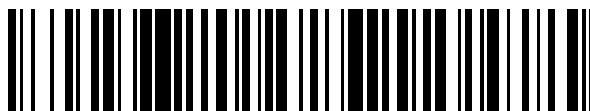


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 066**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09739693 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2283358**

54 Título: **Composiciones inmunomoduladoras y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

29.04.2008 US 71437 P

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

30.07.2015

73 Titular/es:

**IMMUNEXCITE, INC. (100.0%)
3 Forbes Road
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**RUBIN-BEJERANO, IFAT y
FINK, GERALD, R.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 542 066 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 de uso de las mismas

5 Antecedentes de la invención

10 Las paredes celulares de los hongos provocan una poderosa respuesta inmunoestimulante, y se han propuesto para uso como posibles fármacos antiinfecciosos y antitumorales. Las células fúngicas también pueden activar células dendríticas y sensibilizar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno limitadas a la clase II. La mayoría de la pared celular (50-60 %) de los 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) ligado covalentemente a una variedad de manoproteínas de la superficie celular [Klis, F. M. et al. Med Mycol 39 Suppl 1, 1-8, 2001; Klis, F. M. et al., FEMS Microbiol Rev 26, 239-56, 2002].

15 El reconocimiento de β -glucanos por macrófagos se lleva a cabo principalmente mediante dectina-1 con cooperación de TLR, que incluyen TLR2 [Brown, G. D. et al. Nature 413, 36-7, 2001]. La actividad de la dectina-1 se inhibe por β -1,3-glucanos y β -1,6-glucanos, teniendo las laminarinas de β -1,3-glucano el mayor efecto. Sin embargo, los resultados de micromatrices de oligosacáridos muestran que la dectina-1 se une específicamente a β -1,3-glucanos. Los neutrófilos son asesinos profesionales, cuya función en la fagocitosis y destrucción de bacterias y hongos está bien caracterizada. Los individuos neutropénicos son mucho más susceptibles a infecciones bacterianas y fúngicas, desempeñando el regreso a cifras normales una función importante en la resolución de la infección. Los neutrófilos, a diferencia de los macrófagos, requieren suero para la fagocitosis y destrucción óptima. Los principales receptores opsonicos son el receptor del complemento CR3 y el receptor de unión a inmunoglobulina Fc γ R. CR3 tiene un dominio de lectina [Brown, G. D. et al. Immunity 19, 311-5, 2003] que media en la elevada motilidad de neutrófilos hacia una mezcla de β -1,3-glucano y β -1,6-glucano (PGG-glucano) [Wakshull, E. et al. Immunopharmacology 41, 89-107, 1999].

30 Se ha encontrado que los β -1,6-glucanos proporcionan potente actividad antifúngica, y, entre otros, poseen actividad de adyuvante y activan el complemento.

35 El sistema del complemento (C) de los seres humanos y otros mamíferos implica más de 20 componentes que participan en una secuencia de reacciones ordenada que produce la activación del complemento. Productos derivados de la activación de componentes de C incluyen moléculas no de auto-reconocimiento C3b, C4b y C5b, además de las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a que influyen en una variedad de respuestas inmunitarias celulares (Hugli et al. (1982) 15th International Leucocyte Conference, Asilomar, CA (Resumen); Fujii et al. (1993) Protein Science 2:1301-1312; Morgan et al. (1982) J. Exp. Med. 155:1412-1426; Morgan (1993) Complement Today 1:56-75; Morgan et al. (1983) J. Immunol. 130:1257-1261). La activación del complemento se produce principalmente mediante la ruta "clásica" o la ruta "alternativa". La ruta clásica se inicia por la unión del primer componente del complemento (C1) a inmunocomplejos mediante C1q, un subcomponente que participa en la unión al anticuerpo. El complejo c1 está compuesto por C1q y dos serina proteasas homólogas, C1r y C1s (relación molar 1:2:2). Después de la unión a inmunocomplejos, C1q experimenta un cambio conformacional que produce las conversiones de C1r y C1s en sus formas activadas. C1s activado escinde C4 y C2 para generar un complejo de sus fragmentos C4b2a, que a su vez escinde C3 en C3a y C3b. C3b se une a inmunocomplejos.

45 La ruta alternativa se activa sin participación del anticuerpo. Moléculas de C3b generadas a partir de C3 por interacción de C3 con dos serina proteasas, factores B y D, se depositan sobre la superficie microbiana en la que se amplifica la activación de C3. C3b producido por la activación de cualquier ruta actúa de molécula central en la posterior formación de complejos de ataque de la membrana que pueden lisar microbios y también de opsonina.

50 Se desconoce si los β -1,6-glucanos producen una robusta respuesta inmunitaria en todos los sujetos y por qué mecanismo se genera tal respuesta.

55 El documento US5480642 desvela la regulación de respuestas inmunitarias a un antígeno con derivados de polisacáridos polianiónicos: (1) que tienen un peso molecular de entre 1.000 y 600.000; (2) seleccionados por corresponderse con el antígeno; (3) que no son citotóxicos a una dosificación eficaz; y (4) que estimulan una respuesta inmunitaria mediada por célula.

60 El documento US2006160766 desvela composiciones terapéuticas para el tratamiento de cáncer que comprenden una composición de glucano que es adecuada para administración por vía oral y para absorción a través del tubo gastrointestinal del mamífero, y al menos un anticuerpo para el cáncer.

65 BONALDO ALESSIO et al. ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE, vol. 6, nº 2, Abril de 2007, páginas 151-164, desvelan la influencia de beta-glucanos dietéticos sobre las respuestas inmunitarias adaptativas e innatas en róbalo europeo.

El documento US2005208079 desvela un método para detectar la cantidad de IgG secretada en respuesta a beta-1,6-glucano, y composiciones inmunogénicas que comprenden un glucano y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 RUBIN-BEJERANO et al. CELL HOST MICROBE, vol. 2, nº 1, 12 de julio de 2007, páginas 55 – 67, describen la estimulación de la fagocitosis de neutrófilos por beta-1,6-glucano.

El documento WO2008057501 desvela composiciones que comprenden beta-1,6-glucanos para modular respuestas inmunitarias.

