

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 393**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/716** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2013 PCT/US2013/031606**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13165591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13784589 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2844262**

54 Título: **Preparación inmunoterapéutica de beta glucano**

30 Prioridad:

**30.04.2012 US 201261640397 P**

**01.05.2012 US 201261640834 P**

**01.05.2012 US 201261640842 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.03.2018**

73 Titular/es:

**BIOThERA, INC. (100.0%)  
3388 Mike Collins Drive  
Eagan, MN 55121, US**

72 Inventor/es:

**GROSSMAN, WILLIAM, J.;  
ANTONYSAMY, MARY, A.;  
WALSH, RICHARD, M.;  
NELSON, MARIANA, I.;  
BOSE, NANDITA;  
DANIELSON, MICHAEL, E. y  
MICHEL, KYLE, S.**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 661 393 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

Preparación inmunoterapéutica de beta-glucano

5 **Sumario**

La presente invención se define por las reivindicaciones. En más detalle, la presente invención se refiere a un  $\beta$ -glucano soluble y a una preparación de anticuerpos capaces de convertir a un sujeto de baja capacidad de unión en uno de alta capacidad de unión, para su uso en la mejora de inmunoterapia de  $\beta$ -glucano en un sujeto que se identifica como de baja capacidad de unión, donde el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos capaces de convertir al sujeto de baja capacidad de unión en alta capacidad de unión son coadministrados; donde la preparación de anticuerpos comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano soluble; y donde el sujeto se ha identificado como de baja capacidad de unión por un método que comprende: (A) medir el título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano de al menos una parte de la muestra de sangre obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre un título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano; e identificar al sujeto con baja capacidad de unión si el título de anticuerpo IgG anti- $\beta$ -glucano es de menos de 20 000; o (B) añadir  $\beta$ -glucano soluble a al menos una parte de una muestra de sangre obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano soluble se una a la células inmunitarias; detectar el  $\beta$ -glucano soluble unido a la células inmunitarias; e identificar al sujeto como de baja capacidad de unión si el  $\beta$ -glucano se une a no más de un 10 % de las células inmunitarias, donde el  $\beta$ -glucano soluble se obtiene de levadura y está compuesto de monómeros de glucosa organizados como una estructura de glucopiranososa con enlaces  $\beta$ -(1,3) con ramificaciones periódicas de glucopiranososa  $\beta$ -(1,3) unidas a la estructura mediante enlace glucosídico  $\beta$ -(1,6). De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV. De acuerdo con otra realización preferida, el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos se coadministran (i) simultáneamente, (ii) en momentos diferentes o (iii) en sitios diferentes.

También se describe en este documento un método para identificar la unión de  $\beta$ -glucano a células inmunitarias de un sujeto. En línea generales, el método incluye obtener una muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias, añadir  $\beta$ -glucano a al menos una parte de la muestra de sangre e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano se una a las células inmunitarias, y detectar el  $\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias.

El  $\beta$ -glucano puede obtenerse de levadura. El  $\beta$ -glucano puede incluir un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano tal como  $\beta$ (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta$ (1,3)-D-glucopiranososa.

La detección del  $\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias puede incluir poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano. El anticuerpo monoclonal puede comprender BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.

El método puede incluir además obtener una segunda muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias, añadir  $\beta$ -glucano a al menos una parte de la segunda muestra de sangre e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano se una a las células inmunitarias y detectar el  $\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias.

También se describe en este documento un método de mejora de la inmunoterapia de  $\beta$ -glucano para un sujeto. En general, el método incluye identificar al sujeto de baja capacidad de unión y coadministrar al sujeto un  $\beta$ -glucano y una preparación de anticuerpos capaz de convertir al sujeto de baja capacidad de unión en alta capacidad de unión. La identificación del sujeto de baja capacidad de unión puede incluir la obtención de una muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra un título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano, medir el título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano de al menos una parte de la muestra de sangre e identificar al sujeto de baja capacidad de unión si el título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano es menor de un nivel predeterminado. Como alternativa, la identificación del sujeto de baja capacidad de unión puede incluir la obtención de una muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias, añadir  $\beta$ -glucano a al menos una parte de la muestra de sangre e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano se una a las células inmunitarias, detectar el  $\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias e identificar al sujeto como de baja capacidad de unión si el  $\beta$ -glucano se une a no más de un 10 % de las células inmunitarias.

La preparación de anticuerpos puede incluir suero de un sujeto de alta capacidad de unión. La preparación puede incluir un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano, tal como BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV. La preparación de anticuerpos puede incluir inmunoglobulina intravenosa. La preparación de anticuerpos puede incluir un resto de  $\beta$ -glucano conjugado con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo tal como la parte Fc.

El  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos pueden coadministrarse simultáneamente. El  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos pueden coadministrarse en diferentes momentos. El  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos pueden coadministrarse en diferentes sitios.

El  $\beta$ -glucano puede obtenerse de levadura. El  $\beta$ -glucano puede incluir un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano tal como  $\beta$ (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta$ (1,3)-D-glucopiranososa.

### Breve descripción de las figuras

- 5           Figura 1. Datos de citometría de flujo que muestran la unión diferencial de  $\beta$ -glucano (PGG) a leucocitos polimorfonucleares en sangre completa humana sana.
- Figura 2. Datos que muestran la unión diferencial de  $\beta$ -glucano a neutrófilos en sangre completa humana sana.
- 10          Figura 3. Datos que muestran la unión diferencial de  $\beta$ -glucano a monocitos en sangre completa humana sana.
- Figura 4. Datos que comparan los títulos de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano de sujetos de baja capacidad de unión y de alta capacidad de unión.
- 15          Figura 5. Comparación del número promedio de días en tratamiento para pacientes en los grupos de control y de investigación de un estudio abierto, con dos grupos, multicéntrico y aleatorizado.
- Figura 6. Datos que muestran que suero de un sujeto con alta capacidad de unión puede aumentar la unión de  $\beta$ -glucano a PMNs obtenidos de un sujeto de baja capacidad de unión.
- 20          Figura 7. Datos que muestran que los anticuerpos anti- $\beta$ -glucano pueden aumentar la unión de  $\beta$ -glucano a PMNs de un sujeto de baja capacidad de unión.
- Figura 8. Datos que muestran que la inmunoglobulina intravenosa puede aumentar la unión de  $\beta$ -glucano a PMNs de un sujeto de baja capacidad de unión.
- 25          Figura 9. Datos que muestran la unión de conjugados de PGG-anticuerpo a PMNs.
- Figura 10. Datos que muestran la unión de conjugados de PGG-IVIG a PMNs.
- 30

### Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

35           Esta divulgación describe métodos relacionados con el uso de  $\beta$ -glucano soluble como componente de inmunoterapia. Los métodos descritos en este documento explotan la observación de la unión diferencial de  $\beta$ -glucano a células inmunitarias en diferentes poblaciones de seres humanos sanos. Sorprendentemente, los sujetos "de alta capacidad de unión" de  $\beta$ -glucano muestran títulos mayores de anticuerpos anti- $\beta$ -glucano que los "de baja capacidad de unión". Por tanto, esta divulgación describe métodos de selección de individuos para identificar los "de alta capacidad de unión" y los "de baja capacidad de unión". Esta divulgación también describe métodos que incluyen en general convertir un sujeto "de baja capacidad de unión" en un sujeto "de alta capacidad de unión" y, por tanto, aumentar la población para los que puede ser eficaz la inmunoterapia basada en  $\beta$ -glucano. Esta divulgación también describe regímenes de tratamiento que incluyen el control periódico de un sujeto para determinar su estado actual "de alta capacidad de unión" o "de baja capacidad de unión", y ajustar el tratamiento proporcionado al sujeto, si fuera necesario, para promover la consecución o mantenimiento del estado "de alta capacidad de unión".

45

            Los  $\beta$ -glucanos son polímeros de glucosa derivados de una diversidad de fuentes microbiológicas y vegetales incluyendo, por ejemplo, levaduras, bacterias, algas, algas marinas, setas, avena y cebada. De estos, los  $\beta$ -glucanos de levadura se han evaluado ampliamente para sus propiedades inmunomoduladoras. Los  $\beta$ -glucanos de levadura pueden estar presentes en diversas formas tales como, por ejemplo, levadura intacta, cimosano, partículas de glucano completas purificadas, polisacárido cimosano solubilizado o  $\beta$ -glucanos solubles altamente purificados de diferentes pesos moleculares. Estructuralmente, los  $\beta$ -glucanos de levadura están compuestos de monómeros de glucosa organizados como una estructura de glucopiranososa con enlaces  $\beta$ -(1,3) con ramificaciones periódicas de glucopiranososa  $\beta$ -(1,3) unidas a la estructura mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,6). Las diferentes formas de  $\beta$ -glucanos de levadura pueden funcionar de forma diferente entre sí. El mecanismo a través del cual los  $\beta$ -glucanos de levadura ejercen sus efectos inmunomoduladores puede verse influido por diferencias estructurales entre diferentes formas de los  $\beta$ -glucanos tales como, por ejemplo, su naturaleza particulada o soluble, la conformación terciaria, la longitud de la cadena principal, la longitud de la cadena lateral y la frecuencia de las cadenas laterales. Las funciones inmunoestimuladores de los  $\beta$ -glucanos de levadura también dependen de los receptores que participan en diferentes tipos celulares en diferentes especies, que de nuevo pueden depender de las propiedades estructurales de lo  $\beta$ -glucanos.

