

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 798**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2011 PCT/EP2011/059287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11151471**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2011 E 11723472 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2575877**

54 Título: **Nuevos compuestos inmunoadyuvantes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.06.2010 EP 10305596

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

04.04.2017

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (25.0%) y
BAYLOR RESEARCH INSTITUTE (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GORVEL, JEAN-PIERRE;
BANCHEREAU, JACQUES;
MARTIROSYAN, ANNA;
KLECHEVSKY, EYNAV y
OH, SANGKON**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

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

ES 2 607 798 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

Nuevos compuestos inmunoadyuvantes y usos de los mismos

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un compuesto de beta glucano cíclico para su uso como inmunoadyuvante y a una composición de vacuna que comprende al mismo.

10 **Estado de la técnica**

El desarrollo de vacunas seguras y eficaces sigue siendo un objetivo importante en la salud pública global.

15 La mayoría de las vacunas actuales están compuestas de dos componentes principales: (i) el antígeno diana de interés terapéutico y (ii) inmunoadyuvantes, que estimulan y/o inducen la inmunogenicidad contra dicho antígeno.

La naturaleza de los inmunoadyuvantes conocidos varía en gran medida, pero incluye, en particular, aceites minerales, extractos bacterianos, organismos vivos y atenuados y suspensiones de hidróxido de aluminio y metales.

20 Incluso si los inmunoadyuvantes proporcionan respuestas inmunitarias mejoradas, su uso también puede desencadenar efectos secundarios adversos, en función destacadamente de su ruta de administración. Por lo tanto, el número de adyuvantes que están aprobados y son eficaces en seres humanos sigue siendo relativamente limitado. Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos compuestos que podrían usarse como inmunoadyuvantes sin desencadenar efectos secundarios adversos, tales como un efecto secundario endotóxico.

25 La respuesta inmunitaria contra una infección bacteriana se basa en la acción combinada de los sistemas inmunitarios tanto adaptativo como innato. Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) más eficaces, que desempeñan un papel importante en el inicio y regulación de la respuesta inmunitaria. Las DC son centinelas críticos que detectan, capturan, y procesan antígenos, tales como bacterias y virus invasores, y tienen la capacidad de migrar desde los tejidos periféricos a órganos linfoides secundarios para desencadenar respuestas de células T primarias. Tras la exposición a estímulos microbianos, las DC sufren un proceso de maduración caracterizado por la formación aumentada de complejos CMH-péptido, la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras (CD86, CD40 y CD80) y la producción de citocinas. Por otra parte, otros rasgos del proceso de maduración de las DC son la inducción de receptores de quimiocinas que facilitan el movimiento al interior de los nódulos linfáticos regionales (CCR7) y la capacidad aumentada para activar células T.

30 Las DC reconocen estímulos microbianos, también denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), por medio de receptores altamente conservados de reconocimiento de patrones (PRR). Las clases mejor conocidas y caracterizadas de PRR son los receptores de tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina de tipo C (CLR). Por ejemplo, las lipoproteínas y peptidoglucanos se reconocen por TLR2, el ARNbc por TLR3, el LPS por TLR4, el CpG por TLR9, la flagelina por TLR5, el ARNss por TLR7/8, el CpG por TLR9, las moléculas que contienen manosa por DC-SIGN y el β -glucano lineal por Dectina-1. Cuando se activan estos receptores, se activan las cascadas de señalización aguas abajo para la inducción de respuestas inflamatorias. Las rutas de señalización activadas después del acoplamiento del TLR pueden variar, dependiendo del reclutamiento o no de MyD88. Una ruta independiente de MyD88 que es única para TLR3 y TLR4 da lugar a la expresión de factor 3 regulador de interferón mientras que la ruta de señalización dependiente de MyD88, presente en todos los TLR salvo en TLR3, convergen en la inducción de MAPK y NF- κ B para ejercer adecuadamente sus efectos biológicos.

35 Los glucanos periplásmicos osmorregulados (OPG) son constituyentes generales del espacio periplásmico de la envuelta de bacterias Gram-negativas (22). Estos se han encontrado en todas las proteobacterias ensayadas. Los OPG muestran estructuras bastante diferentes entre diversas especies pero comparten varias características comunes: (i) son oligosacáridos formados por un número limitado de unidades (de 5 a 24); (ii) D-glucosa es el único azúcar constituyente; (iii) las unidades de glucosa están unidas, al menos parcialmente, mediante enlaces P-glucosídicos; (iv) la concentración de glucano en el periplasma aumenta en respuesta a una reducción de la osmolaridad ambiental. Los OPG parecen tener una función biológica crítica debido a que los mutantes deficientes en la síntesis de OPG presentan un fenotipo altamente pleiotrópico (por ejemplo, quimiotaxis, motilidad, estabilidad de la membrana externa reducida y síntesis de exopolisacáridos así como crecimiento defectuoso en medio hiposmótico) (22). Por otra parte, son incapaces de establecer asociaciones patógenas o simbióticas exitosas con hospedadores eucariotas (1).

60 *Brucella* es una α -Proteobacteria considerada como un patógeno intracelular facultativo de los mamíferos, incluyendo seres humanos. La patogénesis de la zoonosis resultante, denominada brucelosis, está principalmente vinculada a la capacidad de *Brucella* para sobrevivir y replicarse intracelularmente, en células hospedadoras fagocíticas tanto profesionales como no profesionales. En *Brucella* spp., los beta glucanos cíclicos (C β G) consisten en un armazón cíclico con un grado de polimerización en el intervalo de 17 a 25, en los que todas las unidades de glucosa están unidas mediante enlaces β -1,2 (C β G de *Brucella*) (2). Se ha descrito que la presencia de glucano

cíclico es necesaria para la virulencia completa de *B. abortus* (1). Además, Arellano-Reynoso et al. (3) determinaron que el CβG de *Brucella*, que modula la organización de microdominios de lípidos, era esencial para prevenir la fusión de lisosomas y permitir que la *Brucella* alcance su nicho replicativo. Los CβG se expresan en grandes cantidades, que representan un 1-5 % del peso seco de las bacterias (ref). Por lo tanto, considerando que si el contenido de una sola bacteria se libera dentro de una vacuola que contiene *Brucella*, cuyo volumen es de aproximadamente 10 femtolitros, la concentración del CβG en la vacuola podría estar en el intervalo mM. Esto significa que cuando miles de bacterias liberadas por las células apoptóticas mueren, el CβG liberado en el medio externo puede estimarse en el intervalo μM y esto puede tener algunas consecuencias importantes en el sistema inmunitario.

El papel de los glucanos y especialmente los beta glucanos lineales como PAMP importantes implicados en las interacciones hospedador-patógeno (4, 5) se ha descrito exhaustivamente. Interesantemente, los (1---3) β-glucanos lineales se conocen por sus propiedades inmunomoduladoras, debido a que se ha demostrado que poseen propiedades antitumorales (6) y antiinfecciosas contra infecciones bacterianas (7), víricas (8), fúngicas (9), y de protozoos (10). Sin embargo, hasta la fecha, no hay información acerca de las propiedades de los β-glucanos cíclicos como moduladores del sistema inmunitario. Kournikakis et al (documento US6444210) han descubierto que estos glucanos parecen ser capaces de potenciar la inmunidad general de los animales contra varias enfermedades.

De Gregorio et al (Current Opinion in Immunology 2009 21:339-345) es una revisión referente a la inmunología de adyuvantes para vacunas independientes de TLR.

Objeto de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

La invención se refiere a un compuesto beta glucano cíclico (CβG) que es un carbohidrato con un armazón cíclico que comprende entre 17 y 25 restos de hexosa unidos únicamente por enlaces beta-(1,2)glucosídicos, para su uso en un método para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

Los inventores han demostrado que los beta glucanos cíclicos (CβG) de *Brucella* muestran una actividad inmunoadyuvante, tal como se ilustra en los ejemplos del presente documento.

También se ha demostrado de acuerdo con la presente invención que estos nuevos compuestos adyuvantes representan en particular una nueva clase de moléculas activadoras de células dendríticas. Los inventores han demostrado por primera vez que el CβG de *Brucella* es un agonista de TLR4 y un potente activador de las DC de ratón y de ser humano, ya que es capaz de inducir la maduración de las células dendríticas, la secreción y activación de citocinas proinflamatorias y la proliferación de células T tanto CD4 como CD8.

Dichos nuevos compuestos de beta glucano de la invención son por lo tanto particularmente útiles como inmunoadyuvantes, para inducir y/o potenciar una respuesta inmunitaria.

La presente divulgación se refiere, por lo tanto, a un compuesto inmunoadyuvante que comprende al menos un compuesto beta glucano cíclico.

La divulgación también se refiere a una composición de vacuna que comprende un compuesto inmunoadyuvante, tal como se ha definido anteriormente, uno o más antígenos, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente divulgación también se refiere al compuesto inmunoadyuvante tal como se ha definido anteriormente, para su uso como medicamento (en particular, para inducir y/o potenciar la actividad adyuvante).

La presente divulgación también se refiere al uso de un compuesto inmunoadyuvante de acuerdo con la invención, para fabricar una composición de vacuna, en particular, para inducir y/o para potenciar una respuesta inmunitaria contra uno o más antígenos.

La divulgación también se refiere a un kit que contiene:

- un compuesto inmunoadyuvante de acuerdo con la invención,
- al menos un antígeno;

en forma de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial para inducir una respuesta inmune protectora contra, por ejemplo, un patógeno, o para proteger al sujeto o al animal de manera eficaz contra una infección.

Un objeto adicional de la divulgación se refiere a un compuesto beta glucano cíclico para su uso en un método terapéutico para inducir la maduración de células dendríticas (DC) en un sujeto que lo necesite.

Otro objeto adicional de la divulgación se refiere a un compuesto beta glucano cíclico para su uso como inmunoadyuvante, en donde dicho compuesto es para su uso para inducir la maduración de células dendríticas (DC) en un sujeto que lo necesite.

5 Descripción detallada de la invención

Los inventores han investigado el efecto de los beta glucanos cíclicos (C β G) de *Brucella* y de otros glucanos cíclicos en la maduración de las DC, en términos de producción de citocinas, expresión superficial de CMH-II y de moléculas co-estimuladoras, expresión génica, toxicidad y respuestas de anticuerpo en DC tanto de ser humano como de ratón. Han demostrado que los C β G de *Brucella* son potentes activadores de las DC de ratón y de ser humano. Además, los glucanos cíclicos con diferentes estructuras no indujeron las mismas respuestas de activación, lo que demuestra que C β G con diferentes estructuras pueden tener diferentes propiedades de activación. Los inventores también han demostrado que C β G representa una nueva clase de agonistas de TLR4. De hecho, se ha demostrado que dicho beta glucano cíclico tiene propiedades adyuvantes mediadas por TLR4, con efecto pro-inflamatorio *in vivo*, pero no muestra ningún efecto secundario endotóxico sistémico significativo después de su inyección sistémica. Los resultados contenidos en los ejemplos en el presente documento demuestran que dichos beta glucanos cíclicos no muestran un efecto antigénico intrínseco significativo, es decir, la molécula de interés previene o atenúa la potencia para desencadenar anticuerpos para beta glucanos cíclicos, de manera notable en suero. Por consiguiente, los inventores han demostrado que C β G podría representar una futura clase de inmunoadyuvantes.

Por consiguiente, un primer aspecto de la divulgación se refiere a un compuesto inmunoadyuvante que comprende al menos un compuesto beta glucano cíclico (C β G).