10

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un kit de diagnóstico para medir niveles de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y así determinar la sensibilidad de un sujeto que se ha expuesto a glucanos ambientales a una composición farmacéutica que comprende β -1,6-glucano, que comprende: (i) una composición que comprende β -1,6-glucano que se corresponde con o es un fragmento de, o es altamente homólogo al glucano en la composición farmacéutica para la que está siendo determinada la sensibilidad; y (ii) reactivos para detectar anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 unidos al β -1,6-glucano de la etapa (i) en una muestra de sangre.

15

20

En una realización, el β -1,6-glucano está en disolución o liofilizado.

En otra realización, el β -1,6-glucano se inmoviliza sobre un sustrato. Dicho sustrato puede comprender un material seleccionado de: plástico, vidrio, gel, celuloide, papel, resina magnética, poli(fluoruro de vinilideno), nailon, nitrocelulosa, agarosa, látex y poliestireno, o puede comprender una placa de ELISA, tira reactiva, placa de microtitulación, placa de radioinmunoensayo, perlas, perlas de agarosa, perlas de plástico, perlas de látex, membranas de inmunotransferencia y papeles de inmunotransferencia.

25

Los reactivos pueden conjugarse con un marcador detectable. Dicho marcador detectable puede seleccionarse del grupo que consiste en una marca radiactiva, marca fluorescente, marca quimioluminiscente, marca cromófora, ligando, fluoresceína, radioisótopo, fosfatasa, biotina, compuesto relacionado con biotina, avidina, compuesto relacionado con avidina y peroxidasa.

30

En otro aspecto, la invención contempla el uso del kit de la invención para predecir la robustez de una respuesta a β -1,6-glucanos en un sujeto.

35

En otro aspecto, la invención contempla el uso del kit de la invención para predecir la sensibilidad de un sujeto a vacunas o adyuvantes basados en glucanos.

Si se facilitan en este documento intervalos numéricos, los puntos extremos están incluidos dentro del intervalo.

40

Además, debe entenderse que, a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente del contexto y entendimiento de un experto habitual en la materia, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos establecidos, que opcionalmente incluyen o que excluyen cualquier punto extremo o ambos, en diferentes realizaciones de la invención, al décimo de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Si se cita un porcentaje en referencia a un valor que tiene intrínsecamente unidades que son números enteros, cualquier fracción resultante puede redondearse al número entero más próximo.

45

Breve descripción de los dibujos

50

La Figura 1 demuestra que la engullición de perlas recubiertas de β -1,6-glucano (A) y la producción de ROS (B) son dependientes de anticuerpo, independientemente de la presencia del complemento (C).

La Figura 2 demuestra que los anticuerpos para β -1,6-glucano son predominantes en sueros de adulto normales.

55

La Figura 3 demuestra que isotipos de IgG seleccionados influyen en la sensibilidad a β -glucano.

La Figura 4 demuestra que un conjugado de β -1,6-glucano-Herceptin es funcional.

60

La Figura 5 demuestra que un conjugado de β -1,6-glucano-Herceptin media en la destrucción de células cancerosas por complemento y neutrófilos.

Se apreciará que para simplicidad y claridad de ilustración, los elementos mostrados en las figuras no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden ser

exageradas con respecto a otros elementos por claridad. Además, si se considera apropiado, los números de referencia pueden repetirse entre las figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar un riguroso entendimiento de la invención. Sin embargo, se entenderá por aquellos expertos en la materia que la presente invención puede ponerse en práctica sin estos detalles específicos. En otros casos, métodos, procedimientos y componentes muy conocidos no se han descrito en detalle para no complicar la presente invención.

Los glucanos son polisacáridos encontrados hasta la fecha en todas las especies estudiadas de hongos liquenizados. Los pustulanos parcialmente O-acetilados son típicos de Umbilicariaceae, y se han descrito varias especies de Umbilicaria, tales como *U. pustulata* y *U. hirsute*, *U. angulata*, *U. caroliniana* y *U. polyphylla*.

Los presentes inventores encontraron que la sensibilidad a β -1,6-glucanos era dependiente de anticuerpo, y se encontró que la robustez de esta respuesta se asociaba a sujetos que tenían expresión de isotipo de inmunoglobulina G (IgG) particular. Por tanto, tal expresión puede ser útil en predecir la sensibilidad de un sujeto a vacunas o adyuvantes basados en glucano.

Los kits de diagnóstico de la invención comprenden una composición que comprende β -1,6-glucano que se corresponde con o es un fragmento de, o es altamente homólogo al glucano en la composición farmacéutica para la que va a determinarse la sensibilidad.

La composición es, en algunas realizaciones, distinta de composiciones tales como pustulano o preparaciones de paredes celulares fúngicas. En ciertas realizaciones de la invención, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % del glucano contenido en la composición en peso es β -1,6-glucano. En ciertas realizaciones, entre el 20 % y el 50 % del glucano contenido en la composición es β -1,6-glucano. En ciertas realizaciones, entre el 50 % y el 100 % del glucano contenido en la composición es β -1,6-glucano. En una realización de cualquiera de las composiciones o métodos de la invención, el glucano contiene de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 30 % en peso de β -1,6-glucano. En otra realización de cualquiera de las composiciones o métodos de la invención, el glucano contiene de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 35 % en peso de β -1,6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 % en peso de β -1,6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 60 % en peso de β -1,6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente el 35 % a aproximadamente el 80 % en peso de β -1,6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente el 18 % a aproximadamente el 35 % en peso de β -1,6-glucano, o en otra realización, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 75 % en peso de β -1,6-glucano. En ciertas realizaciones, dicho glucano es una mezcla de oligómeros o polímeros, en la que el β -1,6-glucano es mayor que aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o el 99 % en peso de aquellos oligómeros o polímeros. En ciertas realizaciones de la invención, "peso" se refiere a "peso seco". En otras realizaciones, "peso" se refiere a peso total. En ciertas realizaciones de la invención, el β -1,6-glucano se procesa. Tal procesamiento puede comprender, por ejemplo, desacetilación, tratamiento con enzimas que digieren glucanos distintos de β -1,6-glucano, digestión limitada con enzimas que digieren β -1,6-glucano, selección de intervalos de peso molecular particulares, etc. En ciertas realizaciones, el procesamiento comprende la separación de otros glucanos, por ejemplo, α -glucanos, β -1,3-glucanos, etc. En ciertas realizaciones, el procesamiento comprende eliminar 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 el que el β -1,6-glucano procesado puede presentar capacidad potenciada para modular deseablemente la respuesta inmunitaria con respecto a glucano sin procesar o con respecto a β -1,6-glucano sin procesar.