50

55

60

            En general, las inmunoterapias de  $\beta$ -glucano pueden incluir la administración a un sujeto de cualquier forma adecuada de  $\beta$ -glucano o cualquier combinación de dos o más formas de  $\beta$ -glucano.  $\beta$ -glucanos adecuados y la preparación de  $\beta$ -glucano adecuado a partir de sus fuentes naturales se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US2008/0103112 A1. En algunos casos, el  $\beta$ -glucano puede obtenerse

65

de una levadura tal como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. En ciertos casos, el  $\beta$ -glucano puede ser u obtenerse de  $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa, también mencionada en este documento como PGG (IMPRIME PGG, Biothera, Eagan, MN), una forma altamente purificada y bien caracterizada de  $\beta$ -glucano derivado de levadura soluble. El resumen de investigación de Antonysamy *et al.* del International Symposium The Neutrophil in Immunity, Québec, Canadá, 9-12 de junio de 2012 describe la unión diferencial de IMPRIME PGG a neutrófilos y analiza el uso potencial de esta unión diferencial como biomarcador predictivo para inmunoterapia contra el cáncer. Además, las inmunoterapias basadas en  $\beta$ -glucano pueden implicar el uso de, por ejemplo, un  $\beta$ -glucano modificado y/o derivatizado, tal como los descritos en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US12/36795. En otros casos, la inmunoterapia de  $\beta$ -glucano puede implicar la administración, por ejemplo, de un  $\beta$ -glucano particulado-soluble o una preparación de  $\beta$ -glucano particulado-soluble, cada uno de los cuales se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.981.447.

Como se indica anteriormente, los  $\beta$ -glucanos de levadura se han evaluado ampliamente para sus propiedades inmunomoduladoras. En particular, el  $\beta$ -glucano PGG ha demostrado actividad preclínica contra una diversidad de tipos de cáncer cuando se administra en combinación con anticuerpos monoclonales relacionados con tumores (mAbs). Tipos ilustrativos de cáncer y sus mAbs relacionados con tumor asociados incluyen, por ejemplo, linfoma de linfocitos T (anti-MUC1, anti-GD2), carcinoma broncopulmonar (anti-MUC1), adenocarcinoma de mama (anti-MMTV), carcinoma de ovario (bevacizumab), carcinoma broncopulmonar no microcítico (bevacizumab, cetuximab), cáncer colorrectal (cetuximab), leucemia linfocítica crónica y linfoma no hodgkiniano (rituximab) y carcinoma pancreático (cetuximab, anti-MCTC1). Los  $\beta$ -glucanos pueden sensibilizar a los neutrófilos, que después son reclutados a tumores marcados con anticuerpo relacionado con tumor. Los neutrófilos reclutados se activan por doble ligamiento del receptor 3 del completo (CR3) por iC3b/C3b - en la superficie de células tumorales marcadas con mAb - e infunden  $\beta$ -glucano, para eliminar las células tumorales.

Se descubrió, sin embargo, que existen distintas poblaciones de individuos: una población muestra capacidad relativamente elevada de unión de  $\beta$ -glucano a células inmunitarias innatas en la sangre completa; otra población muestra capacidad relativamente baja de unión de  $\beta$ -glucano a células inmunitarias innatas en sangre completa. Esta observación fue completamente inesperada basándose en datos de modelos de ratón modelo de inmunidad y estudios que implican células inmunitarias humanas aisladas. Muchos individuos muestran algún nivel de unión de  $\beta$ -glucano a las células inmunitarias a partir de exposición de bajo nivel, nativa a  $\beta$ -glucanos (por ejemplo, figura 1, "De novo"). Cuando se administra  $\beta$ -glucano exógeno, los "de baja capacidad de unión" muestran un aumento moderado en el porcentaje de células inmunitarias que se unen a  $\beta$ -glucano, mientras que los "de alta capacidad de unión" muestran un marcado aumento en el porcentaje de células inmunitarias que se unen a  $\beta$ -glucano (figura 1, "+ PGG exógeno"). La figura 1 y la figura 2 muestran datos que reflejan la unión de  $\beta$ -glucano a leucocitos polimorfonucleares (PMNs), y la figura 3 (monocitos) muestra que la unión diferencial se aplica también a otras poblaciones de células inmunitarias innatas. Además, los "de alta capacidad de unión" también tienden a producir más citocinas y quimiocinas quimioatrayentes tales como, por ejemplo, IL-8, MCP, MIP-1, etc.

Como se usa en este documento, un estado como "de alta capacidad de unión" se refiere a un individuo que muestra un porcentaje predeterminado de una población de células inmunitarias particular que se une a  $\beta$ -glucano proporcionado de forma exógena. La población de células inmunitarias usada para determinar si un individuo es "de alta capacidad de unión" o "de baja capacidad de unión" puede ser, por ejemplo, linfocitos polimorfonucleares (PMNs) o monocitos. Un individuo puede considerarse "de alta capacidad de unión" si al menos un 10 % de los PMNs o monocitos en una muestra de sangre del individuo se unen a  $\beta$ -glucano proporcionado de forma exógena. Por tanto, un individuo puede ser "de alta capacidad de unión" si al menos un 10 %, al menos un 12 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 15 % o al menos un 40 % de los PMNs o monocitos en una muestra de sangre del individuo se unen a  $\beta$ -glucano proporcionado de forma exógena (véase, por ejemplo, la figura 2 y la figura 3). En algunos casos, el  $\beta$ -glucano proporcionado de forma exógena puede incluir PGG proporcionado a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml a 100  $\mu$ g/ml. El estado "de baja capacidad de unión" se refiere a un individuo que no logra mostrar un estado "de alta capacidad de unión".

Además, los "de alta capacidad de unión" pueden mostrar títulos mayores de anticuerpos anti- $\beta$ -glucano que los "de baja capacidad de unión" (figura 4). Un título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano típico para un sujeto "de alta capacidad de unión" puede ser un título de al menos 25 000 tal como, por ejemplo, al menos 30 000, al menos 35 000, al menos 40 000, al menos 45 000, al menos 50 000, al menos 55 000 o al menos 60 000 (véase, por ejemplo, la figura 4). El título de anticuerpos anti- $\beta$ -glucano típicamente se refiere a IgG. En algunos casos, sin embargo, la presencia de IgM puede compensar un título de IgG inferior para ayudar a establecer un estado "de alta capacidad de unión". Tal como se describe en más detalle a continuación, el estado "de alta capacidad de unión" puede influir en la respuesta de un individuo a tratamiento con  $\beta$ -glucano. Se puede inducir de forma artificial un estado natural "de baja capacidad de unión" para que muestre una respuesta de tipo "alta capacidad de unión" a tratamiento con  $\beta$ -glucano proporcionando al individuo anticuerpo anti- $\beta$ -glucano como parte del tratamiento con  $\beta$ -glucano.

Por tanto, en un aspecto, esta divulgación describe el cribado de un individuo para identificar si el individuo, en ese punto en el tiempo, muestra un estado "de alta capacidad de unión" o "de baja capacidad de unión". El método, en general, incluye obtener una muestra de sangre del individuo, añadir  $\beta$ -glucano a al menos una parte de la muestra, incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano se una a las células inmunitarias y detectar el

$\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias.

La muestra de sangre incluye una parte suficiente de la sangre para incluir células inmunitarias. Por tanto, en algunas realizaciones, la muestra de sangre puede ser sangre completa. La muestra de sangre se puede procesar al menos parcialmente para eliminar uno o más componentes de la sangre completa que no son necesarios para el ensayo de cribado tales como, por ejemplo, eritrocitos. Por tanto, la muestra de sangre puede incluir un producto de la sangre tal como, por ejemplo, cualquier fracción de sangre que incluya al menos una parte de la capa leucocitaria.

El  $\beta$ -glucano puede obtenerse de levadura, tal como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El  $\beta$ -glucano puede incluir un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano tal como, por ejemplo,  $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa.

El  $\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias puede detectarse poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano. El anticuerpo monoclonal puede ser cualquier anticuerpo monoclonal que se una específicamente al  $\beta$ -glucano. Como se usa en este documento, "específico" y variaciones del mismo se refieren a tener una afinidad diferencial o que no sea general (es decir, no específica), en cualquier grado, por una diana particular. Anticuerpos monoclonales ilustrativos que se unen específicamente a  $\beta$ -glucano incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales identificados como BfD I, BfD II, BfD III y/o BfD IV (Biothera, Eagan, MN), cada uno de los cuales se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.294.321.