La presente divulgación se refiere también a un compuesto beta glucano cíclico para su uso como inmunoadyuvante.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadyuvante" se refiere a un compuesto que puede inducir y/o potenciar la respuesta inmunitaria contra un antígeno cuando se administra a un sujeto o a un animal. También pretende hacer referencia a una sustancia que actúa generalmente para acelerar, prolongar, o potenciar la calidad de las respuestas inmunitarias específicas para un antígeno específico. En el contexto de la presente invención, el término "inmunoadyuvante" significa un compuesto, que potencia tanto la respuesta inmunitaria innata afectando a la reacción transitoria de la respuesta inmunitaria innata como los efectos de larga duración de la respuesta inmunitaria adaptativa mediante la activación y maduración de las células presentadoras de antígenos (APC), especialmente las células dendríticas (DC).

Por consiguiente, un objeto adicional de la divulgación se refiere a un compuesto beta glucano cíclico para su uso en un método terapéutico para inducir la maduración de células dendríticas (DC) en un sujeto que lo necesite.

Otro objeto adicional de la divulgación se refiere a un compuesto beta glucano cíclico para su uso como inmunoadyuvante, en donde dicho compuesto se usa para inducir la maduración de células dendríticas (DC) en un sujeto que lo necesite.

Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o a un receptor de células T (TCR) en caso de que esté procesado y se presenta por moléculas del CMH. El término "antígeno", tal como se usa en el presente documento, también abarca epítopos de células T. Además, un antígeno es capaz de ser reconocido por el sistema inmunitario y/o es capaz de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular que da lugar a la activación de linfocitos B y/o T. Un antígeno puede tener uno o más epítopos o sitios antigénicos (epítopos de B y T).

Como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto de beta glucano cíclico" o "compuesto de C β G" se refiere a un carbohidrato de superficie de bajo peso molecular con un armazón cíclico que comprende entre 17 y 25 restos de hexosa unidos únicamente mediante enlaces beta-(1,2)glucosídicos. Los restos de hexosa pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en unidades de hexosa de origen natural así como alteraciones estructurales que incorporan hexosas de origen no natural, y análogos y miméticos de hexosa. Los expertos en la materia sabrán o podrán determinar qué estructura constituyen los análogos de hexosa y miméticos de hexosa funcionalmente equivalentes. Preferentemente, las unidades de hexosa de origen natural pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en aldohexosa, que pueden formar estructuras cíclicas, tales como alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa y talosa. Preferentemente, las unidades de hexosa de origen natural son glucosa.

En algunas realizaciones, pueden unirse diversas moléculas al compuesto de beta glucano cíclico de la invención, de manera covalente mediante el uso de los grupos hidroxilo libres ubicados en las unidades de hexosa y/o de manera no covalente mediante interacciones de carga creadas por la forma del anillo similar a un donut que muestra un nicho de aproximadamente 10 Å que acepta moléculas (11). Las moléculas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en polipéptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos o lípidos (como colesterol).

En algunas realizaciones, los restos de hexosa pueden sustituirse con al menos un resto sustituyente natural. La expresión "resto sustituyente natural" puede significar restos de succinilo (Suc) (como en C β G de *Brucella abortus* y C β G de *Sinorhizobium meliloti*), restos de fosfoglicerol (P-Gro) (como en C β G de *E. coli* y C β G de *Sinorhizobium meliloti*); restos de fosfoetanolamina (P-Etn) (como en C β G de *E. coli*); restos de fosfocolina (P-Cho) (como en C β G de *Bradyrhizobium japonicum*); restos de acetilo (Ace) (como en C β G de *R. sphaeroides*); restos de metilmalonilo (MeMal) (como en C β G de *S. meliloti*). En realizaciones preferidas, los restos sustituyentes naturales son restos de succinilo. Dicha sustitución se produce de manera natural en los beta glucanos cíclicos de otras especies bacterianas, tales como *Brucella abortus* (restos de O-succinilo). Pueden introducirse otras sustituciones en posiciones que no alteran la actividad inmunoadyuvante en el C β G. Típicamente, el enlace sustituyente en el compuesto beta glucano cíclico está formado preferentemente de un enlace O-éster en los grupos hidroxilo de la hexosa. En algunas realizaciones, el número de restos sustituyentes natural está comprendido entre 0 a 25. En realizaciones preferidas, el número de restos sustituyentes natural está comprendido entre 0 a 3.

El experto en la materia puede evaluar fácilmente el compuesto de C β G que tiene propiedades inmunoadyuvantes de acuerdo con la invención probando si dicho compuesto induce la maduración de las células dendríticas midiendo la producción de citocinas, tal como la producción de IL-12p y TNF-alfa y la expresión de marcadores de superficie en las células dendríticas, tales como CD80, CD40 y CD86. En una segunda etapa, también puede ensayarse la inducción de la proliferación y la activación de células T CD8+. Como alternativa, también pueden determinarse las actividades agonistas de TLR4. Típicamente, las pruebas que pueden usarse para probar la actividad inmunoadyuvante de un compuesto C β G se describen en los ejemplos.

El compuesto de beta glucano cíclico de la invención puede obtenerse mediante la purificación de una bacteria, más preferentemente de *Brucella*, o mediante uno cualquiera de los métodos para la síntesis química de oligosacáridos, que son de sobra conocidos para un experto en la materia.

Por ejemplo, los compuestos de beta glucano cíclico de interés pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células bacterianas. Típicamente, los compuestos de C β G de la invención se aíslan de *Brucella*. Por ejemplo, el compuesto C β G de la invención puede aislarse a partir de células de *Brucella* de tipo silvestre o de cepas de *Brucella* tales como *Brucella melitensis* 16M (Colección Americana de Cultivos Tipo 23456; cepa virulenta, biotipo 1), *Brucella abortus* 2308 (12). La bacteria empleada en la producción del beta glucano cíclico de interés puede romperse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica, o agentes de lisado celular.

Puede ser deseable purificar el beta glucano cíclico de interés a partir de bacterias. Los procedimientos descritos en los ejemplos son ilustrativos de procedimientos adecuados para la purificación de C β G del sobrenadante de *Brucella melitensis* o de *Brucella abortus*.

Los siguientes procedimientos son ilustrativos de procedimientos de purificación adecuados para el compuesto de beta glucano cíclico: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación de etanol (tal como se usa en el ejemplo); HPLC en fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatoenfoco; SDS-PAGE; precipitación por sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de Proteína A sefarosa para eliminar contaminantes; y columnas quelantes de metal para unir formas marcadas epitópicamente del beta glucano cíclico de interés. Pueden emplearse diversos métodos de purificación de oligosacáridos y se conocen en la técnica métodos similares, tales como tratamiento con ácido tricloroacético y cromatografía de permeación en gel y se describen, por ejemplo, en (21).

Las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y del compuesto beta glucano cíclico particular producido.

La preparación y producción de compuesto beta glucano cíclico, y especialmente con enlaces β -1,2, mediante el cultivo de una bacteria (*Agrobacterium* o *Rhizobium*), y la recogida del compuesto enunciado de la solución de cultivo se describe también en los documentos JP 61040799 y JP61070994.

En determinadas realizaciones, el compuesto beta-glucano cíclico de la invención puede sintetizarse mediante técnicas convencionales de síntesis química. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 0216384 describe aparatos y métodos para la síntesis automatizada de oligosacáridos para la síntesis eficaz de oligosacáridos sobre un soporte sólido, por ejemplo, formado mediante adición de subunidades a subunidades terminales inmovilizadas sobre una partícula de fase sólida. El compuesto de beta glucano cíclico de la invención también puede sintetizarse mediante el uso de laminarina 16A glucosintasa (23).

Un objeto adicional de la divulgación se refiere a una composición de vacuna, que comprende un compuesto de C β G de acuerdo con la invención como un inmunoadyuvante, opcionalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición de vacuna que comprende un compuesto inmunoadyuvante tal como se ha definido anteriormente, junto con uno o más antígenos.

Una "composición de vacuna", una vez que ha sido administrada a un sujeto o a un animal, desencadena una respuesta inmunitaria contra dichos uno o más antígenos que están comprendidos en la misma. Por consiguiente, la composición de vacuna de la invención, una vez que se ha administrado al sujeto o al animal, induce una respuesta inmunitaria protectora contra, por ejemplo, un microorganismo, o para proteger al sujeto o al animal de manera eficaz contra una infección.

Pueden emplearse una diversidad de sustancias como antígenos en un compuesto o formulación, de tipo inmunogénico o de vacuna. Por ejemplo, los patógenos víricos y bacterianos atenuados e inactivados, macromoléculas purificadas, polisacáridos, toxoides, antígenos recombinantes, organismos que contienen un gen exógeno de un patógeno, péptidos sintéticos, ácidos polinucleicos, anticuerpos y células tumorales pueden usarse para preparar (i) una composición inmunogénica útil para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo o (ii) una vacuna útil para tratar una patología.

Por lo tanto, un compuesto beta glucano cíclico de la invención puede combinarse con una gran variedad de antígenos para producir una composición de vacuna útil para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo.

Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar un antígeno adecuado para tratar una patología concreta y sabrán cómo determinar si un antígeno aislado se ve favorecido en una formulación de vacuna particular.

Los expertos en la materia también serán capaces de determinar si es preferible unir covalentemente, o no unir covalentemente, el inmunoadyuvante de la invención a dichos uno o más antígenos. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la divulgación, la presente divulgación se refiere a un compuesto de beta glucano cíclico de acuerdo con la invención unido a al menos un antígeno.

Un antígeno aislado puede prepararse usando una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. Puede aislarse y clonarse un gen que codifica un polipéptido inmunogénico, por ejemplo, en células bacterianas, de levadura, de insecto, de reptil o de mamífero usando métodos recombinantes bien conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1992) y en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1998). Se han clonado, expresado y usado una serie de genes que codifican antígenos de superficie de patógenos víricos, bacterianos y de protozoos como antígenos para el desarrollo de vacunas. Por ejemplo, el antígeno de superficie principal del virus de la hepatitis B, HbsAg, la subunidad P de la toxina del cólera, la enterotoxina de *E. coli*, la proteína del circumesporozoito del parásito de la malaria, y el antígeno de membrana de glucoproteína del virus Epstein-Barr, así como antígenos de células tumorales, se han expresado en diversos sistemas de vector/hospedador conocidos, se han purificado y se han usado en vacunas.

También puede usarse una célula patológicamente aberrante en una composición de vacuna de acuerdo con la divulgación y puede obtenerse de cualquier fuente, tal como uno o más individuos que tengan una patología o de células cultivadas *ex vivo* o *in vitro* obtenidas de uno o más individuos, incluyendo un individuo específico que va a tratarse con la vacuna resultante.

En una realización particular, el antígeno de la composición de vacuna puede ser un "antígeno asociado a tumores". Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno asociado a tumores" se refiere a un antígeno que es característico de un tejido tumoral. Un ejemplo de un antígeno asociado a tumores expresado por un tejido tumoral puede ser la fosfatasa ácida de antígeno prostático (véase el documento WO 2004026238) o el péptido T de MART (antígeno de melanoma).