El β -1,6-glucano puede enriquecerse en grupos O-acetilados. Por ejemplo, el glucano puede contener al menos el 25 % en peso de glucano O-acetilado, por ejemplo, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 30 % en peso de glucano O-acetilado. En otra realización, el glucano contiene de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 35 % en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 % en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 60 % en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente el 35 % a aproximadamente el 80 % en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente el 18 % a aproximadamente el 35 % en peso de glucano O-acetilado, o en otra realización, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 75 % en peso de glucano O-acetilado. En otras realizaciones, el glucano contiene entre aproximadamente el 75 % y el 100 % en peso de glucano O-acetilado, por ejemplo, entre el 75 % y el 90 %, o entre el 90 % y el 100 % en peso de glucano O-acetilado. En una realización, el glucano contiene aproximadamente ese porcentaje de unidades de glucosa O-acetilada (en peso o número, en diversas realizaciones de la invención) que resultarían de la digestión de un β -1,6-glucano que se produce naturalmente (por ejemplo, pustulano o cualquier otro β -1,6-glucano mencionado en el presente documento) con una β -1,6-endoglucanasa durante un tiempo suficiente

para digerir al menos el 90 % en peso del β -1,6-glucano en oligosacáridos que comprenden 5 o menos unidades de glucosa, seguido de (i) eliminación de aquellos oligosacáridos que comprenden 5 o menos residuos de glucosa de la composición o (ii) aislamiento de una porción de la composición resultante que tiene un peso molecular superior a 5 kD, o en alguna realización superior a 10, 20, 30, 50 ó 100 kD.

5 En algunas realizaciones, el término "enriquecido en residuos O-acetilados" se refiere al % mejorado de sitios O-acetilados en unidades de glucosa individuales dentro de la molécula de glucano, % mejorado de unidades de glucosa O-acetiladas dentro de la molécula de glucano, o una combinación de los mismos, en comparación con una molécula de glucano nativa. En una realización, referencia a preparaciones de glucano enriquecidas en un porcentaje en peso particular de glucano O-acetilado se refiere a preparaciones que comprenden un % mejorado de sitios O-acetilados en unidades de glucosa individuales dentro de la molécula de glucano, un % mejorado de unidades de glucosa O-acetiladas dentro de la molécula de glucano, o una combinación de los mismos, en comparación con una molécula de glucano.

15 Los glucanos derivados de diferentes fuentes pueden comprender cantidades variables de O-acetilación en términos de sitios O-acetilados en unidades de glucosa individuales, unidades de glucosa O-acetiladas dentro de la molécula de glucano, o una combinación de los mismos. Según este aspecto de la invención, el término "enriquecido en glucano O-acetilado" se refiere, en algunas realizaciones, a la O-acetilación mejorada como se describe en el presente documento, entre la fuente de referencia de la que se deriva el glucano, y puede no representar un enriquecimiento global en comparación con cualquier fuente de glucano.

25 El término "enriquecido en glucano O-acetilado" puede referirse a un enriquecimiento de al menos el 25 % en peso de las cadenas de glucano, que están O-acetiladas sobre al menos una unidad de glucosa, o al menos el 25 % de las unidades de glucosa presentes en el glucano en la composición están O-acetiladas, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, al menos el 25 % de las unidades de glucosa en al menos el 1 %, o en otra realización, al menos el 5 % de las cadenas de beta-glucano están O-acetiladas. En otras realizaciones, entre el 25 % y el 35 %, entre el 25 % y el 50 %, entre el 25 % y el 75 %, entre el 15 % y el 45 %, entre el 20 % y el 60 %, entre el 35 % y el 80 %, u otras de las unidades de glucosa en al menos el 5 % de las cadenas de beta-glucano, están O-acetiladas, etc. En otras realizaciones, entre el 25 % y el 35 %, entre el 25 % y el 50 %, entre el 25 % y el 75 %, entre el 15 % y el 45 %, entre el 20 % y el 60 %, entre el 35 % y el 80 %, u otras de las unidades de glucosa, en al menos el 10 % de las cadenas de beta-glucano, o en otra realización, en al menos el 15 % de las cadenas de beta-glucano, están O-acetiladas.

35 En una realización, el glucano se aísla o deriva de un líquen, que en una realización es del género Umbilicariaceae. En una realización, el glucano se aísla de un hongo. En una realización, el glucano se aísla de levadura, o en otra realización el glucano se sintetiza o acetila químicamente. En otra realización, el glucano está conjugado con un soporte sólido.

40 Los glucanos son polisacáridos que contienen glucosa encontrados, entre otras cosas, en pareces celulares fúngicas, los α -glucanos incluyen uno o más enlaces α entre subunidades de glucosa y los β -glucanos incluyen uno o más enlaces β entre subunidades de glucosa.

45 Los β -1,6-glucanos se producen frecuentemente en hongos, pero son más raros fuera de los hongos. El glucano usado 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*.

50 En algunas realizaciones, los β -glucanos se derivan de *Candida*, tales como *C. albicans*. Otros organismos de los que pueden usarse β -glucanos 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 químicamente o enzimáticamente, como se conoce en la técnica, o en otras realizaciones, los β -glucanos se derivan de cualquier especie que produzca los mismos, y se alteran químicamente o enzimáticamente, por ejemplo, para aumentar la O-acetilación de la molécula.

55 En algunas realizaciones, los β -glucanos son glucanos fúngicos. Un glucano 'fúngico' se obtendrá generalmente de un hongo pero, si se encuentra una estructura de glucano particular en tanto hongos como no hongos (por ejemplo, en bacterias, plantas inferiores o algas), entonces el organismo no fúngico puede usarse como fuente alternativa.