Para ayudar a detectar el anticuerpo anti- $\beta$ -glucano que se une al  $\beta$ -glucano unido a la célula inmunitaria, el anticuerpo anti- $\beta$ -glucano puede incluir un marcador detectable. Como alternativa, el anticuerpo anti- $\beta$ -glucano unido puede detectarse usando un anticuerpo secundario marcado. En cualquier caso, marcadores adecuados incluyen, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador colorimétrico o un radiomarcador.

El método puede incluir además inmovilizar las células inmunitarias unidas a  $\beta$ -glucano en un sustrato. En algunos casos, las células inmunitarias pueden inmovilizarse antes de ponerse en contacto con el  $\beta$ -glucano - por ejemplo, poniendo en contacto al menos una parte de la muestra de sangre con el sustrato antes de poner en contacto la muestra de sangre con el  $\beta$ -glucano. Las células inmunitarias pueden inmovilizarse después de ponerse en contacto con el  $\beta$ -glucano. En cualquier caso, las células inmunitarias pueden inmovilizarse usando cualquier material adecuado tal como, por ejemplo, un anticuerpo inmovilizado que se una específicamente a la población deseada de células inmunitarias.

El método puede incluir una etapa de lavado para eliminar los componentes de ensayo no unidos. Por ejemplo, algunos métodos pueden incluir una etapa de lavado del  $\beta$ -glucano no unido, y/o los componentes de la muestra de sangre no unidos, de las células inmunitarias unidas a  $\beta$ -glucano. Como otro ejemplo, algunos métodos pueden incluir una etapa de lavado de las células inmunitarias no unidas del sustrato, si las hubiera. Como otro ejemplo más, algunos métodos pueden incluir el lavado de los anticuerpos específicos para  $\beta$ -glucano no unidos del  $\beta$ -glucano unido a las células inmunitarias.

El método puede incluir la monitorización repetida de un sujeto de forma periódica para controlar el estado del sujeto como "de alta capacidad de unión" o "de baja capacidad de unión" en el tiempo. Algunos pacientes con cáncer que reciben inmunoterapia de  $\beta$ -glucano muestran una disminución en el título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano en el tiempo con dosificación repetida de  $\beta$ -glucano. Estos pacientes también pueden mostrar una disminución longitudinal en las células inmunitarias unidas a  $\beta$ -glucano (por ejemplo, PMNs periféricos). Esta observación puede deberse, al menos en parte, al reclutamiento de células inmunitarias unidas a  $\beta$ -glucano fuera de la circulación y dentro del microentorno del tumor. Como alternativa, puede deberse, al menos en parte, a cambios en los factores plasmáticos que influyen en la unión de  $\beta$ -glucano a las células inmunitarias circulantes (por ejemplo, anticuerpos anti- $\beta$ -glucano disminuidos en el tiempo).

En otro aspecto, esta divulgación describe un método de conversión de un sujeto "de baja capacidad de unión" en uno "de alta capacidad de unión". En un estudio multicéntrico aleatorizado, abierto con dos grupos, 795 sujetos con cáncer colorrectal recidivante/progresivo después de al menos dos tratamientos quimioterapéuticos previos, se dividieron, en un grupo de control y un grupo de investigación. Los sujetos en el grupo de control recibieron tratamiento con cetuximab. Los sujetos en el grupo de investigación recibieron tratamiento con cetuximab + 4 mg/kg de  $\beta$ -glucano PGG. La figura 5 muestra que, mientras los sujetos que reciben  $\beta$ -glucano como parte de su inmunoterapia, permanecieron en tratamiento durante un periodo promedio más largo que los sujetos que recibían únicamente cetuximab, el efecto era máximo en aquellos sujetos que eran "de alta capacidad de unión". En este contexto, la duración del tratamiento es una indicación del éxito del tratamiento de modo que un tiempo de tratamiento más largo indica un resultado terapéutico positivo mientras que una duración más corta de tratamiento indica malos resultados. Por tanto, existe una consecuencia clínica para el estado "de alta capacidad de unión" frente al estado "de baja capacidad de unión".

Esta consecuencia clínica de mostrar un estado "de alta capacidad de unión" frente a mostrar un estado "de baja capacidad de unión" significa que la capacidad de convertir a un individuo de "baja capacidad de unión" en uno "de alta capacidad de unión" puede tener consecuencias clínicas para ese individuo. La figura 6 muestra que suero "de alta capacidad de unión" puede aumentar la unión de  $\beta$ -glucano a células inmunitarias (por ejemplo, PMNs) de un

5 sujeto "de baja capacidad de unión". Cantidades crecientes de anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -glucano también pueden aumentar la unión de  $\beta$ -glucano a las células inmunitarias (por ejemplo, PMNs) en suero de un sujeto "de baja capacidad de unión" (figura 7). Además, la inmunoglobulina intravenosa (IVIG), un producto de la sangre que contiene IgG polivalente combinado de muchos donantes (típicamente de varios cientos, incluso de miles de donantes y, por tanto, que contiene de forma natural anticuerpos anti- $\beta$ -glucano), también puede aumentar la unión de  $\beta$ -glucano a células inmunitarias (por ejemplo, PMNs) en suero de un sujeto "de baja capacidad de unión" (figura 8). Por consiguiente, se puede convertir un individuo que muestra un estado "de baja capacidad de unión" para que muestre un estado "de alta capacidad de unión" proporcionando al individuo, como un componente de inmunoterapia, una combinación de  $\beta$ -glucano y una preparación que incluya anticuerpos anti- $\beta$ -glucano. De forma significativa, la conversión de un individuo de un estado "de baja capacidad de unión" en un estado "de alta capacidad de unión" puede mejorar el resultado clínico de la inmunoterapia.

15 Por tanto, el método incluye coadministrar un  $\beta$ -glucano con una preparación de anticuerpos capaz de convertir al sujeto de baja capacidad de unión en alta capacidad de unión. Tal como se usa en este documento "coadministrado" se refiere a dos o más componentes de una combinación administrados de modo que los efectos terapéuticos y profilácticos de la combinación puedan ser mayores que los efectos terapéuticos o profilácticos de cualquier componente administrado en solitario. Dos componentes pueden coadministrarse de forma simultánea o secuencial. Los componentes coadministrados de forma simultánea pueden proporcionarse en una o más composiciones farmacéuticas. La coadministración secuencial de dos o más componentes incluye casos en los que los componentes se administran de modo que ambos componentes estén biodisponibles de forma simultánea después de administrar ambos. Independientemente de si los componentes se coadministran de forma simultánea o secuencial, los componentes pueden coadministrarse en un único sitio o en diferentes sitios.

25 Una conversión similar del estado de "baja capacidad de unión" en "alta capacidad de unión" se puede producir administrando al sujeto una composición que incluye un resto de  $\beta$ -glucano conjugado con cualquier anticuerpo o una parte de un anticuerpo. La figura 9 muestra datos que ilustran unión a PGG relativamente baja en PMNs en sangre completa (Imp Ref, segundo panel) que cambia a un estado de alta unión conjugando el PGG a anticuerpos antitumorales BTH1704 (anti-MUC1, patente de Estados Unidos n.º 6.204.366, Biothera, Inc, Eagan, MN, tercer panel) o ERBITUX (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN, cuarto panel). La figura 10 también ilustra la unión a PGG relativamente baja en PMNs en sangre completa (Imp Ref, segundo panel) que cambia a un estado de alta unión conjugando el PGG a inmunoglobulina intravenosa (IVIG, Biolegend, San Diego, CA).

35 Por tanto, en otro aspecto, el método incluye administrar a un sujeto una composición que incluye un resto de  $\beta$ -glucano conjugado con un anticuerpo, un anticuerpo terapéutico, un anticuerpo antitumoral o un fragmento de anticuerpo tal como la parte Fc de un anticuerpo. El PGG modificado y/o derivatizado, incluyendo conjugados de PGG de un resto PGG y un anticuerpo se describen en la solicitud de patente internacional n.º PCT/US 12/36795, que también puede aplicarse a conjugados de fragmentos de anticuerpo. El resto de PGG puede ser, u obtenerse de un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano. En este contexto, "obtenido de" reconoce que un conjugado puede prepararse necesariamente creando un enlace covalente que reemplaza uno o más átomos del  $\beta$ -glucano PGG. Tal como se usa en este documento, "obtenido de un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano" se refiere a una parte del  $\beta$ -glucano PGG que permanece como parte de un conjugado después de reemplazar uno o más átomos del PGG para formar el enlace covalente del conjugado.

45 Tal como se usa en este documento, "capaz de convertir a un sujeto de baja capacidad de unión en uno de alta capacidad de unión" se refiere a la propiedad de modificar el estado de capacidad de unión de un individuo de "baja capacidad de unión" (por ejemplo, por debajo de un umbral predeterminado) en "alta capacidad de unión" (por ejemplo, por encima de un umbral predeterminado). El estado de un sujeto "de baja capacidad de unión" o "de alta capacidad de unión" puede determinarse con referencia al grado en el que el  $\beta$ -glucano se une a las células inmunitarias en al menos una parte de una muestra de sangre obtenida del sujeto. Como alternativa, el estado de capacidad de unión de un sujeto puede determinarse con respecto al título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano medido en al menos una parte de una muestra de sangre obtenida del sujeto.

