la composición de la invención, o por otros medios covalentes o no covalentes); (b) revistiendo el implante o el dispositivo con una sustancia, tal como un hidrogel, que a su vez absorbe el compuesto o la composición de la invención; (c) entretejiendo un hilo u otra sustancia revestido con el compuesto o la composición en el implante o el dispositivo; (d) insertando el implante o el dispositivo en un manguito o una malla que está formada o revestida con un compuesto o una composición descrita en la presente; (e) construyendo el propio implante o dispositivo con un compuesto o una composición descrita en la presente; o (f) adaptando de otra forma el implante o el dispositivo para liberar el compuesto o la composición.

En una realización, el término "revestido" se refiere a la unión física, o en otra realización, la asociación de un gel,

película, espuma, partícula y/o composición que comprende β -1,6-glucano con al menos una porción de la superficie de un material cuyo "revestimiento" se desea. En una realización, este revestimiento comprenderá menos del 1% de una superficie expuesta del material, o en otra realización, del 1-10%, o en otra realización, del 1-25%, o en otra realización, del 1-50%, o en otra realización, del 1-75%, o en otra realización, del 1-100% de al menos una superficie del material.

5 En una realización, la aplicación de dicho "revestimiento" se realiza formando un dibujo, o sobre regiones específicas del material para ajustarse a un objetivo concreto. Por ejemplo, y en algunas realizaciones, un dispositivo con forma de tubo, tal como un catéter, puede comprender revestir un material sobre la superficie expuesta al lumen del tubo, por ejemplo, un revestimiento que comprende un compuesto antiinflamatorio o antiproliferativo y, en algunas realizaciones, el dispositivo con forma de tubo puede estar revestido con un material diferente, por ejemplo, un revestimiento que comprende un β -1,6-glucano que, en una realización, inhibe la formación de una biopelícula. En una realización, el revestimiento de un material se realizará sobre al menos una superficie del material, o en otra realización, sobre dos o más superficies del material, o en otra realización, sobre cualquier superficie expuesta del material, o en otra realización, sobre cualquier superficie del material.

10 En algunas realizaciones, la expresión "material revestido" se aplica no sólo al revestimiento de una superficie del material, sino que también incluye sumergir y/u impregnar el material, como un todo, o en algunas realizaciones, en parte, con los geles, las películas, las espumas, las partículas y/o las composiciones descritas en la presente que comprenden β -1,6-glucano. En algunas realizaciones, la inmersión y/o la impregnación del material puede realizarse según un dibujo y/o un diseño deseado, para ajustarse a un objetivo o a una aplicación concretos. En algunas realizaciones, pueden formarse múltiples revestimientos mediante impregnación o inmersión en el material, cada uno de los cuales puede aplicarse según un dibujo o un diseño concreto, que puede ser el mismo, o en otra realización, diferente del dibujo de un primer revestimiento.

15 En algunas realización, la inmersión y/o la impregnación puede ser sobre una superficie concreta del material, en un dibujo y/o diseño concreto, para ajustarse a un objetivo o a una aplicación concretos. En algunas realizaciones, la inmersión y/o la impregnación del material puede ser sobre dos o más superficies del material con un dibujo y/o un diseño concreto, o este dibujo y/o diseño puede variar en función de la superficie del material que se está sumergiendo y/u impregnando.

20 Los dispositivos se fabrican con cualquiera de una diversidad de materiales diferentes, según sea apropiado para su uso previsto. En ciertas realizaciones, los dispositivos de esta invención pueden fabricarse al menos en parte a partir de cualquier polímero termoplástico o termosensible (por ejemplo, termocurable). Los polímeros adecuados incluyen, por ejemplo, siliconas y uretanos (por ejemplo, poliuretano). En una realización, el sustrato, el material o el dispositivo pueden fabricarse al menos en parte a partir de poli(cloruro de vinilo). En ciertas realizaciones, el dispositivo está formado al menos en parte por polietileno. Los expertos en la técnica apreciarán que estos materiales se emplean de modo habitual para dispositivos tubulares, tales como catéteres.

25 En ciertas realizaciones, el compuesto o la composición que lo comprende se adhiere suficientemente al implante o a otro dispositivo durante el almacenaje y en el momento de la introducción en el cuerpo, de modo que el dispositivo resiste la manipulación habitual (por ejemplo, durante la inserción) y el almacenaje sin una pérdida significativa del compuesto o de la composición, por ejemplo, una pérdida no mayor que 10%, 20% o 30% del compuesto o de la composición. En ciertas realizaciones, el compuesto o la composición no se degrada significativamente durante el almacenaje, antes de la inserción, o cuando se calienta hasta la temperatura corporal después de la inserción en el cuerpo (si se va a realizar). En ciertas realizaciones de la invención, el implante o el dispositivo de la invención proporciona una liberación uniforme, predecible y prolongada del compuesto o la composición de la invención hacia el fluido o el tejido que rodea al implante o al dispositivo después de haber sido desplegado. En ciertas realizaciones, por ejemplo, para implantes de estenosis vasculares u otros dispositivos que pueden estar expuestos a la sangre, la composición o el compuesto y los materiales utilizados para formar un revestimiento no hacen que la superficie sea trombogénica (que provoca la formación de coágulos sanguíneos), ni provocan una turbulencia significativa en el flujo sanguíneo (más de la esperada en el caso de que el dispositivo no estuviese revestido o de que su superficie no comprendiese un compuesto o una composición descritos en la presente).

30 En algunas realizaciones, el término "gel" incluye su significado normal en la técnica. En una realización, el término "gel" se refiere a una composición que comprende un polímero que tiene una fluidez a temperatura ambiente entre la de un líquido y un sólido. En algunas realizaciones, el término "gel" se refiere a un sistema coloidal sólido o semisólido formado por una fase continua sólida y una fase líquida (discontinua, continua o mixta), que en algunas realizaciones puede identificarse por su aspecto gelatinoso exterior y/o muestra propiedades de un sólido, tales como plasticidad, elasticidad o rigidez. En algunas realizaciones, la fase líquida puede ser una fase "dispersada", o en otras realizaciones, continua. En algunas realizaciones, el componente gelificante (fase sólida) es lipófilo y está presente en concentraciones menores que 10%, o en otra realización 15%, o en otra realización 20%, o en otra realización 25%, o en otra realización 30%, o en otra realización 40%. En algunas realizaciones, el término "gel" puede incluir un gel de sílice, un gel de aluminosilicato u otros materiales, que son principalmente sólidos y/o en partículas, microesferoides, esferoides, etc., o se describe con propiedades, términos o expresiones descriptivas que indican la destrucción del sistema de dos fases, tales como el volumen de poro, el diámetro del poro, el área superficial. En una realización, el gel es un hidrogel, que en ciertas realizaciones, comprende al menos 70%, 80%,

90%, 95%, 98% o más agua en peso. En otra realización, el gel comprende polímeros dispersos en disolventes distintos al agua o disoluciones acuosas.

5 En algunas realizaciones, el término “espuma” incluye su significado normal en la técnica. En algunas realizaciones, el término “espuma” se refiere a una suspensión coloidal de un gas en un líquido. En una realización, el término “espuma” se refiere a una composición que comprende una fase interna de un gas en una fase externa de un líquido o de un sólido. En una espuma líquida, en algunas realizaciones, un agente de adsorción coloidal forma una película que se une a una burbuja de gas, afectando la dimensión coloidal en la espuma al espesor de la película, no al tamaño de la burbuja.

10 En algunas realizaciones, el término “película” incluye su significado normal en la técnica. En una realización, el término “película” se refiere a una capa de material cuya dimensión está restringida en una dirección. En algunas realizaciones, el espesor medio de la película es entre 10 μm y 100 μm . En algunas realizaciones, el espesor medio de la película es entre 1 μm y 10 μm . El espesor de la película puede variar o ser sustancialmente uniforme (por ejemplo, variando en menos de aproximadamente 1%, 5% o 10% a lo largo de una superficie en diversas realizaciones).

15 La invención incluye precursores del material revestido, por ejemplo, composiciones que comprenden un β -1,6-glucano y un material precursor que puede utilizarse para formar una capa de revestimiento cuando se aplica a un sustrato, o puede utilizarse para impregnar un sustrato. Opcionalmente, la composición comprende un disolvente, por ejemplo, que se evapora para permitir la formación de una capa de revestimiento. En algunas realizaciones, el disolvente es un disolvente acuoso. En algunas realizaciones, el disolvente es un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, el disolvente es polar, o ligeramente polar. En algunas realizaciones, el disolvente es no polar, o fundamentalmente no polar. Los disolventes adecuados pueden incluir, entre otros, dimetilsulfóxido (DMSO), acetona, alcoholes, metil etil cetona, tolueno, xileno, N,N-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano y similares. En algunas realizaciones, el disolvente es agua.

20

También se proporcionan procesos para preparar el material, el implante u otro dispositivo revestido de la invención.

25 Los sustratos, los materiales y/o los dispositivos revestidos de esta invención pueden comprender materiales metálicos, cerámicos, o poliméricos, o sus combinaciones. Los sustratos, los materiales y/o los dispositivos pueden tener una diversidad de propiedades físicas. Por ejemplo, pueden ser flexibles, de modo que se adaptan o se doblan con facilidad para adoptar una forma o una configuración deseada en condiciones de uso, o pueden ser rígidos de modo que se requiera una fuerza significativa para provocar una alteración de su forma. En algunas realizaciones, el dispositivo mantiene su forma cuando se apoya sólo sobre un punto o un extremo. La superficie puede ser sustancialmente lisa o puede ser rugosa y/o comprender grietas.

30

35 En algunas realizaciones, los materiales metálicos incluyen metales y aleaciones basadas en titanio (tales como nitinol, aleaciones de níquel y titanio, materiales de aleaciones con termomemoria), acero inoxidable, tántalo, níquel-cromo, o ciertas aleaciones de cobalto, incluyendo aleaciones de cobalto-cromo-níquel, tales como Elgiloy® y Phynox®. Los materiales metálicos también incluyen filamentos de materiales compuestos revestidos, tales como los descritos en el documento WO 94/16646.

40 En algunas realizaciones, los materiales cerámicos incluyen, pero no se limitan a óxidos, carburos, o nitruros de elementos de transición, tales como óxidos de titanio, óxido de hafnio, óxidos de iridio, óxidos de cromo, óxidos de aluminio, y óxidos de circonio. También pueden utilizarse materiales con una base de silicio, tal como sílice. Cualquiera de estos materiales puede utilizarse para formar un sustrato o una parte de un dispositivo de esta invención, y pueden revestirse con los geles, espumas, películas u otras composiciones que comprenden un β -1,6-glucano, según se describe en la presente.

45 La presente invención también proporciona métodos para utilizar los dispositivos. Los dispositivos pueden utilizarse de cualquier manera en que se emplean sus homólogos convencionales (por ejemplo, homólogos que no comprenden y/o que no están revestidos con un compuesto o una composición descrita en la presente), siendo dichos métodos conocidos en la técnica. La presente invención también proporciona métodos para transportar un compuesto o una composición descritos en la presente que comprende un β -1,6-glucano a un sujeto, en los que dicho método comprende implantar o introducir un material o un dispositivo revestido que comprende un compuesto o una composición de la invención, en el cuerpo del sujeto.

50 En otra realización, cualquiera de las composiciones de la invención comprende un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones.

55 En una realización, esta invención proporciona el uso combinado de β -glucanos y un adyuvante, o de composiciones que los comprenden. En algunas realizaciones, el adyuvante puede incluir, pero no se limita a: (A) compuestos de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato, oxihidróxido, ortofosfato, sulfato, etc. de aluminio (por ejemplo, veáanse los capítulos 8 y 9 de la referencia 96)), o mezclas de diferentes compuestos de aluminio, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, forma cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferida la adsorción; (B) MF59 (escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5%, formulados en

partículas submicrónicas utilizando un microfluidificador); (C) liposomas; (D) ISCOM, que pueden estar exentos de detergentes adicionales; (E) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, polímero en bloque plurónico L121 al 5%, y thr-MDP, microfluidificados en una emulsión submicrónica o agitados en vórtice para generar una emulsión con un tamaño de partícula mayor; (F) sistema adyuvante Ribi™ (RAS) (Ribi Immunochem) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil-lípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL+CWS (Detox™); (G) adyuvantes de saponina, tales como QuilA o QS21, también denominado Stimulon™; (H) quitosano; (I) adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante de Freund incompleto (IFA); (J) citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc.; (K) monofosforil-lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL); (L) combinaciones de 3dMPL, por ejemplo con QS12 y/o emulsiones de aceite en agua; (M) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG, es decir, que contienen al menos un dinucleótido CG, utilizándose opcionalmente 5-metilcitosina en lugar de citosina; (N) un polioxietilén éter o un polioxietilén éster; (O) un tensioactivo de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol, o un tensioactivo de éster o éter de polioxietilenalquilo en combinación con al menos otro tensioactivo no iónico, tal como octoxinol; (P) un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo, un oligonucleótido CpG) y una saponina; (Q) un inmunoestimulante y una partícula de una sal metálica; (R) una saponina y una emulsión de aceite en agua; (S) una saponina (por ejemplo, QS21)+3dMPL+IL12 (opcionalmente + un esteroles); (T) una enterotoxina termolábil de *E. coli* ("LT") o sus mutante desintoxicados, tales como los mutantes K63 o R72; (U) la toxina del cólera ("CT") o la toxina de la difteria ("DT") o cualquiera de sus mutantes desintoxicados; (V) ARN bicatenario; (W) miméticos de monofosforil-lípido A, tales como derivados de aminoalquilglucosamidinfosfato, por ejemplo, RC-529; (X) polifosfaceno (PCPP); o (Y) un bioadhesivo, tal como microesferas de ácido hialurónico esterificado, o un mucoadhesivo, tal como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa.

Los péptidos de muramilo incluyen N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilnormuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)etilamina (MTP-PE), etc.

En otra realización, esta invención proporciona el uso combinado de β -glucanos y un antígeno, o de composiciones que los comprenden.

En diversas realizaciones, el antígeno puede ser cualquier molécula reconocida por el sistema inmunológico del sujeto como extraña. Por ejemplo, el antígeno puede ser cualquier molécula extraña, tal como una proteína (incluyendo una proteína modificada, tal como una glicoproteína, una mucoproteína, etc.), un ácido nucleico, un carbohidrato, un proteoglicano, un lípido, una molécula de mucina, u otra molécula similar, incluyendo cualquiera de sus combinaciones. El antígeno puede ser, en otra realización, una célula o una parte de esta, por ejemplo, una molécula de la superficie celular. En otra realización, el antígeno puede obtenerse de un virus infeccioso, bacteria, hongo, u otro organismo (por ejemplo, protistas) o de una parte de estos. Estos organismos infecciosos pueden ser activos, en una realización, o inactivos, en otra realización, lo cual puede lograrse, por ejemplo, mediante la exposición al calor o la eliminación de al menos una proteína o un gen necesarios para la replicación del organismo. En una realización, la proteína o el péptido antigénico se aísla, o en otra realización, se sintetiza.

En una realización, el término "antígeno" se refiere a una sustancia, tal como una proteína, un péptido o cualquier fragmento que estimula o potencia una respuesta inmunológica, tras su exposición o contacto con el antígeno. En una realización, el antígeno es una señal de "peligro" interpretada por el sistema inmunológico de un sujeto para que inicie o potencia una respuesta inmunológica como consecuencia de la señal. En otra realización, el antígeno representa la capacidad del hospedante para distinguir la presencia de una molécula que no es "propia".

En una realización, el antígeno se deriva de un patógeno, una célula infectada, una célula neoplásica o preneoplásica. En otra realización, el antígeno es un autoantígeno, o una molécula que inicia o potencia una respuesta autoinmunológica.

En una realización, el antígeno se deriva de un agente parasitario, que reside de modo intracelular en al menos algunas etapas de su ciclo vital. Los parásitos intracelulares contemplados incluyen, por ejemplo, protozoos. Los protozoos que infectan células incluyen: parásitos del género *Plasmodium* (por ejemplo, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Schistosoma*, y *Cryptosporidium*. En otra realización, el agente parasitario reside de modo extracelular durante al menos parte de su ciclo vital. Los ejemplos incluyen nemátodos, tremátodos, y céstodos. En algunas realizaciones, el antígeno se deriva de subproductos de una infección por los protozoos descritos, por ejemplo, antígenos de huevos de *Schistosoma*, antígenos expresados exclusivamente en quistes de *Toxoplasma*, y otros, según apreciarán los expertos en la técnica.

En una realización, el antígeno se deriva de una célula enferma y/o anómala. Las células enfermas o anómalas contempladas incluye: células infectadas, células neoplásicas, células preneoplásicas, focos inflamatorios, tumores benignos o pólipos, manchas color café con leche, leucoplaquia, otros lunares de la piel, células autorreactivas, incluyendo células T y/o NK, etc.

En una realización, el antígeno se deriva de un virus infeccioso que incluye, entre otros, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tal como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP); *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que producen gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, bungavirus, flebovirus y nairovirus); *Arenaviridae* (virus de fiebres hemorrágicas); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus de varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de vaccinia, virus de la sífilis); e *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus sin clasificar (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no-A, no-B (clase 1 = transmitido por vía interna; clase 2 = transmitido por vía parenteral (es decir, hepatitis C)); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

En una realización, el antígeno se deriva de bacterias que incluyen, entre otras, *Helicobacter pylori*, *Borellia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* ssp. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógenos, *Enterococcus* sp., *Chlamydia* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Actinomyces israelii* y *Francisella tularensis*.

En una realización, el antígeno se deriva de hongos, incluyendo, entre otros, *Absidia*, tal como *Absidia corymbifera*, *Ajellomyces*, tales como *Ajellomyces capsulatus*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Arthroderma*, tales como *Arthroderma benhamiae*, *Arthroderma fluvium*, *Arthroderma gypseum*, *Arthroderma incurvatum*, *Arthroderma otae*, *Arthroderma vanbreuseghemii*, *Aspergillus*, tales como *Aspergillus falvus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces*, tal como *Blastomyces dermatitidis*, *Candida*, tales como *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida pelliculosa*, *Cladophialophora*, tal como *Cladophialophora carriionii*, *Coccidioides*, tal como *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus*, tal como *Cryptococcus neoformans*, *Cunninghamella*, *Epidermophyton*, tal como *Epidermophyton floccosum*, *Exophiala*, tal como *Exophiala dermatitidis*, *Filobasidiella*, tal como *Filobasidiella neoformans*, *Fonsecaea*, tal como *Fonsecaea pedrosoi*, *Fusarium*, tal como *Fusarium solani*, *Geotrichum*, tal como *Geotrichum candidum*, *Histoplasma*, tal como *Histoplasma capsulatum*, *Hortaea*, tal como *Hortaea werneckii*, *Issatschenkia*, tal como *Issatschenkia orientalis*, *Madurella*, tal como *Madurella griseae*, *Malassezia*, tales como *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Malassezia obtuse*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia restricta*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia sympodialis*, *Microsporum*, tales como *Microsporum canis*, *Microsporum fulvum*, *Microsporum gypseum*, *Mucor*, tal como *Mucor circinelloides*, *Nectria*, tal como *Nectria haematococca*, *Paecilomyces*, tal como *Paecilomyces variotti*, *Paracoccidioides*, tal como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium* tal como *Penicillium marneffeii*, *Pichia*, tales como *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Pneumocystis*, tal como *Pneumocystis carinii*, *Pseudallescheria*, tal como *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus*, tal como *Rhizopus oryzae*, *Rhodotorula*, tal como *Rhodotorula rubra*, *Scedosporium*, tal como *Scedosporium apiospermum*, *Schizophyllum*, tal como *Schizophyllum commune*, *Sporothrix*, tal como *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton*, tales como *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichosporon*, tales como *Trichosporon asahii*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon mucoides*, u otros.

