

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 969**

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/US2013/031625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13165593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2013 E 13784472 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2854530**

54 Título: **Composiciones para inmunoterapia de β -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:
10.04.2018

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:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

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

ES 2 662 969 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para inmunoterapia de β -glucano

5 **Compendio**

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Según esto, la presente invención se refiere en un primer aspecto a una composición que comprende: un componente β -glucano derivado de levadura soluble compuesto de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con unión β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6); y un componente anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble; y un anticuerpo anti-tumor. La presente invención se refiere en un segundo aspecto a una composición que comprende (i) un β -glucano derivado de levadura soluble compuesto de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con unión β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6); (ii) una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble; y (iii) un anticuerpo anti-tumor para su uso en aumentar la respuesta de un sujeto a inmunoterapia de β -glucano soluble, en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran. La presente invención se refiere en un tercer aspecto a una composición que comprende: un β -glucano derivado de levadura soluble compuesto de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con unión β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6); una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble; y una preparación de anticuerpo anti-tumor para su uso en tratar un tumor en un sujeto, en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran.

Esta divulgación describe, en un aspecto, una combinación que incluye un componente β -glucano y un componente anticuerpo que específicamente se une al β -glucano. El β -glucano puede derivar de levadura. El β -glucano puede incluir un β -1,3/1,6 glucano tal como β (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- β (1,3)-D-glucopiranososa.

El componente anticuerpo puede incluir un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano. En algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal puede incluir BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.

El componente β -glucano y el componente anticuerpo se pueden proporcionar en una única formulación. El componente β -glucano y el componente anticuerpo se pueden proporcionar en formulaciones separadas.

En otro aspecto, esta divulgación describe un método que en general incluye coadministrar a un sujeto un β -glucano y una preparación de anticuerpo que específicamente se une al β -glucano. El método puede incluir además administrar al sujeto un anticuerpo anti-tumor.

En otro aspecto, esta divulgación describe un método de aumentar la respuesta de un sujeto a inmunoterapia de β -glucano. En general, el método incluye coadministrar al sujeto una composición que comprende un β -glucano y una preparación de anticuerpo que específicamente se une al β -glucano. El método puede incluir además identificar el sujeto como un unidor bajo y administrar una composición que comprende un β -glucano y una preparación de anticuerpo que específicamente se une al β -glucano.

En algunos casos de cualquiera de estos métodos, el β -glucano y la preparación de anticuerpo se pueden coadministrar simultáneamente. En otros casos de cualquiera de los métodos, la preparación de anticuerpo se puede coadministrar en momentos diferentes. En algunos casos de cualquiera de los métodos, el β -glucano y la preparación de anticuerpo se pueden coadministrar en sitios diferentes.

En algunos casos de estos métodos, el β -glucano puede derivar de levadura. En algunos casos de estos métodos, el β -glucano puede incluir un β -1,3/1,6 glucano tal como β (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- β (1,3)-D-glucopiranososa.

En algunos casos de estos métodos, el componente anticuerpo puede incluir un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano tal como BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.

En otro aspecto, esta divulgación describe un método de aumentar la respuesta de un sujeto a inmunoterapia de β -glucano que implica un anticuerpo. En general, el método incluye administrar al sujeto una composición que incluye una fracción β -glucano conjugada al anticuerpo. La fracción β -glucano se puede conjugar a un anticuerpo terapéutico tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-tumor. El método puede incluir además identificar el sujeto como un bajo unidor de β -glucano.

La fracción β -glucano puede derivar de levadura. La fracción β -glucano puede ser, o derivar de, un β -1,3/1,6 glucano tal como β (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- β (1,3)-D-glucopiranososa.

65

La terapia de β -glucano puede incluir administrar a un sujeto un anticuerpo contra β -glucano que se une específicamente a β -glucano, y un anticuerpo terapéutico. El anticuerpo terapéutico puede incluir un anticuerpo anti-tumor.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Datos de citometría de flujo que muestran la unión diferencial de β -glucano (PGG) a leucocitos polimorfonucleares en sangre completa de seres humanos sanos.