55 La preparación de anticuerpos puede incluir suero de un sujeto de alta capacidad de unión. La preparación de anticuerpos puede incluir inmunoglobulina intravenosa. La preparación de anticuerpos puede incluir un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano. Ejemplos de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a  $\beta$ -glucano incluyen, por ejemplo, BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.

60 El  $\beta$ -glucano, la preparación de anticuerpos y/o la combinación de ambos componentes pueden formularse en una composición junto con un "vehículo". Como se usa en este documento, "vehículo" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, vehículo, recubrimiento, diluyente, agente antibacteriano y/o agente antifúngico, agente isotónico, agente retardador de la absorción, tampón, solución de vehículo, suspensión, coloide y similares. El uso de dicho medio y/o agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el  $\beta$ -glucano o el anticuerpo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos complementarios en las composiciones.

65 Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es

decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el  $\beta$ -glucano y/o el anticuerpo sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

5 El  $\beta$ -glucano, la preparación de anticuerpos y/o la combinación de ambos componentes pueden formularse en una composición farmacéutica. El  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos pueden proporcionarse en una única formulación. El  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos también pueden proporcionarse en formulaciones diferentes. Una composición farmacéutica puede formularse en una diversidad y/o una pluralidad de formas adaptadas para una o más vías preferidas de administración. Por tanto, una composición farmacéutica puede  
10 administrarse mediante una o más vías conocidas incluyendo, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intradérmica, transcutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc.) o tópica (por ejemplo, intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica, transcutánea, rectal, etc.). Una composición farmacéutica, o una parte de la misma puede administrarse a la superficie de la mucosa, tal como por administración a, por ejemplo, la mucosa nasal o respiratoria (por ejemplo, por pulverización o aerosol). Una  
15 composición farmacéutica, o una parte de la misma, también puede administrarse mediante liberación sostenida o retardada.

Una formulación puede presentarse convenientemente en forma monodosis y puede prepararse por métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Métodos de preparación de una composición con un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de poner el  $\beta$ -glucano y/o la preparación de anticuerpos en asociación con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, una formulación puede prepararse poniendo de forma uniforme y/o íntima el compuesto activo en asociación con un vehículo líquido, un vehículo sólido dividido finamente o ambos, y después, si fuera necesario, conformando el producto en las formulaciones deseadas.

25 El  $\beta$ -glucano, la preparación de anticuerpos y/o la combinación de ambos componentes pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada incluyendo, aunque sin limitación, una solución, una suspensión, una emulsión, una pulverización, un aerosol o cualquier forma de mezcla. La composición puede suministrarse en formulación con cualquier excipiente, medio o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la formulación puede  
30 suministrarse en una forma tópica de dosificación convencional tal como, por ejemplo, una crema, una pomada, una formulación de aerosol, una pulverización que no es de aerosol, un gel, una loción y similares. La formulación puede incluir además uno o más aditivos incluyendo tales como, por ejemplo, un adyuvante, un potenciador de la penetración en la piel, un colorante, una fragancia, un aromatizante, un humectante, un espesante y similares.

35 El  $\beta$ -glucano puede obtenerse de levadura tal como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El  $\beta$ -glucano puede incluir un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano tal como, por ejemplo,  $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa.

El método puede incluir administrar suficiente  $\beta$ -glucano para proporcionar una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg al sujeto, aunque en algunos casos los métodos pueden realizarse administrando el  $\beta$ -glucano en una dosis fuera de este intervalo. El método puede incluir la administración de suficiente  $\beta$ -glucano para proporcionar una dosis de aproximadamente 10  $\mu$ g/kg a aproximadamente 10 mg/kg al sujeto tal como, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg. El método también  
45 puede incluir la administración de suficiente  $\beta$ -glucano para proporcionar una dosis de aproximadamente 4 mg/kg.

Como alternativa, la dosis puede calcularse usando el peso corporal real obtenido justo antes del inicio del curso de tratamiento. Para las dosificaciones calculadas de esta manera, el área de superficie corporal ( $m^2$ ) se calcula antes de empezar el curso de tratamiento usando el método de Dubois:  $m^2 = (\text{peso kg}^{0,425} \times \text{estatura cm}^{0,725}) \times 0,007184$ .  
50 Por lo tanto, el método puede incluir la administración de suficiente  $\beta$ -glucano para proporcionar una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/ $m^2$  a aproximadamente 10 mg/ $m^2$ .

El método puede incluir la administración de suficiente anticuerpo que se une específicamente al  $\beta$ -glucano para proporcionar una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg al sujeto, aunque en algunos casos los métodos pueden realizarse administrando el anticuerpo en una dosis fuera de este intervalo. El método puede incluir la administración de suficiente anticuerpo para proporcionar una dosis de aproximadamente 10  $\mu$ g/kg a aproximadamente 5 mg/kg al sujeto, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 100  $\mu$ g/kg a aproximadamente 1 mg/kg. El anticuerpo que se une específicamente al  $\beta$ -glucano puede administrarse en forma de inmunoglobulina intravenosa (IVIG), un producto de la sangre que contiene IgG polivalentes combinadas de muchos donantes (típicamente varios cientos, incluso miles, de donantes y, por tanto, que contiene de forma natural anticuerpos anti- $\beta$ -glucano). La IVIG puede administrarse en una dosis de aproximadamente 0,1 g/kg a aproximadamente 2,0 g/kg, tal como, por ejemplo, 0,1 g/kg, 0,2 g/kg, 0,3 g/kg, 0,4 g/kg, 0,5 g/kg, 0,6 g/kg, 0,7 g/kg, 0,8 g/kg, 0,9 g/kg, 1,0 g/kg, 1,1 g/kg, 1,2 g/kg, 1,3 g/kg, 1,4 g/kg, 1,5 g/kg, 1,6 g/kg, 1,7 g/kg, 1,8 g/kg, 1,9 g/kg o 2,0 g/kg. La IVIG también puede administrarse para proporcionar una dosis de aproximadamente 0,4 g/kg a aproximadamente 1,0 g/kg.  
65

Como alternativa, la dosis puede calcularse usando el peso corporal real obtenido justo antes de empezar un curso de tratamiento. Para las dosificaciones calculadas de esta manera, el área de superficie corporal ( $m^2$ ) se calcula antes de empezar el curso de tratamiento usando el método de Dubois:  $m^2 = (\text{peso } kg^{0,425} \times \text{estatura } cm^{0,725}) \times 0,007184$ . Por lo tanto, el método puede incluir la administración de suficiente anticuerpo para proporcionar una dosis de, por ejemplo, aproximadamente  $0,01 \text{ mg}/m^2$  a aproximadamente  $10 \text{ mg}/m^2$ .

El  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos pueden coadministrarse, por ejemplo, a partir de una dosis única a múltiples dosis por semana, aunque en algunos casos el método puede realizarse coadministrando el  $\beta$ -glucano y el anticuerpo a una frecuencia fuera de este intervalo. El  $\beta$ -glucano y el anticuerpo pueden administrarse de aproximadamente una vez al año a una vez por semana.

El método puede incluir además proporcionar inmunoterapia al sujeto. La inmunoterapia puede incluir la administración de uno o más anticuerpos relacionados con tumores (por ejemplo, cetuximab, bevacizumab, anti-MUC1). En este contexto, la coadministración de  $\beta$ -glucano y la preparación de anticuerpos puede aumentar la eficacia de la inmunoterapia.

Como se usa en este documento el término "y/o" significa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos o más cualesquiera de los elementos enumerados; el término "comprende" y variaciones del mismo no tiene un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y las reivindicaciones; salvo que se especifique de otro modo, "uno", "una", "el", "la" y "al menos uno" se usan indistintamente y significan uno o más de uno; y las enumeraciones de intervalos numéricos por puntos finales incluyen todos los números incluidos dentro de ese intervalo (por ejemplo, de 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

Para cualquier método divulgado en este documento que incluye etapas concretas, las etapas pueden realizarse en cualquier orden factible. Y, según lo apropiado, puede realizarse simultáneamente cualquier combinación de dos o más etapas.

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Materiales*

Se proporcionó Imprime PGG (Biothera, Eagan, MN) en una formulación de  $\beta$ -glucano soluble sin conservante preparada a una concentración de  $1 \text{ mg}/\text{ml}$  en cloruro de sodio al  $0,8 \%$  y citrato de sodio monobásico al  $0,2 \%$  a un pH de 6,4. El compuesto se almacenó a  $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### *Preparación de muestras*

*Sangre completa.* Se obtuvo sangre completa fresca de voluntarios sanos que habían proporcionado consentimiento informado antes de la donación (New England Institutional Review Board, mayo de 2007). La sangre se recogió en un Vacutainer® que contenía 158 unidades USP de heparina sódica secada por congelación (BD Biosciences; San Jose, CA).