En una realización, el hongo patógeno infecta a hospedantes humanos. En una realización, el hongo patógeno infecta a animales no humanos.

En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos de esta invención permiten el uso combinado de múltiples antígenos procedentes de la misma fuente, de múltiples antígenos procedentes de la misma clase de organismo, de múltiples antígenos procedentes de diferentes clases de organismos, o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance o reducir la incidencia o la gravedad de una infección en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano purificado. En ciertas realizaciones de la invención, la infección es debida a un hongo patógeno. En ciertas realizaciones de la invención, la infección es debida a una bacteria patógena, un virus o un parásito. En ciertas realizaciones de la invención, el sujeto recibe, además de una composición de esta invención, cualquier agente conocido en la técnica por ser útil para tratar o prevenir una infección para la cual el sujeto está en

riesgo, o que el sujeto padece. Así, en una realización, el método comprende administrar a un sujeto (i) una composición de esta invención que comprende β -1-6-glucano; y (ii) un agente antifúngico, antibacteriano, antivírico o antiparasitario conocido. La composición y el agente antifúngico pueden administrarse en una única composición, o por separado. En algunas realizaciones, esta administración separada puede realizarse con un intervalo de hasta 24 o de hasta 48 horas, y en algunas realizaciones, en menos de una hora. La composición puede ser adecuada para su uso en seres humanos, para aplicaciones veterinarias, o para ambos.

En algunas realizaciones, las partículas, los glucanos, las composiciones o sus combinaciones de esta invención estimulan, potencian o favorecen la fijación del complemento.

Según este aspecto, y en algunas realizaciones, los sustratos revestidos, materiales, partículas, esferas, glucanos y/o dispositivos de esta invención pueden utilizarse en métodos para estimular, potenciar o promover respuestas inmunológicas que implican la fijación del complemento, lo cual produce unos efectos terapéuticos en el sujeto. En algunas realizaciones, estas infecciones pueden comprender una infección por cualquiera de los patógenos descritos en la presente. En algunas realizaciones, esta respuesta inmunológica puede dirigirse a la sepsis en el sujeto. En algunas realizaciones, esta respuesta inmunológica puede dirigirse a la enfermedad de Chagas en un sujeto, un patógeno pulmonar, o un parásito o helminto. En algunas realizaciones, esta respuesta inmunológica se dirige contra una infección vírica, tal como HSV.

En algunas realizaciones, los métodos según este aspecto de la invención pueden comprender además la administración de un agente que estimula la elaboración de la cascada del complemento. En algunas realizaciones, según este aspecto de la invención, los métodos pueden comprender además la administración de un anticuerpo que reconoce de modo específico el agente patógeno con el que está infectado el sujeto.

En una realización, el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados, que en una realización contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado, y ciertas realizaciones contiene entre 10%, 20%, o entre 20% y 25% en peso de glucano O-acetilado. En otra realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un péptido, un compuesto inmunoestimulador, un compuesto quimioterapéutico o sus combinaciones. En una realización, el antígeno o el péptido se deriva de la fuente de la infección. En una realización, el compuesto inmunoestimulador es una citoquina. En otra realización, el compuesto quimioterapéutico es un antibiótico o un compuesto antivírico.

En otra realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, prolongar la remisión, o reducir la incidencia o la gravedad del cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una composición que comprende β -1-6-glucano purificado.

En una realización, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor, o en otra realización, el péptido se deriva de un antígeno asociado a un tumor.

En una realización, el sujeto tiene una lesión hiperplásica o preneoplásica. En otra realización, el sujeto tiene cáncer.

En una realización, los cánceres asociados con los siguientes antígenos del cáncer pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos y las composiciones de la invención: antígeno pan-carcinoma KS 1/4 (Pérez y Walker, 1990, *J. Immunol.*, 142:32-37; Bumal, 1988, *Hybridoma*, 7(4):407-415), antígeno del carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.*, 1991, *Cancer Res.*, 51(2):48-475), fosfato del ácido prostático (Tailor *et al.*, 1990, *Nucl. Acids Res.*, 18(1):4928), antígeno específico de próstata (Henttu y Viiko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 10(2):903-910; Israeli *et al.*, 1993, *Cancer Res.*, 53:227-230), antígeno asociado con el melanoma p97 (Estin *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Instit.*, 81(6):445-44), antígeno del melanoma gp75 (Vijayasardahl *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.*, 171(4):1375-1380), antígeno del melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, *Cancer*, 59:55-3; Mittelman *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.*, 86:2136-2144), antígeno de la membrana específica de la próstata, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 13:294), antígeno de la mucina epitelial polimórfico, antígeno del glóbulo de la grasa de la leche humano, antígenos asociados a tumores colorrectales, tales como CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, *Cancer Res.*, 52:3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer*, 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, *J. Clin. Immunol.*, 2:135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, *Blood*, 83:1329-1336), antígeno del linfoma B humano CD20 (Reff *et al.*, 1994, *Blood*, 83:435-445); CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, *J. Nucl. Med.*, 34:422-430), antígenos específicos del melanoma, tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.*, 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, *J. Clin. Oncol.*, 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, *Cancer Res.*, 53:5244-5250), antígeno de la superficie celular de tipo de trasplante específico de tumor (TSTA), tal como antígenos tumorales inducidos por virus, que incluyen virus tumorales de ADN de antígeno T y virus tumorales de ARN de antígenos de la envuelta, antígeno oncofetal de alfa-fetoproteína, tal como CEA del colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al.*, 1985, *Cancer Res.*, 45:2210-2188), antígeno de diferenciación, tal como antígeno del carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom *et al.*, 1986, *Cancer Res.*, 46:3917-3923), antígenos del fibrosarcoma, antígeno de células T de leucemia humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, *J. of Immun.*, 141:1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno del cáncer de mama, tal como EGFR (receptor del factor del crecimiento epidérmico), antígeno de HER2 (p185HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.*, 17:359), antígeno

de linfocitos humanos malignos APO-1 (Bernhard *et al.*, 1989, Science, 245:301-304), antígeno de la diferenciación (Feizi, 1985, Nature, 314:53-57), tal como el antígeno 1 que se encuentra en eritrocitos fetales y endodermo primario, 1(Ma) que se encuentra en adenocarcinomas gástricos, M18 y M39 que se encuentran en el epitelio de la mama, SSEA-1 que se encuentra en células mieloides, VEP8, VEP9, My1, VIM-D5, y D156-22 que se encuentran en el cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 que se encuentra en el adenocarcinoma colónico, F3 que se encuentra en el adenocarcinoma pulmonar, AH6 que se encuentra en el cáncer gástrico, hapteno Y, Ley que se encuentra en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF que se encuentra en células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) que se encuentra en el cáncer pancreático, FC10.2 que se encuentra en células de carcinoma embrionario, adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) que se encuentra en adenocarcinomas, NS-10 que se encuentra en adenocarcinomas, CO-43 (grupos sanguíneo Leb), G49, receptor de EGF (grupo sanguíneo ALeb/Ley) que se encuentra en el adenocarcinoma colónico, 19.9 que se encuentra en el cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico, T5A7 que se encuentra en células mieloides, R24 que se encuentra en el melanoma, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, M1:22:25.8 que se encuentra en células de carcinoma embrionario y SSEA-3, SSEA-4 que se encuentra en embriones de etapa 4-8. En otra realización, el antígeno es un péptido derivado del receptor de células T de un linfoma de células T cutáneo (véase Edelson, 1998, The Cancer Journal, 4:62).

En otra realización, la proteína o el péptido antigénico se deriva de HER2/neu o del antígeno corioembrionario (CEA) para la supresión/inhibición de cánceres de mama, ovario, páncreas, colon, próstata y pulmón, que expresan estos antígenos. De modo similar, los antígenos de tipo mucina, tal como MUC-1, pueden utilizarse contra diversos carcinomas; los antígenos Mage, BAGE, y Mart-1 pueden utilizarse contra melanomas. En una realización, los métodos pueden adaptarse para un paciente con cáncer concreto, de forma que la elección de la proteína o del péptido antigénico se base en el antígeno o antígenos que son expresados en las células cancerosas del paciente, que pueden predeterminarse, en otras realizaciones, mediante una biopsia quirúrgica o una muestra de células sanguíneas, seguido de un procedimiento de inmunohistoquímica.

En otras realizaciones, esta invención proporciona el uso combinado de β -glucanos y un compuesto inmunomodular, o de composiciones que los contienen.

Los ejemplos de proteínas inmunomoduladoras útiles incluyen citoquinas, quimioquinas, componentes del complemento, moléculas accesorias del sistema inmunológico y de adhesión y sus receptores con especificidad humana o de animal no humano. Los ejemplos útiles incluyen, pero no se limitan a GM-CSF, IL-2, IL-12, OX40, OX40L (gp34), linfotactina, CD40, y CD40L. Otros ejemplos útiles incluyen, pero no se limitan a interleuquinas, por ejemplo interleuquinas 1 a 15, interferón-alfa, -beta o -gamma, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), quimioquinas tales como la proteína activadora de neutrófilos (NAP), quimioatrayentes de macrófagos y factor activador (MCAF), RANTES, péptidos inflamatorios de macrófagos MIP-1a y MIP-1b, componentes del complemento y sus receptores, o una molécula accesorias, tal como B7.1, B7.2, TRAP, ICAM-1, -2 o -3, y receptores de citoquinas. OX40 y OX40-ligando (gp34) son otros ejemplos útiles de proteínas inmunomoduladoras. Debe entenderse que cualquier compuesto que puede potenciar, estimular o mitigar o abrogar una respuesta inmunológica, en concierto con los glucanos según se describen en la presente en una respuesta inmunológica dada, pueden incorporarse en las composiciones de esta invención, o utilizarse según los métodos de esta invención, y deben considerarse una realización de esta.

En otra realización, esta invención proporciona el uso combinado de β -glucanos y al menos un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador o sus combinaciones, o de composiciones que los contienen. En otra realización, esta invención proporciona el uso combinado de β -glucanos, o de composiciones que los contienen, que pueden obtenerse a partir de múltiples fuentes, de combinaciones de estos glucanos y dos o más adyuvantes, antígenos, compuesto inmunomoduladores, o sus combinaciones. Los β -glucanos pueden ser cualquiera de los β -glucanos descritos en la presente, en diversas realizaciones de la invención.

Tras haber sido formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. En algunas realizaciones, los sujetos que se van a tratar son animales incluyendo, por ejemplo, ganado. En algunas realizaciones, los animales que se van a tratar son seres humanos. En algunas realizaciones, pueden tratarse machos u hombres y/o hembras o mujeres con las composiciones y/o según los métodos de esta invención. En algunas realizaciones, los sujetos que se van a tratar son niños y niñas y/o adolescentes y/o adultos.

En un aspecto de la presente invención, los neutrófilos inducen la expresión de la proteína del choque término (HSP) tras la exposición al β -glucano. Cuanto mayor sea la exposición al β -glucano, mayor será la expresión de HSP y también la inmunomodulación corriente abajo, en algunas realizaciones.

Las microesferas revestidas con β -1,6-glucano, en oposición al β -1,3-glucano, son más eficaces para inducir la expresión de HSP, la producción de ROS, etc.

Las HSP ya están asociadas con péptidos que pueden presentarse sobre células presentadoras de antígenos de MHC de clase I y II. En una realización, tras el reconocimiento del β -1,6-glucano en la composición y/o según un método de esta invención, los neutrófilos en el sujeto al cual se administra el glucano o las células que se ponen en

contacto con este, expresan HSP para señalar a otras células inmunológicas, lo cual conduce a la presentación de otros antígenos sobre células presentadoras de antígenos.

En una realización, esta invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados, o cualquiera de sus realizaciones según se describe en la presente. En otra realización, esta invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano conjugado con un soporte sólido, o cualquiera de sus realizaciones según se describe en la presente. En otra realización, esta invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende β -1-6-glucano, o cualquiera de sus realizaciones según se describe en la presente. En una realización, el β -glucano en la composición comprende al menos de aproximadamente 35-99% en peso, o en otra realización aproximadamente 45-99% en peso, o en otra realización aproximadamente 55-99% en peso, o en otra realización aproximadamente 65-99% en peso, o en otra realización aproximadamente 75-99% en peso, o en otra realización aproximadamente 85-99% en peso, o en otra realización aproximadamente 90-99% en peso de β -1-6-glucano, comparado con cualquier otro β -glucano. En una realización, el término "aproximadamente" se refiere a una varianza del 1-10%, o en otra realización del 5-15%, o en otra realización hasta 10%, o en otra realización hasta 25% de varianza desde los valores indicados, excepto cuando el contexto indique que la varianza no debe producir un valor mayor que 100%.

Según este aspecto de la invención, y en una realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende estimular dicha respuesta inmunológica, que en una realización es una respuesta específica de antígeno. En una realización, la composición comprende además un compuesto inmunoestimulador, o en otra realización, un compuesto quimioterapéutico. En otra realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un agente infeccioso, un cáncer, una lesión preneoplásica, o sus combinaciones, y las composiciones comprenden, o la administración de β -1,6-glucano es útil en este contexto. En una realización, según este aspecto de la invención, pueden administrarse otros agentes, o en otra realización, las composiciones para su uso según este aspecto pueden comprender otro agente, que sea útil en este contexto.

En una realización, según este aspecto de la invención, el otro agente puede comprender un agente antiinflamatorio, tal como betametasona, prednisolona, piroxicamo, aspirina, flurbiprofeno y (+)-N-{4-[3-(4-fluorofenoxi)fenoxi]-2-ciclopenten-1-il]-N-hidroxiurea; un agente antivírico, tal como aciclovir, nefinavir, o virazol; un antibiótico, tal como ampicilina y penicilina G o que pertenece a la familia de las penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídicos, macrólidos, carbapenem y penem, beta-lactama monocíclica, inhibidores de beta-lactamasas, tetraciclinas, antibióticos polipeptídicos, cloranfenicol y derivados, ácido fusídico, lincomicina, novobiocina, espectinomicina, ionóforos polietéricos, quinolonas; un agente antiinfeccioso, tal como cloruro de benzalconio o clorhexidina; dapsona, cloranfenicol, neomicina, cefaclor, cefadroxilo, cefalexina, cefradina, eritromicina, clindamicina, lincomicina, amoxicilina, ampicilina, bacampicilina, carbenicilina, dicloxacilina, ciclacilina, picloxacilina, hetacilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, que incluye penicilina G y penicilina V, ticarcilina, rifampina y tetraciclina; un agente antiinflamatorio, tal como diflunisal, ibuprofeno, indometacina, meclofenamato, ácido mefenámico, naproxeno, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicamo, sulindaco, tolmetina, aspirina y salicilatos; un agente antifúngico, tal como anfotericina B, inhibidores de la síntesis de glucano, tales como caspofungina, micafungina, o anidulafungina (LY303366), econazol, terconazol, fluconazol, voriconazol o griseofulvina; un agente antiprotosoario, tal como metronidazol; un agente antineoplásico de tipo imidazol, tal como tubulazol; un agente antihelmíntico, tal como tiabendazol u oxfendazol; un agente antihistamínico, tal como astemizol, levocabastina, cetirizina, o cinnarizina; un agente descongestionante, tal como pseudoefedrina; un agente antipsicótico, tal como fluspirileno, penfluridol, risperidona o ziprasidona; un agente antineoplásico, tal como compuestos de platino (por ejemplo, espiroplatino, cisplatino, y carboplatino), metotrexato, fluorouracilo, adriamicina, mitomicina, ansamitocina, bleomicina, citosina arabinósido, arabinosiladenina, mercaptopolisina, vincristina, busulfano, clorambucilo, melfalano (por ejemplo, PAM, L-PAM o fenilalanina mostaza), mercaptopurina, mitotano, clorhidrato de procarbazona, dactinomicina (actinomicina D), clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, paclitaxel y otros taxenos, rapamicina, manumicina A, TNP-470, plicamicina (mitramicina), aminoglutetimida, estramustina fosfato sodio, flutamida, acetato de leuprolida, acetato de megestrol, citrato de tamoxifeno, testolactona, trilostano, amsacrina (m-AMSA), asparaginasa (L-asparaginasa), asparaginasa de *Erwinia*, interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, tenipósido (VM-26), sulfato de vinblastina (VLB), sulfato de vincristina, sulfato de bleomicina, hidroxiiurea, procarbazona, y dacarbazona; un inhibidor mitótico, tal como etopósido, colchicina, y los vinca-alcaloides, un compuesto radiofarmacéutico, tal como yodo radiactivo y productos del fósforo, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende estimular la respuesta inmunológica, que en una realización es una respuesta específica de antígeno. Según este aspecto de la invención y en una realización, la composición comprende además un compuesto inmunoestimulador, o en otra realización, un compuesto quimioterapéutico. En una realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un agente infeccioso, un cáncer, una lesión preneoplásica, o sus combinaciones, o cualquier realización, según se describe en la presente.

En algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de esta invención se aplican o son útiles para estimular

- el sistema inmunológico en un individuo (animal o ser humano) mediante la administración oral o parenteral de composiciones que contienen los β -glucanos, según se describe en la presente. En algunas realizaciones, estas composiciones y/o métodos son eficaces para reforzar la respuesta inmunológica, por ejemplo, de individuos o pacientes que tienen lesiones, están inmunocomprometidos o presentan una malnutrición de proteínas. Un individuo inmunocomprometido se refiere, en algunas realizaciones, a una persona que muestra una capacidad atenuada o reducida para armar una defensa celular o humoral normal frente a la exposición a un agente infeccioso, por ejemplo, virus, bacterias, hongos y protozoos. Un individuo que presenta malnutrición de proteínas se refiere, en algunas realizaciones, a una persona cuyo nivel de albúmina en suero es menor que aproximadamente 3,2 gramos por decilitro (g/dl) y/o tiene una pérdida de peso involuntaria mayor que 10% del peso corporal habitual.
- En algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de esta invención se emplean para tratar de modo terapéutico o profiláctico animales o seres humanos que tienen un mayor riesgo de infección debido a una cirugía inminente, lesiones, enfermedades, radiación o quimioterapia, u otra condición que afecte de modo perjudicial al sistema inmunológico. En algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de esta invención se utilizan para tratar pacientes que tienen una enfermedad o un trastorno que provoca que la respuesta inmunológica normal se vea reducida o disminuida, tal como una infección por VIH (SIDA) o que están recibiendo una terapia inmunosupresora (por ejemplo, individuos que son candidatos a trasplantes o que han recibido un trasplante, individuos que padecen una enfermedad autoinmunitaria, etc.). En algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de esta invención se emplean para preiniciar una respuesta inmunológica en pacientes que están sometidos a quimioterapia o terapia de radiación, o que tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones secundarias o complicaciones postoperatorias debido a una enfermedad, un trastorno o un tratamiento que da como resultado una capacidad reducida para movilizar las respuestas normales del cuerpo frente a una infección.
- En otra realización, la modulación de la respuesta inmunológica comprende inframodular o abrogar la respuesta inmunológica. Según este aspecto, y en una realización, la composición comprende además un inmunosupresor. En una realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un autoantígeno, o en otra realización, un alérgeno, o en otra realización, la respuesta inmunológica se dirige contra tejido transplantado, o en otra realización, células transplantadas.
- En una realización, una respuesta inmunológica frente a un antígeno concreto puede ser, en un primer momento, beneficiosa para el hospedante, tal como, por ejemplo, una respuesta dirigida contra un antígeno de un patógeno que ha invadido al sujeto. En una realización, esta respuesta inmunológica puede ser, no obstante, demasiado robusta, de modo que incluso después de haber erradicado o controlado al patógeno, la respuesta inmunológica se mantiene y provoca daños al hospedante, tales como, por ejemplo, provocando una necrosis de tejidos, en tejidos que antes estaban infectados por el patógeno. En estas y otras circunstancias, las composiciones y/o los métodos de esta invención pueden ser útiles para inframodular una respuesta inmunológica, de modo que el hospedante no se vea comprometido de ninguna manera por la persistencia de esta respuesta inmunológica.
- En otra realización, la respuesta inmunológica, cuya infrarregulación se desea, es la enfermedad del hospedante frente al injerto. Con la mejora en la eficacia de las técnicas quirúrgicas para transplantar tejidos y órganos, tales como la piel, riñón, hígado, corazón, pulmón, páncreas y médula ósea, a sujetos, quizás el principal problema destacado sea la respuesta inmunológica armada por el receptor frente al aloinjerto u órgano transplantado, que a menudo provoca su rechazo. Cuando se transplantan células o órganos alogeneicos a un hospedante (es decir, el donante y el receptor son individuos diferentes de la misma especie), es probable que el sistema inmunológico del hospedante arme una respuesta inmunológica frente a los antígenos extraños en el trasplante (enfermedad del hospedante frente al injerto), lo cual conduce a la destrucción del tejido transplantado. Por consiguiente, las composiciones y/o los métodos de esta invención pueden utilizarse, en una realización, para evitar este rechazo de tejido u órganos transplantados.
- En otra realización, la respuesta inmunológica cuya infrarregulación se desea es la enfermedad del injerto frente al hospedante (GVHD). La GVHD es una enfermedad potencialmente letal que se produce cuando células inmunológicamente competentes se transfieren a un receptor alogeneico. En esta situación, las células inmunocompetentes del donante pueden atacar a los tejidos del receptor. Los tejidos de la piel, el epitelio intestinal y el hígado son dianas frecuentes, y pueden resultar destruidos durante la GVHD. La enfermedad presenta un problema especialmente grave cuando se está transplantando tejido inmunológico, tal como en el trasplante de médula ósea, pero también se ha indicado una GVHD grave en otros casos, incluyendo trasplantes de corazón e hígado. Las composiciones y/o los métodos de esta invención pueden utilizarse, en una realización, para prevenir o mejorar esta enfermedad.
- En otra realización, la respuesta inmunológica cuya infrarregulación se desea es cualquier respuesta autoinmunitaria. Según este aspecto de la invención, y en una realización, el método comprende administrar las composiciones descritas en la presente a un sujeto que padece una enfermedad o un trastorno autoinmunitario.
- En una realización, la expresión "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a la presencia de una respuesta autoinmunitaria en un sujeto. En una realización, la expresión "respuesta autoinmunitaria" se refiere a una respuesta inmunológica dirigida contra un autoantígeno. En una realización, la enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, miastenia grave, anemia perniciosa, enfermedad de

Addison, lupus eritematoso, síndrome de Reiter, dermatitis atópica, psoriasis o enfermedad de Graves.