60 Los β -glucanos nativos de longitud completa son insolubles y tienen un peso molecular en el intervalo de megadalton. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona β -1,6-glucano soluble. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona β -1,6-glucano O-acetilado soluble. En algunas realizaciones, la solubilización puede lograrse fragmentando glucanos insolubles largos. Esto puede lograrse, por ejemplo, por hidrólisis o, en algunas realizaciones, por digestión con una glucanasa (por ejemplo, con una β -1,3 glucanasa o digestión limitada con una β -1,3-glucanasa). En otras realizaciones, los glucanos pueden prepararse sintéticamente, por ejemplo, y en algunas realizaciones, uniendo bloques constructivos de monosacáridos. La O-acetilación de tales

glucanos puede llevarse a cabo fácilmente por métodos conocidos en la técnica. Tales métodos pueden incluir acetilación química y/o enzimática, tal como se conoce en la técnica.

5 Hay diversas fuentes de β -glucanos fúngicos. Por ejemplo, están comercialmente disponibles β -glucanos puros, por ejemplo, el pustulano (Calbiochem) es un β -1,6-glucano purificado de *Umbilicaria papulosa*. Los β -glucanos pueden purificarse de pareces celulares fúngicas de diversas formas, por ejemplo, como se describe en Tokunaka et al. [(1999) Carbohydr Res 316:161-172], y el producto puede enriquecerse en restos de β -1,6-glucano, o restos de β -1,6-glucano O-acetilados, por métodos como se conocen en la técnica.

10 Un experto habitual en la materia podrá identificar o seleccionar métodos apropiados para enriquecer en restos de β -1,6-glucano y/o en β -1,6-glucano O-acetilado. En una realización, la O-acetilación de beta-glucano se realiza químicamente. Por ejemplo, se secan polisacáridos (50 mg) en una centrífuga SpeedVac y se resuspenden en 1,5 ml de anhídrido acético (Mallinckrodt). Después de la resuspensión, se añaden algunos cristales de 4-dimetilaminopiridina (Avocado Research Chemist, Ltd) como catalizador. Se deja que la reacción avance a temperatura ambiente durante 5, 20 ó 120 minutos y a continuación se detiene con 2 volúmenes de agua. Después de 15 las muestras se dializan durante la noche contra agua. Se apreciará que ese proceso podría variarse o aumentarse de escala, como es evidente para un experto en la materia. En otras realizaciones, los métodos para separar β -1,6-glucano O-acetilado pueden incluir una o más de las siguientes etapas, que podrían realizarse en diversos ordenes: (a) separación basada en mayor hidrofobia, tal como unión a cualquier matriz/ resina hidrófoba; (b) separación basada en digestión con una endo- o exo-glucanasa adecuada o combinación de las mismas, en la que el β -1,6-glucano O-acetilado es resistente a digestión; (c) separación por afinidad usando anticuerpos u otros restos que se unen a β -1,6-glucano o a grupos O-acetilo sobre él; (d) separación basada en peso molecular. En una realización, el β -1,6-glucano se digiere con una enzima que digiere β -1,6-glucano sin acetilar y/o ligeramente acetilado. El material resultante se separa basándose en el tamaño o peso molecular y se aísla una porción que comprende glucano muy 20 acetilado. En algunas realizaciones, se obtienen preparaciones de β -1,6-glucano, se digieren y los oligosacáridos O-acetilados se separan, o en otra realización, se aíslan y se usan en la preparación de nuevas composiciones. Tales composiciones representan realizaciones de las preparaciones de β -1,6-glucano enriquecidas en residuos O-acetilados de la presente invención.

30 Debe entenderse que los productos de cualquier proceso para preparar preparaciones de β -1,6-glucano O-acetilado enriquecidas deben considerarse según convenga para su uso en los kits de la presente invención.

En algunas realizaciones, los glucanos para su uso en los kits y/o según los métodos de la presente invención pueden comprender modificaciones estructurales, no presentes en las preparaciones de glucano nativo. Tales 35 modificaciones pueden comprender O-acetilación, como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, tales modificaciones pueden comprender metilación, alquilación, alcoilación, sulfatación, fosforilación, conjugación de lípidos u otras modificaciones, como son conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la modificación comprende la modificación (por ejemplo, esterificación) con un ácido tal como ácido fórmico, succínico, cítrico, u otro ácido conocido en la técnica.

40 En algunas realizaciones, la conjugación de lípidos con cualquiera o todos los grupos hidroxilo libres puede llevarse a cabo por cualquier número de medios conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Drouillat B, et al., Pharm Sci. Enero 1998; 87(1):25-30, B. N. A. Mbadugha, et al., Org. Lett., 5 (22), 4041-4044, 2003.

45 En algunas realizaciones, la metilación puede llevarse a cabo y verificarse por cualquier número de medios conocidos en la técnica, por ejemplo, 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. & 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. & McGinnis, G.D., eds), pp. 157-216. CRC Press, Boca Raton, FL.

55 En algunas realizaciones, la metilación puede confirmarse por GLC de éteres, acetatos u otros ésteres de TMS adicionalmente derivados, EM acoplada, o digestión dando monosacáridos, des-O-metilación y análisis por derivatización y GLC/EM, por ejemplo, como se describe en Pazur 1986, Carbohydrate Analysis - A Practical Approach, IRL Press, Oxford, pp. 55-96; Montreuil et al. 1986, Glycoproteins. In M.F. Chaplin and 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, London, pp. 415-441; Stephen et al. 1990, Methods in Plant Biochemistry, Volumen 2, Carbohydrates, Academic Press, London, pp. 483-522; o Churms 1991, CRC Handbook of Chromatography. Carbohydrates, Volumen II, CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU.).

60 En algunas realizaciones, la fosforilación, que opcionalmente incluye la introducción de otras modificaciones, y la verificación del producto obtenido pueden llevarse a cabo por medios muy conocidos para aquellos expertos en la materia, véanse, por ejemplo, Brown, D. H., Biochem. Biophys. Acta, 7, 487 (1951); Roseman, S., and Daffner, L,

65

Anal. Chem., 28, 1743 (1956); Romberg, A., and Horecker, B. L., en *Methods in enzymology*, Vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 323; patente de Estados Unidos número 4.818.752.