*Suero y plasma:* La sangre completa se procesó en suero o plasma por recolección en tubos Vacutainer® (BD Biosciences; San Jose, CA) con tubos separadores de suero (parte superior roja) o heparina sódica (parte superior verde). Los tubos se mezclaron bien, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se centrifugaron a  $2000 \text{ r.p.m.}$  ( $\sim 1150 \times g$ ) durante 10 minutos. El sobrenadante (suero o plasma) se transfirió entonces a un tubo cónico de almacenamiento de policarbonato nuevo.

#### *Método de ELISA anti-BG*

Se usó un método ELISA preliminar modificado del método anti- $\beta$ -glucano de mono (Noss *et al.*, 2012 Int. Arch. Allergy Immunol., 157:98-108) para ensayar las muestras de suero humano. Se recubrieron placas de unión universales Costar con  $50 \mu\text{l}$  de  $\beta$ -glucano en un  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\beta$ -glucano purificado diluido en agua purificada y se incubaron a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. La placa recubierta entonces se expuso a luz ultravioleta de alta intensidad a  $> 1500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  durante 5 minutos a temperatura ambiente y se colocó en un horno de aire forzado a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta secarse antes de una segunda exposición a luz ultravioleta a  $> 1500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  durante 5 minutos a temperatura ambiente. La placa entonces se bloqueó con una solución al  $0,5 \%$  de seroalbúmina bovina durante  $> 30$  minutos antes de lavar con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato [PBS] con Tween-20 al  $0,05 \%$ ). Las muestras de suero humano se diluyeron en tampón de lavado añadido a la placa y posteriormente se diluyeron en serie en tampón de lavado en la placa. Las muestras de ensayo diluidas  $1:400$  se pipetearon en la placa de ensayo con siete diluciones en serie adicionales  $1:2$  (diluciones de suero entre  $1:400$  y  $1:12.800$ ). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que la IgG humana se uniera al antígeno  $\beta$ -glucano unido



a la placa. Después de la incubación, los pocillos se lavaron con tampón de lavado y se incubó un anticuerpo secundario marcado con enzima (de cabra anti-IgG humana, específico de Fc gamma, purificado por afinidad conjugado con peroxidasa de rábano picante) en los pocillos para unirse con la IgG humana unida al antígeno β-glucano. El anticuerpo secundario se dejó incubando durante 30 minutos antes del lavado con tampón de lavado. Después de eliminar todo el tampón de lavado de los pocillos, se incubó un sustrato de peroxidasa en los pocillos y se interrumpió el desarrollo de color con ácido fosfórico ~ 1 M a los 5 minutos de desarrollo del color. La densidad óptica (DO) a 450 nm se midió usando un lector de microplacas de valoración.

*Determinación del título de Ab anti-β-glucano*

Se calculó la media de las DO resultantes de los pocillos duplicados y se le sustrajo la media del fondo de ensayo. La mayor dilución que da una DO ajustada al fondo mayor de o igual a 0,100 se consideró el título de las muestras y se expresó como la inversa de esa dilución. Para la definición del rendimiento de ensayo, se asignó un valor al suero de referencia patrón y se construyó una curva de referencia en cada placa de ensayo. Por ejemplo, una muestra de ensayo que da una DO ajustada al fondo de 0,100 a una dilución de 1:12 800 se consideró con un título de 12 800. Cuando las muestras se ensayaron múltiples veces y el promedio de sus títulos está entre los niveles del título de serie 1:2 desde 1:400 el siguiente nivel de título más bajo se presentó como su título. Por ejemplo, se ensayó el suero de un donante de cuatro donaciones en cinco ensayos diferentes produciendo un título medio de 28 160; su título se presentó como 25 600.

*Curva patrón de ensayo.* Se asignó un valor de 160 unidades arbitrarias por ml (UA/ml) al anticuerpo humano anti-β-glucano patrón. Por tanto, una dilución 1:400 en el método de ensayo produce un valor de 400 mUA/ml como el máximo punto de una curva de dilución patrón de diluciones 1:2 en serie adicionales que se prepararon en la placa de ensayo. Los controles de ensayo se diluyeron 1:100 en tampón de lavado ELISA para ensayo. Además, se prepararon independientemente dos diluciones de cada nivel de control para su ensayo en cada placa en paralelo.

*Análisis estadístico.* La representación de la concentración del patrón en mUA/ml frente a la media de la densidad óptica corregida por el fondo produjo una curva de referencia patrón. Usando el software de ELISA se calculó un ajuste de 4 parámetros a partir de la curva de respuesta con la dosis del patrón para determinar los valores desconocidos en muestras, controles y suero de ensayo. Los valores de respuesta del ensayo que están entre los puntos de inflexión superior e inferior de la curva patrón (parte lineal) se usaron para determinar un valor de ensayo de las muestras. Para calcular el coeficiente de variación (% CV), se dividió la desviación típica de un conjunto de valores por la media del mismo conjunto de valores y el resultado se multiplicó por 100.

*Unión de PGG a células de sangre completa (WB)*

Cien microlitros de WB de donantes sanos se dividieron en alícuotas en tubos de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de poliestireno de 5 ml. Estas muestras WB se estimularon con Imprime PGG (10 µg/ml o 100 µg/ml) o tampón citrato, el vehículo de control. Los tubos de FACS que contenían las muestras se cubrieron débilmente con los tapones correspondientes y se incubaron durante 30 minutos o 2 horas, a 37 °C en una incubadora humidificada (5 % de CO<sub>2</sub>).

Tabla 1. Cóctel de anticuerpos usado para teñir muestras de sangre completa

Anticuerpo	Empresa; clon n.º	Dilución o concentración final	Para la identificación de:
Anti-CD15	Biolegend; W6D3	0,2 µg/ml	neutrófilos
Anti-CD19	Biolegend; HIB19	0,63 µg/ml	linfocitos B
Anti-CD14	Biolegend; HCD14	5 µg/ml	monocitos
Anti-CD14	Invitrogen; TuK4	1:50	monocitos
Anti-CD3	Biolegend; HIT3a	0,25 µg/ml	linfocitos T
Anti-CD45	Biolegend; HI30	0,25 µg/ml	células hematopoyéticas excluyendo eritrocitos y plaquetas
F(ab') <sub>2</sub> de cabra anti-IgM de ratón	Jackson Immunolab	5 mg/ml	anticuerpo anti-β-glucano de ratón

Tras la incubación con el anticuerpo anti-β-glucano BfD IV, las células se incubaron con el cóctel de anticuerpos que contiene un anticuerpo secundario para el reconocimiento de BfD IV, así como anticuerpos para el reconocimiento de diversos marcadores de superficie celular

Después de la incubación, todas las muestras se lavaron añadiendo 2 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) 1 x y se centrifugaron a 1500-1700 r.p.m. a 4 °C durante 5 minutos. Después de dos rondas de lavados y aspiraciones, se mezclaron 5 µl del anticuerpo anti-β-glucano BfD IV (~ 100 µg/ml) en cada tubo y se

incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este anticuerpo primario se eliminó por lavado dos veces con DPBS 1 x como se describe anteriormente y se añadió un cóctel de anticuerpos que contiene el anticuerpo secundario, así como los marcadores de superficie celular específicos (tabla 1) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron 2 ml de solución de lisis BD 1 x (BD Biosciences; San Jose, CA) a cada muestra y se agitó con vórtice suavemente. Después de un periodo de incubación de una hora a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 1500-1700 r.p.m. a 4 °C durante 5 minutos. La solución de lisis BD se aspiró y las células se lavaron una vez con DPBS 1 x y se aspiraron como se describe anteriormente. Para la fijación, se añadieron 300-400 µl de paraformaldehído al 1 % a cada muestra. Las muestras se adquirieron en el LSR II (BD Biosciences; San Jose, CA) en 20 horas de fijación. Los datos de analizaron usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

## Ejemplo 2

### *Materiales*

Se proporcionó Imprime PGG (Biothera, Eagan, MN) en una formulación de β-glucano soluble sin conservante preparada a una concentración de 1 mg/ml en cloruro de sodio al 0,8 % y citrato de sodio monobásico al 0,2 %, a un pH de 6,4. El compuesto se almacenó a 4-8 °C hasta su uso.

### *Ensayo de unión de sangre completa (WB)*

Se obtuvo WB fresca de voluntarios sanos que habían proporcionado el consentimiento informado antes de la donación (New England Institutional Review Board. N.º de protocolo de donación de sangre 07-124). La sangre se recogió en un Vacutainer® que contenía 158 unidades USP de heparina sódica secada por congelación (BD Biosciences; San Jose, CA). El suero se recogió en un Vacutainer® que contenía un activador de coágulos basado en trombina (BD Biosciences; San Jose, CA). Aproximadamente 20 minutos después de la recogida, el vial se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero se recogió de este vial y se almacenó a 4 °C para su uso en un plazo de 8 horas o a -80 °C para su uso después de 8 horas.