La composición de vacuna de acuerdo con la divulgación puede contener al menos un inmunoadyuvante. Puede ser adecuada una serie de inmunoadyuvantes para alterar una respuesta inmunitaria en un individuo. El tipo de alteración deseada determinará el tipo de inmunoadyuvante seleccionado para combinarse con dicho compuesto de beta glucano cíclico de la invención. Por ejemplo, para potenciar la respuesta inmune innata, las composiciones de vacuna de la divulgación pueden comprender otro inmunoadyuvante que promueve una respuesta inmune innata, tal como otro PAMP o región conservada conocida o sospechosa de inducir una respuesta inmune innata. Se sabe que una serie de PAMP estimulan las actividades de diferentes miembros de la familia de receptores de tipo Toll. Dichos PAMP pueden combinarse para estimular una combinación particular de receptores de tipo Toll que inducen un perfil de citocinas beneficioso. Por ejemplo, Los PAMP pueden combinarse para estimular un perfil de citocinas que induce una respuesta inmunitaria de Th1 o Th2. Pueden combinarse otros tipos de inmunoadyuvantes que promueven las respuestas inmunitarias humorales o mediadas por células con un compuesto de beta glucano cíclico de la invención. Por ejemplo, pueden administrarse citocinas para alterar el equilibrio de respuestas inmunitarias de Th1 y Th2. Los expertos en la materia sabrán cómo determinar las citocinas adecuadas útiles para obtener una alteración beneficiosa en la respuesta inmunitaria para una patología concreta.

En otra realización particular, la composición de vacuna de acuerdo con la divulgación, comprende además uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en tensioactivos, promotores de la absorción, polímeros absorbentes de agua, sustancias que inhiben la degradación enzimática, alcoholes, disolventes orgánicos, aceites, agentes para el control del pH, conservantes, agentes para el control de la presión osmótica, propelentes, agua y

mezclas de los mismos.

La composición de vacuna de acuerdo con la divulgación puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La cantidad del vehículo dependerá de las cantidades seleccionadas para los otros ingredientes, de la concentración deseada del antígeno, de la selección de la ruta de administración, oral o parenteral, etc. Puede añadirse el vehículo a la vacuna en cualquier momento conveniente. En el caso de una vacuna liofilizada, el vehículo puede, por ejemplo, añadirse inmediatamente antes de la administración. Como alternativa, puede fabricarse el producto final con el vehículo.

Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación, agua estéril, suero salino, tampones, suero salino tamponado con fosfato, cloruro sódico tamponado, aceites vegetales, medio esencial mínimo (MEM), MEM con tampón HEPES, etc.

Opcionalmente, la composición de vacuna de la divulgación puede contener adyuvantes secundarios convencionales en diversas cantidades, dependiendo del adyuvante y del resultado deseado. La cantidad habitual varía de aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 20 % en peso, dependiendo de los otros ingredientes y del efecto deseado. Para los fines de la presente invención, estos adyuvantes se identifican en el presente documento como "secundarios" simplemente para diferenciarlo del compuesto inmunoadyuvante anteriormente descrito que es un ingrediente esencial en la composición de vacuna por su efecto en combinación con una sustancia antigénica para aumentar la respuesta inmunitaria humoral a la sustancia antigénica. Los adyuvantes secundarios se incluyen principalmente en la formulación de vacuna como adyuvantes del procesado aunque determinados adyuvantes poseen hasta cierto punto propiedades potenciadoras de la inmunidad y tienen un propósito dual.

Los ejemplos de adyuvantes secundarios incluyen, pero sin limitación, estabilizantes; emulsionantes; hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; ajustadores del pH, tales como hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etc.; tensioactivos, tales como Tween™ 80 (polisorbato 80, disponible comercialmente a través de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.); liposomas; adyuvante iscom; glucopéptidos sintéticos, tales como dipéptidos de muramilo; extensores, tales como dextrano o combinaciones de dextrano, por ejemplo, con fosfato de aluminio; carboxipolimetileno; paredes de células bacterianas, tales como extracto de pared celular micobacteriana; sus derivados, tales como *Corynebacterium parvum*; *Propionibacterium acne*; *Mycobacterium bovis*, por ejemplo, Calmette Guerin bovino (BCG); proteínas de vaccinia o de poxvirus animal; adyuvantes de partículas subvéricas, tales como orbivirus; toxina del cólera; N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxiethyl)-propanodiamina (piridina); lípido A de monofosforilo; bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDA, disponible comercialmente a través de Kodak, Rochester, N.Y.); sintéticos y mezclas de los mismos. De manera deseable, se mezcla hidróxido de aluminio con otros adyuvantes secundarios o un inmunoadyuvante, tal como Quil A.

Los ejemplos de estabilizantes adecuados incluyen, pero sin limitación, sacarosa, gelatina, peptona, extractos de proteína digeridas, tales como NZ-amina o NZ-amina AS. Los ejemplos de emulsionantes incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, aceite vegetal, aceite de cacahuete y otros aceites convencionales, metabolizables, no tóxicos útiles para composiciones de vacuna inyectables o intranasales.

Pueden añadirse conservantes convencionales a la composición de vacuna en cantidades eficaces en el intervalo de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 0,1 % en peso. Dependiendo del conservante empleado en la formulación, pueden ser útiles cantidades por encima o por debajo de este intervalo. Los conservantes típicos incluyen, por ejemplo, sorbato de potasio, metabisulfito de sodio, fenol, metil parabeno, propil parabeno, timerosal, etc.

La composición de vacuna de la divulgación puede formularse en forma de una solución o suspensión junto con un medio farmacéuticamente aceptable.

Dicho medio farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua, solución salina tamponada con fosfato, suero salino normal u otro suero salino fisiológico tamponado, un otro disolvente o vehículo, tal como glicol, glicerol, y aceite, tal como aceite de oliva o un éster orgánico inyectable. Un medio farmacéuticamente aceptable también puede contener liposomas o micelas, y puede contener complejos inmunoestimulantes preparados mezclando antígenos polipeptídicos o peptídicos con detergente y un glucósido, tal como Quil A.

Las formas de dosificación líquida para la administración oral de la composición de vacuna de la divulgación incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los principios activos, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos.

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes suspensores, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

- 5 Las suspensiones, además de los principios activos, pueden contener agentes suspensores como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilén sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

- 10 Las formulaciones de las composiciones de vacuna de la divulgación para administración rectal o vaginal pueden presentarse en forma de un supositorio, que pueden prepararse mezclando los principios activos con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorio o salicilato y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirán en el recto o en la cavidad vaginal y liberarán los principios activos. Las formulaciones de la presente divulgación que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverizador que contienen dichos vehículos que se conocen en la técnica como adecuados.

- 20 Las composiciones de vacuna de la presente divulgación adecuadas para administración parenteral comprenden los principios activos en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles y farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hagan a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

- 25 Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos que pueden emplearse en las composiciones de vacuna de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de las dispersiones, y usando tensioactivos.

- 30 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

- 40 Las formas en depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de los principios activos en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de ingredientes activos a polímero, y de la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la tasa de liberación de los principios activos. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables en depósito también se preparan atrapando a los principios activos en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

- 45 Las formulaciones pueden presentarse en contenedores sellados monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado liofilizado, que requiere únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

- 50 La cantidad de antígeno y compuesto inmunoadyuvante en la composición de vacuna de acuerdo con la divulgación se determinan mediante técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica farmacéutica, teniendo en consideración factores tales como el antígeno particular, la edad, el sexo, el peso, la especie, y el estado del animal o paciente particular, y la vía de administración.

- 55 Aunque la dosificación de la composición de vacuna depende notablemente del antígeno, de la especie del hospedador vacunado o que se va a vacunar, etc., la dosificación de una cantidad farmacológicamente eficaz de la composición de vacuna variará normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg (y en particular, de 50 mg a aproximadamente 500 mg) de compuesto inmunoadyuvante de la invención por dosis.

- 60 Aunque la cantidad de la sustancia antigénica particular en la combinación tendrá influencia en la cantidad del compuesto inmunoadyuvante de acuerdo con la invención, necesaria para mejorar la respuesta inmunitaria, se contempla que el médico pueda ajustar fácilmente la cantidad de dosificación eficaz del compuesto inmunoadyuvante mediante pruebas rutinarias para satisfacer las circunstancias particulares.

65

La composición de vacuna de acuerdo con la divulgación puede ensayarse en una diversidad de estudios toxicológicos y de seguridad bien conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo, dicha composición de vacuna puede evaluarse en un modelo animal en el que se ha observado que el antígeno es inmunogénico y que puede inmunizarse de manera reproducible por la misma ruta propuesta para ensayos clínicos.

10 Por ejemplo, la composición de vacuna de acuerdo con la invención puede ensayarse, por ejemplo, mediante una estrategia expuesta por el Center for Biologics Evaluation and Research/Food and Drug Administration y el National Institute of Allergy and Infectious Diseases (13).

15 Los expertos en la materia sabrán cómo determinar, para una composición de vacuna particular, la carga de antígeno adecuada, la ruta de inmunización, el volumen de dosis, la pureza del antígeno, y el régimen de vacunación útil para tratar una patología concreta en una especie animal particular.

En un protocolo de vacunación, puede administrarse ventajosamente la vacuna en forma de una sola dosis o, preferentemente, varias veces, por ejemplo, dos veces, tres veces o cuatro veces a intervalos semanales o mensuales, según un modo de cebado/refuerzo. La dosificación adecuada depende de varios parámetros.

20 Por norma general, la composición de vacuna de la presente divulgación se administra de manera conveniente por vía oral, parenteral (subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica o intraperitoneal), intrabucal, intranasal, o transdérmica, intralinfática, intratumoral, intravesical, intraperitoneal e intracerebral. La ruta de administración contemplada por la presente invención dependerá del antígeno.

25 La presente divulgación se refiere a un kit que comprende un compuesto inmunoadyuvante como se ha definido anteriormente (es decir, un compuesto de C β G de acuerdo con la invención) y al menos un antígeno.

Más particularmente, la divulgación se refiere a un kit que comprende:

- 30 - un compuesto inmunoadyuvante como se ha definido anteriormente,
- al menos un antígeno como se ha definido anteriormente;

35 en forma de una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial para inducir una respuesta inmune protectora contra, por ejemplo, un patógeno, o para proteger al sujeto o al animal de manera eficaz contra una infección.

40 Puede administrarse un compuesto de C β G antes de, de manera concomitante con, o después de la administración de al menos un antígeno a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra, por ejemplo, un patógeno, o para proteger al sujeto o al animal de manera eficaz contra una infección. El compuesto de C β G y el antígeno se administran a un sujeto en una secuencia y en un intervalo de tiempo de tal forma que el compuesto de C β G pueda actuar junto con el antígeno para proporcionar una respuesta inmunitaria aumentada contra dicho antígeno que si se administrase de otro modo. Preferentemente, el compuesto de C β G y el antígeno se administran de manera simultánea al sujeto. También preferentemente, las moléculas se administran simultáneamente y cada día a dicho paciente.

45 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para vacunar a un sujeto que lo necesita que comprende administrar una cantidad farmacológicamente eficaz de un antígeno y una cantidad farmacológicamente eficaz de un compuesto inmunoadyuvante de acuerdo con la invención.

50 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felido, un cánido, y un primate. Preferentemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

55 Puede administrarse una cantidad farmacológicamente eficaz del compuesto inmunoadyuvante de acuerdo con la invención, por ejemplo, por vía oral, parenteral o de otro modo, de manera concurrente con, secuencialmente con o poco después de la administración del antígeno para potenciar, acelerar o extender la inmunogenicidad del antígeno.