Según este aspecto y en algunas realizaciones, las composiciones de esta invención pueden comprender además un inmunosupresor. En algunas realizaciones, los métodos de esta invención pueden hacer uso de la administración al mismo tiempo o posterior de un inmunosupresor.

5 En una realización, la enfermedad o el trastorno autoinmunitario está asociado con una excesiva actividad de neutrófilos, infiltración de neutrófilos, desgranulación de neutrófilos, etc. En una realización, el trastorno es un trastorno que afecta a la piel. Según este aspecto, y en una realización, los glucanos, las composiciones, los conjugados, las partículas, las micelas, etc., según se describen en la presente, pueden aplicarse directamente a la piel.

10 En una realización, la composición comprende además un esteroide. En algunas realizaciones, estas composiciones son útiles para infrarregular o abrogar una respuesta inmunológica, y encuentran aplicación en cualquiera de las realizaciones descritas en la presente para infrarregular estas respuestas.

15 En una realización, el término "esteroide" se refiere a esteroides naturales y sus derivados, así como a análogos de esteroides sintéticos o semisintéticos que tienen una actividad de tipo esteroide. En una realización, el esteroide es un glucocorticoide o corticosteroide. Por ejemplo, muchos de estos esteroides tienen una estructura de anillo central condensada basada en ciclopentanfenantreno. Los ejemplos de esteroides naturales y sintéticos específicos incluyen, pero no se limitan a aldosterona, beclometasona, betametasona, budesonida, cloprednol, cortisona, cortivazol, desoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, difluorocortolona, fluciclorolona, flumetasona, flunisolida, flucinolona, fluocinonida, flucortina butilo, fluorocortisona, fluorocortolona, fluorometolona, flurandrenolona, fluticasona, halcinonida, hidrocortisona, icometasona, meprednisona, 25 metilprednisolona, parametasona, prednisolona, prednisona, tixocortol o triamcinolona, y sus respectivas sales farmacéuticamente aceptables o derivados. Se apreciará que las combinaciones de estos esteroides también pueden utilizarse según esta invención.

25 En algunas realizaciones, estas composiciones son útiles para estimular o potenciar una respuesta inmunológica, y encuentran aplicación en cualquiera de las realizaciones descritas en la presente para estimular o potenciar estas respuestas. En una realización, el esteroide es un andrógeno, o un agonista de un receptor de andrógeno.

30 En otra realización, la composición comprende β -1,3-glucanos que tiene ramificaciones de β -1,6-glucano (también denominados beta-1,3/1,6-glucano o beta-1,3-glucano beta-1,6 ramificado), en la que al menos algunas de las ramificaciones de β -1,6-glucano están enriquecidas en grupos O-acetilados. En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende (i) β -1,6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados; y (ii) β -1,3-glucano β -1,6-ramificado. En otra realización, la composición está sustancialmente exenta de β -1,3-glucano. En ciertas realizaciones, la composición contiene menos del 75%, o menos del 50%, o menos del 25%, o menos del 10%, o menos del 5%, o menos del 1%, o menos del 0,1%, de β -1,3-glucano en peso. En ciertas realizaciones, menos del 50%, o menos del 25% o 10%, o menos del 5%, o menos del 1%, o menos del 0,1%, del total de glucanos en la composición en peso es β -1,3-glucano.

35 Debe entenderse que la inframodulación de cualquier respuesta inmunológica, a través de las composiciones y/o los métodos de esta invención, se considera parte de esta invención y una realización de esta.

40 En una realización, las composiciones y/o los métodos de esta invención estimulan y/o potencian la secreción de sustancias, que median en los efectos supresores. En una realización, las composiciones y/o los métodos de esta invención median en la supresión de transeúntes, sin que sea necesario un contacto directo con las células. En una realización, las sustancias que median en la supresión segregadas por las poblaciones de células T supresoras de esta invención pueden incluir IL-10, TGF- β , o sus combinaciones.

45 En otra realización, la modulación de la respuesta inmunológica puede comprender desplazar el tipo celular que participa en la respuesta inmunológica, un producto celular elaborado durante la respuesta inmunológica y/o el carácter global de la respuesta, por ejemplo, desplazando una respuesta de tipo Th1 a una respuesta de tipo Th2, o viceversa. En una realización, los métodos/las composiciones de esta invención proporcionan la formación de una respuesta "Th1", en una enfermedad en la que se ha desarrollado una respuesta denominada de tipo "Th2", cuando el desarrollo de una respuesta denominada de tipo "Th1" es beneficiosa para el sujeto.

50 En una realización, la expresión "respuesta de tipo Th2" se refiere a un patrón de expresión de citoquinas, inducidas por células T auxiliares como parte de la respuesta inmunológica adaptativa, que apoya el desarrollo de una respuesta de anticuerpos robusta. Generalmente, las respuestas de tipo Th2 son beneficiosas en infecciones por helmintos en un sujeto, por ejemplo. Generalmente las respuestas de tipo Th2 se reconocen por la producción de interleuquina-4 o interleuquina-10, por ejemplo.

55 En otra realización, la expresión "respuesta de tipo Th1" se refiere a un patrón de expresión de citoquinas, inducidas por células T auxiliares como parte de la respuesta inmunológica adaptativa, que apoya el desarrollo de una inmunidad mediada por células robusta. Generalmente, las respuestas de tipo Th1 son beneficiosas en infecciones

intracelulares en un sujeto, por ejemplo. Generalmente las respuestas de tipo Th1 se reconocen por la producción de interleuquina-2 o interferón- γ , por ejemplo.

5 En otra realización, las composiciones y/o los métodos de esta invención son útiles para modular la respuesta, de modo que cuando se ha desarrollado una respuesta de tipo Th1, cuando las respuestas de tipo Th2 proporcionan un resultado más beneficioso a un sujeto, los métodos y/o las composiciones de esta invención proporcionan un desplazamiento hacia el perfil de citoquinas más beneficioso. Un ejemplo puede ser la lepra, en la que las composiciones y/o los métodos de la presente invención estimulan un desplazamiento de citoquinas Th1, dando como resultado una lepra tuberculoide, en oposición a la lepra lepromatosa, una forma mucho más grave de la enfermedad asociada a respuestas de tipo Th2.

10 En otra realización, esta invención proporciona un método para inducir la expresión de proteínas de choque térmico en una célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígenos, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula presentadora de antígenos con una composición que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados.

15 En otra realización, esta invención proporciona un método para inducir la expresión de proteínas de choque térmico en una célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígenos, comprendiendo dicho método poner en contacto la célula presentadora de antígenos con una composición que comprende β -1-6-glucano conjugado con un soporte sólido.

Tal como se ejemplifica en la presente, la fagocitosis de partículas que comprenden β -1-6-glucano, pero no composiciones que comprenden β -1-3-glucano, estimula la inducción de proteínas de choque término (hsp).

20 En una realización, la célula es un neutrófilo. En otra realización, la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica o un macrófago.

Según este aspecto de la invención, y en otra realización, esta invención proporciona un método para inducir la expresión de proteínas de choque térmico en células, por ejemplo, células presentadoras de antígenos, neutrófilos, etc., comprendiendo dicho método poner en contacto las células presentadoras de antígenos/neutrófilos con una composición que comprende β -1-6-glucano, en el que al menos 25% de las unidades de glucosa en al menos 5% de las moléculas de glucano están enriquecidas en grupos O-acetilados.

25

En otra realización, la invención proporciona un método para estimular o potenciar la presentación de antígenos, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula presentadora de antígenos con una composición que comprende β -1-6-glucano, en el que dicho contacto estimula o induce la presentación de antígenos por dicha célula presentadora de antígenos.

30

En una realización, las células fagocíticas sufren una apoptosis tras captar el β -1-6-glucano. Según este aspecto de la invención, y en una realización, la invención proporciona un método para estimular o promover la apoptosis celular, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula con una composición que comprende β -1-6-glucano, en el que la composición induce la expresión de al menos una proteína de choque térmico en dicha célula y la posterior apoptosis de dicha célula. Según este aspecto, y en una realización, la célula procede de un sujeto con una infección o una enfermedad autoinmunitaria, y la estimulación de la apoptosis de dichas células proporciona un efecto terapéutico en el sujeto.

35

En algunas realizaciones, esta invención proporciona un método para modular la respuesta de macrófagos, que comprende poner en contacto macrófagos con neutrófilos que se han puesto en contacto con una composición que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados.

40

En otra realización, la invención proporciona un método para modular una respuesta inmunológica en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una composición que comprende un β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, en el que el resto de transporte dirigido interacciona de modo específico o atrae a una célula fagocítica.

45 En una realización, la modulación de dicha respuesta inmunológica comprende estimular dicha respuesta inmunológica, que en una realización es una respuesta específica de antígeno. En una realización, la composición comprende además un compuesto inmunoestimulador, o en otra realización, la composición comprende además un compuesto quimioterapéutico. En una realización, la respuesta inmunológica se dirige contra un agente infeccioso, un cáncer, una lesión preneoplásica o sus combinaciones, y en otra realización, la respuesta inmunológica depende del complemento.

50

En una realización, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, o reducir la incidencia o la gravedad de una infección en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una composición que comprende un β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, en el que dicho resto de transporte dirigido interacciona de modo específico o atrae a una célula fagocítica. En una realización, la composición comprende además un adyuvante, un antígeno, un péptido, un compuesto inmunoestimulador, un

55

compuesto quimioterapéutico o sus combinaciones. En una realización, el antígeno o el péptido se derivan de la fuente de la infección. En otra realización, el compuesto inmunoestimulador es una citoquina. En otra realización, el compuesto quimioterapéutico es un antibiótico o un compuesto antivírico.

5 En una realización, esta invención proporciona un método para estimular o potenciar la expresión de proteínas de choque térmico en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto a la célula con una composición que comprende un β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, en el que el resto de transporte dirigido interacciona de modo específico o atrae a una célula fagocítica.

10 En algunas realizaciones, los métodos de esta invención actúan para potenciar la actividad de una diversidad de células del sistema inmunológico, tales como macrófagos, células dendríticas, etc., en algunas realizaciones además de los neutrófilos, o en otras realizaciones en lugar de los neutrófilos.

En algunas realizaciones, los métodos de esta invención actúan como una estrategia general para estimular los efectos citotóxicos celulares, mediante el uso de un ligando, que actúa para dirigirse a la célula o al material cuya respuesta citotóxica se desea, conjugado con un glucano de esta invención, que a su vez actúa, en algunas realizaciones, para estimular la citotoxicidad contra la célula o el material diana.

15 En algunas realizaciones, los glucanos descritos en la presente, las composiciones que los comprenden, y el β -1-6-glucano físicamente asociado con un resto de transporte dirigido, y las composiciones que los comprenden, pueden actuar para potenciar la lisis mediada por el complemento en un sujeto. En algunas realizaciones, esta potenciación puede implicar la respuesta de células fagocíticas, por ejemplo, potenciando los neutrófilos o los macrófagos, u otras respuestas citotóxicas y fagocitosis de células presentadoras de antígenos profesionales. En algunas realizaciones, esta potenciación puede ser independiente de la implicación de células fagocíticas, por ejemplo, mediante la potenciación de la formación y/o la actividad de complejos de ataque de membrana.

20 En algunas realizaciones, esta invención proporciona un método para tratar, retrasar el avance, prolongar la remisión, o reducir la incidencia o la gravedad de un cáncer en un sujeto, a través de poner en contacto una célula en un sujeto, o administrar al sujeto un glucano, una composición, un conjugado, una micela, una preparación o una partícula de esta invención.

25 En algunas realizaciones, debe entenderse que la invención incluye composiciones que comprenden, y conjugados que comprenden cualquier compuesto que favorezca el reclutamiento de células inmunológicas, por ejemplo células de la respuesta inmunológica innata, tales como neutrófilos. Estos compuestos se denominan en la presente, entre otras denominaciones, un resto de transporte dirigido, que favorece la activación de células inmunológicas, las respuestas inmunológicas estimuladoras, la citotoxicidad contra una diana deseada, que en algunas realizaciones es establecida como objetivo específico a través del resto descrito, por ejemplo, mediante la especificidad dictada por un anticuerpo o fragmento conjugado o asociado con el glucano.

30 En algunas realizaciones, la invención comprende conjugados y composiciones que comprenden un anticuerpo con una especificidad deseada para ajustarse a una aplicación concreta, según se describe en la presente, y como apreciarán los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, estos conjugados y las composiciones/las preparaciones según se describen en la presente, pueden comprender, entre otros, cualquier compuesto de fijación del complemento conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los conjugados y las composiciones/las preparaciones según se describen en la presente excluyen de modo específico el factor del veneno de cobra, pero utilizan cualquier otro compuesto fijador del complemento. En algunas realizaciones, los conjugados y las composiciones/las preparaciones según se describen en la presente pueden comprender cualquier polisacárido, excepto el dextrano. En algunas realizaciones, los conjugados y las composiciones/las preparaciones según se describen en la presente pueden comprender cualquier glucano incluyendo, entre otros, β -1,6-glucano acetilado, β -1,6-glucano, una mezcla de β -1,3-glucano y β -1,6-glucano, β -1,3-glucano, una mezcla de β -1,3-glucano y β -1,4-glucano, β -1,4-glucano, glucanos acetilados y/o cualquier glucano que comprende cualquier otra modificación. En algunas realizaciones, los conjugados y las composiciones/las preparaciones según se describen en la presente pueden comprender cualquier glucano, incluyendo las formas genéticamente modificadas, por ejemplo, β -glucanos sintetizados en bacterias, levaduras, células de mamífero, etc., por medios recombinantes.

En algunas realizaciones, los conjugados y las composiciones/las preparaciones según se describen en la presente pueden aplicarse a la inmunización de un sujeto con *Candida albicans* y otras infecciones fúngicas.

35 En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el contacto puede producirse fuera del cuerpo de un sujeto o dentro del cuerpo. En una realización, se retiran células, tales como células presentadoras de antígenos, que en algunas realizaciones son neutrófilos, o macrófagos o células dendríticas, de un sujeto, se ponen en contacto con la composición, y después se administran al sujeto en un momento posterior. En una realización, las células se ponen en contacto con la composición durante un tiempo suficiente para inducir la expresión de proteínas de choque térmico. En una realización, las células se ponen en contacto con la composición durante un tiempo suficiente para inducir la producción de especies de oxígeno reactivas. En una realización, el sujeto recibe una terapia inmunosupresora antes de la administración a las células. Por ejemplo, un sujeto puede necesitar una terapia inmunosupresora para el trasplante de órganos o para otros fines, por ejemplo, quimioterapia o terapia de radiación