El ensayo de unión de sangre completa se realizó incubando muestras de sangre completa con Imprime PGG durante 30 minutos o 2 horas a 37 °C en una incubadora humidificada. Después del lavado con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) 1 x, se añadió BfD IV, un anticuerpo de ratón anti-β-glucano, y se incubó con la WB durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de más rondas de lavado, se añadió un cóctel de anticuerpos que incluye un anticuerpo de cabra de detección antirratón y anticuerpos contra moléculas de superficie y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Los eritrocitos se lisaron con BD Lyse y las muestras se resuspendieron en paraformaldehído al 1 %. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo y se analizaron usando el software Flow Jo (Ashland, OR).

### *Estudios cruzados de WB y suero*

Para estudios cruzados de suero, la sangre completa se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 10 minutos y se eliminó el plasma. Las células sanguíneas se lavaron 1-2 veces con DPBS 1 x para eliminar el plasma restante. Se añadieron 50 µl de suero y se mezclaron antes de la adición de Imprime.

Para la incubación con IgG anti-β-glucano (BioSupplies, Australia), el anticuerpo liofilizado se resuspendió a 1 mg/ml con DPBS 1 x y se almacenó a -80 °C o 4 °C como solución madre. Antes de añadir a las muestras de sangre, la solución madre se diluyó 1:10 a 100 µg/ml y se añadieron 10 µl de esta solución a 100 µl de sangre. Para la incubación con IVIG, se añadió IVIG al 10 % (100 mg/ml) (PRIVIGEN, CSL Behring, King of Prussia, PA) a la muestra de sangre completa a las concentraciones finales indicadas.

### *Puntos ejemplares*

También se describen en este documento los siguientes puntos.

Punto 1. Un método para identificar la unión de β-glucano soluble a células inmunitarias de un sujeto, comprendiendo el método:

obtener una muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias;  
añadir β-glucano soluble a al menos una parte de la muestra de sangre e incubar la muestra en condiciones que permitan que el β-glucano soluble se una a las células inmunitarias; y  
detectar el β-glucano unido a las células inmunitarias.

Punto 2. El método del punto 1 en el que el β-glucano soluble se obtiene de levadura.

Punto 3. El método del punto 1 o el punto 2, en el que el β-glucano soluble comprende β-1,3/1,6 glucano.

Punto 4. El método de cualquier punto precedente, en el que el β-glucano soluble comprende β(1,6)-[poli-(1,3)-D-

glucopiranosil]-poli- $\beta$ (1,3)-D-glucopiranososa.

5 Punto 5. El método de cualquier punto precedente, en el que la detección del  $\beta$ -glucano soluble unido a las células inmunitarias comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano.

Punto 6. El método del punto 5, en el que el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.

10 Punto 7. El método de cualquier punto precedente que comprende, además:

obtener una segunda muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias; añadir  $\beta$ -glucano soluble a al menos una parte de la segunda muestra de sangre e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano soluble se una a las células inmunitarias; y detectar el  $\beta$ -glucano soluble unido a las células inmunitarias.

15 Punto 8. Un método para mejorar la inmunoterapia de  $\beta$ -glucano para un sujeto, comprendiendo el método:

20 identificar al sujeto como uno de baja capacidad de unión; y coadministrar al sujeto un  $\beta$ -glucano soluble y una preparación de anticuerpos capaz de convertir el sujeto de baja capacidad de unión en alta capacidad de unión.

Punto 9. El método del punto 8, en el que la identificación del sujeto como uno de baja capacidad de unión comprende:

25 obtener una muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra un título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano; medir el título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano de al menos una parte de la muestra de sangre; y identificar el sujeto de baja capacidad de unión si el título de anticuerpo IgG anti- $\beta$ -glucano es de menos de 20 000.

30 Punto 10. El método del punto 8, en el que la identificación del sujeto como uno de baja capacidad de unión comprende:

35 obtener una muestra de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias; añadir  $\beta$ -glucano soluble a al menos una parte de la muestra de sangre e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano soluble se una a las células inmunitarias; detectar el  $\beta$ -glucano soluble unido a las células inmunitarias; y identificar al sujeto como uno de baja capacidad de unión si el  $\beta$ -glucano se une a no más de un 10 % de las células inmunitarias.

40 Punto 11. El método de uno cualquiera de los puntos 8-10, en el que la preparación de anticuerpos comprende suero de un sujeto de alta capacidad de unión.

Punto 12. El método de uno cualquiera de los puntos 8-10, en el que la preparación de anticuerpos comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano soluble.

45 Punto 13. El método del punto 12, en el que el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.

Punto 14. El método de uno cualquiera de los puntos 8-13, en el que la preparación de anticuerpos comprende inmunoglobulina intravenosa.

50 Punto 15. El método de uno cualquiera de los puntos 8-14, en el que el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos se coadministran simultáneamente.

55 Punto 16. El método de uno cualquiera de los puntos 8-14, en el que el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos se coadministran en diferentes momentos.

Punto 17. El método de uno cualquiera de los puntos 8-14, en el que el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos se coadministran en diferentes sitios.

60 Punto 18. El método de uno cualquiera de los puntos 8-16, en el que el  $\beta$ -glucano soluble se obtiene de levadura.

Punto 19. El método de uno cualquiera de los puntos 8-18, en el que el  $\beta$ -glucano soluble comprende un  $\beta$ -1,3/1,6 glucano.

65 Punto 20. El método de uno cualquiera de los puntos 9-19, en el que el  $\beta$ -glucano soluble comprende  $\beta$ (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta$ (1,3)-D-glucopiranososa.

**REIVINDICACIONES**

1. Un  $\beta$ -glucano soluble y una preparación de anticuerpos capaces de convertir a un sujeto de baja capacidad de unión en uno de alta capacidad de unión, para su uso en la mejora de la inmunoterapia de  $\beta$ -glucano para un sujeto que se identifica de baja capacidad de unión, donde el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos capaces de convertir al sujeto de baja capacidad de unión en uno de alta capacidad de unión se coadministran; en el que la preparación de anticuerpos comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al  $\beta$ -glucano soluble; y donde el sujeto se ha identificado como uno de baja capacidad de unión por un método que comprende:
- (A) medir el título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano de al menos una parte de una muestra de sangre obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre un título de anticuerpo anti- $\beta$ -glucano; e identificar al sujeto como uno de baja capacidad de unión si el título de anticuerpo IgG anti- $\beta$ -glucano es de menos de 20 000; o
- (B) añadir  $\beta$ -glucano soluble a al menos una parte de una muestra de sangre obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de sangre células inmunitarias, e incubar la mezcla en condiciones que permitan que el  $\beta$ -glucano soluble se una a las células inmunitarias;
- detectar el  $\beta$ -glucano soluble unido a las células inmunitarias; e identificar al sujeto como uno de baja capacidad de unión si el  $\beta$ -glucano se une a no más de un 10 % de las células inmunitarias, donde el  $\beta$ -glucano soluble se obtiene de levadura y está compuesto de monómeros de glucosa organizados como una estructura de glucopiranososa con enlaces  $\beta$ -(1,3) con ramificaciones periódicas de glucopiranososa  $\beta$ -(1,3) unidas a la estructura mediante un enlace glucosídico  $\beta$ -(1,6).
2. El  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos para su uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.
3. El  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el  $\beta$ -glucano soluble y la preparación de anticuerpos se coadministran (i) simultáneamente, (ii) en diferentes momentos o (iii) en diferentes sitios.