60 La dosificación de la composición de vacuna dependerá de manera destacable del antígeno seleccionado, de la vía de administración, de la especie y de otros factores convencionales. Se contempla que un experto habitual en la materia pueda titular fácil y rápidamente la dosificación adecuada para una respuesta inmunogénica para cada antígeno para lograr la cantidad de inmunización y el método de administración eficaz.

La presente divulgación se refiere también a un agonista de TLR4, que consiste en un compuesto de C β G de acuerdo con la invención.

65 Como se usa en el presente documento, un agonista de TLR4 se refiere a un agente que es capaz de inducir de manera sustancial, promover o potenciar la actividad biológica de TLR4 o la activación o señalización del receptor

TLR4.

Un objeto adicional de la divulgación se refiere a un método para inducir la maduración de las células dendríticas (DC) en un sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad farmacológicamente eficaz de un compuesto inmunoadyuvante de acuerdo con la invención.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

10 Descripción de las figuras

Figura 1. La inducción de la maduración de las mDC depende de la estructura del glucano cíclico. Se estimularon DC de ratón durante 8 h y 24 h con medio (neg), LPS de *E. coli* o C β G de *B. melitensis*, C β G de *B. abortus*, C α G y M β CD de *Ralstonia* a una concentración equivalente de 0,25 mM. Se midieron los niveles superficiales de MHC-II, CD80, CD40 y CD86 mediante citometría de flujo y se determinaron mediante ELISA los niveles de IL-12 y TNF-alfa en el sobrenadante de cultivo (B). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. * p < 0,05 en comparación con negativo.

Figura 2 C β G de *B. melitensis* en DC humanas potencia las respuestas de células T CD4+ y CD8+.

A) Se estimularon DC humanas derivadas de monocitos durante 24 h con medio (neg), 10 ng/ml de LPS de *E. coli* y 0,2 μ M, 2 μ M y 20 μ M de C β G de *B. melitensis* y se analizaron los niveles superficiales de HLA-DR, HLA-ABC, CD80, CD40, CD83 y CD86 mediante FACS. B) Las mDC de la sangre se estimularon con 20 mg/ml de C β G durante 24 h. Las citocinas en los sobrenadantes de cultivo se midieron mediante Luminex.

Figura 3 La producción de IL-12 y la expresión en superficie de CD80, CD40 y CD86 inducida por C β G de *B. melitensis* son dependientes de TLR4.

Se estimularon DC de ratones TS (A, B y C), MyD88KO (A), TRIFKO (A), TLR2KO (B) y TLR4KO (B y C) durante 24 h con medio (neg), CpG, Polil:C, Pam2CSK4 y C β G de *B. melitensis*. A y B) Se determinó la concentración de IL-12 en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. C) Se midieron los niveles de superficie de CD80, CD40 y CD86 mediante citometría de flujo. Como controles positivos: Pam2CSK4 (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml), CpG (1 μ M) y Poli I:C (1 mg/ml). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. *p < 0,05, en comparación con ratones TS.

Figura 4 Actividad adyuvante de C β G de *B. abortus* contra el veneno de *Bothrops asper*.

A; Los (**) en la mezcla de veneno+alginato de calcio+C β G indican un valor de p < 0,001 con respecto al veneno inyectado individualmente en una mezcla de alginato de calcio.

B. Actividad adyuvante de C β G contra el veneno de *Bothrops asper* 21 días después de la inmunización. Agrupaciones de suero de 10 ratones por grupo (un total de 30 ratones). La DT es menor del 5 %.

EJEMPLO 1: LOS β 1,2 GLUCANOS CÍCLICOS BACTERIANOS SON NUEVOS ACTIVADORES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

MATERIALES Y MÉTODOS:

Anticuerpos y reactivos.

Se adquirieron anticuerpos conjugados a fluorocromo contra CD8, CD45.2, CD44, CD25 y CD62L a través de BD Biosciences o de eBiosciences.

La ovoalbúmina (OVA) se adquirió a través de EndoGrade con una pureza >98 % y una concentración de endotoxina < 1 UE/mg.

El succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) se encargó a Invitrogen.

El colorante para células muertas Aqua para excitación a 405 nm (Invitrogen) se usó para detectar las células muertas para los experimentos de citometría de flujo.

El péptido SIINFEKL se adquirió a través de Schafer-N.

Extracción, purificación y caracterización del glucano cíclico

Las moléculas de glucano cíclico se obtuvieron a partir de *B. melitensis* 16M (Colección Americana de Cultivos Tipo 23456; cepa virulenta, biotipo 1), *Brucella abortus* 2308 (12) y *Ralstonia solanacearum* (el C α G purificado de *Ralstonia solanacearum* fue donado por el Dr. JP Bohin, CNRS UMR8576, Lille, Francia). Las cepas se cultivaron en un fermentador a 36°C y una saturación de O₂ del 35 % en una sala de nivel de bioseguridad 3 en el caso de las

cepas de *Brucella* (14) y se inactivaron con fenol (al 0,5 % a 36°C durante 48 h). Las bacterias se resuspendieron en agua destilada (20 g de peso húmedo en 100 ml) y se calentaron a 120 °C durante 30 min. Se retiraron los restos celulares (8.000 g durante 30 min a 4°C) y se precipitó el extracto con tres volúmenes de etanol a -20°C durante una noche. Se retiró el precipitado (5.000 g durante 10 min) y se mezcló el sobrenadante con dos volúmenes de etanol. Se recogió el nuevo precipitado (5.000 g durante 10 min), se suspendió en NaCl 175 mM, NaN₃ al 0,05 % y Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, y se digirió primeramente durante 18 h a 37 °C con nucleasas (50 mg de DNasa-II de tipo V y RNasa-A (Sigma-Aldrich) por ml) y después durante 1 h a 55°C seguido de 24 h a 25°C con proteinasa K (50 mg/ml; Merck). El fluido se extrajo durante 30 min a 70°C con un volumen de fenol, después se enfrió y centrifugó la mezcla (8.000 g durante 15 min a 0°C) y se recogió la fase acuosa y se extrajo de nuevo con fenol usando las mismas condiciones. Se dializó la fase acuosa, se clarificó mediante una breve centrifugación y se criodesecó. La identidad del glucano cíclico se confirmó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹³C, cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía en capa fina de alto rendimiento (TLC) tal como se describe por Aragon y colaboradores. Se demostró la ausencia de polisacáridos y lipopolisacáridos u otros contaminantes mediante espectrofotometría ultravioleta, SDS-PAGE, inmunoprecipitación en gel y determinación con ácido 3-desoxi-D-mano-2-octulosónico (14).

Ratones y células

Las células HEK 293 se mantuvieron en DMEM complementado con FCS al 10 %.

Los ratones de tipo silvestre C57BL/6 y los ratones con eliminación génica (KO) para TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} se mantuvieron en el Centre d'Immunologie Marseille-Luminy (CIML), Marsella, Francia. Las células con doble KO (MyD88/TRIF^{-/-}) fueron proporcionadas por el laboratorio de Caetano Reis y Souza, Londres, R.U.

Las DC derivadas de médula ósea de ratón se prepararon a partir de ratones C57BL/6 hembra de 7-8 semanas de edad o de ratones con eliminación génica (KO) para TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} tal como se ha descrito anteriormente (15). En resumen, se extirparon los fémures y tibias de los ratones y se retiraron los músculos y tendones. Los huesos se colocaron en etanol al 70 % durante 2 min y posteriormente se lavaron en PBS. Se cortaron ambos extremos, y se extrajo la médula con medio RPMI 1640. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con RPMI 1640 completo (FCS al 5 % y β-mercaptoetanol 50 μM) complementado con GM-CSF de ratón (mGM-CSF). En el día 3, se cambió el medio y en el día 6 se llevó a cabo el experimento.

Los macrófagos derivados de médula ósea de ratón se prepararon del mismo modo a las DC derivadas de médula ósea, a partir de los fémures de ratones C57BL/6 hembra de 7-8 semanas de edad. Las células se sembraron en DMEM completo (L-glutamina 2 mM, FCS al 10 %) complementado con M-CSF. En los días 5 y 6, se cambió el medio y en el día 7, se llevó a cabo el experimento.

Las DC derivadas de monocitos humanos se generaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos separadas con Ficoll (16). Los monocitos se enriquecieron por adherencia y se cultivaron en medio RPMI completo (complementado con factor estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4 durante 6 días o GM-CSF e IFN durante 3 días. Las DC mieloides sanguíneas (mDC: HLA-DR+CD11c+CD123-Lin-) se clasificaron a partir de las PBMC usando FACS aria (BD Biosciences, CA). Las células T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes (CD45RA+CD45RO-) (pureza >99,2 %) se purificaron mediante clasificación FACS.

Para los experimentos, se usaron ratones C57Bl/6 Ly5.1 de Jackson Laboratory y ratones transgénicos OT-I TCR Ly5.2 en un origen de C57Bl/6 criados en las instalaciones para animales del CIML.

Microscopía de inmunofluorescencia y citometría de flujo

Para la microscopía de inmunofluorescencia, se fijaron las DC estimuladas en paraformaldehído al 3 % a 37°C durante 15 min y se procesaron para marcaje inmunofluorescente tal como se ha descrito anteriormente (17).

Se usaron el anticuerpo rivoli de conejo contra I-A murino (18) y el anticuerpo FK2 de ratón (Biomol) como anticuerpos primarios. Después de la tinción, las muestras se examinaron en un microscopio de epifluorescencia Leica DMRBE o en un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 510 para la obtención de imágenes. Entonces se ensamblaron imágenes de 1024x1024 píxeles usando Adobe Photoshop 7.0. La cuantificación se llevó a cabo en todos los casos contando al menos 100 células en 4 experimentos independientes, hasta un total de al menos 400 células hospedadoras analizadas.

Para la citometría de flujo, se recogieron y tiñeron las DC estimuladas. El anticuerpo para CD80 y CD40 conjugado a FITC, el anticuerpo para CD83 e IA-IE (clase II del CMH) y el anticuerpo para CD11c conjugado a APC se obtuvieron a través de Pharmingen. Como controles, se usaron anticuerpos de isotipo adecuado. Después de la tinción, las células se lavaron con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 3 % antes de su análisis en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). Las células se clasificaron para su análisis respecto de CD11c y se obtuvieron de cada muestra 10.000 acontecimientos clasificados. Los datos se analizaron usando el programa informático FlowJo. A partir de la

población clasificada, se representaron los histogramas y se determinaron los valores de la mediana de intensidad de fluorescencia. Para efectuar el seguimiento de la proliferación y activación de células T marcadas con CFSE, se recogieron los nódulos linfáticos poplíteos drenantes (DLN) 3 días después de la inmunización y se sometieron a digestión con colagenasa de tipo I. Las células se tiñeron para su análisis mediante citometría de flujo usando diferentes anticuerpos conjugados a fluorocromo. Se recogieron al menos 100.000 eventos en un FACS-Canto II (BD Biosciences). El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo usando el programa informático FlowJo.

Medición de la concentración de citocinas

Se cuantificaron la IL-12 y el TNF-alfa totales en el sobrenadante de cultivo de DC estimuladas mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) según las instrucciones del fabricante (Abcys). Las citocinas y quimiocinas humanas, incluyendo IL-1b, TNFa, e IL-12p40, se cuantificaron usando el kit de ensayo de citocinas BeadLyte (Upstate, MA) según el protocolo del fabricante.