- para el cáncer, leucemia, linfoma u otro tipo de tumor, en la que la terapia tiende a hacer que el individuo esté inmunocomprometido. En una realización de la invención, antes de administrar la terapia inmunosupresora, se retiran células del sistema inmunológico del sujeto. Las células (que en algunas realizaciones son neutrófilos, o en otras realizaciones son otras células del sistema inmunológico, tales como otras células presentadoras de antígenos profesionales, tales como macrófagos o células dendríticas) se ponen en contacto fuera del cuerpo con una composición de esta invención, y después se devuelven al sujeto un periodo de tiempo adecuado después de que el sujeto haya recibido la terapia inmunosupresora. El periodo de tiempo adecuado puede ser, por ejemplo, después de que la terapia haya sido administrada o cuando sus efectos citotóxicos hayan disminuido, cuando el sujeto está en riesgo o muestra síntomas o señales de infección, etc.
- 5 Debe entenderse que los métodos y/o las composiciones de esta invención, que afectando/modulando una respuesta inmunológica a su vez evitan una enfermedad y/o mejoran una enfermedad y/o alteran el avance de una enfermedad deben considerarse parte de esta invención.
- En algunas realizaciones, la expresión “poner en contacto” o el término “administrar” se refieren a la exposición directa e indirecta al material indicado.
- 15 En algunas realizaciones, las composiciones y/o los métodos de esta invención comprenden o utilizan un vehículo o vehículos estériles o no estériles para la administración a células, tejidos u organismos, tales como un vehículo farmacéutico adecuado para la administración a un individuo. Estos vehículos pueden incluir, pero no se limitan a disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol y sus combinaciones. La formulación debe adaptarse a la vía de administración.
- 20 Las composiciones o los glucanos de esta invención pueden administrarse de cualquier manera eficaz y conveniente, incluyendo, por ejemplo, la administración por vía intravascular (i.v.), intramuscular (i.m.), intranasal (i.n.), subcutánea (s.c.), oral, rectal, intravaginal, o por cualquier medio en el que el glucano/la composición pueda administrarse a un tejido (por ejemplo, aguja o catéter). Como alternativa, la administración tópica puede ser deseable para la inserción en células epiteliales. Otra vía de administración es mediante aspiración o formulación en aerosol. En algunas realizaciones, el glucano se administra implantando o introduciendo en el cuerpo de un sujeto un implante u otro dispositivo médico o quirúrgico que comprenda el glucano, por ejemplo, como un componente de una capa de revestimiento.
- 25 En una realización, la invención proporciona un suplemento alimentario que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados. En una realización, la invención proporciona un producto alimentario que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados. En otra realización, la invención proporciona una composición cosmética que comprende β -1-6-glucano enriquecido en grupos O-acetilados.
- 30 En algunas realizaciones, un alimento o un producto alimentario es cualquier sustancia que sea sustancialmente no tóxica que pueda ser metabolizada por un organismo para producir energía y construir tejidos. En algunas realizaciones, un alimento o un producto alimentario indica un producto previsto para su ingestión por un mamífero, por ejemplo, por seres humanos, que tiene valor nutricional. En algunas realizaciones, un alimento o un producto alimentario indica un producto regulado como alimento o producto alimentario por la U.S. Food and Drug Administration (FDA). En algunas realizaciones, un alimento o un producto alimentario es un producto envasado en un recipiente que porta una etiqueta que indica que el producto es un alimento o un producto alimentario. En algunas realizaciones, un alimento o un producto alimentario es un producto envasado en un recipiente que porta una etiqueta que proporciona información nutricional con respecto al producto, tal como las calorías, las grasas, o el contenido en proteínas, o el contenido en una o más vitaminas o minerales. En algunas realizaciones, un suplemento alimentario (también denominado “suplemento dietético”) es cualquier sustancia que se añade a un alimento o a un producto alimentario. En algunas realizaciones, el suplemento alimentario comprende, además de un glucano de esta invención, uno o más nutrientes esenciales, tales como vitaminas, minerales, y proteínas. En algunas realizaciones, el suplemento alimentario es cualquier producto previsto para la ingestión como suplemento a la dieta y puede comprender, además de un glucano de esta invención, una o más vitaminas, minerales, hierbas, medicamento botánico, y otras sustancias derivadas de plantas; aminoácidos; y concentrados, metabolitos, constituyentes y extractos de estas sustancias. En algunas realizaciones, el alimento, el producto alimentario, el suplemento alimentario, o la composición cosmética no pretende diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad. En algunas realizaciones, el suplemento alimentario se proporciona en un recipiente u otro material de envasado, etiquetado para indicar que los contenidos son alimentos o suplementos dietéticos, por ejemplo, según las actuales leyes de EEUU y/o directrices de la FDA. En algunas realizaciones, el suplemento o producto alimentario comprende de aproximadamente 0,01% al 30% en p/p del glucano, y también puede comprender vitaminas, oligosacáridos, ingredientes dietéticos, proteínas, o sus combinaciones.
- 45 En algunas realizaciones, la proporción de los componentes no está fijada, o en otras realizaciones, esta proporción puede variar de aproximadamente 0,01% al 30% en p/p por 100% en p/p. Los ejemplos de alimentos que comprenden el glucano de la invención mencionado anteriormente son diversos alimentos, bebidas, gomas de mascar, complejos vitamínicos, alimentos que mejoran la salud y similares.
- 55 La composición puede comprender además uno o más de un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido fumárico,

ácido adípico, ácido láctico, ácido málico; fosfato, tal como fosfato, fosfato de sodio, fosfato de potasio, pirofosfato ácido, polifosfato; antioxidantes naturales, tales como polifenol, catequina, alfa-tocoferol, extracto de romero, vitamina C, extracto de raíz de regaliz, quitosano, ácido tánico, ácido fítico, etc.

5 En algunas realizaciones, una composición cosmética o para el cuidado personal es una composición que potencia o mejora el aspecto de al menos una porción del cuerpo, por ejemplo, cabello, uñas, piel, etc. En una realización, la composición embellece el cuerpo. En una realización, la composición devuelve un aspecto más juvenil. En una realización, cualquier composición aplicada o administrada a un sujeto se considera un cosmético si se administra con el fin de potenciar o mejorar el aspecto de al menos una porción del cuerpo, por ejemplo, el cabello, las uñas, la piel, etc., o para devolver un aspecto más juvenil. En algunas realizaciones, las composiciones cosméticas o de cuidado personal de esta invención pueden comprender un emoliente, un agente hidratante, un agente calmante, un agente bloqueante del ultravioleta A o B, un retinoide, un agente colorante, o una fragancia, etc. En algunas realizaciones, la composición cosmética o para el cuidado personal contiene, además de un glucano de esta invención, cualquier otro componente reconocido en la técnica como útil para proporcionar un efecto beneficioso para el aspecto. En algunas realizaciones, la composición cosmética o para el cuidado personal se proporciona en un recipiente etiquetado para indicar su uso previsto como cosmético y/o etiquetado para indicar que es sólo para uso externo.

20 En algunas realizaciones, las composiciones de esta invención se formulan como ungüento tópico, loción, gel, o crema que contiene el ingrediente o ingredientes activos en una cantidad, por ejemplo, del 0,0001% al 50% en p/p, por ejemplo, del 0,075% al 20% en p/p (que incluyen el ingrediente o ingredientes activos en un intervalo entre 0,1% y 20% en incrementos del 0,1% en p/p, tales como 0,6% en p/p, 0,7% en p/p, etc.), a menudo del 0,2% al 15% en p/p, y lo más a menudo del 0,5% al 10% en p/p). En algunas realizaciones, cuando se formula como un ungüento, los ingredientes activos pueden emplearse con una base parafínica o de ungüento miscible en agua. En algunas realizaciones, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua.

25 En algunas realizaciones, la fase acuosa de la base de la crema puede incluir, por ejemplo, al menos 30% en p/p de un alcohol polihidroxílico, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo, tal como propilenglicol, butan-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y sus mezclas. En algunas realizaciones, las formulaciones tópicas pueden incluir un compuesto que potencia la absorción o la penetración del ingrediente o ingredientes activos a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen sulfóxido de dimetilo y análogos relacionados.

30 En algunas realizaciones, las composiciones de esta invención utilizan emulgentes y/o estabilizantes de la emulsión, tales como, por ejemplo, Tween 60™, Span 80™, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y/o laurilsulfato de sodio.

35 En algunas realizaciones, la elección de los aceites o grasas adecuados para la formulación se basa en lograr las propiedades cosméticas deseadas. Las cremas en general son no grasientas, no manchan, y son productos que se eliminan con un lavado, con la consistencia adecuada para evitar que se salgan de los tubos u otros recipientes. Pueden utilizarse ésteres de alquilo mono- o dibásicos, de cadena lineal o ramificada, tales como diisoadipato, estearato de isocetilo, diéster de propilenglicol de ácidos grasos de coco, miristato de isopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo, o una mezcla de ésteres de cadena ramificada conocidos como Crodamol CAP. Estos pueden utilizarse por sí solos o en combinación, dependiendo de las propiedades requeridas. En algunas realizaciones, se emplean lípidos de alto punto de fusión, tales como parafina blanca blanda y/o parafina líquida u otros aceites minerales.

40 En algunas realizaciones, las composiciones se formulan para su uso como colirios, en las que el ingrediente o ingredientes activos se disuelven o se suspenden en un excipiente o excipientes adecuados, por ejemplo, un disolvente acuoso para el ingrediente o ingredientes activos que comprende una o más cargas a unos valores de pH cercanos a la neutralidad, por ejemplo, pH aproximadamente 6-8. En algunas realizaciones, el ingrediente o ingredientes activos están presentes en estas formulaciones en una concentración de aproximadamente 0,5-20% en p/p, generalmente de aproximadamente 1-10% en p/p, a menudo de aproximadamente 2-5% en p/p.

45 En algunas realizaciones, las composiciones de esta invención se formulan para la administración tópica en la boca, y pueden incluir pastillas para chupar que comprenden el ingrediente activo en una base aromatizada, que puede comprender sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas, que comprenden el ingrediente o ingredientes activos en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica, u otros; o colutorios, que comprenden el ingrediente activo en un excipiente o excipientes líquidos adecuados, u otros, como apreciarán los expertos en la técnica.

55 Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para la administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,01 a 500 micrómetros (incluyendo un tamaño medio de partícula en un intervalo entre 0,01 y 500 micrómetros en incrementos de 0,01 micrómetros o en otros incrementos, por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,5, 1,

1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 30, 35, 50, 75, 100 micrómetros, etc.), que se administran mediante inhalación rápida a través del conducto nasal, o mediante inhalación a través de la boca para alcanzar los sacos alveolares. Las formulaciones micronizadas adecuadas incluyen disoluciones o suspensiones acuosas u oleosas del ingrediente o ingredientes activos. Las formulaciones adecuadas para la administración en aerosol, polvo seco o comprimido pueden prepararse según métodos convencionales, y pueden administrarse con otros agentes terapéuticos, tales como los compuestos utilizados hasta este momento para el tratamiento o la profilaxis de infecciones víricas u otras infecciones, según se describe en la presente. Esta formulación puede administrarse, por ejemplo, por vía oral, parenteral (intravenosa, intramuscular, subcutánea), tópica, o mediante una vía bucal. Según este aspecto de la invención, y en algunas realizaciones, el β -1,6-glucano utilizado en la composición está enriquecido en glucano O-acetilado, tal como se describe en la presente, conjugado con una partícula o una esfera, según se describe en la presente, o sus combinaciones.

Las formulaciones adecuadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverizar que contienen, además del ingrediente o ingredientes activos, los excipientes conocidos en la técnica por ser apropiados.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Las formulaciones se presentan en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden conservarse en una condición liofilizada que sólo requiere la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Se preparan disoluciones y suspensiones para inyección improvisadas a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descritos. Las formulaciones de dosificación unitaria son las que contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, según se indica en la presente, o una fracción apropiada de estas, del ingrediente o ingredientes activos.

En algunas realizaciones, los β -glucanos de esta invención, en cualquier de sus formas según se describe en la presente, se administrarán a un sujeto a una dosificación de 0,1 mg a aproximadamente 50 mg/kg de peso del sujeto. En algunas realizaciones, los β -glucanos de esta invención se administrarán según cualquier régimen, en términos del número de veces diarias, duración del tiempo, etc., que puede ajustarse como parte del desarrollo de una terapia para un sujeto, tal como apreciarán los expertos en la técnica.

Debe entenderse que además de los ingredientes mencionados en concreto anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes o excipientes convencionales en la técnica tomando en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

Será evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse diversas modificaciones y variaciones en las composiciones, el uso y las preparaciones de la presente invención se apartarse del espíritu ni del alcance de la invención.

Para la administración a mamíferos, y en concreto a seres humanos, se espera que en el caso de las medicaciones, el médico u otro profesional sanitario titulado pueda determinar la dosificación y la duración del tratamiento reales que sean las más adecuadas para un individuo, y estas pueden variar según la edad, el peso, y la respuesta del individuo concreto. Se apreciará que, en el caso de medicaciones sin receta médica, alimentos, productos alimentarios, suplementos alimentarios, composiciones cosméticas y de cuidado personal, la cantidad puede ser determinada a discreción por el usuario, opcionalmente tomando en cuenta las indicaciones de la etiqueta o de un profesional sanitario apropiado u otro asesor.

Ejemplos

45 Materiales y métodos

Fagocitos

Se aislaron neutrófilos y monocitos según se ha descrito (Rubin-Bejarano, I., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(19): pp. 11007-11012) a partir de sangre humana fresca recogida de voluntarios sanos según un protocolo aprobado por el MIT Committee on Use of Humans as Experimental Subjects.

50 *Preparación de Candida*

La cepa de *Candida* fue la cepa que se emplea habitualmente en laboratorios CAF2-1 (Ca). *Candida* se cultivó en medio convencional (YPD), según se ha descrito (Sherman, *supra*). Se utilizaron cultivos desarrollados durante la noche en todos los experimentos (aproximadamente 3×10^8 células/ml), debido a que se descubrió que la población de *Candida albicans* era más homogénea (contenía >99% de células en forma de levadura) que los cultivos en fase semilogarítmica.

Para ensayar el modo en que los neutrófilos reconocen a los hongos, y para evitar cualquier alteración de los hongos por el medio, por los neutrófilos o por la manipulación de los neutrófilos por los hongos, los hongos se inactivaron mediante UV, que mata a las células pero no altera la estructura de la pared fúngica (Wheeler, R.T. y G.R. Fink, PLoS Pathog., 2006, 2(4): p. e35).

5 Opsonización de *Candida*

Se generó una agrupación de suero humano fresco a partir de diez voluntarios sanos, y se utilizó para todos los experimentos. Las células fúngicas se preopsonizaron en suero al 50% en disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin cloruro de calcio y sin cloruro de magnesio (Gibco) durante 15 minutos a 37 °C en un mezclador. Las células después se incubaron en hielo durante 5 minutos, se lavaron dos veces con 0,04 mg/ml del inhibidor de proteasa AEBSF (Sigma) en el mismo tampón, y después se lavaron dos veces con el mismo tampón sin AEBSF. Las células fúngicas se volvieron a contar.

Coincubación de fagocitos con *Candida*

Se mezclaron neutrófilos o monocitos con células de *Candida albicans* a una proporción de fagocito:diana 1:5. Los fagocitos se cultivaron con hongos opsonizados o solos en RPMI 1640 a 37 °C durante 2 horas, y se congelaron en reactivo TRI (MRC) a -80 °C.

Procedimiento de micromatrices

Se preparó el ARN total siguiendo el protocolo del reactivo TRI, excepto que para la precipitación del ARN, se incubó con isopropanol durante la noche a 4 °C. La síntesis de la primera y la segunda hebra, la transcripción *in vitro*, la hibridación, y el barrido se realizaron como se ha descrito previamente (Rubin-Bejarano, I., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100(19): pp. 11007-11012). Las micromatrices fueron matrices GeneChip Human Genome U133A 2.0 (Affymetrix).

Análisis de las micromatrices

Se normalizaron conjuntos de datos y se nivelaron a 20. Se calcularon las proporciones de expresión de neutrófilos cultivados con *Candida* dividido entre la expresión de neutrófilos control solos. Se definieron los genes inducidos y reprimidos como los que tienen una proporción de expresión mayor que dos desviaciones estándar desde la media para un experimento concreto. Los únicos genes que fueron constantemente inducidos o reprimidos en dos experimentos por duplicado se consideraron inducidos o reprimidos.

PCR a tiempo real (RT-PCR) sobre neutrófilos que han captado a *Candida*

Se preparó el ARN total siguiendo el protocolo del reactivo TRI, excepto que para la precipitación del ARN, se incubó con isopropanol durante la noche a 4 °C. Se creó ADNc utilizando el kit High cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Se realizó una RT-PCR cuantitativa utilizando ensayos de expresión de genes TaqMan® (Applied Biosystems) y un sistema de PCR a tiempo real 7500 (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante. Se emplearon los siguientes ensayos de expresión de genes TaqMan®: ACTB (Hs99999903_m1), DNAJB1 (Hs00428680_m1), HSPCB (Hs00607336_gH), HSPH1 (Hs00198379_m1), CXCL2 (Hs00236966_m1), y CCL3 (Hs00234142_m1). Se calculó la inducción en número de veces como la proporción de expresión de los fagocitos cultivados en una condición experimental, dividido entre la expresión de fagocitos control solos.

Carbohidratos

La laminarina (Sigma) es una preparación de β -1,3-glucano puro, y el pustulano (Calbiochem) es una preparación de β -1,6-glucano puro. El dextrano (Fluka) es un β -1,6-glucano. Los glucanos de la cebada (Sigma) está compuestos por β -1,3-glucano (30%) y β -1,4-glucano (70%). El pustulano se procesó según se ha descrito (Lindberg, B. y J. McPherson, Acta Chem. Scand., 1954, 8: pp. 985-988). Cuando se indica, el pustulano se digirió específicamente utilizando una endo- β -1,6-glucanasa (Lora, J.M., De la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. y Pintor-Toro, J.A., Mol. Gen. Genet., 1995, 247: pp. 639-645). La enzima fue un generoso obsequio del doctor Nick Zecherle (Biomarin Pharmaceutical, Inc.). Los productos de la reacción se analizaron mediante filtración en gel y cromatografía en capa fina.

Cromatografía de filtración en gel

Se aplicó pustulano (20 mg) a una columna BioGel P6 (1,5 x 120 cm, BioRad, malla 200-400). La columna se equilibró en ácido acético 0,1 M y se ensayó a un caudal constante de 15 ml/h, se recogieron fracciones de 1,5 ml y se midieron los carbohidratos mediante el método del fenol-ácido sulfúrico. Las fracciones que contenían los picos se secaron dos veces para la completa eliminación del ácido acético, y se suspendieron en agua a 10-20 mg/ml. Se utilizó el citocromo C como marcador del volumen de exclusión y la glucosa como marcador del volumen de inclusión.

Cromatografía en capa fina (TLC)

5 Se ascendieron muestras (5 µl) dos veces sobre placas de gel de sílice 60 (Merck, 0,25 mm), longitud de 20 cm. El sistema disolvente fue n-butanol/etanol/agua (5:3:2). Las muestras y los patrones se visualizaron calentando las placas a 80 °C después de una pulverización con fenol-ácido sulfúrico. Los patrones de genticoligosacáridos se prepararon a partir de hidrolizado ácido parcial de pustulano y se aislaron mediante una cromatografía BioGel P4 según se ha descrito (Magnelli, P., Cipollo, J.F., y Abeijon, C. (2002), Anal. Biochem., 301, 136-150).

O-desacetilación del pustulano

Se ajustó el pustulano (3 ml, 15 mg/ml) hasta NaOH 0,1 M y se incubó durante 1 hr a 37 °C, y se dializó contra agua.

Preparación de microesferas revestidas con glucano

10 Se revistieron microesferas de poliestireno de 6,0 micrómetros Polybead (Polysciences, Inc.) con polisacáridos según se ha descrito (Schlesinger, L.S., S.R. Hull, y T.M. Kaufman, J. Immunol., 1994, 152(8): pp. 4070-4079). El pustulano tiende a solidificar a temperatura ambiente.

15 El pustulano se solubilizó en agua hirviendo, y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente antes de su aplicación a las esferas. Se detectó el revestimiento de las microesferas mediante el método del fenol-ácido sulfúrico, midiendo los carbohidratos (Duboius, M., *et al.*, Anal. Biochem., 1956, 28: pp. 350-356).

20 A menos que se indique lo contrario, sólo las esferas con 6-15 µg de glucosa por 1 ml (2×10^8 esferas) se incluyeron en el análisis (véase la tabla 1). Se descubrió que los polisacáridos cortos no revestían a las esferas de forma eficaz con este método. Además, mediante este método, los glucanos acetilados revisten mejor a las esferas que los glucanos no acetilados. Cuando no están acetilados, se añade más glucano a las esferas para lograr unos niveles similares de revestimiento.

Opsonización de las esferas

Las esferas se opsonizaron según se describió anteriormente para *Candida*.

Coincubación de neutrófilos con esferas

Las esferas se coincubaron con neutrófilos según se describió anteriormente para *Candida*.

25 *PCR a tiempo real de neutrófilos que han captado a las esferas*

Se realizó una RT-PCR según se describió anteriormente para *Candida*. Se calculó la inducción en número de veces como la proporción de expresión de neutrófilos cultivados con esferas revestidas con carbohidratos frente a neutrófilos cultivados con esferas sin tratar.

Ensayo de producción de especies de oxígeno reactivas (ROS)

Entrada de pustulano (µg de glucosa)	Revestimiento de pustulano (µg de glucosa/ml)	Expresión de PMN (inducción en nº de veces)		
		DNAJB1	HSPCB	HSPH1
14.400	37,3	5,2	4,7	8,3
10.800	19,6	4,6	4,9	10,3
7.200	9,0	7,6	7,2	21,0
3.600	9,2	2,8	2,4	3,9
1.800	6,6	3,3	3,0	4,9
900	6,6	3,3	2,8	5,9

30 Se ensayó la producción de ROS utilizando DHR123 (Molecular Probes), que se hace fluorescente cuando se oxida. Se cultivaron 5×10^6 neutrófilos con las esferas indicadas a una proporción de 1:5 en un volumen de 1 ml durante 1 hr a 37 °C. Se añadió 1 µl de DHR123 (D-23806) a 200 µl de cultivo. Después de una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, las células se ensayaron mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

35 **Identificación de proteínas séricas que se unen a β-1,6-glucano**

Las esferas se revistieron con cantidades equivalentes de β-1,3-glucano y β-1,6-glucano, y se opsonizaron tal como se describió anteriormente. Las esferas se suspendieron en SDS al 2%, tampón de hidróxido de amonio 1 M, y se

incubaron a 37 °C durante 1 hora. El sobrenadante se cargó sobre un gel de acrilamida al 4-20%-SDS. El gel se tiñó con tinte de plata, y las bandas se cortaron para un análisis mediante espectroscopía de masas.