Figura 1

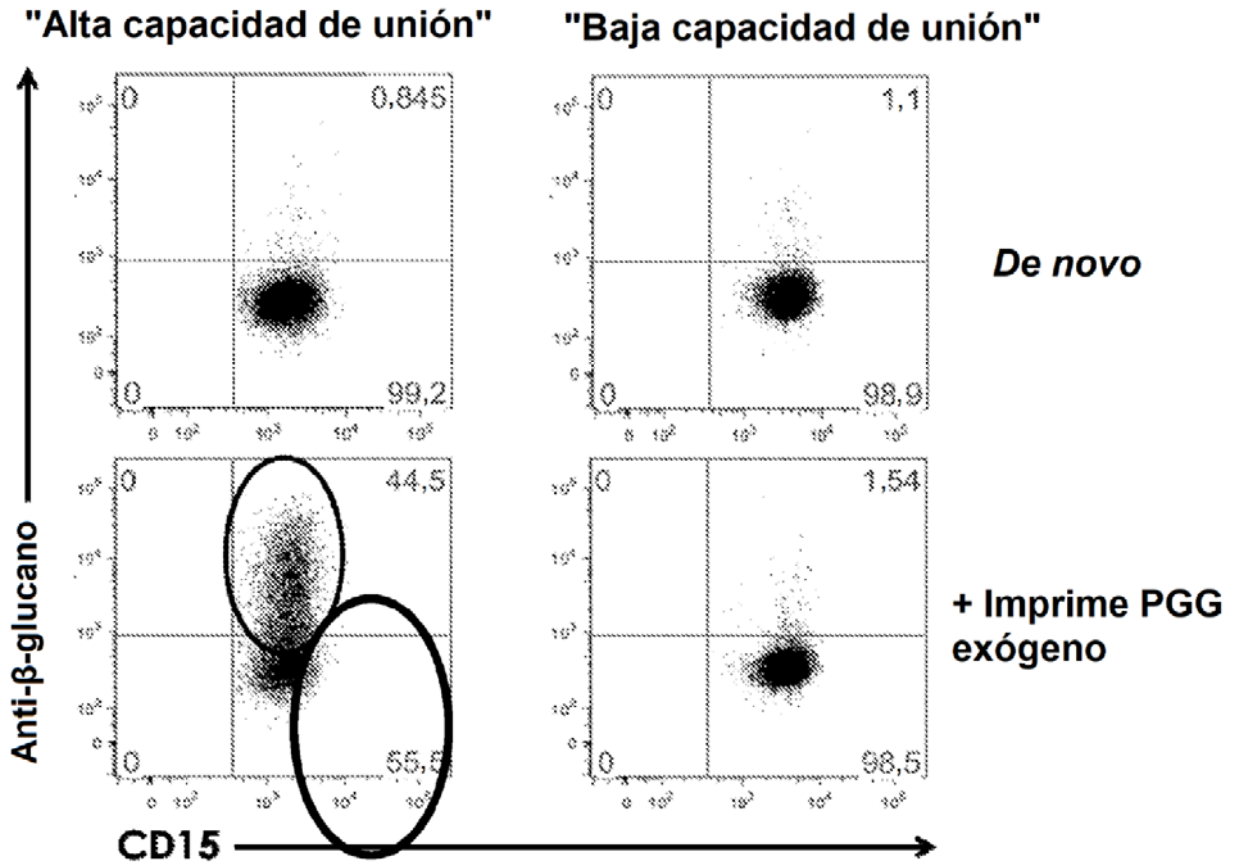


Figura 2

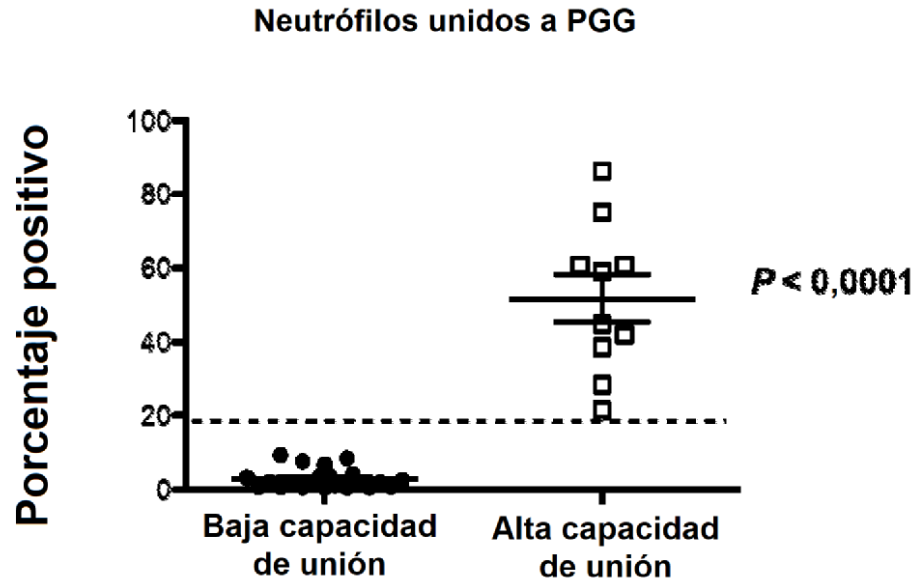


Figura 3

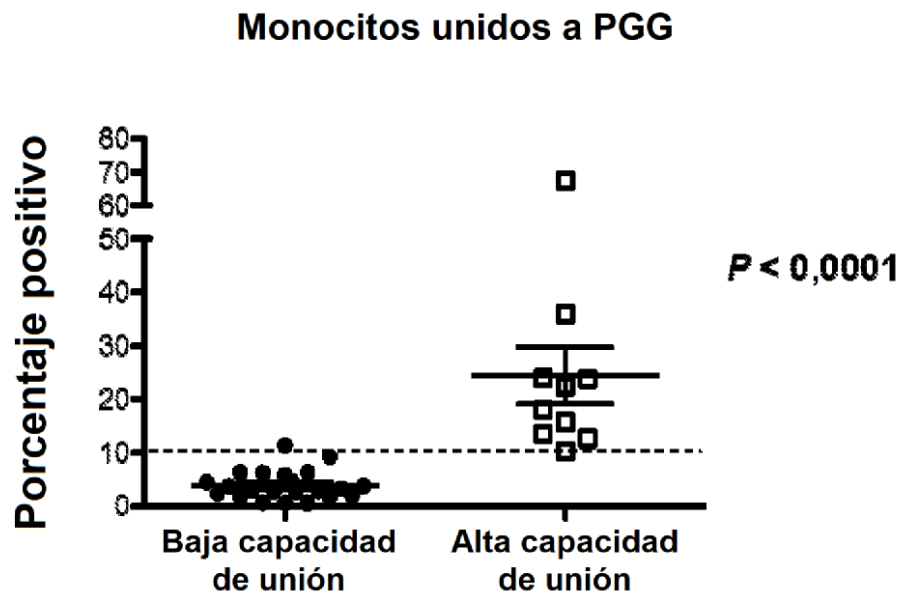


Figura 4

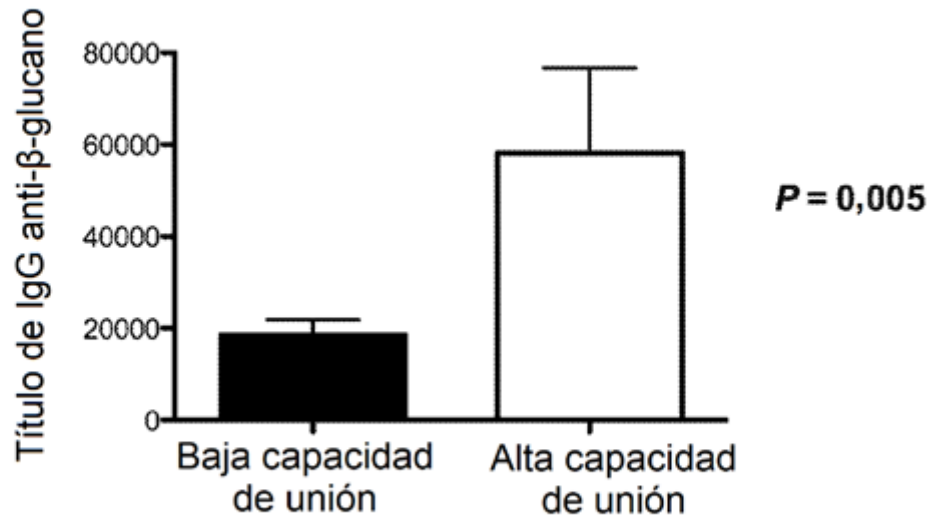


Figura 5

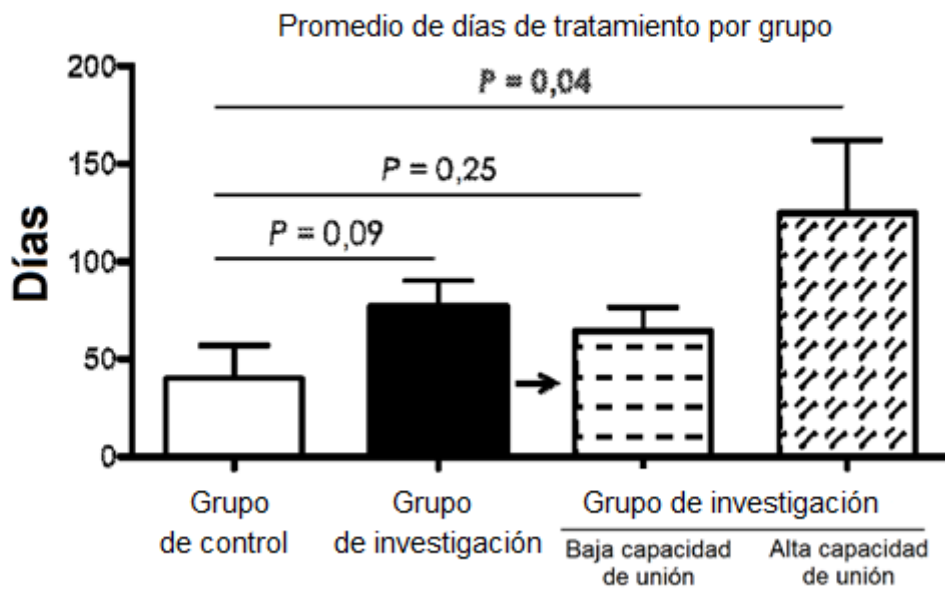


Figura 6

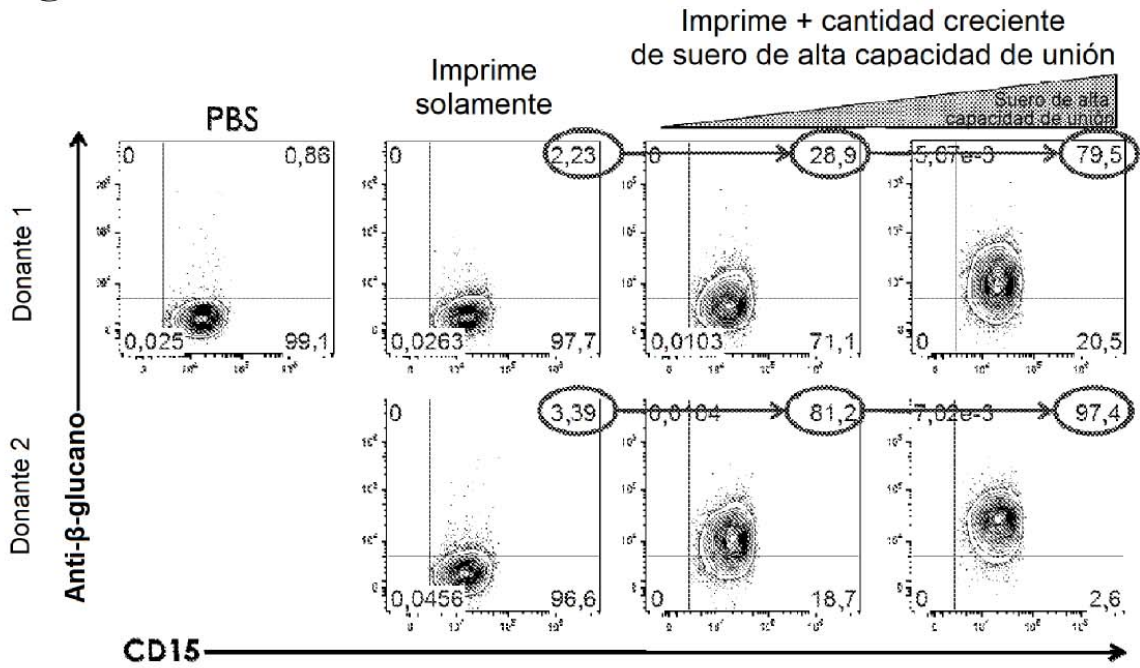


Figura 7

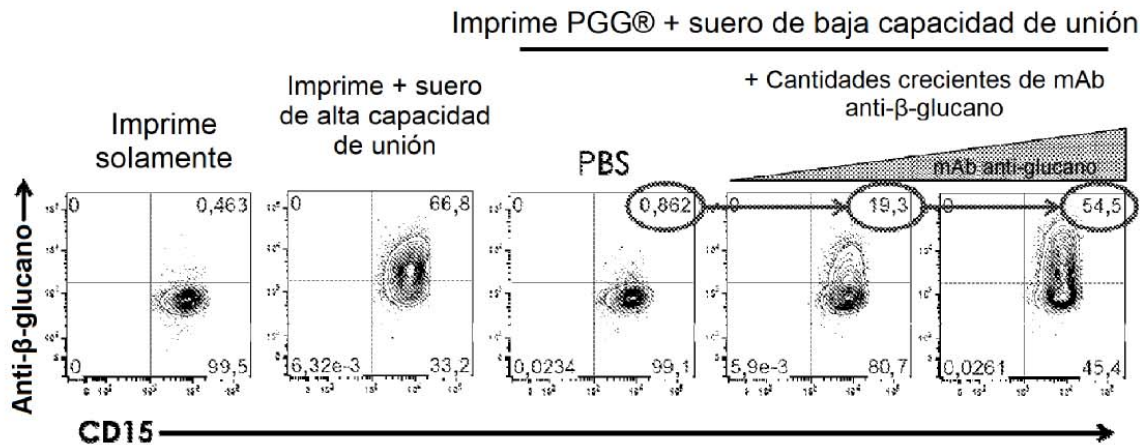




Figura 8

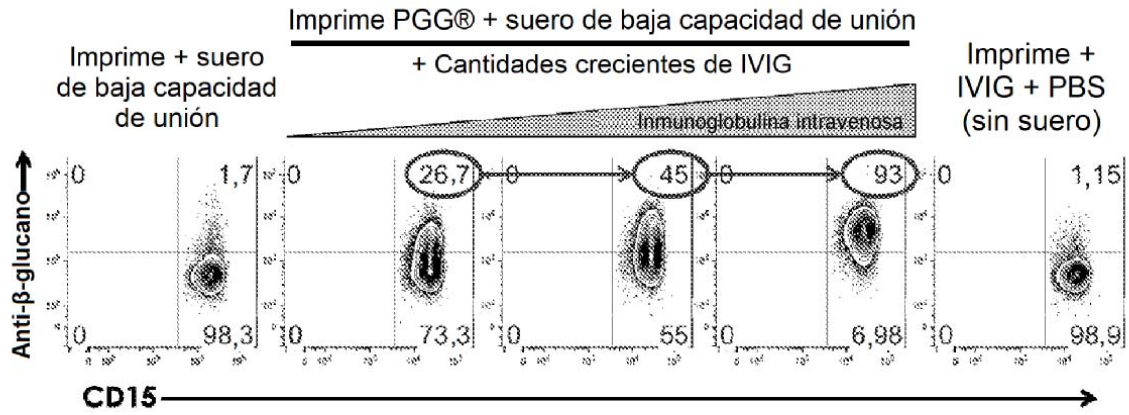


Figura 9

Unión de conjugados Imp a PMN en WB de LB

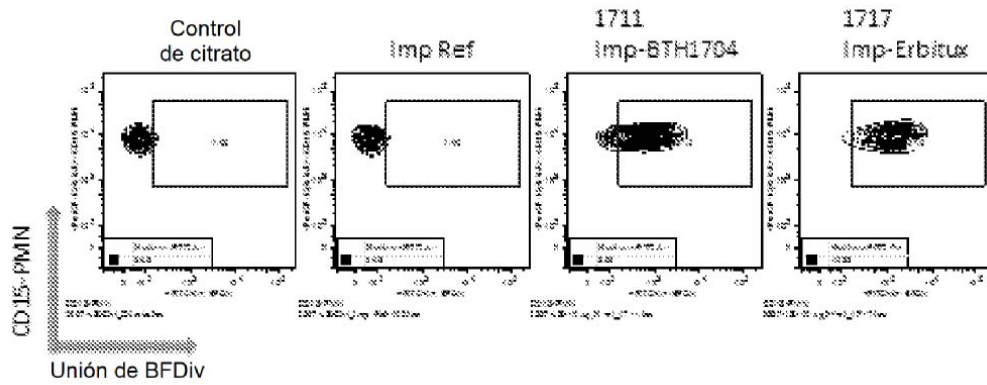