Respuestas de células T CD4+ and CD8+

Se cultivaron conjuntamente 5×10^3 mDC sanguíneas con células T CD4+ vírgenes alogénicas marcadas con CFSE ($1-2 \times 10^5$). La proliferación celular se evaluó midiendo la dilución de CFSE en el día 6. Para las células T CD8+, durante 8-10 días en presencia de IL-2 (20 unidades/ml). Se cargaron 5×10^3 mDC sanguíneas de donantes sanos HLA-A0201+ con virus de la gripe (PR8) a una m.d.i. (multiplicidad de infección) de 0,2 durante 2 h a 37 °C. Las células T CD8+ autólogas ($1-2 \times 10^5$) se mezclaron y cultivaron durante 7 días en presencia de 20 unidades/ml de IL-2. Después se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD8 y tetrámero (HLA-A*0201-Flu M158-66). Se midieron las respuestas de las células T CD8+ específicas de MART-1 después del cultivo conjunto con mDC cargadas con péptido MART-126-35 (27L) 10 mM.

Transferencia adoptiva e inmunización de células OT-I T.

Se usaron células OT-I transgénicas que expresan TCR específico para un epítipo de célula T CD8+ restringido a H-2Db de OVA. Se recogieron los nódulos linfáticos de ratones OT-I Ly5.2 y se digirieron con colagenasa de tipo I (Sigma) a 37°C durante 30min. Las células T CD8+ se clasificaron negativamente usando un kit de aislamiento negativo para CD8 de ratón (Dyna). De manera rutinaria, las células resultantes fueron > 90 %. Se determinó el porcentaje de CD8 mediante citometría de flujo. Las células T CD8+ se marcaron con CFSE $10 \mu\text{M}$ a 37°C durante 10min.

Se transfirieron por vía intravenosa (i.v.) de manera adoptiva células T CD8+ Ly5.2 CFSE+ en ratones receptores C57Bl/6 Ly5.1 congénicos vírgenes (200.000 células/ratón). 24 h después de la transferencia adoptiva de OT-I, se inmunizó por vía subcutánea (s.c.) a los ratones receptores con 30 mg solo de OVA en PBS sin endotoxinas o con 30 mg de OVA mezclada con 200 mg de glucano cíclico o 30 mg de OVA mezclada con 50 mg de poli I/C o 30 mg de OVA emulsionada con IFA (volumen/volumen).

Activación y proliferación de células T.

Las células viables se clasificaron siempre para una población CD8+CD45.2+ y los inventores analizaron la reducción de marcaje de CFSE, que se correlaciona con la división celular. Para estudiar el nivel de activación celular, los inventores observaron la expresión de marcadores de activación, tales como CD25, CD44 y CD62L.

Ensayo indicador de luciferasa en células HEK 293

Se llevaron a cabo ensayos indicadores en células HEK 293 tal como se ha descrito anteriormente usando los plásmidos indicados. Se amplificaron los ADNc de TLR, MD2 y CD14 de ratón mediante PCR con transcriptasa inversa a partir de ARN total preparado a partir de macrófagos derivados de médula ósea y subclonación en el vector de expresión pCDNA3.1 (Promega). Las células HEK 293 se transfectaron transitoriamente usando Eugene (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para un total de 0,4 μg de ADN que consistía en 50 ng de plásmidos de receptor, 200 ng de plásmido indicador pBIxLuc, 5 ng de luciferasa Renilla (pRL-null, Promega). Después de 24 h de transfección, las células se estimularon con el agonista descrito durante 6 h y después se lisaron las células y se midió la actividad de luciferasa usando un sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo (Promega).

RESULTADOS:

C β G de *Brucella* es un modulador de la maduración de DC de ratón

La maduración de DC de ratón se caracteriza por muchos cambios morfofuncionales, entre otros, la regulación positiva de moléculas coestimuladoras y de la clase II del CMH en la superficie de la célula, el cambio en la morfología y la formación de grandes estructuras citosólicas inducidas similares al agrosoma de células dendríticas, denominadas DALIS, que están formadas por proteínas ubiquitinadas defectuosas recientemente sintetizadas. Para

determinar inicialmente si el C β G de *B. melitensis* era un activador de la maduración de las DC de ratón, las células se incubaron con diferentes concentraciones de C β G de *B. melitensis*. Después de 8 y 24 h, se analizó la expresión superficial de moléculas de clase II del CMH y la formación de DALIS mediante microscopía confocal. Como control de la activación de DC, se usaron 0,25 mM de LPS de *E. coli*. Las DC de ratón tratadas con C β G de *B. melitensis* o con LPS de *E. coli*, pero no las tratadas con LPS de *Brucella* sufrieron transformación, ya que mostraron localización superficial del CMH II y formación de DALIS. Sin embargo, en las DC no tratadas y las DC tratadas con LPS de *Brucella*, las moléculas de CMHII permanecieron principalmente en el espacio intracelular y no se observaron DALIS. Porcentaje de DC con DALIS después de incubación durante 8 h y 24 h con los estímulos respectivos. En el caso de LPS de *E. coli*, el 80 % de las células contenían grandes y numerosos DALIS después de 8 h mientras que solo el 20 % de las células no tratadas contenían DALIS. C β G de *B. melitensis*, a 0,025 μ M indujo la formación de DALIS en un 45 % de las células y a 0,25 μ M y 2,5 μ M el número de células aumentó al 79 % y 72 %, respectivamente, alcanzando los niveles obtenidos con 0,25 μ M de LPS de *E. coli*. A las 24 h, comenzó a reducirse el número de DALIS, lo que es consistente con lo que se ha observado anteriormente, ya que la expresión de DALIS en el proceso de la maduración de DC es un acontecimiento transitorio.

Para obtener una perspectiva adicional acerca del efecto de C β G de *B. melitensis* en el proceso de maduración de las DC, los inventores analizaron seguidamente la expresión superficial de los marcadores clásicos de maduración (CD80, CD86, CD40 y moléculas de la clase II del CMH) mediante citometría de flujo en DC de ratón positivas a CD11c. El análisis de la mediana de fluorescencia mostró una clara inducción dependiente de la dosis de todas las moléculas coestimuladoras y de la clase II del CMH mediante C β G de *B. melitensis*. Esto concuerda con las observaciones de microscopía, donde una elevada proporción de las moléculas de la clase II del CMH estaban presentes en la superficie celular.

Estas observaciones sugieren que el C β G de *B. melitensis* promueve la maduración de las DC. Los inventores han investigado si la secreción de citocinas por DC de ratón se inducía también después de la estimulación con C β G de *B. melitensis*. Se determinaron los niveles de IL-12 y TNF-alfa en los sobrenadantes de DC de ratón estimuladas. Los resultados demostraron que C β G de *B. melitensis* indujo la secreción de ambas citocinas de una manera dependiente de la dosis. Este efecto se observó a las 8 h así como a las 24 h después de la estimulación, sin diferencias significativas entre ambos instantes de tiempo. En su conjunto, estos datos confirmaron que C β G de *B. melitensis* es una potente molécula activadora de las DC de ratón.

La maduración de DC de ratón se modula por diferentes estructuras de glucano cíclico

Entonces, los inventores investigaron la posible relación entre la estructura de glucano cíclico y la activación de DC incubando DC con varios C β G de diferentes orígenes. C β G de *B. melitensis* consiste en un armazón acíclico que contiene 17-25 restos de glucosa que están unidos mediante enlaces β -1,2 (22). En el caso de C β G de *B. abortus*, una parte de los β -1,2-glucanos está sustituida con restos de O-succinilo (19). C α G de *Ralstonia* está formado por un armazón cíclico con 13 glucosas. Un enlace es α -1,6 mientras que todos los demás restos de glucosa están unidos mediante β -1,2 (22). La metil ciclodextrina (M β CD) sintética consiste en un armazón cíclico de 7 glucosas que están unidas mediante enlaces β -1,4 y con sustituciones de O-metilo, que también es conocida por los biólogos como un agente destructor de las balsas lipídicas usando su propiedad para extraer el colesterol de membrana (22).

En primer lugar, los inventores analizaron la expresión superficial de los marcadores de maduración. LPS de *E. coli*, C β G de *B. melitensis* y de *B. abortus* indujeron una expresión robusta de CD80, CD86, CD40 y de moléculas de la clase II del CMH, aunque a niveles ligeramente menores, que en las células incubadas con C β G de *B. abortus*. Por el contrario, C α G y M β CD de *Ralstonia* no lograron activar a las DC de manera significativa.

El análisis de la secreción de citocinas corrobora la expresión de marcadores de superficie. C β G de *B. melitensis* y de *B. abortus* indujo la secreción de TNF-alfa y de IL-12. En respuesta a C α G de *Ralstonia*, las DC apenas produjeron TNF-alfa e IL-12 y en respuesta a M β CD no se secretó ninguna de las citocinas.

Los datos anteriores demostraron en primer lugar que la activación de DC dependiente de glucano cíclico depende en gran medida de la estructura molecular y en segundo lugar, que la extracción de colesterol no tiene efecto alguno en las respuestas del sistema inmunitario en las DC.

La activación de DC por C β G necesita a TLR4, MyD88 y TRIF, pero es independiente de CD14.

Los presentes inventores analizaron la contribución de los TLR y de los adaptadores para el reconocimiento de C β G. MyD88 y TRIF son moléculas adaptadoras implicadas en la señalización de TLR. MyD88 está implicado en las rutas de TLR1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, IL-1R e IL-18R mientras que TRIF es único para TLR3 y TLR4. Se trataron BMDC derivadas de ratones KO para TLR4, TLR2, MyD88, TRIF, TRIF/MyD88 y CD14 KO con C β G. No pudo observarse activación en las BMDC derivadas de ratones KO para TLR4, Myd88, Myd88/TRIF and TRIF KO estimuladas con LPS de *E. coli* y C β G de *B. melitensis*, según se indica midiendo la expresión de superficie de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-12, IL-6 y TNF- α (Fig 2 y B). Estos resultados demuestran que C β G de *B. melitensis* induce la maduración de DC mediante la activación de la ruta de TLR4. Para delinear la ruta implicada en la maduración de DC inducida por C β G de *B. melitensis*, se ensayó la

activación en BMDC derivada de ratones MyD88KO, TRIFKO y doble MyD88/TRIFKO. De manera similar a LPS de *E. coli*, la inducción de IL-12 por C β G de *B. melitensis* se vio impedida en BMDC derivadas de ratones MyD88-KO y TRIF-KO. No se observó secreción de IL-12 en los doble KO MyD88/TRIF cuando las células se incubaron con C β G de *Brucella* a diferencia de las DC tratadas con curdlano, un α -1,3 glucano lineal de *Alcaligenes faecalis*. Se sabe que el curdlano interactúa con el receptor clave de β -glucano, Dectina-1 de un modo independiente de MyD88/TRIF.

El reconocimiento del LPS implica a la proteína de unión a LPS (LBP), CD14 y el complejo TLR4/MD2. La secreción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-12, se suprimió completamente en BMDC KO para CD14 tratadas con LPS de *E. coli* así como la expresión en la superficie celular de moléculas coestimuladoras, CMH-II. Por el contrario, la activación de BMDC tratadas con C β G fue independiente de CD14. El hecho de que C β G no requiera de CD14 para activar la ruta de TLR4 destaca un mecanismo de reconocimiento diferente que para LPS. En conjunto, estos resultados demuestran que C β G es un nuevo agonista de TLR4.