Análisis de la transferencia Western de C3

5 Se ensayó el depósito de C3 utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cadena alfa o beta de C3b (RDI Reasearch Diagnostics).

Ensayo de destrucción

Se determinó la viabilidad de *Candida albicans* utilizando XTT tal como se describió anteriormente (Meshulam, T., Levitz, S.M., Christin, L., y Diamond, R.D. (1995), J. Infect. Dis., 172, 1153-1156).

Experimentos de preincubación

10 Se preincubó suero con una cantidad equivalente de laminarina o pustulano soluble durante 5 minutos a 37 °C. El suero después se utilizó para opsonizar esferas revestidas con pustulano según se describió anteriormente.

Ab de bloqueo de CR3

Se preincubaron neutrófilos con anti-Mac-1 humano o control de isotipo IgG (Bender Med Systems) durante 30 minutos sobre hielo antes de añadirlos a esferas revestidas con pustulano opsonizadas.

15 **Ejemplo 1: El β-1,6-glucano estimula a los neutrófilos**

Se utilizó la cepa de *Candida* CAF2-1 para analizar la respuesta de los neutrófilos a los hongos. Los experimentos de micromatrices demostraron que los neutrófilos que fagocitan a *Candida* expresan proteínas de choque térmico (HSP) (HSPE1 de 10 kDa, DNAJB1 y DNAJB9 de 40 kDa, HSPA1A y HSPA9B de 70 kDa, HSPCA y HSPCB de 90 kDa, y HSPH1 de 105/110 kDa) (tabla 2), junto con citoquinas y quimioquinas, tales como el ligando del receptor de IL-8 CXCL2, y CCL3.

Tabla 2

nº	Nombre del conjunto de sondas Affymetrix	Gen	Exp. 1	Exp. 2
1	208744_x_at	HSPH1	4,3	4,9
1	206976_s_at	HSPH1	7,2	9,6
2	205133_s_at	HSPE1	2	9,7
3	200064_at	HSPCB	3	6,7
3	214359_s_at	HSPCB	3,1	7,1
4	211969_at	HSPCA	2,7	5,7
4	210211_s_at	HSPCA	3	5,2
4	211968_s_at	HSPCA	3,6	7,2
5	200690_at	HSPA9B	2,8	3,1
6	202581_at	HSPA1A	10,8	12
7	202842_s_at	DNAJB9	6,8	6,6
7	202843_at	DNAJB9	9,1	9,7
8	200666_s_at	DNAJB1	5,8	10,1
8	200664_s_at	DNAJB1	5,9	11,2

La expresión de HSP por neutrófilos fue corroborada por una RT-PCR cuantitativa (figura 1A).

La inducción de HSP fue mayor si *Candida* primero se calienta para descubrir el β-glucano subyacente (figura 1B), lo cual sugiere que la expresión de HSP es proporcional al β-glucano expuesto.

25 Para ensayar cuál de los componentes del glucano es el responsable de esta inducción, se presentaron a los

neutrófilos con diversos polímeros de glucano. Los glucanos en la forma soluble producen sólo unos niveles bajos de HSP en neutrófilos (figura 1E).

5 Puesto que los neutrófilos responden mejor al material en partículas, se conjugaron varias fuentes de β -glucano con esferas de poliestireno de 6 micrómetros, que tienen un tamaño similar a las células con forma de levadura de *Candida albicans* (5 μ). Se utilizó β -1,3-glucano y β -1,6-glucano purificados a partir de paredes celulares de *Candida* (figura 1C), así como fuentes no fúngicas de β -1,3-glucano y β -1,6-glucano que se habían utilizado como patrones en estudios previos (figura 1D) (Brown, G.D. *et al.*, Nature, 413, 36-37; Palma, A.S. *et al.*, J. Biol. Chem., 281, 5771-5779).

10 Las esferas revestidas con pustulano o β -1,6-glucano de *Candida albicans* inducen unos altos niveles de HSP en neutrófilos (figura 1C,D), mientras que las esferas revestidas con laminarina o β -1,3-glucano de *Candida albicans* inducen una expresión mínima de HSP (figura 1C,D), a pesar del revestimiento eficaz de las esferas. El β -glucano de la cebada, que está compuesto de β -1,3-glucano (30%) y β -1,4-glucano (70%) tampoco indujo la expresión de HSP (figura 1E). Las esferas revestidas con α -1,6-glucano (dextrano) no indujeron ninguna respuesta (figura 1E), lo cual sugiere que la respuesta de los neutrófilos es específica de la configuración β . La inducción de HSP requiere componentes séricos termolábiles, puesto que las esferas revestidas con pustulano no indujeron HSP cuando se opsonizan con suero termoinactivado (HI) (figura 1D). El β -1,6-glucano acetilado indujo unos mayores niveles de HSP que el β -1,6-glucano no acetilado (comparar la figura 1D con la figura 1C, y con la figura 2F), teniendo el β -1,6-glucano una mayor capacidad estimuladora que el β -1,3-glucano (figura 1C,D).

Ejemplo 2: La inducción de HSP por el pustulano es debida al β -1,6-glucano y al β -1,6-glucano O-acetilado

20 Para confirmar que la inducción de HSP por el pustulano es debida al β -1,6-glucano, el pustulano se digirió con una endoglucanasa específica para el enlace del β -1,6-glucano (Lora, J.M. *et al.*, Mol. Gen Genet., 247, 639-645).

25 El producto de la digestión produjo una reducción de aproximadamente 80% en la inducción de HSP (figura 2A). El análisis de los productos de la digestión del pustulano mediante columnas de tamaño P-6 (véase el apartado de métodos) reveló un pico principal de productos pequeños (figura 2, comparar B con C) compuesto por di- y trisacáridos, según se determina mediante TLC (G2-G3, compara el carril 2 y 3, figura 2D). Estos polímeros cortos en la fracción G2-G3 no revisten a las esferas con eficacia.

30 Además de los productos de la digestión por la β -1,6-glucanasa esperados, que constituyen la gran mayoría del pustulano, se observó un pequeño pico que era resistente a la enzima (figura 2C, denominado V_0), que corresponde al 4-5% del material de partida. El material en este pico fue reconocido por el anticuerpo antiglucano e indujo la expresión de HSP en los neutrófilos. Para determinar si el pico pequeño resistente a la digestión enzimática es una forma modificada del polímero, por ejemplo, una forma acetilada, el producto se desacetiló.

35 La desacetilación del pustulano antes del fraccionamiento prácticamente suprimió este componente menor (figura 2E) e hizo que este residuo no pudiese inducir HSP (figura 2F). Estos experimentos demuestran que el pustulano es un polímero de β -1,6-glucosa que contiene una pequeña cantidad de β -1,6-glucano O-acetilado o β -1,6-glucano O-modificado de otra forma. La inducción residual de HSP por el pustulano digerido con endo- β -1,6-glucanasa puede atribuirse a que el pustulano O-acetilado es resistente a la enzima y reviste a las esferas con eficacia.

Ejemplo 3: El β -1,6-glucano media en la fagocitosis eficaz y la producción de especies de oxígeno reactivas por los neutrófilos

40 Se revistieron microesferas de poliestireno Polybead (esferas) con β -glucanos y después se opsonizaron. Se evaluó la fagocitosis de esferas revestidas con laminarina (figura 3A, a y b) o pustulano (figura 3A, c y d) mediante microscopía de larga duración.

45 Un análisis mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) de los neutrófilos que ingirieron las esferas reveló que las esferas revestidas con pustulano se internalizaron con más eficacia que las esferas revestidas con laminarina, aunque la laminarina estimuló la internalización mejor que las esferas sin revestir (figura 3B, comparar el panel e con c y a, respectivamente).

50 Puesto que la destrucción de los patógenos por los neutrófilos depende de un aumento brusco de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Babior, B.M. *et al.*, J. Clin. Invest., 52, 741-744), se evaluó la inducción de ROS por cualquiera de los dos glucanos. No pudieron detectarse ROS en neutrófilos solos ni en neutrófilos a los que se les presentaron esferas que no habían sido tratadas (figura 3C, rojo y verde, respectivamente). Se detectaron unos niveles bajos con esferas revestidas con laminarina, β -1,3-glucano de *Candida albicans* o β -glucano de cebada (figura 3C, azul, marrón, y morado, respectivamente). Sin embargo, las esferas revestidas con pustulano estimularon la generación de cantidades significativas de ROS (figura 3C, azul claro). No se detectaron ROS mediante la adición de pustulano soluble (figura 3C, rosa). Estos datos demuestran que el β -1,6-glucano evoca una producción masiva de ROS, mientras que la respuesta al β -1,3-glucano es mucho menor en comparación.

De manera similar, en la figura 10, se demuestra que el β -1,6-glucano es necesario para una fagocitosis eficaz de *Candida albicans*, la producción de ROS, y la expresión de HSP, mostrando las muestras sometidas a una digestión con β -1,6-glucanasa una menor eficacia.

Ejemplo 4: Depósito del complemento sobre esferas revestidas con β -1,6-glucano

5 Puesto que se requiere suero para la fagocitosis y la inducción de HSP por las esferas revestidas con β -1,6-glucano (figura 1D), resulta de interés determinar si existe un componente en el suero que se deposita diferencialmente sobre esferas revestidas con β -1,6-glucano o β -1,3-glucano. Las esferas se revistieron con laminarina o pustulano y se opsonizaron. Las proteínas unidas se retiraron de las esferas y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS. Aunque una serie de proteínas séricas se unieron al β -1,3-glucano o al β -1,6-glucano, fueron dos proteínas
10 destacadas las que se adhirieron con más avidez al β -1,6-glucano (figura 4A). Estas proteínas se extrajeron del gel y se sometieron a un análisis mediante espectrometría de masas. Los péptidos de estas bandas produjeron unas masas que identificaron a ambas proteínas como C3, lo cual sugiere que los fragmentos proteolíticos de C3 se depositan con más avidez sobre el β -1,6-glucano que sobre el β -1,3-glucano.

Un análisis de la transferencia Western reveló que, en efecto, el β -1,6-glucano se deposita con más C3 (figura 4B).
15 Los anticuerpos específicos de la cadena-alfa detectaron unas bandas de alto peso molecular, que incluyen bandas del tamaño de C3 completo o C3b (105 y 115 kDa, respectivamente), así como un doblete de menor peso molecular con el tamaño de C3d (31 y 33 kDa, figura 4B a). Las esferas revestidas con laminarina tenían unos niveles bajos de estos fragmentos C3 (figura 4B a). Los anticuerpos específicos de la cadena-beta de C3 revelaron sólo C3/C3b de alto peso molecular (figura 4B b). No se detectó la cadena de 75 kDa de C3b o iC3b (figura 4B b).

20 Ejemplo 5: Otros estudios de depósito del complemento

Para evaluar aún más las diferencias en el depósito de C3 sobre el β -1,6-glucano, comparado con el β -1,3-glucano, se preincubó suero con pustulano o laminarina soluble antes de utilizarlo para opsonizar esferas revestidas con pustulano. La preincubación del suero con pustulano soluble elimina la fagocitosis (figura 5A, comparar c y a) y la
25 producción de ROS (figura 5B, comparar rojo y azul) por los neutrófilos, lo cual sugiere que hay demasiado β -1,6-glucano soluble para el C3 sérico. El suero que se preincubó con una cantidad equivalente de laminarina soluble aún media en la fagocitosis (figura 5A, comparar b y a) y la producción de ROS (figura 5B, compara rojo y verde), lo cual sugiere que el β -1,3-glucano no bloquea de forma eficaz la interacción de C3 con las esferas revestidas con pustulano.

Un análisis de la transferencia Western revela que la preincubación con pustulano soluble elimina la mayoría del depósito de C3/C3b y C3d sobre las esferas revestidas con pustulano (figura 5C, comparar 1 con 3). Una preincubación con laminarina elimina el doblete de C3d de bajo peso molecular, pero mantiene C3/C3d de alto peso molecular (figura 5C, comparar 2 con 3), lo cual sugiere que el C3/C3b remanente está mediando en la fagocitosis y la inducción de ROS (figura 5A y B). Una preincubación del suero con pustulano soluble reduce la destrucción de *Candida* (figura 5D).

35 Ejemplo 6: Papel del CR3 en la fagocitosis

Se sabe que el receptor del complemento 3 (CR3) media en la fagocitosis de levadura opsonizada y la preparación de paredes celulares de levadura zimosano, así como en producción de ROS, y así CR3 media en la fagocitosis de esferas revestidas con β -1,6-glucano. Anticuerpos de bloqueo anti-CR3 humano reducen el grado de fagocitosis (figura 6A, comparar b con a) y la producción de ROS (figura 6B, comparar rojo con verde), lo cual sugiere que CR3
40 reconoce los fragmentos proteolíticos de C3b (C3d) que se depositan sobre β -1,6-glucano en partículas.

Ejemplo 7: El β -1,6-glucano induce la producción de quimioquinas en monocitos

Para evaluar el papel de los β -1,6-glucanos para inducir la producción de quimioquinas en monocitos, se revistieron microesferas de poliestireno Polybead (esferas) con cantidades equivalentes del β -1,3-glucano laminarina (lam), o del β -1,6-glucano pustulano (pus). Las esferas se opsonizaron con suero humano reunido. Los monocitos se
45 cultivaron durante 2 horas con 5 mg/ml de lam o pus soluble, o con las esferas descritas anteriormente. La inducción de quimioquinas se determinó mediante una PCR a tiempo real cuantitativa. Los resultados se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar (figura 7).

Ejemplo 8: Conjugados de β -1,6-glucano

Para determinar si la actividad de los neutrófilos puede potenciarse, se buscó la unión física del polisacárido con
50 agentes de transporte dirigido, tales como anticuerpos monoclonales con la especificidad apropiada.

En este escenario, se espera que el depósito del complemento sobre el polisacárido β -1,6-glucano reclute a neutrófilos y potencie la captación del complejo entero (figura 8). Se sabe que algunos anticuerpos específicamente se unen mal al complemento (por ejemplo, IgG2 e IgG4). La capacidad diferencial de IgG1 e IgG4 humanas para activar el complemento está determinada por la secuencia COOH-terminal del dominio CH2, y esta tecnología

potenciaría su eficacia.

La unión entre el polisacárido y el anticuerpo puede lograrse mediante una serie de medios, incluyendo protocolos descritos para unir polisacáridos a proteínas (por ejemplo, Bystricky S., *et al.*, Glyconconj. J., octubre de 2000, 17(10):677-680; y Tianhong Chen, *et al.*, Langmuir, 2003, 19, 9382-9386). Otro medio para esta unión comprende modificar el extremo reductor del polisacárido para que comprenda un grupo amino, según se ha descrito (Xia, B., *et al.*, Nat. Methods, noviembre de 2005, 2(11):845-850; Valdivia, A., *et al.*, J. Biotechnol., 10 de abril de 2006, 122(3):326-333). El grupo amino después puede acoplarse al extremo terminal carboxilo del anticuerpo.

Con este fin, se unió el pustulano (un polisacárido de β -1,6-glucano de 20 kDa, que tiene del 10-20% de grupos O-acetilo) con un anticuerpo monoclonal anti-*Candida albicans* siguiendo métodos previos para unir el manano a BSA (Bystricky S., *et al.*, Glycoconj. J., octubre de 2000, 17(1):677-680). El producto se dializó contra agua, y se aislaron los complejos mayores que 100 kDa utilizando unas columnas de exclusión molecular apropiadas (figura 9A). Se aisló una fracción mayor que 100 kDa y mostró unas características bandas del anticuerpo y una mancha que indica la presencia del polisacárido, lo cual indica que los dos están en la misma fracción. Puesto que el peso molecular del polisacárido es de 20 kDa, esto sugiere que el polisacárido y el anticuerpo estaban unidos.

Se realizó la cuantificación del azúcar utilizando un método de fenol-ácido sulfúrico descrito (Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956), Anal. Biochem., 28, 350-356). Con ello se confirmó la presencia del polisacárido en la fracción mayor que 100 kDa.

Se evaluó el efecto del anticuerpo modificado sobre la producción de ROS por neutrófilos cultivados con *Candida albicans*. Los neutrófilos cultivados con *Candida albicans* en presencia del anticuerpo sin tratar produjeron niveles bajos de ROS (figura 9B). Sin embargo, el anticuerpo unido covalentemente al polisacárido indujo la producción de altos niveles de ROS por los neutrófilos. La mezcla del anticuerpo sin tratar y el polisacárido, sin unirlos covalentemente, no produjo un efecto comparable, lo cual indica que el polisacárido debe unirse al anticuerpo para inducir la producción de ROS.

Ejemplo 9: Protección *in vivo* mediada por β -1,6-glucano

Puesto que la activación del complemento fue mediada por el β -1,6-glucano *in vitro*, resulta de interés determinar si estas respuestas protectoras pueden provocarse *in vivo* en modelos de ratón. Para este fin, primero se determinó si el suero murino activa el complemento (figura 11). Esferas revestidas con pustulano (β -1,6-glucano) y opsonizadas con suero murino mostraron activación del complemento, comparado con las esferas revestidas con laminarina (β -1,3-glucano). Ratones inyectados con células de *Candida albicans* (10^6) por vía intravenosa, seguido de una inyección de 10^5 esferas revestidas con β -1,6-glucano o esferas sin tratar se evaluaron para la supervivencia, demostrando los ratones tratados una supervivencia significativamente prolongada comparado con los ratones sin tratar.

Las esferas de PLGA que encapsulan al β -1,6-glucano inducen la producción de especies de oxígeno reactivas y protegen a los ratones frente a la infección fúngica sistémica (figura 12). Las esferas de PLGA que encapsulan al β -1,6-glucano provocan la producción de niveles mayores de especies de oxígeno reactivas (panel B) y potencian notablemente la supervivencia (panel C), comparado con esferas de PLGA que encapsulan al β -1,3-glucano.

Ejemplo 10: Depósito de inmunoglobulina mediado por β -1,6-glucano

Puesto que la activación del complemento es mediada por el β -1,6-glucano *in vitro*, resulta de interés determinar si también se provocó el depósito de inmunoglobulina. Para este fin, esferas tratadas con pustulano (β -1,6-glucano) y laminarina (β -1,3-glucano), así como esferas sin tratar, se opsonizaron y se evaluaron para el depósito de IgM e IgG (figura 13).

Se produjo un depósito de IgG notablemente mayor en las esferas tratadas con pustulano, comparado con las esferas tratadas con laminarina o sin tratar.

Ejemplo 11: Realización de la producción de micropartículas de PLGA que contienen β -1,6-glucano

El método de encapsulación por evaporación del disolvente se emplea habitualmente para preparar micropartículas de polímeros biodegradables, tales como PLGA y PLA, porque estos poliácidos son muy biocompatibles y tienen una cinética de biodegradación favorable. La encapsulación por evaporación del disolvente implica varias etapas y variaciones habituales:

- 1) El polímero se disuelve en un disolvente inmiscible en agua.
- 2) El medicamento se disuelve, se dispersa o se emulsiona en la disolución polimérica.
- 3) La disolución, la dispersión o la emulsión resultante entonces se emulsiona en una fase acuosa continua, formando gotas discretas.

4) El disolvente inmisible en agua se difunde a través de la fase acuosa y se evapora en la interfase agua-aire, induciendo la precipitación del polímero y la encapsulación del medicamento.