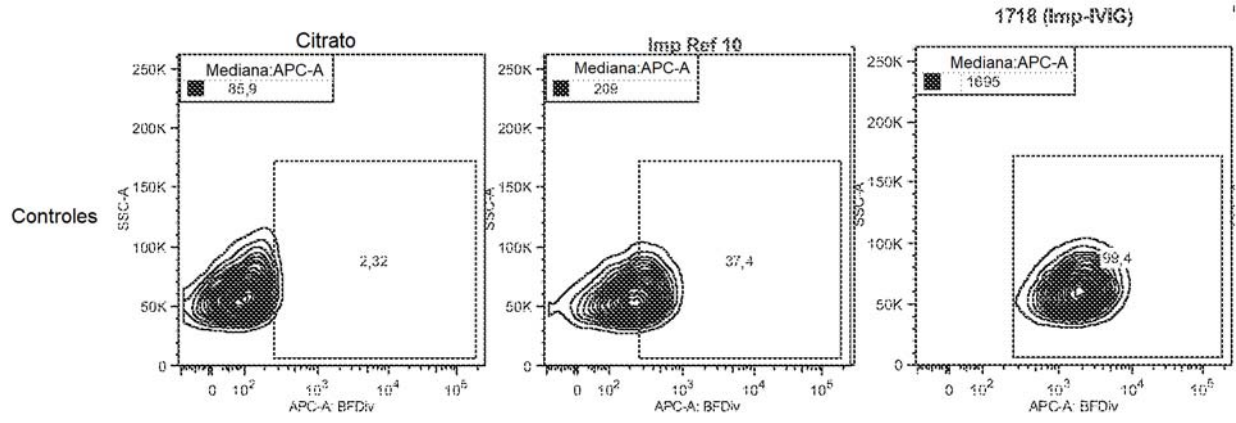


Figura 10



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

10 **Documentos de patente citados en la descripción**

- US 20080103112 A1 [0013]
- US 1236795 W [0013] [0030]
- US 7981447 B [0013]
- US 6294321 B [0021]
- US 6204366 B [0029]

15 **Literatura no patente citada en la descripción**

- **ANTONYSAMY et al.** *International Symposium The Neutrophile in Immunity*, 09 June 2012 [0013]
- **NOSS et al.** *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2012, vol. 157, 98-108 [0051]