Los inductores biológicos potentes, tales como LPS, muestran una alta toxicidad e inmunogenicidad, propiedades que dificultan el uso de estas moléculas como adyuvante. Por lo tanto, era relevante explorar estas propiedades en las preparaciones purificadas de C β G de *Brucella*. A diferencia de LPS de *E. coli*, C β G de *Brucella* no fue tóxico para los cultivos celulares o para los animales (Tabla 1) y no indujo la generación de anticuerpos en ratones, conejos o en bóvidos infectados de manera natural (no mostrado). Estos resultados corroboran resultados anteriores que demuestran que en cultivo celular, C β G no era tóxico, incluso a concentraciones muy elevadas (10 mM). Por lo tanto, C β G es un agonista de TLR4 que no muestra las propiedades tóxicas del LPS.

C β G de *Brucella* induce una respuesta de CD8 *in vivo*.

Los inventores investigaron la capacidad del glucano cíclico para inducir una respuesta de células T CD8+ contra un antígeno exógeno libre. Los inventores transfirieron células CD8+ Ly5.2 CFSE+ OT-IT en ratones C57Bl/6 Ly5.1 que después fueron inmunizados (s.c.) con PBS solo (grupo 1), OVA sola (grupo 2), OVA con glucano cíclico (grupo 3) u OVA con adyuvantes conocidos, tales como Poli I/C (grupo 4) o IFA (grupo 5). Tres días después de la inmunización, los inventores pudieron observar la proliferación de células OT-I T en el nódulo linfático drenante en ratones de todos los grupos, salvo los de control inmunizados con PBS. Los presentes inventores exploraron a continuación la expresión superficial de marcadores de activación en la población CD8+ CD45.2+. Los inventores analizaron mediante citometría de flujo la regulación positiva de la expresión de CD25, CD44 y la regulación negativa de CD62L, que se correlaciona con la migración de células T desde los nódulos linfáticos hasta los sitios de infección. No se produjo activación celular en ratones vacunados solo con PBS o con PBS con OVA. Sin embargo, en el grupo inmunizado con OVA y glucano cíclico, los inventores pudieron observar una regulación positiva de CD25 y CD44, así como una fuerte regulación negativa de la expresión de CD62L, que es mayor que en los grupos inmunizados con adyuvantes conocidos, tales como Poli:IC.

Estos datos indican que C β G puede inducir la proliferación y activación de células T CD8+ *in vivo*.

C β G de *Brucella* induce la maduración de DC humanas.

Los inventores investigaron si C β G de *B. melitensis* era también un estímulo para DC derivadas de monocitos humanos. Las DC humanas se diferenciaron de monocitos obtenidos a partir de sangre periférica humana en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 6 días o GM-CSF e IFN durante 3 días. Por lo tanto, los inventores probaron el efecto de diversas concentraciones de C β G de *B. melitensis* en la maduración de las DC. En las DC diferenciadas con IFN, la regulación positiva de CD80, CD83, CD40, HLA-DR, HLA-ABC y CD86 en la superficie celular se detectó también de una manera dependiente de la dosis después del tratamiento durante 24 h con C β G de *B. melitensis* (Figura 2A). Al igual que en las DC de ratón, la menor concentración empleada (0,2 μ M) no fue capaz de inducir este fenotipo de DC. Se obtuvo el mismo resultado para DC humanas diferenciadas con IL-4. Los inventores demostraron además que C β G activa de manera eficaz las mDC de sangre humana, dando como resultado cantidades significativas de IL-1b, TNF α , e IL-12, tal como se observó en DC de ratón. En particular, C β G fue más potente que LPS de *E. coli* para la inducción de IL-1b de mDC de ratón (Figura 2B). La activación de las mDC con C β G dio como resultado un aumento de la proliferación de células T CD4+ vírgenes. También dio como resultado respuestas de células T CD8+ específicas para M1 de gripe así como respuestas de células T CD8+ específicas de MART-1. Aunque C β G fue más eficaz que LPS de *E. coli* para la proliferación de células T CD4+, tanto C β G como LPS de *E. coli* dieron como resultado niveles similares de respuestas de células T CD8+ específicas de M1 de gripe tal como se demuestra en el ensayo de presentación cruzada.

En su conjunto, estos resultados indican que C β G de *Brucella* es un pan-activador de DC y macrófagos. C β G de *Brucella* no es endotóxico *in vivo* e *in vitro*.

Debido a que C β G fue capaz de desencadenar una fuerte activación y debido a que parecía que la activación mediada era dependiente de la ruta de TLR4, los inventores observaron la posible endotoxicidad generada *in vitro* e *in vivo*. Se usaron ensayos diferenciales, en particular, el ensayo de lisado de amebocito *Limulus*, la DL50 en ratones Swiss a los que se inyectan los distintos agonistas y la toxicidad en macrófagos, medida mediante liberación de cromo. La tabla 1 muestra que C β G no fue en absoluto tóxico, en comparación con LPS de *E. coli* y LPS de

Brucella. Como era de esperar, en comparación con LPS de *Brucella*, el LPS de *E. coli* pudo inducir un choque endotóxico a una concentración muy baja.

Tabla 1: C β G de *B. melitensis* está desprovisto de propiedades endotóxicas

Lisado de amebocito <i>Limulus</i>	DL50 en ratones	Toxicidad en macrófagos
LPS de <i>E. coli</i>	0,1 ng/ml	65 μ g
LPS de <i>B. melitensis</i>	0,1 ng/ml	>250 μ g
C β G de <i>B. melitensis</i>	>105 ng/ml	>500 μ g

5 Lisado de amebocito *Limulus* de Pyrogen MA Bio products Inc. Walkersville EE.UU. El método se llevó a cabo de acuerdo con el manual de instrucciones.

10 La DL50 se determinó en ratones Swiss (de 20 a 22 g), con 0,1 ml de las concentraciones de LPS adecuadas. Se registraron las muertes a las 12, 24, 48 y 72 h, y se determinó el 50 % de la dosis letal mediante el método probit. El método probit. (20). La toxicidad para macrófagos peritoneales se llevó a cabo usando el método de liberación de cromo.

15 **EJEMPLO 2: ACTIVIDAD ADYUVANTE DE C β G DE BRUCELLA**

15 **Métodos:**

20 Se evaluó la actividad adyuvante de C β G para la inducción de anticuerpos frente a veneno de serpiente de acuerdo con el método propuesto por (24). En resumen, se mezcló el veneno de *Bothrops asper* diluido en PBS con alginato de calcio o con PBS (control) y se emulsionó la mezcla. Después se inyectó la mezcla por vía subcutánea a ratones CD-1, para proporcionar un equivalente a 20 μ g de veneno en un volumen de 50 μ l/ratón. Se inyectó a otro grupo de ratones a través de la misma ruta con la misma mezcla de alginato de calcio y veneno, pero incluyendo a la vez 100 μ g de C β G de *B. abortus* por ratón. Finalmente, a un grupo de ratones se les inyectó únicamente veneno diluido en PBS. Se extrajo sangre de los ratones inmunizados desde el día "0" hasta el día 30, y se determinaron los anticuerpos contra el veneno de *B. asper* mediante ELISA indirecto usando placas recubiertas con antígeno de veneno completo y en forma de anti-Ig de ratón conjugada a peroxidasa de rábano picante (24). Se evaluaron los valores independientes de los diferentes grupos de ratones y se determinaron las diferencias mediante análisis ANOVA unidireccional (<http://www.uv.es/~lejarza/anova/anova.html>), seguido de análisis de la significación de Fisher (PLSD) (<http://www.graphpad.com/faq/view-faq.cfm?faq=176>).

30 **Resultados:**

35 El alginato de calcio es el inmunoadyuvante usado clásicamente para inducir una respuesta inmunológica contra el veneno. Tal como se muestra en la figura 4, C β G actúa de manera sinérgica con el alginato de calcio para la producción de inmunoglobulinas anti-veneno después de 21 y 28 días (Figura 4A). Por lo tanto, se acelera la cinética de producción de anticuerpos y la actividad adyuvante es mayor que la observada únicamente con alginato de calcio (Figura 4B).

40 **Referencias:**

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

- 45 1. Briones, G. et al. *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 69, 4528-4535 (2001).
2. Inon, d., I, Briones, G., Tolmasky, M. y Ugalde, R. A. Molecular cloning and characterization of cgs, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti* ndvB and *Agrobacterium tumefaciens* chvB mutants. *J. Bacteriol.* 180, 4392-4400 (1998).
- 50 3. Arellano-Reynoso, B. et al. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 6, 618-625 (2005).
4. Brown, G. D. y Gordon, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol.* 7, 471-479 (2005).
5. Netea, M. G. et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest* 116, 1642-1650 (2006).
6. Seljelid, R. A water-soluble aminated beta 1-3D-glucan derivative causes regression of solid tumors in mice. *Biosci. Rep.* 6, 845-851 (1986).
7. Kokoshis, P. L., Williams, D. L., Cook, J. A. y Di Luzio, N. R. Increased resistance to *Staphylococcus aureus* infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan. *Science* 199, 1340-1342 (1978).
8. Itoh, W. et al. Immunopharmacological study of sulfated schizophyllan (SPG). I.--Its action as a mitogen and anti- HIV agent. *Int. J. Immunopharmacol.* 12, 225-233 (1990).
- 60 9. Williams, D. L., Cook, J. A., Hoffmann, E. O. y Di Luzio, N. R. Protective effect of glucan in experimentally

- induced candidiasis. *J. Reticuloendothel. Soc.* 23, 479-490 (1978).
10. Cook, J. A., Holbrook, T. W. y Dougherty, W. J. Protective effect of glucan against visceral leishmaniasis in hamsters. *Infect. Immun.* 37, 1261-1269 (1982).
- 5 11. Mimura M, Kitamura S, Gotoh S, Takeo K, Urakawa H, Kajiwara K *Carbohydr Res.* 19 de agosto de 1996;289:25-37. Conformation of cyclic and linear (1 → 2)-beta-D-glucans in aqueous solution.
12. Pizarro-Cerda, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66, 5711-5724 (1998).
13. Goldenthal, KL et al. *AID Res Hum Retroviruses*, 9: S45-9 (1993)
- 10 14. Aragon, V., Diaz, R., Moreno, E. y Moriyon, I. Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 178, 1070-1079 (1996).
- 15 15. Inaba, K. et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702 (1992).
- 16 16. Dhodapkar, K. M. et al. Selective blockade of inhibitory Fc-gamma receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 2910-2915 (2005).
- 17 17. Pizarro-Cerda, J. et al. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66, 5711-5724 (1998).
- 20 18. Pierre, P. et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792 (1997).
19. Roset, M. S., Ciocchini, A. E., Ugalde, R. A. e Inon, d., I The *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J. Bacteriol.* 188, 5003-5013 (2006).
- 20 20. Haskell G., *Science*, 1950 111:43.
- 25 21. Talaga P, Coge V, Wieruszkeski JM, Stahl B, Lemoine J, Lippens G, Bohin JP. Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem.* mayo de 2002;269(10):2464-72.
22. Bohin, J. P. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 11-19 (2000).
- 30 23. Vasur J, Kawai R, Jonsson KH, Widmalm G, Engström A, Frank M, Andersson E, Hansson H, Forsberg Z, Igarashi K, Samejima M, Sandgren M, Ståhlberg J. Synthesis of cyclic beta-glucan using laminarinase 16A glycosynthase mutant from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Am Chem Soc.* 10 de feb de 2010;132(5):1724-30.
24. Rucavado A, Moreno E, Gutiérrez JM. Effect of adjuvants on the antibody response of mice to *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Braz J Med Biol Res.* octubre de 1996;29(10):1337-40.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto beta glucano cíclico (CβG) que es un carbohidrato con un armazón cíclico que comprende entre 17 y 25 restos de hexosa unidos únicamente por enlaces beta-(1,2)glucosídicos, para su uso en un método para potenciar una respuesta inmunitaria específica de antígeno.
- 10 2. El compuesto de beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto de CβG se sustituye con al menos un resto sustituyente natural seleccionado entre el grupo que consiste en restos de succinilo, restos de fosfoglicerol, restos de fosfoetanolamina, restos de fosfocolina, restos de acetilo y restos de metilmalonilo.
- 15 3. El compuesto de beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el al menos un resto sustituyente natural es un resto de succinilo.
- 20 4. El compuesto de beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que el número de restos sustituyentes naturales está comprendido entre 1 y 25.
5. El compuesto de beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el número de restos sustituyentes naturales está comprendido entre 1 y 3.
- 25 6. El compuesto de beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto de CβG es un compuesto de CβG obtenido de *Brucella*.
- 30 7. El compuesto de beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el compuesto de CβG es un compuesto de CβG obtenido de *Brucella melitensis* o de *Brucella abortus*.
8. Un compuesto de beta glucano cíclico (CβG) tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso para potenciar la respuesta inmunitaria contra un antígeno mediante la inducción de una respuesta de células T CD8+ y/o CD4+.
9. El beta glucano cíclico (CβG) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el antígeno es un antígeno de célula tumoral.