5 En algunas realizaciones, la sulfatación de glucano y verificación del producto obtenido pueden llevarse a cabo por cualquiera de los medios muy conocidos en la técnica, por ejemplo, como 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.

10 El término "homología", cuando es en referencia al beta-1,6-glucano comprendido en los kits de la invención, indica un porcentaje de identidad estructural o identidad en términos de composición o contenido en la molécula candidata en comparación con una molécula de referencia de glucano correspondiente.

15 En una realización, los términos "homología" u "homólogo", en cualquier caso, indican que la molécula citada presenta al menos el 70 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 72 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 75 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 77 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 80 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 82 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 85 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 87 % de correspondencia con la secuencia indicada. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 90 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 92 % de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 95 % o más de correspondencia con la molécula de referencia. En otra realización, la molécula de glucano presenta al menos el 95 % - 100 % de correspondencia con la molécula de referencia.

30 Con respecto a la correspondencia con una molécula de referencia, tal correspondencia puede referirse a identidad estructural o identidad composicional, en términos de contenido químico. En algunas realizaciones se utilizan glucanos similarmente preparados en kits de la presente invención, que son comparables a aquellos utilizados en un adyuvante o vacuna basado en glucano; sin embargo, el glucano utilizado en el kit puede no haberse sometido a todas las etapas de procesamiento, que comprenden el proceso de preparación para una vacuna o adyuvante basado en glucano.

35 La homología puede determinarse, en una realización, por métodos bien descritos en la materia, que incluyen análisis de inmunotransferencia, o mediante análisis de algoritmos por ordenador de, utilizando cualquiera de varios paquetes de software disponibles, mediante métodos establecidos.

40 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits que comprenden glucanos de bajo peso molecular, que tienen un peso molecular inferior a 100 kDa (por ejemplo, inferior a 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 ó 15 kDa). En algunas realizaciones, la presente 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 de monosacárido de glucosa.

50 En algunas realizaciones, el β -1,6-glucano usado en los kits de la presente invención comprende o consiste esencialmente 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 esencialmente en un glucano de bajo peso molecular. Opcionalmente, al menos alguno del β -1,6-glucano de bajo peso molecular en cualquier realización de la invención está enriquecido en grupos O-acetilados.

55 Una técnica común en la determinación del tipo y estructura de enlace en los glucanos es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C). El número e intensidades relativas de señales de ^{13}C en un espectro dado pueden usarse para determinar configuraciones y posiciones de enlace en polímeros de glucano. Por ejemplo, los desplazamientos químicos (señales) de átomos de carbono que participan en el enlace glucosídico están desplazados fuertemente hacia campo bajo (hasta 9 ppm) en comparación con los carbonos sin enlazar correspondientes.

60 Ejemplos

Materiales y métodos

Preparación de suero con empobrecimiento de IgG

65

Se lavaron tres veces con PBS perlas de proteína G-Sepharose de perlas Sepharose sin tratar (control). El suero se diluyó 2 veces en PBS y se añadió a las perlas. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente en una mezcladora de extremo a extremo durante 30 min. Las perlas se eliminaron por centrifugación.

5 Se reunió el suero de 10 donantes sanos normales sin inmunizar.

Ensayo de SRBC

10 Se lavaron SRBC (Accurate Chemical and Scientific Corp.) con tampón veronal de gelatina (Sigma) y se opsonizaron con anticuerpos de conejo anti-SRBC (Accurate Chemical and Scientific Corp.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió suero con empobrecimiento de IgG (de perlas de proteína G-Sepharose) o suero que contenía IgG (de perlas Sepharose sin tratar) a los SRBC y se incubó a 37 °C durante una hora. Se añadió agua como control positivo (lisis completa), y se añadió tampón como control negativo (sin lisis). La lisis se detectó por visualización microscópica directa (Fig. 1C a) o por D.O. 414 nm, que detecta el hemo que es secretado por los SRBC en lisis).

Preparación de perlas recubiertas de β -1,6-glucano y análisis de FACS (fagocitosis y producción de ROS)

20 Estos métodos se realizaron como se describe en Rubin-Bejerano, L, et al., Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. Cell Host Microbe, 2007.2(1): p. 55-67.

Cultivo celular

25 Se cultivaron células SK-BR-3 (ATCC) en medio McCoy's 5A (Gibco) complementado con 10 % de FBS.

Conjugación

30 Se conjugaron Herceptin (Genentech, Inc.) o control de isotipo IgG1 (Sigma) con β -1,6-glucano tras la oxidación con metaperiodato de sodio (Pierce).

Neutrófilos

35 Se proporcionaron sangre y suero humano reciente de Research Blood Components (Brighton, MA). Se aislaron neutrófilos de sangre humana reciente según un protocolo aprobado por el Comité MIT sobre Uso de Seres humanos como Sujetos Experimentales usando Histopaque 1077 e Histopaque 1119 (Sigma).

Opsonización

40 Se opsonizaron células de cáncer de mama en 40 % de suero en solución salina tamponada con fosfato sin cloruro de calcio y sin cloruro de magnesio (PBS) (Gibco) durante 15 minutos a 37 °C. Entonces, las células se lavaron tres veces con PBS frío complementado con 0,04 mg/ml del inhibidor de la proteasa AEBSF (Sigma).

Unión al anticuerpo y deposición de C3

45 Se usó análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) para detectar Herceptin que se unía a células de cáncer de mama (usando anticuerpos anti-IgG1 humana, Sigma) y deposición de C3 (usando anticuerpos anti-C3 humano, Accurate Chem.).

Citotoxicidad

50 Se determinó la citotoxicidad para células de cáncer de mama tras la incubación con Herceptin conjugado con β -1,6-glucano o sin conjugar y suero por el ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® (Promega), que detecta lactato deshidrogenasa liberado de células lisadas. Para la destrucción dependiente de neutrófilo, las células anteriores se cultivaron con neutrófilos a 37 °C, tras lo cual se midió la citotoxicidad.