El disolvente debe ser inmisible con el agua y ser un disolvente adecuado para el medicamento, o ser inmisible con otro disolvente que es un disolvente adecuado para el medicamento, de modo que pueda formarse una emulsión primaria del polímero y el fármaco, o debe haber otro método para dispersar el medicamento en la disolución del polímero.

Solubilidad del β-1,6-glucano en los disolventes candidatos

Se determinó la solubilidad del β-1,6-glucano en una serie de disolventes potencialmente útiles en protocolos de microemulsión de múltiples disolventes añadiendo aproximadamente 10 mg/ml del β-1,6-glucano sólido a los disolventes a temperatura ambiente y observando el grado de disolución. Los disolventes miscibles en agua incluyen agua, DMSO, metanol y etanol. Los disolventes inmiscibles en agua incluyen acetona, cloruro de metileno y acetato de etilo. El β-1,6-glucano mostró una solubilidad >10 mg/ml sólo en DMSO, pero fue soluble a concentraciones menores en agua.

Generación de micropartículas que encapsulan al β-1,6-glucano con protocolos convencionales

Utilizando un protocolo convencional para una emulsión de agua en aceite en agua, se encapsuló al β-1,6-glucano utilizando agua como fase interna, cloruro de metileno como fase oleosa, y agua como fase externa. Se lograron unas concentraciones de 25 mg/ml en la fase acuosa interna resolviendo en primer lugar el β-1,6-glucano en DMSO y después añadiendo esto al agua. Las partículas resultantes (2% marcadas) se ensayaron en neutrófilos y no mostraron actividad.

Generación de nanopartículas que encapsulan al β-1,6-glucano con nanoprecipitación

La nanoprecipitación es un método sencillo que es útil para preparar nanopartículas de polímeros que atrapan al fármaco. Las técnicas de nanoprecipitación generalmente incluyen las siguientes etapas:

1) Disolución del polímero y del fármaco en un disolvente.

2) Adición lenta con agitación fuerte de esta disolución de polímero/fármaco a un no disolvente. El no disolvente debe ser miscible con el disolvente, pero el polímero y el fármaco no deben ser solubles en el no disolvente.

Puesto que el β-1,6-glucano y PLGA son muy solubles en DMSO y no solubles en agua, debería ser posible lograr unas nanopartículas en un intervalo de proporciones de glucano/PLGA. Se ensayaron las siguientes condiciones:

β-1,6-glucano	PLGA	Tamaño (nm)
90%	10%	35.650
80%	20%	124
50%	50%	199
25%	75%	206
10%	90%	194
0%	100%	201

A unas concentraciones mayores que 80% de β-1,6-glucano ya no se forman partículas. Las partículas resultantes se ensayaron en neutrófilos y no mostraron actividad.

Desarrollo del protocolo de nanosuspensión-emulsión del β-1,6-glucano: modificación del protocolo de agua en aceite en agua convencional

Generación de la nanosuspensión de β-1,6-glucano

El β-1,6-glucano se resolvió en sulfóxido de dimetilo a temperatura ambiente (50 mg/ml) y se diluyó con un volumen igual de agua desionizada. Esta mezcla se añadió a una disolución de PLGA en diclorometano con sonicación con un sonicador de sonda.

La disolución de DMSO/agua/glucano es miscible con la disolución de PLGA/diclorometano y se forma una única fase. Cuando la disolución de DMSO/agua/glucano se inyecta en diclorometano con agitación (no con sonicación) se produce la precipitación del β-1,6-glucano, y el precipitado forma un gel filamentoso (durante el procedimiento de nanoprecipitación). Con sonicación, la precipitación parece generar una disolución turbia que probablemente es una nanosuspensión o emulsión que está suspendida en una emulsión externa secundaria.

La suspensión generada anteriormente se añade a una disolución de poli(alcohol vinílico) al 1% en agua y se homogeneiza para generar micropartículas de polímero. La evaporación del diclorometano se desarrolla durante 3 horas con agitación a condiciones atmosféricas.

Las partículas resultantes se lavan 3 veces con agua desionizada y se liofilizan para producir un polvo seco.

5 **Ejemplo 12: Los conjugados de β -1,6-glucano pueden mejorar la eficacia de anticuerpos monoclonales**

Algunos anticuerpos monoclonales (mAb) tienen una buena afinidad por su diana, pero no provocan una buena respuesta inmunológica. Algunos mAb podrían ser más eficaces si tuviesen mejores propiedades de unión al complemento. En algunas realizaciones de esta invención, las limitaciones descritas anteriormente del uso de mAb se tratan en términos de cambios en el efecto de conjugar el β -1,6-glucano al mAb, por ejemplo, sobre sus propiedades de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

El polisacárido de β -1,6-glucano se conjuga directamente a una porción Fc de un mAb, por ejemplo mediante la oxidación del polisacárido y/o del anticuerpo con meta-peryodato de sodio. Se ensayan diversos conectores de diamina, incluyendo PEG-diaminas, así como la conjugación basada en biotina-avidina/estreptavidina. Los conjugados se controlan para asegurarse de que conservan la especificidad por la diana, de que conservan las propiedades de unión al complemento del polisacárido, y de que sean solubles.

El β -1,6-glucano se conjuga con una serie de anticuerpos monoclonales singeneicos que tienen la misma especificidad por una célula diana (la misma región Fab), pero diferentes regiones conservadas (Fc), y que tienen diferentes propiedades de unión al complemento. El polisacárido se conjuga con IgG2a e IgG2b, y la capacidad de estos anticuerpos para realizar CDC y/o ADCC *in vitro* se ensaya utilizando tintes que son excluidos por las células vivas (tales como yoduro de propidio) o con radioisótopos que son liberados por las células muertas (tales como ⁵¹Cr-cromo, ToxiLight, que detecta la adenilato quinasa, etc.).

Los anticuerpos conjugados con polisacáridos se comparan con los respectivos anticuerpos no conjugados (mezclados con el polisacárido sin unión covalente), o la IgG1 singeneica, para aumentar la CDC. Los anticuerpos que muestran una mayor CDC en asociación con el polisacárido conjugado se ensayan *in vivo* en un modelo para estas células. Se inyectan ratones con las células diana, seguido de anticuerpos no conjugados, anticuerpos conjugados, o anticuerpos de control de isotipo, y se controlan para la supervivencia.

También se ensayó la conjugación de los polisacáridos a mAb aprobados por la FDA (que incluyen alemtuzumab (campath), bevacizumab (avastatina), cetuximab (erbitux), gemtuzumab (mylotarg), ibritumomab (zevalina), panitumumab (vectibix), rituximab (rituxano), tositumomab (bexxar), trastuzumab (herceptina), palivizumab (synagis)), para el aumento en la eficacia del mAb. Otros mAb que pueden ensayarse pueden comprender los mAb que han demostrado carecer de una estimulación inmunológica adecuada en ensayos clínicos en estudios de protección, cuya capacidad inmunoestimuladora puede potenciarse por su conjugación con los glucanos de esta invención.

35 **Ejemplo 13: Conjugados de β -1,6-glucano para el tratamiento del cáncer**

El cáncer de mama es la segunda causa principal de muerte por cáncer entre la mujeres del mundo occidental, y la principal causa de muerte entre las mujeres entre 30 y 70 años. La mayor mortalidad se limita a las pacientes cuyos nódulos linfáticos regionales están afectados. Una detección temprana, seguida de cirugía, proporciona una buena prognosis. En pacientes con metástasis de nódulos linfáticos oculta, una quimioterapia o una terapia hormonal adyuvante para el cáncer de mama ha demostrado ser eficaz, pero muchas pacientes pueden sucumbir a la metástasis.

Se ha descrito una serie de antígenos asociados a tumores para los carcinomas de mama. La mucina MUC-1, una glicoproteína de alto peso molecular, se expresa en alto grado en los carcinomas de mama. BA-46 es una glicoproteína asociada a transmembrana de la membrana del glóbulo de grasa de la leche humana (HMFG) que se sobreexpresa en carcinomas de mama humanos. Los anticuerpos monoclonales anti-BA-46 radioconjugados se han dirigido con éxito a tumores de mama humanos transplantados en ratones.

Se ensaya el efecto de la conjugación del β -1,6-glucano a MUC-1 y péptidos derivados de BA-46 sobre su capacidad para inducir CTL (linfocitos T citotóxicos) que reconocen preferentemente a péptidos derivados del tumor de mama.

El polisacárido de β -1,6-glucano se conjuga directamente con MUC-1 y con péptidos derivados de BA-46. Los conjugados se controlan para asegurarse de que conservan su especificidad por la diana, de que conservan las propiedades de unión al complemento del polisacárido, y de que sean solubles.

En las reivindicaciones, los artículos tales como “el/la” y “un/una” significan uno o más a menos que se indique lo contrario o que sea evidente lo contrario a partir del contexto. Las reivindicaciones o las descripciones que incluyen “o” o “y/o” entre los miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean o son pertinentes de otra manera para un producto o proceso concreto, a menos

que se indique lo contrario o que sea evidente lo contrario a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea o es pertinente de otra manera para un producto o proceso concreto. Además, debe entenderse que la invención proporciona, en diversas realizaciones, todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en la que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc. de una o más de las reivindicaciones listadas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base, a menos que se indique lo contrario o a menos que resulte evidente para los expertos en la técnica que surgiría una contradicción o incoherencia. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en formato de grupo de Markush o similares, debe entenderse que cada subgrupo de elementos también se describe, y que cualquier elemento o elementos pueden retirarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se indica que la invención, o aspectos de la invención, comprende elementos, características, etc., concretas, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten fundamentalmente en dichos elementos, características, etc. Para simplificar, estas realizaciones no se han indicado específicamente en cada caso *in haec verba* en la presente. Se presentan ciertas reivindicaciones en forma dependiente por comodidad, pero el inventor se reserva el derecho a reescribir cualquier reivindicación dependiente en formato independiente para incluir los elementos o las limitaciones de la reivindicación independiente y cualquier otra reivindicación o reivindicaciones de las que dependa dicha reivindicación, y esta reivindicación reescrita debe considerarse equivalente en todos los aspectos a la reivindicación dependiente en cualquiera que sea su forma (corregida o no corregida) antes de ser reescrita en formato independiente.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición que comprende β -1-6-glucano, opcionalmente enriquecido en grupos O-acetilados, conjugado con una partícula o un soporte sólido, o con un resto de transporte dirigido.
- 5 2.- La composición de la reivindicación 1 conjugada con una partícula o un soporte sólido y con un resto de transporte dirigido.
- 3.- La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el β -1-6-glucano está enriquecido en grupos O-acetilados.
- 4.- La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2,
- (a) en la que dicho glucano contiene al menos 25% en peso de glucano O-acetilado;
- 10 (b) en la que dicho glucano se aísla o se deriva de un líquen, un hongo, una levadura, o *Umbilicariaceae*;
- (c) en la que dicho glucano está genéticamente modificado, o se sintetiza o se acetila de modo químico;
- (d) que comprende además un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones.
- 5.- Las composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso para modular una respuesta inmunológica.
- 15 6.- La composición de la reivindicación 5, en la que:
- (a) la modulación de dicha respueseta inmunológica comprende estimular dicha respuesta inmunológica;
- (b) dicha respuesta inmunológica es una respuesta específica de antígeno;
- (c) dicha composición comprende además un compuesto quimioterapéutico o un compuesto inmunoestimulador;
- (d) dicha respuesta inmunológica depende del complemento;
- 20 (e) dicha respuesta inmunológica se dirige contra un agente infecciosos, un cáncer, una lesión preneoplásica, o sus combinaciones;
- (f) la modulación de dicha respuesta inmunológica comprende inframodular o abrogar dicha respuesta inmunológica;
- 25 (g) dicha respuesta inmunológica se dirige contra un autoantígeno, un alérgeno, tejido transplantado, o células transplantadas;
- (h) dicha respuesta inmunológica es la enfermedad del hospedante frente al injerto, o la enfermedad del injerto frente al hospedante;
- (i) dicha respuesta inmunológica es una respuesta autoinmunológica.
- 7.- La composición de la reivindicación 6, en la que:
- 30 (a) dicho agente infeccioso provoca sepsis;
- (b) dicho agente infeccioso es un parásito, un helminto, un virus o una bacteria;
- (c) dicha composición comprende además un inmunosupresor; o
- (d) dicha respuesta inmunológica se dirige contra un autoantígeno o un alérgeno, tejido o células transplantados.
- 8.- La composición de la reivindicación 1,
- 35 (a) que comprende además un adyuvante, un antígeno, un compuesto inmunomodulador, o sus combinaciones;
- (b) en la que dicha partícula es una microesfera o una nanopartícula;
- (c) en la que la partícula comprende al menos 50% de β -1-6-glucano en peso;
- (d) en la que la partícula comprende glucano, y en la que al menos 50% del glucano es β -1-6-glucano;
- (e) en la que el β -1-6-glucano se distribuye de modo homogéneo en la partícula; o
- 40 (f) en la que la partícula tiene un tamaño apropiado para la fagocitosis por neutrófilos, monocitos, macrófagos, o

células dendríticas.

9.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso para tratar, retrasar el avance, prolongar la remisión, o reducir la incidencia o la gravedad del cáncer o de una infección en un sujeto.

10.- La composición de la reivindicación 9,

- 5 (a) que comprende además un adyuvante, un antígeno, un péptido, un compuesto inmunoestimulador, un compuesto quimioterapéutico, o sus combinaciones;
- (b) en la que dicho sujeto tiene una lesión hiperplásica o preneoplásica; o
- (c) en la que dicho resto de transporte dirigido interacciona de modo específico con un antígeno asociado a un tumor o una célula neoplásica.

10 11.- La composición de la reivindicación 10, en la que:

- (a) dicho antígeno o péptido es un antígeno asociado a un tumor o se deriva de la fuente de infección; o
- (b) dicho compuesto inmunoestimulador es una citoquina; o
- (c) en la que dicho compuesto quimioterapéutico es un antibiótico o un compuesto antivírico.

15 12.- Un método *in vitro* para estimular o potenciar la expresión de proteínas de choque térmico en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

13.- El método de la reivindicación 12,

- (a) en el que dicho glucano está unido a una partícula;
- (b) en el que dicha célula es una célula presentadora de antígenos;
- 20 (c) en el que dicha célula es un neutrófilo; o
- (d) en el que dicha célula está infectada.

14.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es una composición farmacéutica, un alimento o un producto alimentario, un suplemento alimentario, o una composición cosmética.

25 15.- La composición de la reivindicación 14, en la que la composición comprende β -1-6-glucano que ha sido procesado para aumentar su capacidad para modular la respuesta inmunológica con relación al β -1-6-glucano sin procesar, o en la que al menos 50% del glucano contenido en la composición es β -1-6-glucano.

16.- Una micela que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

30 17.- Una composición que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un polímero biodegradable, en la que dicho polímero biodegradable se degrada para formar restos alfa-hidroxiácido o salicilato biológicamente activos.

18.- Una partícula o un dispositivo médico que comprende la composición de la reivindicación 17.

19.- Un dispositivo médico o un implante en el que al menos una porción de la superficie del implante o del dispositivo comprende o está revestida con la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

35 20.- El dispositivo médico de la reivindicación 19, en el que el dispositivo se selecciona del grupo que consiste en un catéter, un implante de estenosis, una válvula, un marcapasos, una línea central, un pesario, un tubo, un implante de derivación, un tubo de alimentación, un drenaje, y aparatos ortopédicos; o en el que la composición comprende un polímero biodegradable.

21.- Un material revestido, que comprende:

- (a) un sustrato; y
- 40 (b) una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, físicamente asociada con al menos una porción de una superficie de dicho sustrato, en el que dicha composición está opcionalmente en forma de un gel o una película.

22.- El material revestido de la reivindicación 21, en el que,

- (a) la composición comprende un polímero;

(b) la composición comprende un polímero biodegradable; o

(c) el sustrato está compuesto al menos en parte de metal, material cerámico, o polímero.

23.- La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho resto de transporte dirigido es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido, un aptámero, o una molécula pequeña.

5 24.- La composición de la reivindicación 23, en la que dicho resto de transporte dirigido se une a un antígeno tumoral, una célula infectada, una célula neoplásica, una célula preneoplásica, o un patógeno, o a uno de sus componentes.

25.- La composición de la reivindicación 23, en la que:

(a) dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo humano;

10 (b) dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento (Fab')₂, un fragmento Fv, un anticuerpo monocatenario, o un péptido que codifica una única región determinante de la complementariedad.

26.- La composición de la reivindicación 23, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

15 27.- La composición de la reivindicación 23, en la que dicho resto de transporte dirigido es alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, ibritumomab, panitumumab, rituximab, tositumomab, trastuzumab, o palivizumab.

28.- La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho resto de transporte dirigido se dirige a una célula neoplásica o preneoplásica, para su uso para estimular las respuestas anticáncer del hospedante, estimular la lisis de células tumorales, o potenciar las respuestas antitumorales del hospedante.

20 29.- La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de tumores que son resistentes a la lisis mediada por el complemento.

30.- La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho resto de transporte dirigido se dirige a un antígeno expresado específicamente sobre células cancerosas y, con ello, potencia la lisis mediada por el complemento de las células.

25 31.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 28-30, en la que dicho resto de transporte dirigido es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpos, un péptido, un aptámero, o una molécula pequeña.

32.- La composición de la reivindicación 6:

30 (a) para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, miastenia gravis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, lupus eritematoso, síndrome de Reiter, dermatitis atópica, psoriasis, y enfermedad de Graves; o

(b) para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario que afecta a la piel.