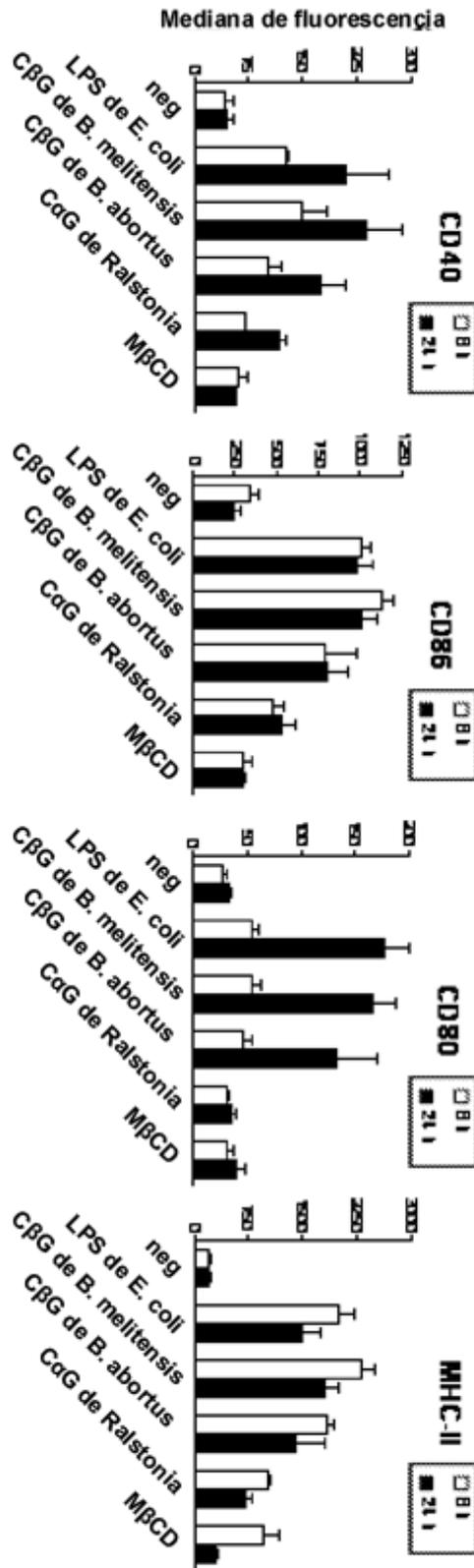


Figura 1A

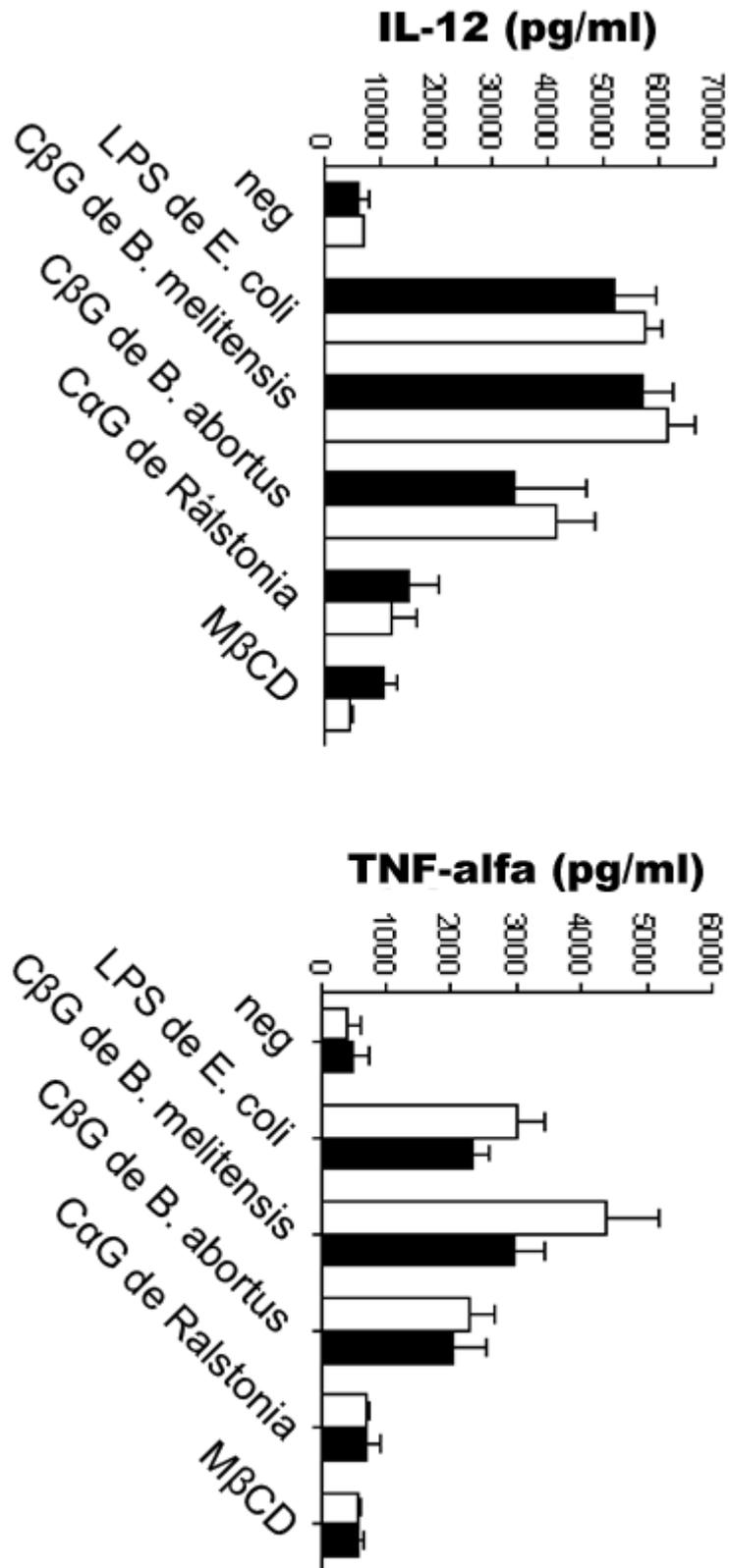


Figura 1B

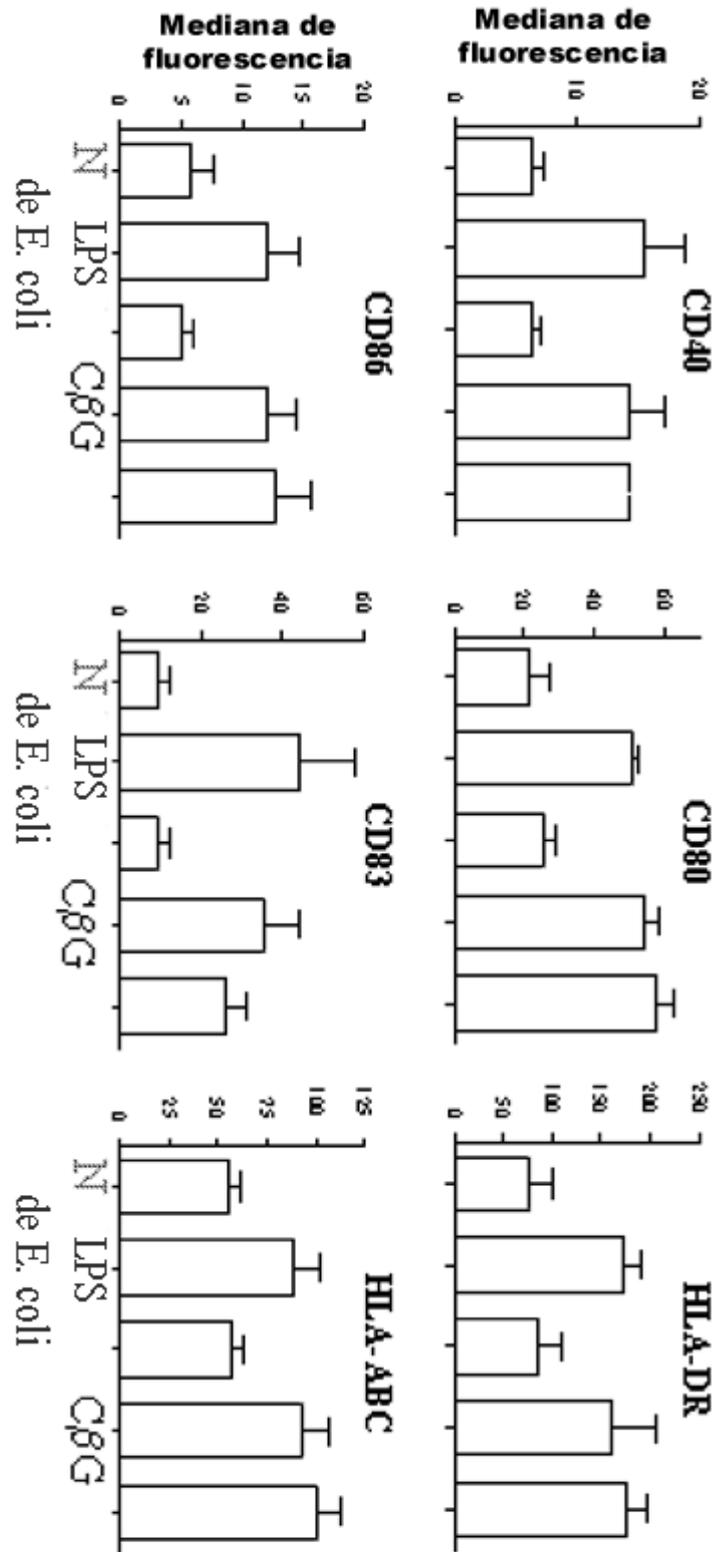


Figura 2A