55 EJEMPLO 1

La activación del complemento estimulada con β -1,6-glucano depende de anticuerpos

60 Con el fin de probar si los anticuerpos participan o no en la activación del complemento por β -1,6-glucano, suero usado en la activación de ensayos del complemento se agotó en anticuerpos usando perlas de proteína-Sepharose. Este suero con empobrecimiento de IgG se usó para opsonizar perlas recubiertas de β -1,6-glucano. A continuación, las perlas se probaron en un ensayo de fagocitosis realizado con neutrófilos humanos. La fagocitosis y la producción de ROS se redujeron cuando las perlas recubiertas de β -1,6-glucano se opsonizaron con suero con

empobrecimiento de IgG (Fig. 1A y B), sugiriendo que la ruta clásica desempeña una función importante en la activación del complemento por β -1,6-glucano.

5 El suero con empobrecimiento de IgG contuvo factores del complemento funcionales. En un ensayo de glóbulos rojos de oveja (SRBC, por las siglas *Sheep Red Blood Cells*), los SRBC opsonizados con anticuerpo anti-SRBC se lisaron cuando se utilizó suero con empobrecimiento de IgG (Fig. 1 C).

EJEMPLO 2

10 Los anticuerpos para β -1,6-glucano son predominantes en adultos normales

Suero reunido de 10 donantes humanos tuvo altos niveles de anticuerpos IgG que se unían a β -1,6-glucano, a diferencia de bajos niveles de IgG que se unían a β -1,3-glucano. Para probar cómo de predominante es el anticuerpo anti- β -1,6-glucano en diferentes donantes, los presentes inventores recogieron sueros de 12 individuos. 15 Los sueros se usaron para opsonizar perlas recubiertas de β -1,6-glucano o β -1,3-glucano, y las perlas se incubaron con neutrófilos humanos. Once de los doce sueros tuvieron la alta respuesta que dio el conjunto, mediando en la eficaz engullición y la producción de ROS (Fig. 2 Aa, un suero representativo de altos respondedores). Un suero medió en una engullición y producción de ROS menos eficaz (Fig. 2 Ab, bajo respondedor).

20 EJEMPLO 3

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

25 Con el fin de evaluar qué isotipo de IgG estaba mediando en el reconocimiento de β -1,6-glucano, se usaron anticuerpos específicos para IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 para determinar el uso de isotipo de IgG en suero de donante con una alta o baja respuesta a β -1,6-glucano, tras la exposición a perlas opsonizadas recubiertas de β -1,6-glucano. El alto respondedor produjo más IgG1, IgG2 e IgG3, pero no produjo IgG4, en comparación con el bajo respondedor (Fig. 3). Específicamente, el nivel de IgG2 fue espectacularmente mayor en el alto respondedor, probablemente debido a que los polisacáridos tienden a inducir la producción del isotipo IgG2.

30 Los diferentes isotipos se diferencian en sus propiedades de activación del complemento. IgG3 tiene las mayores propiedades de activación del complemento, luego sigue IgG1, IgG2 es la siguiente, e IgG4 no puede activar el complemento. IgG2 es un mal activador de la ruta clásica, pero puede activar el complemento mediante la ruta alternativa, y es un buen sustrato para la fagocitosis por neutrófilos.

35 EJEMPLO 4

El β -1,6-glucano conjugado con el anticuerpo monoclonal Herceptin media en el reclutamiento del complemento y neutrófilos para células de cáncer de mama

40 Con el fin de evaluar si el β -1,6-glucano conjugado enlazado a restos dirigidos a diana puede mediar en el reclutamiento del complemento y neutrófilos para lisar y destruir células diana unidas por los restos dirigidos a diana, se probó un 1,6-glucano enlazado a un anticuerpo monoclonal (mAb) Herceptin en un sistema de células de cáncer de mama (SK-BR-3). El mAb Herceptin está dirigido contra la proteína Her-2/neu expresada en exceso sobre células 45 SK-BR-3. La conjugación de β -1,6-glucano con Herceptin no afectó su unión a células de cáncer de mama (Fig. 4 Aa). Además, el conjugado medió en la alta deposición de C3 (Fig. 4 Ab), sugiriendo que el β -1,6-glucano siguió siendo funcional. Anticuerpos de control de isotipo no específicos conjugados con β -1,6-glucano no se unen a células de cáncer de mama (Fig. 4 Ba) y, por tanto, no mediaron en la activación del complemento y deposición de C3 sobre estas células (Fig. 4 Bb). La mezcla de β -1,6-glucano con el mAb sin conjugación química no medió en la deposición de C3 sobre estas células de cáncer de mama (Fig. 4C, compárese la verde con la azul). Por tanto, se concluyó que se requería la conjugación de β -1,6-glucano con restos dirigidos a diana para dirigir el complemento y, por consiguiente, neutrófilos a células diana. La deposición de C3 se detectó sobre células de cáncer de mama 50 tratadas con Herceptin conjugado con β -1,6-glucano, pero no β -1,3-glucano (Fig. 4D, compárese la azul con la verde), sugiriendo que de hecho el β -1,6-glucano fue más eficaz que β -1,3-glucano en atraer el complemento.

55 EJEMPLO 4

El β -1,6-glucano conjugado con el anticuerpo monoclonal Herceptin media en la destrucción de células de cáncer de mama por complemento y neutrófilos

60 La deposición de la proteína del complemento C3 sobre células de cáncer de mama condujo a la lisis de estas células cancerosas. El conjugado de Herceptin- β -1,6-glucano mostró un efecto citotóxico dependiente de la dosis sobre las células de cáncer de mama, mientras que Herceptin sin conjugar careció de cualquier efecto (Fig. 5 A).