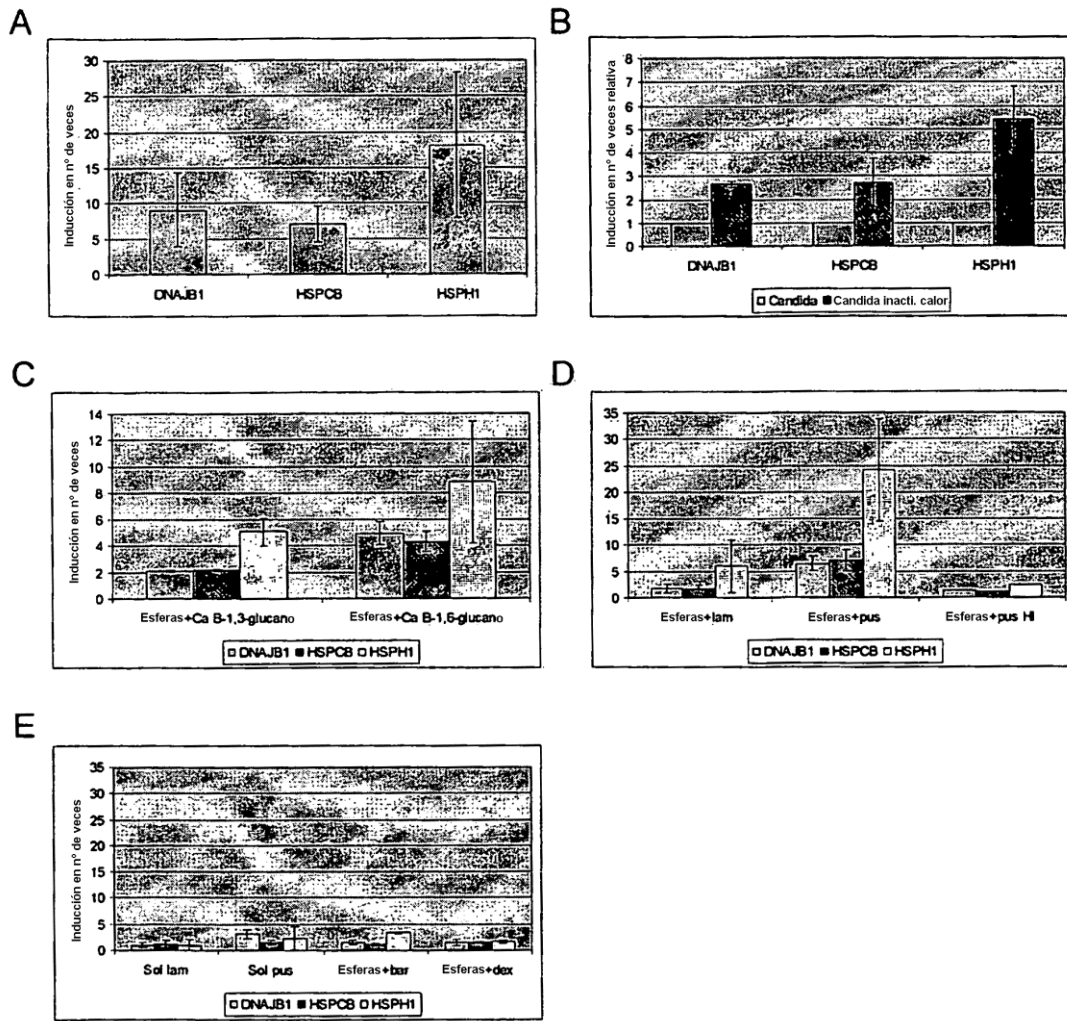


Fig. 1

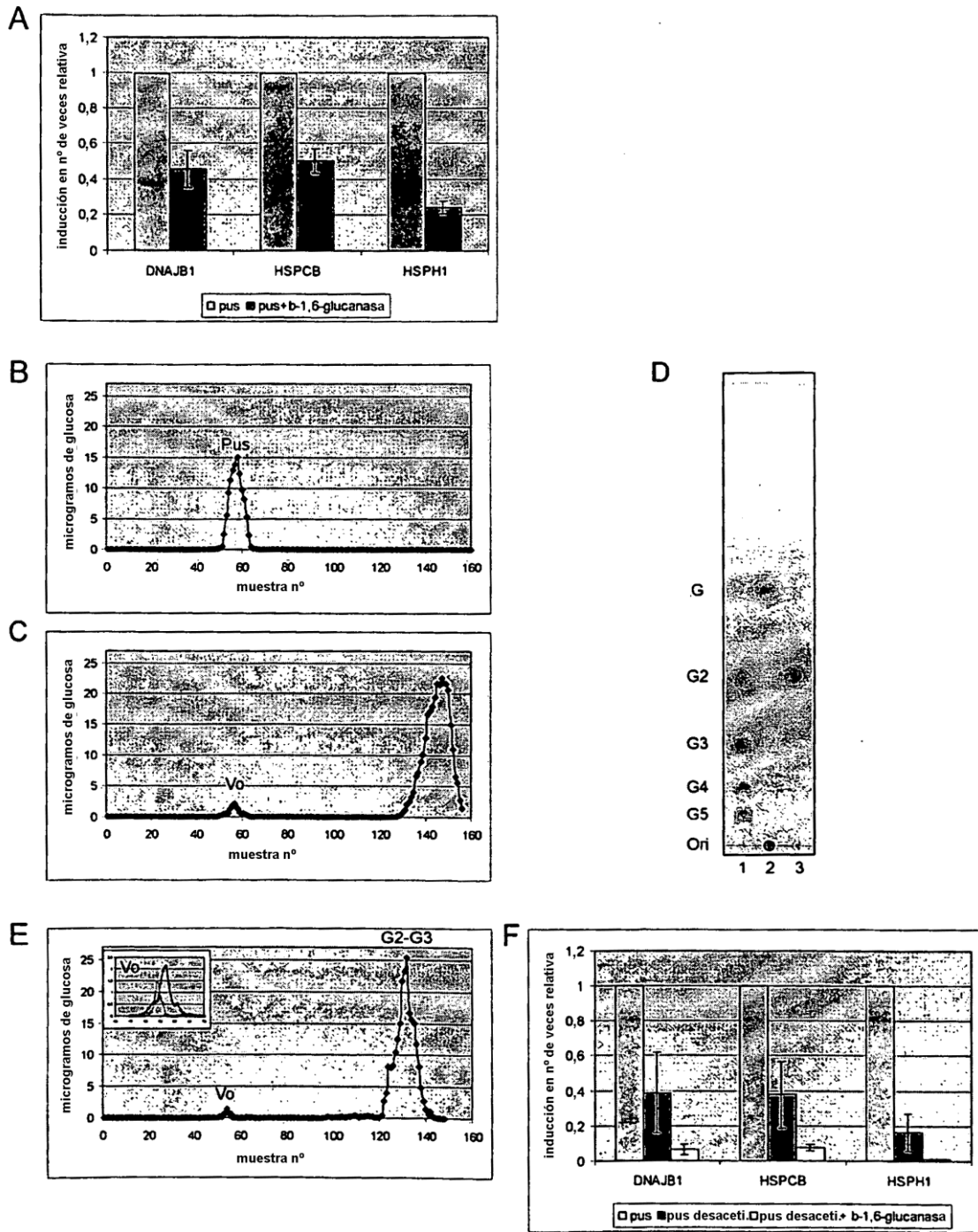


Fig. 2

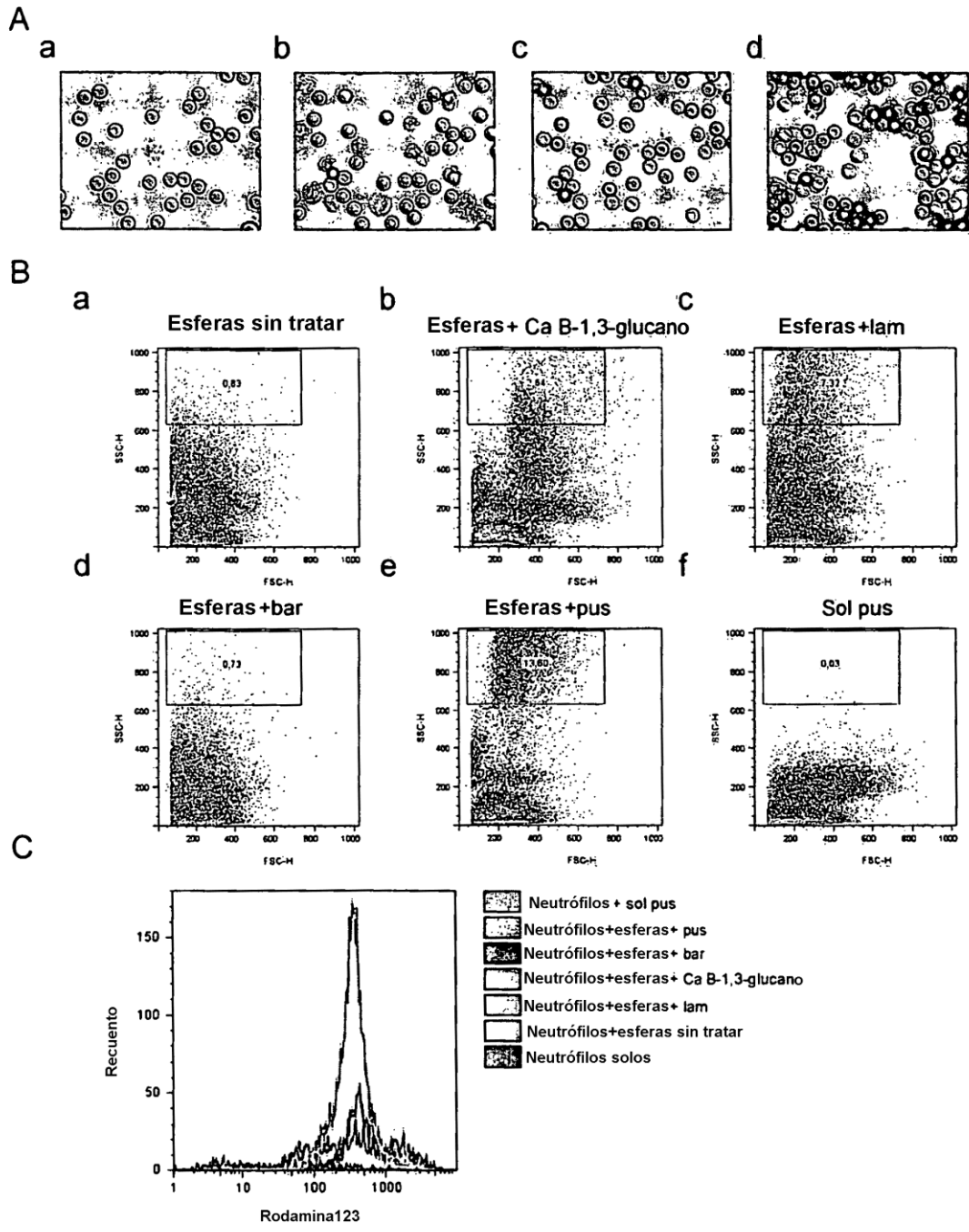


Fig. 3

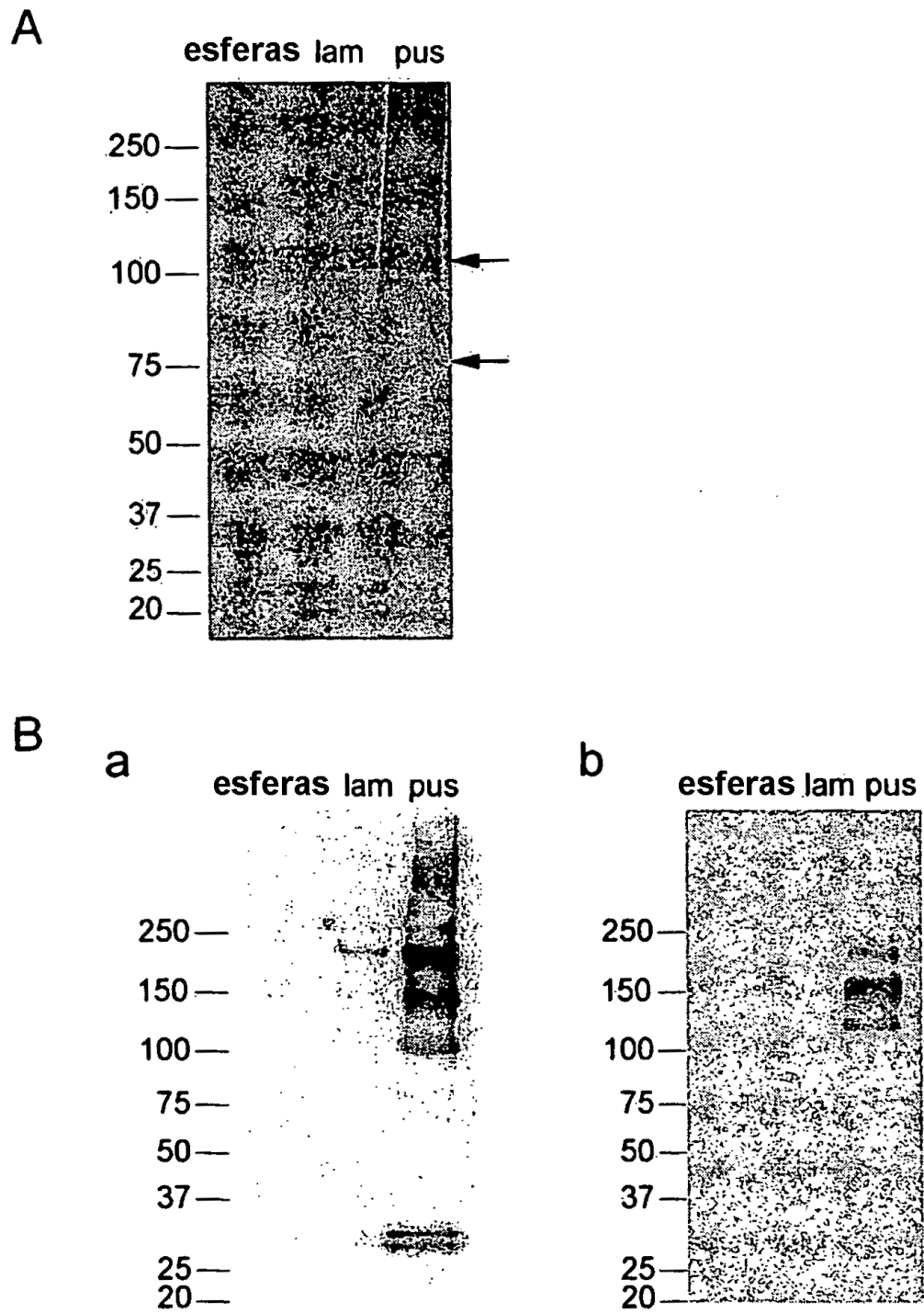


Fig. 4

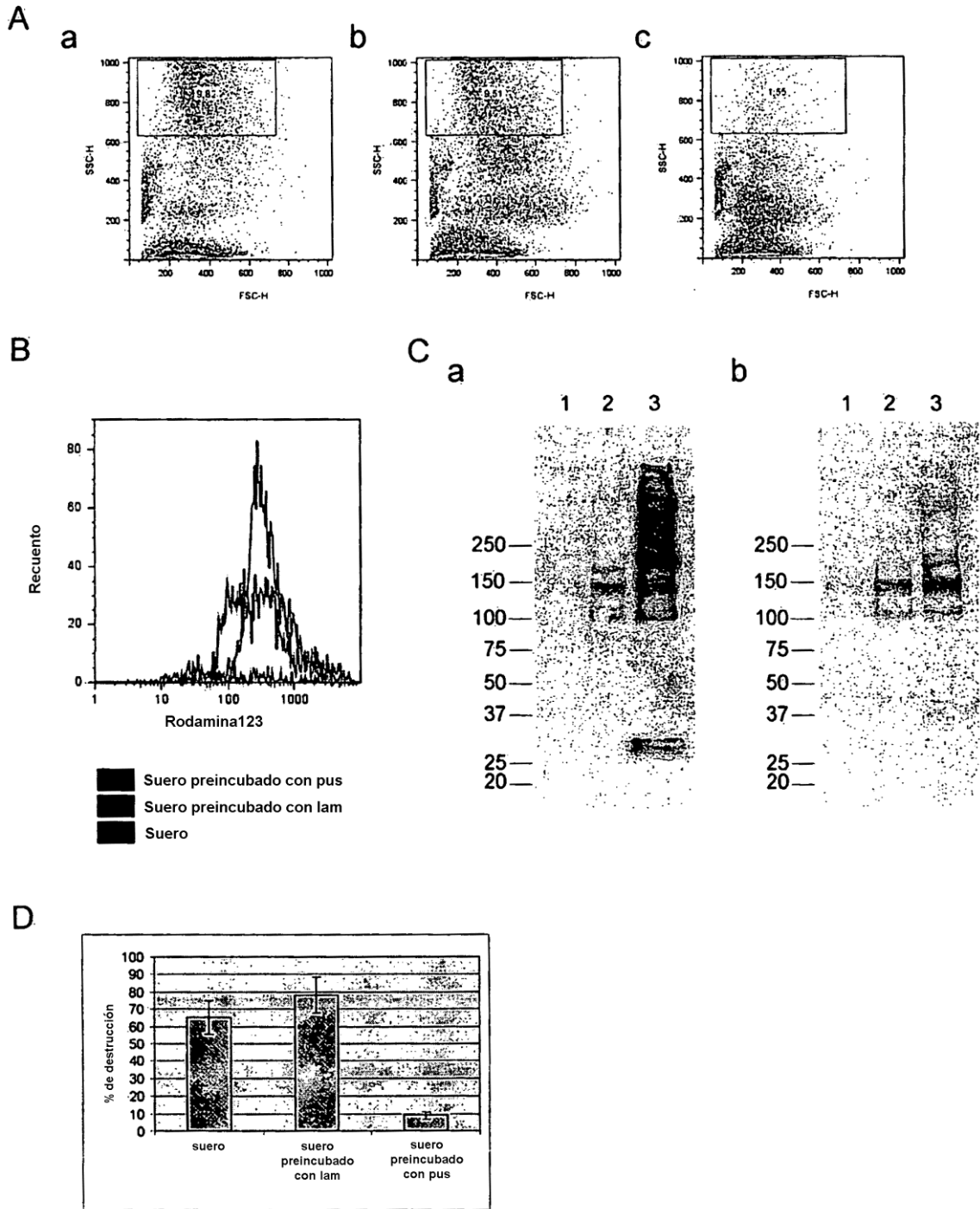


Fig. 5

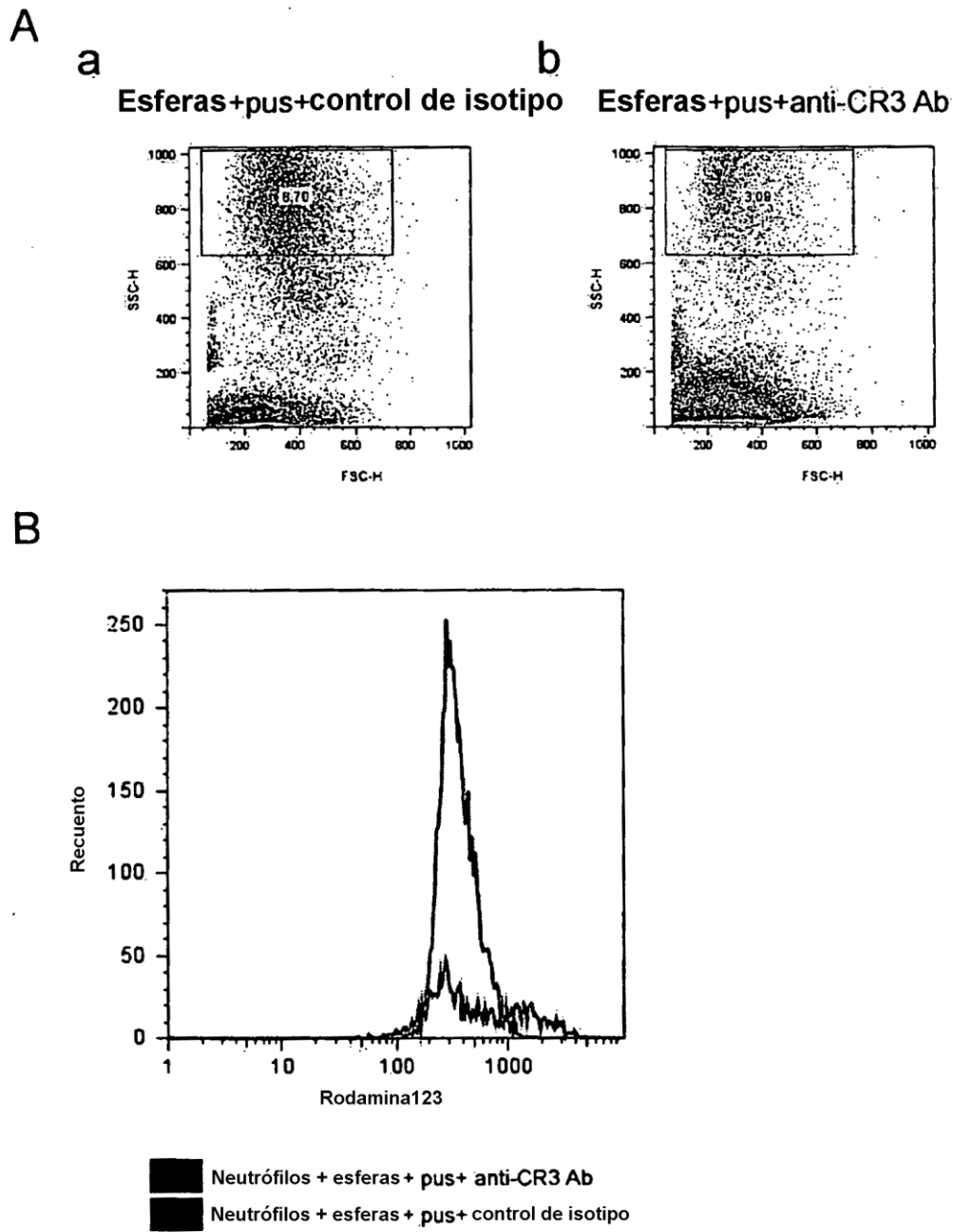


Fig. 6

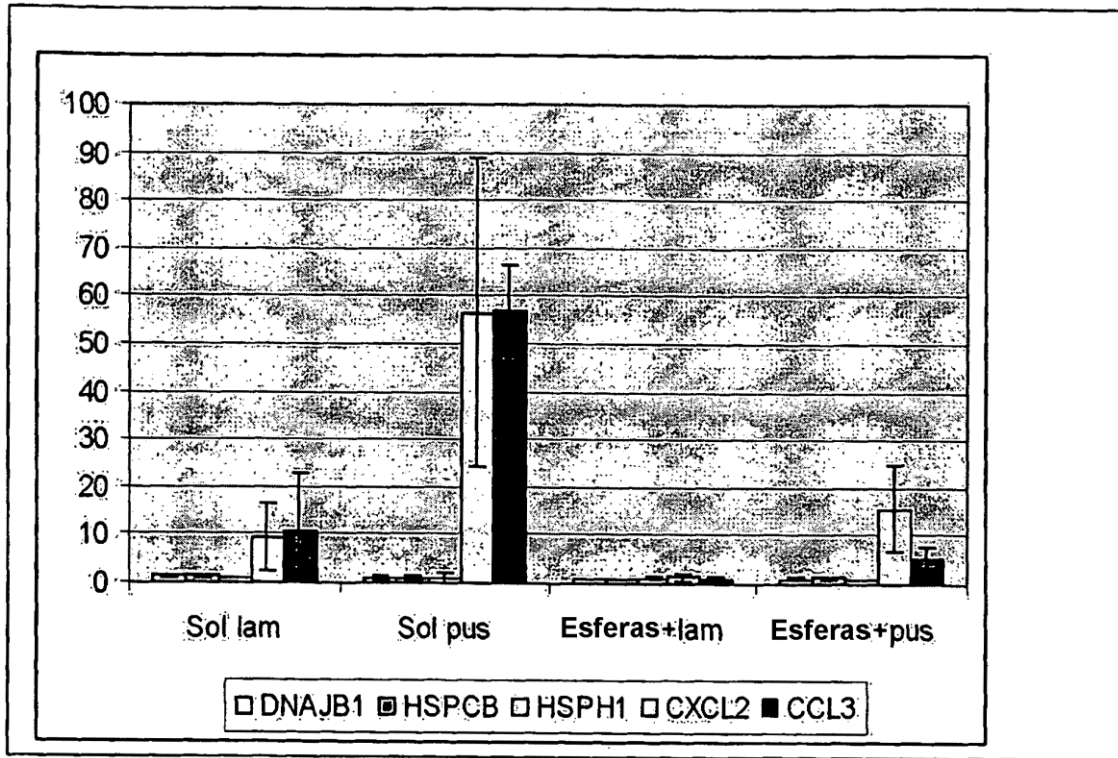


Fig. 7