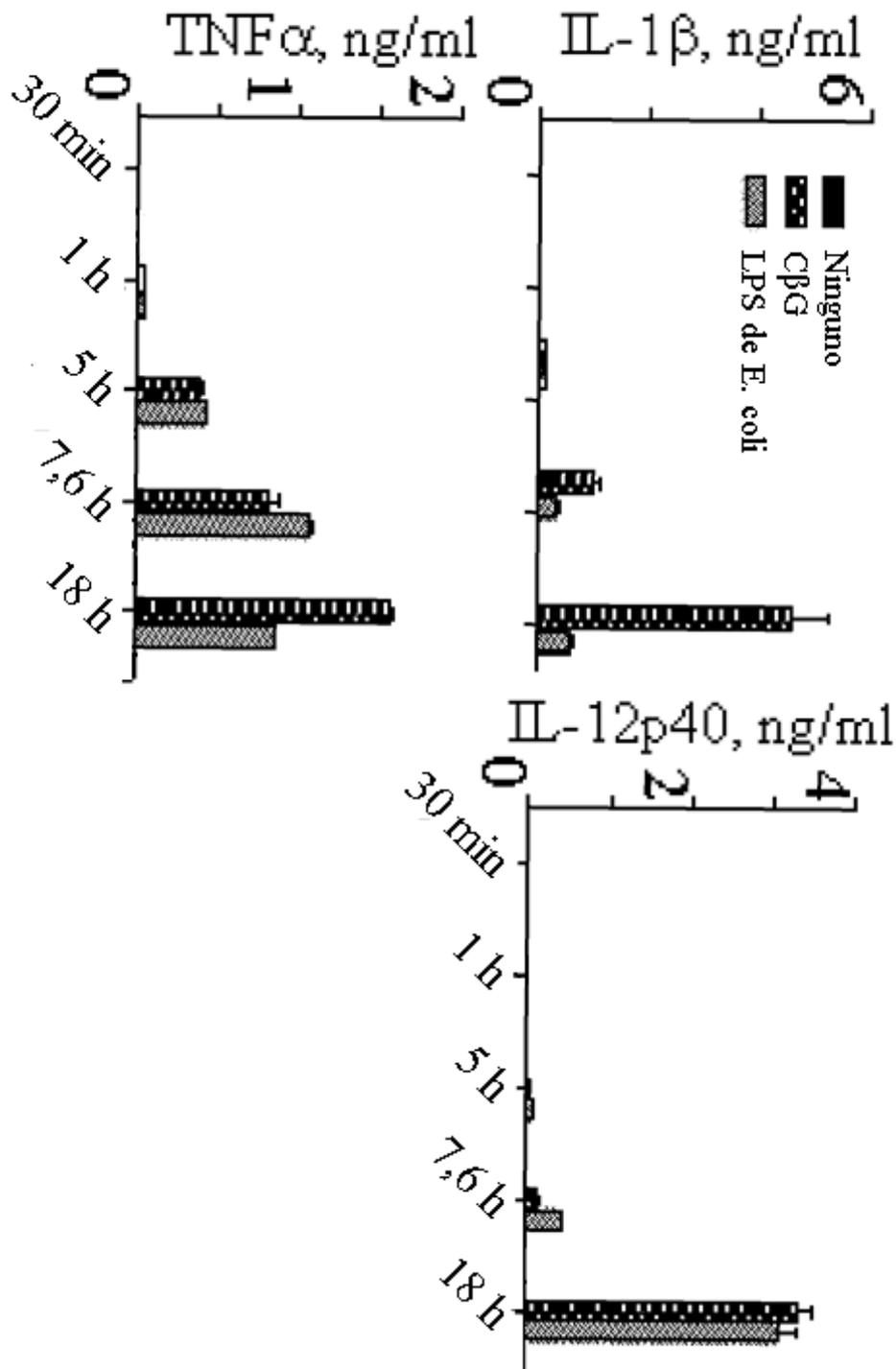


Figura 2B

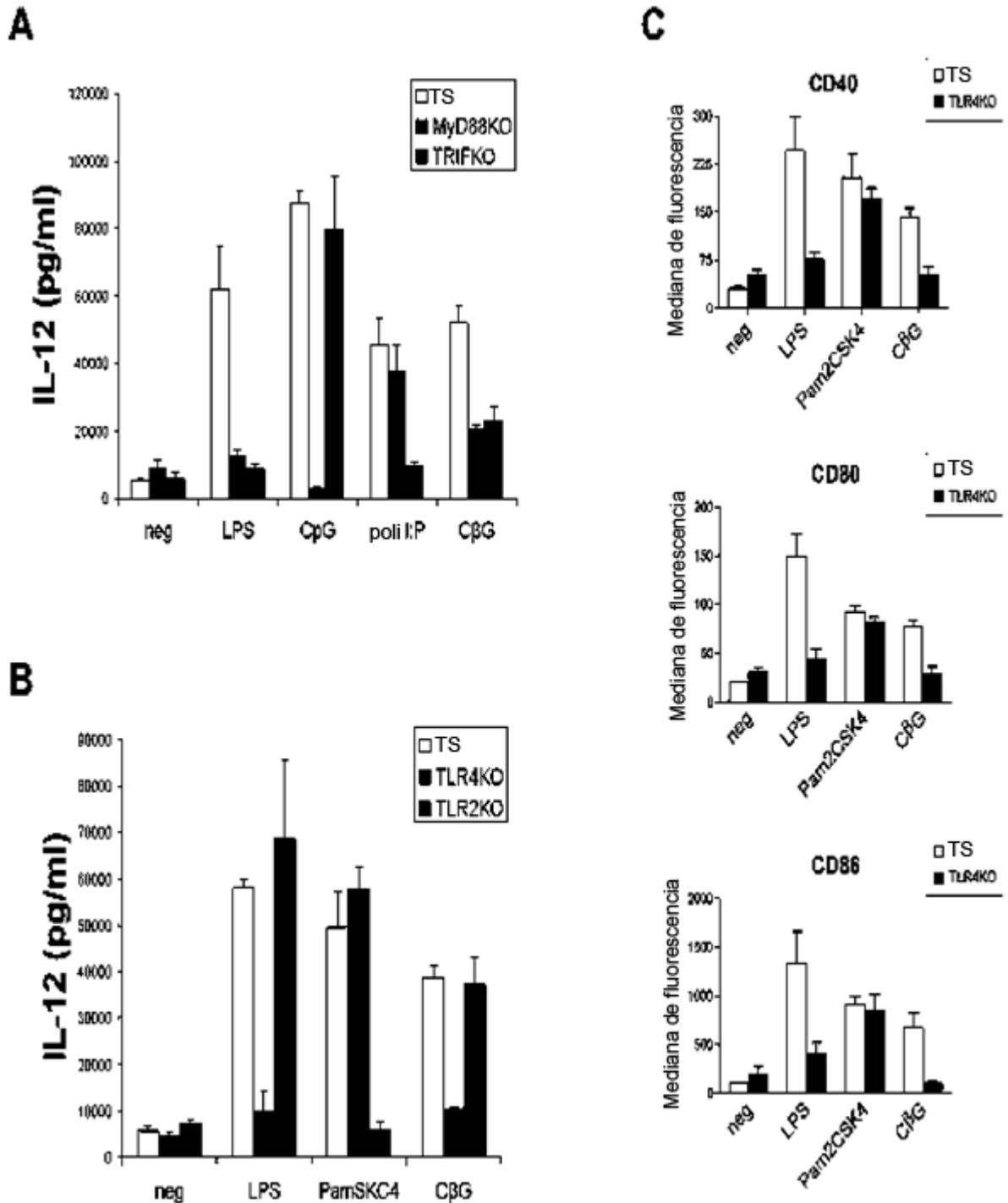


Figura 3

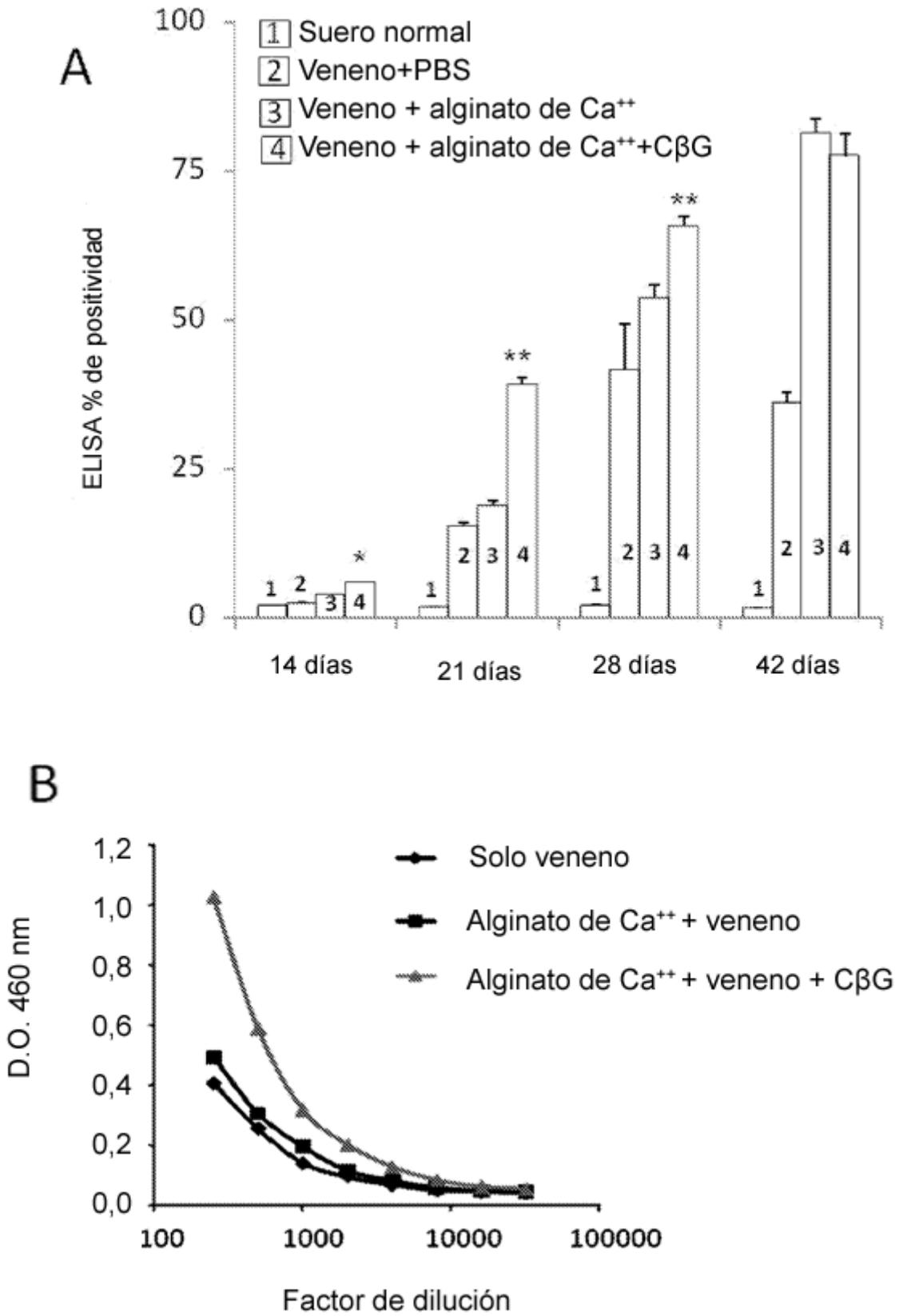


Figura 4