Además, el conjugado de Herceptin- β -1,6-glucano mostró una elevada destrucción de neutrófilos de las células cancerosas (Fig. 5 B).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit de diagnóstico para medir niveles de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y así determinar la sensibilidad de un sujeto que se ha expuesto a glucanos medioambientales, a una composición farmacéutica que comprende β -1,6-glucano, que comprende:
- 10 (i) una composición que comprende β -1,6-glucano que se corresponde con o es un fragmento de, o es altamente homólogo al glucano en la composición farmacéutica para la que está siendo determinada la sensibilidad; y
- (ii) reactivos para detectar anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 unidos al β -1,6-glucano de la etapa (i) en una muestra de sangre.
- 15 2. El kit de la reivindicación 1, en el que el β -1,6-glucano está en disolución o liofilizado.
3. El kit de la reivindicación 1, en el que el β -1,6-glucano está inmovilizado sobre un sustrato.
- 20 4. El kit de la reivindicación 3, en el que dicho sustrato comprende un material seleccionado de: plástico, vidrio, gel, celuloide, papel, resina magnética, poli(fluoruro de vinilideno), nailon, nitrocelulosa, agarosa, látex y poliestireno.
5. El kit de la reivindicación 3, en el que dicho sustrato comprende una placa de ELISA, tira reactiva, placa de microtitulación, placa de radioinmunoensayo, perlas, perlas de agarosa, perlas de plástico, perlas de látex, membranas de inmunotransferencia y papeles de inmunotransferencia.
- 25 6. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos reactivos están conjugados con un marcador detectable.
- 30 7. El kit de la reivindicación 6, en el que dicho marcador detectable está seleccionado del grupo que consiste en una marca radiactiva, marca fluorescente, marca quimioluminiscente, marca cromófora, ligando, fluoresceína, radioisótopo, fosfatasa, biotina, compuesto relacionado con biotina, avidina, compuesto relacionado con avidina y peroxidasa.
8. Uso del kit de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para establecer la fuerza de una respuesta a β -1,6-glucanos en un sujeto.
- 35 9. Uso del kit de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para predecir la sensibilidad de un sujeto a vacunas o a adyuvantes basados en glucano.