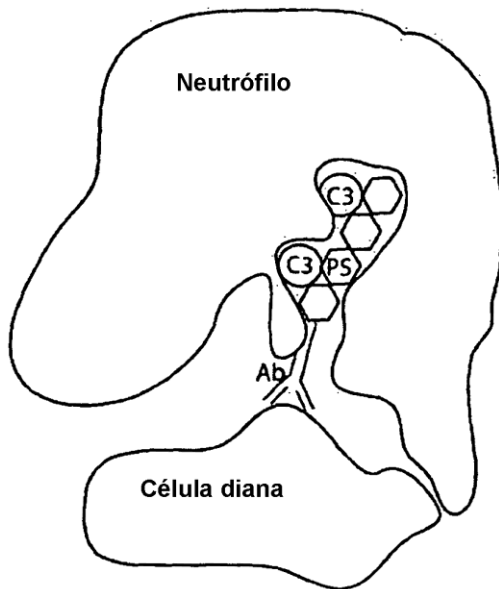


Fig 8.

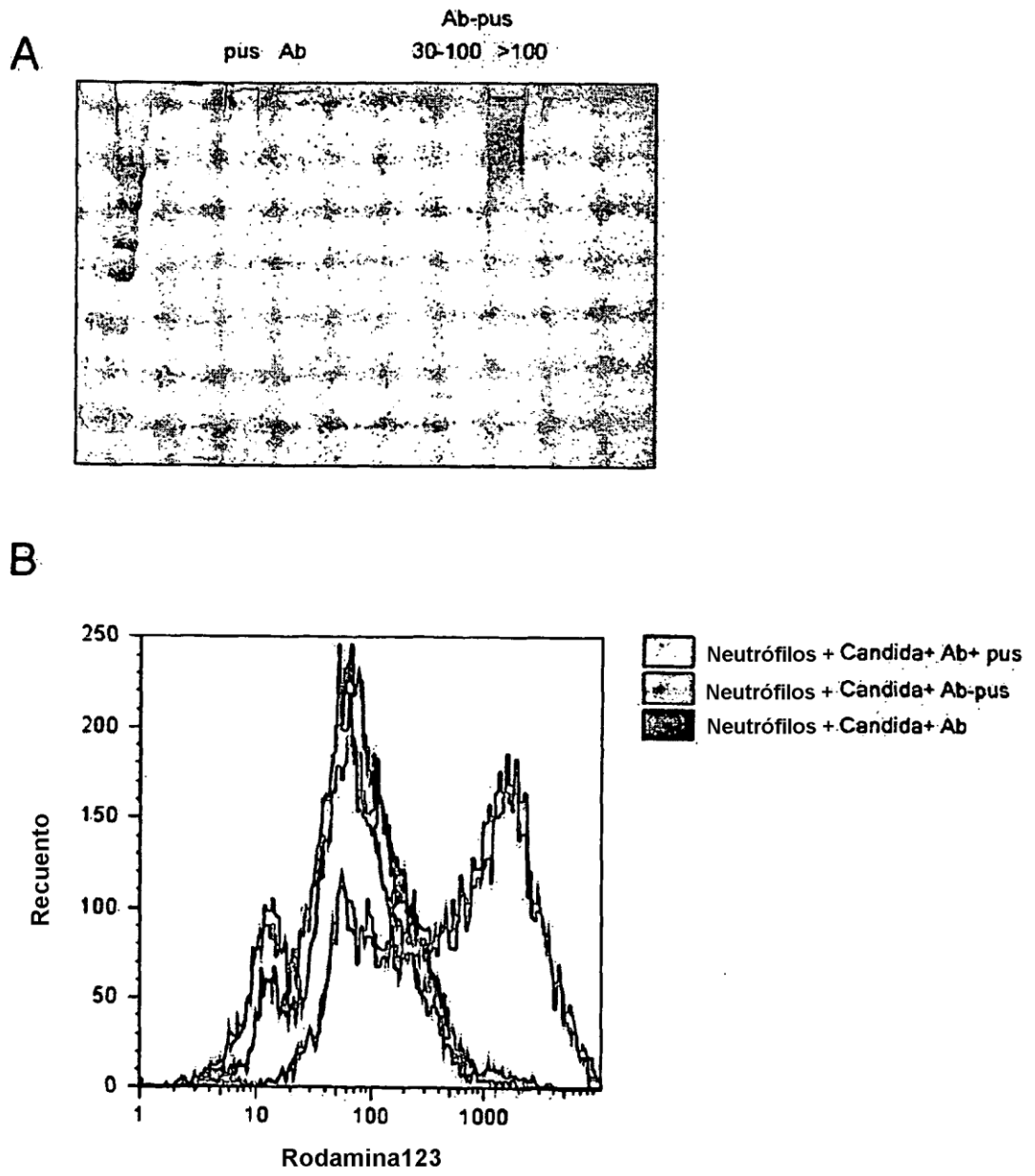


Fig. 9

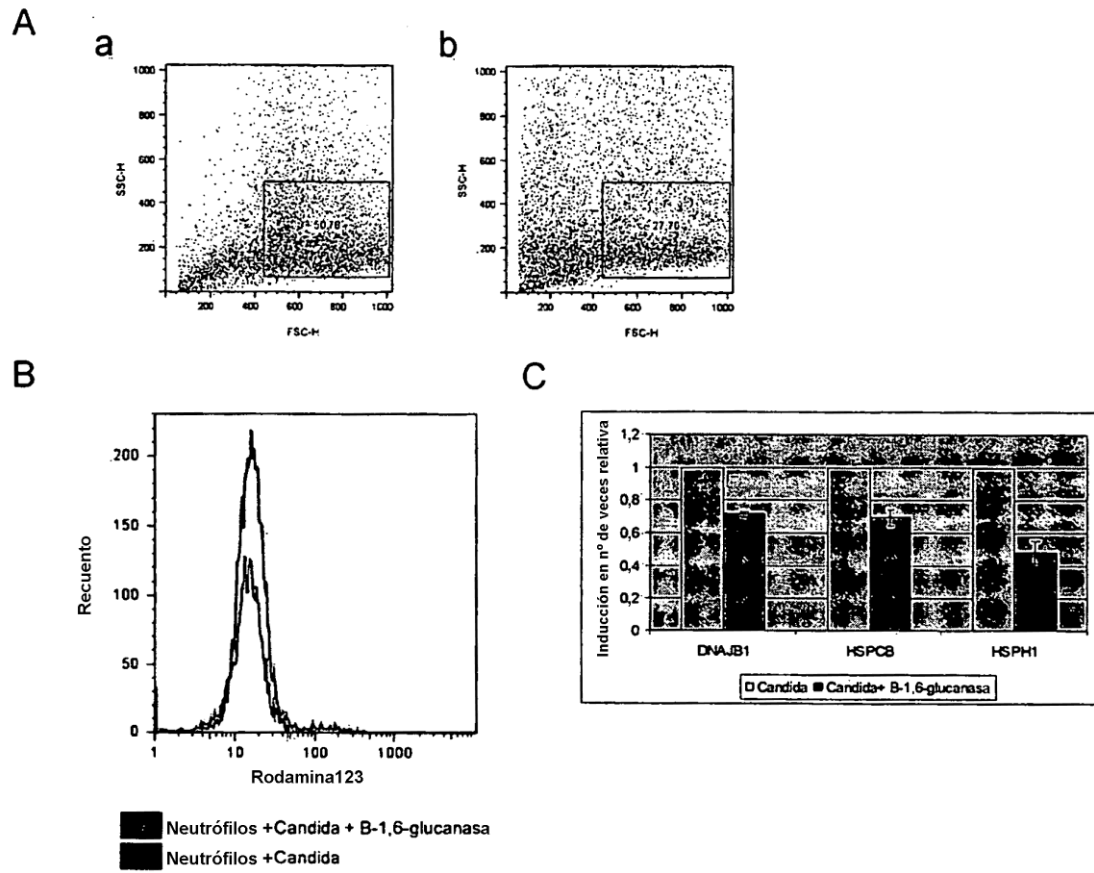
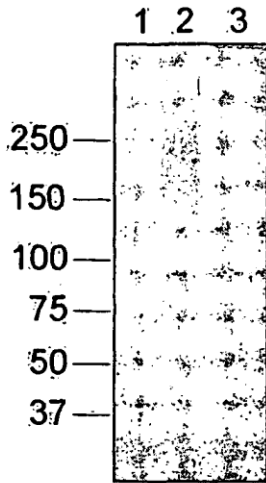


Fig. 10

A



B

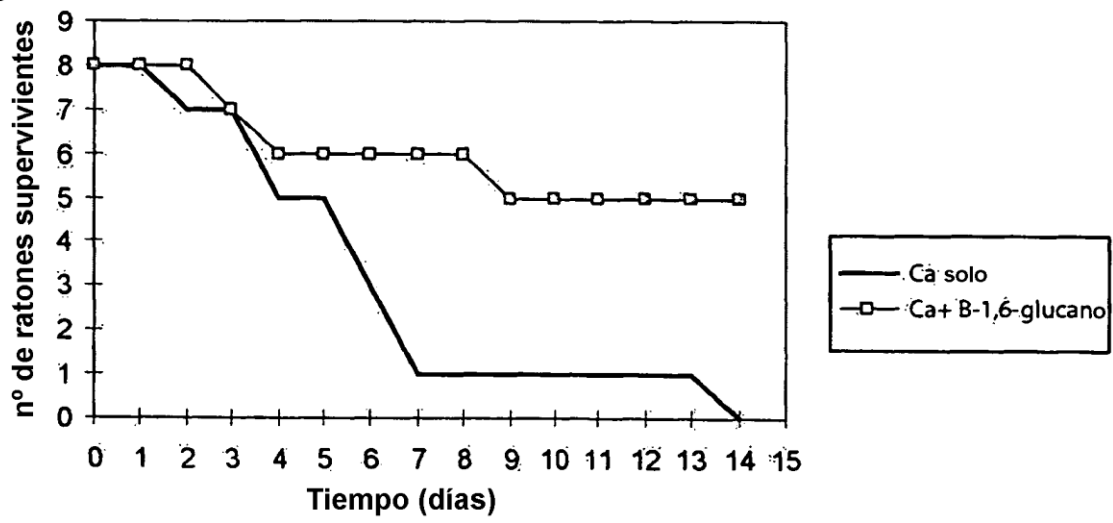


Fig. 11

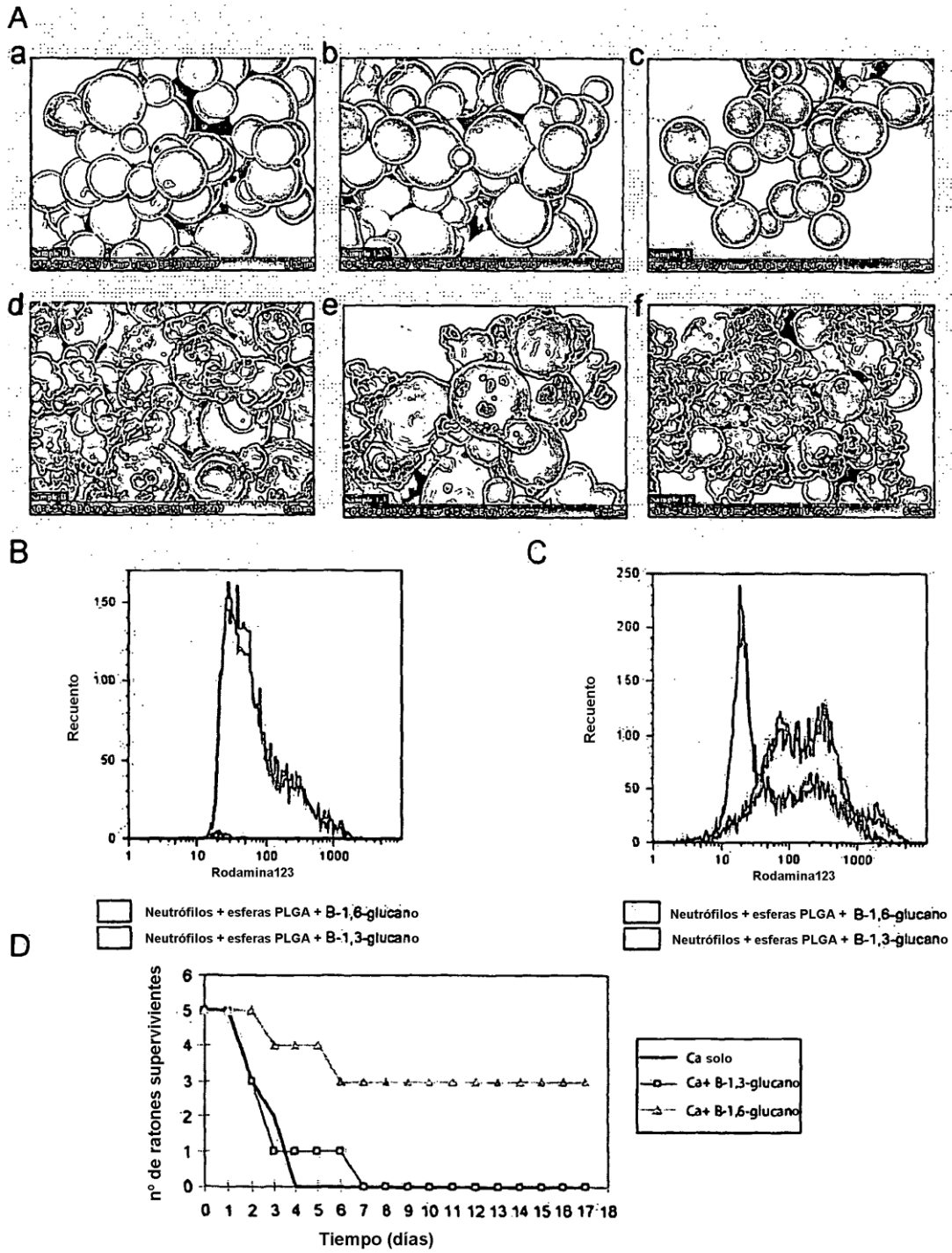


Fig. 12

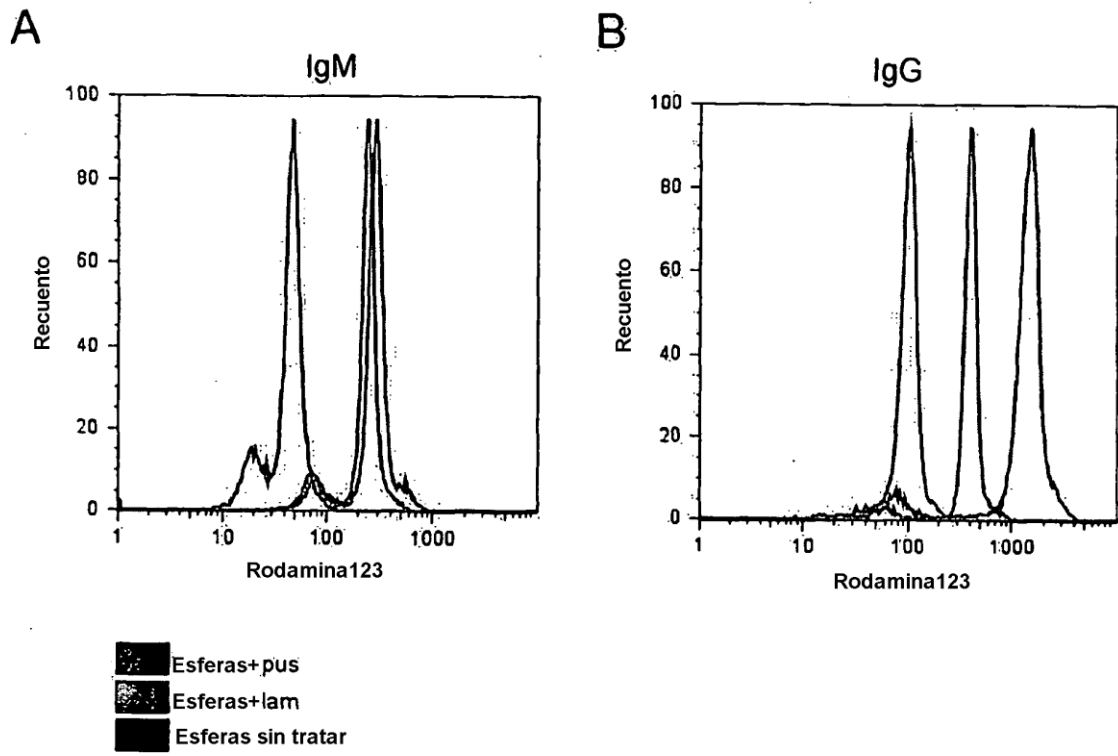


Fig. 13