Fig. 1

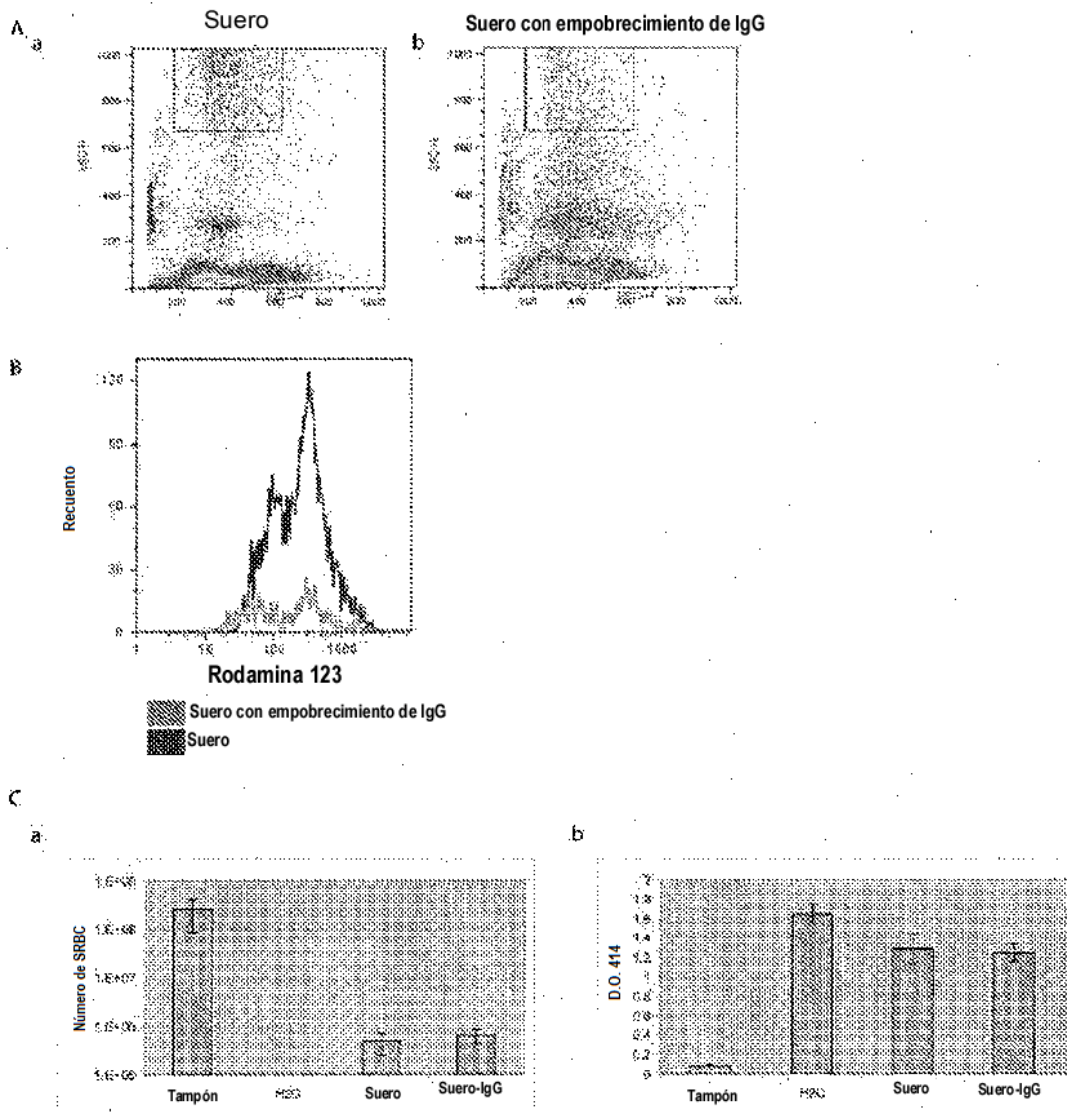


Fig. 2

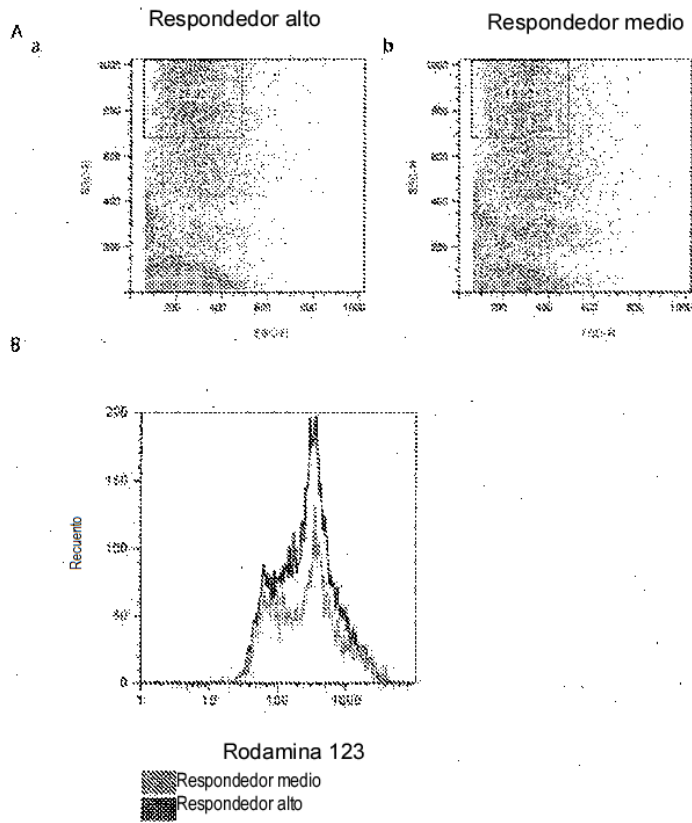


Fig. 3

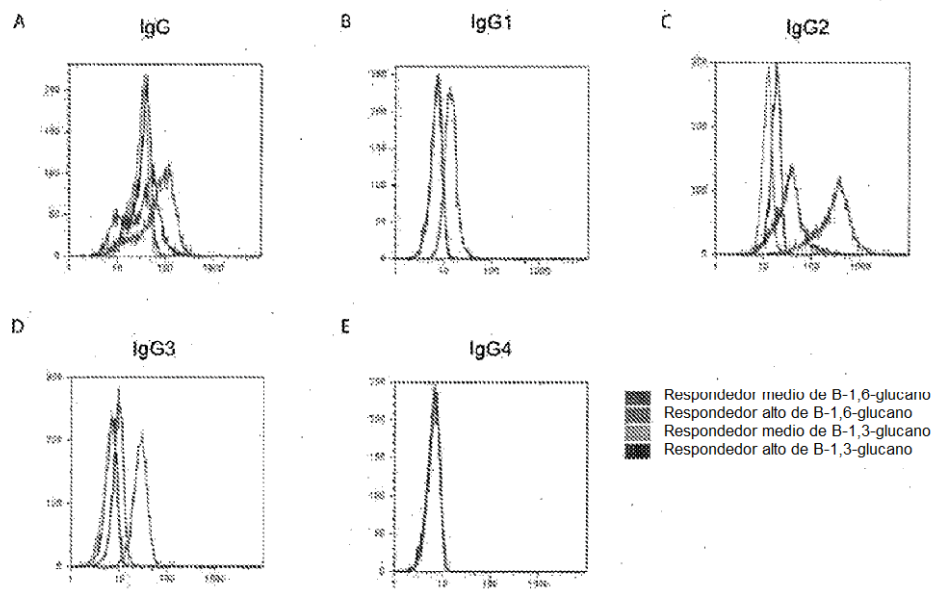


Fig. 4

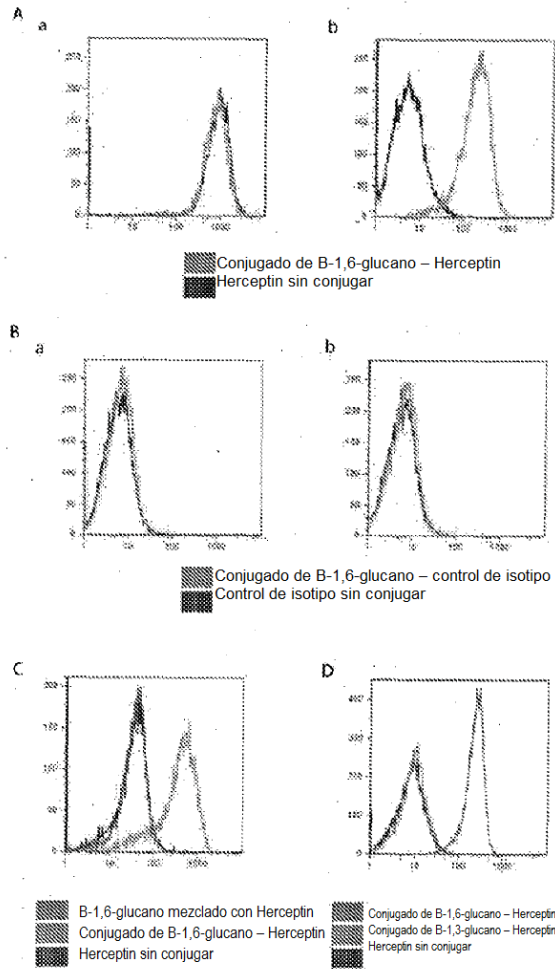
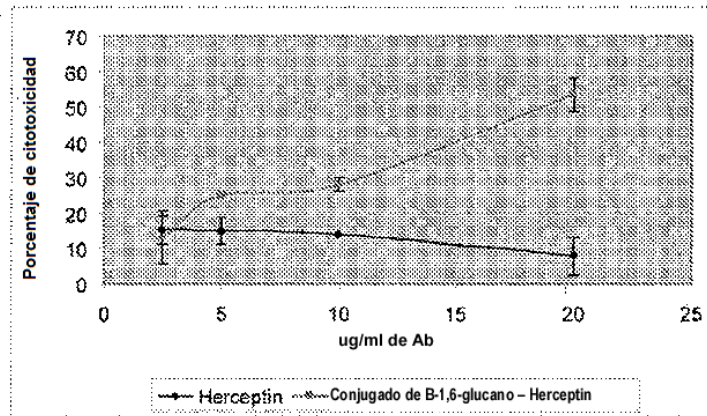


Fig. 5

A



B