10 Figura 2. Datos que muestran la unión diferencial de β -glucano a neutrófilos en sangre completa de seres humanos sanos.

Figura 3. Datos que muestran la unión diferencial de β -glucano a monocitos en sangre completa de seres humanos sanos.

15 Figura 4. Datos que comparan los títulos del anticuerpo anti- β -glucano de bajos unidores y altos unidores.

Figura 5. Datos que muestran que el suero de altos unidores puede aumentar la unión de β -glucano a PMN obtenidos de un bajo unidor.

20 Figura 6. Datos que muestran que los anticuerpos anti- β -glucano pueden aumentar la unión de β -glucano a PMN de un bajo unidor.

Figura 7. Datos que muestran que la inmunoglobulina intravenosa puede aumentar la unión de β -glucano a PMN de un bajo unidor.

Figura 8. Datos que muestran la conversión de un bajo unidor a un alto unidor por tratamiento con inmunoglobulina intravenosa que incluye una combinación de β -glucano y anticuerpos anti- β -glucano.

30 Figura 9. Comparación del número medio de días en terapia para pacientes en los brazos control y de investigación de un estudio multicentro, aleatorizado, abierto de dos brazos.

Figura 10. Datos que muestran la unión de conjugados PGG-anticuerpo a los PMN.

35 Figura 11. Datos que muestran la unión de conjugados PGG-IGIV a los PMN.

Descripción detallada de formas de realización ilustrativas

40 Esta divulgación describe métodos relacionados con el uso de β -glucano como un componente de inmunoterapia. Las composiciones y métodos descritas en el presente documento explotan la observación de unión diferencial de β -glucano por células inmunitarias en diferentes poblaciones de seres humanos sanos. Sorprendentemente, los "altos unidores" de β -glucano muestran títulos más altos de anticuerpo anti- β -glucano que los "bajos unidores". Por tanto, esta divulgación describe composiciones que incluyen un componente β -glucano y un componente anticuerpo que se une específicamente al β -glucano. Esta divulgación también describe métodos que en general incluyen

45 coadministrar un β -glucano y un anticuerpo o componente anticuerpo que se une específicamente al β -glucano, o una fracción β -glucano conjugada a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Tales métodos pueden convertir un "bajo unidor" en un "alto unidor" y, por tanto, aumentar la población para la que la inmunoterapia basada en β -glucano puede ser eficaz.

50 Los β -glucanos son polímeros de glucosa derivados de una variedad de fuentes microbiológicas y vegetales incluyendo, por ejemplo, levadura, bacterias, algas, algas marinas, setas, avena y cebada. De estos, los β -glucanos de levadura se han evaluado extensamente por sus propiedades inmunomoduladoras. Los β -glucanos de levadura pueden estar presentes como varias formas tal como, por ejemplo, levadura intacta, cimosano, partículas de glucano enteras purificadas, polisacárido de cimosano solubilizado, o β -glucanos solubles muy purificados de diferentes

55 pesos moleculares. Estructuralmente, los β -glucanos de levadura están compuestos de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con unión β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6). Las diferentes formas de los β -glucanos de levadura pueden funcionar de forma diferente entre sí. El mecanismo a través del cual los β -glucanos de levadura ejercen sus efectos inmunomoduladores pueden estar influidos por las diferencias estructurales entre las diferentes formas de

60 los β -glucanos tal como, por ejemplo, su naturaleza particulada o soluble, conformación terciaria, longitud de la cadena principal, longitud de la cadena lateral, y frecuencia de las cadenas laterales. Las funciones inmunoestimulantes de los β -glucanos de levadura también dependen de los receptores involucrados en diferentes tipos celulares en diferentes especies que, de nuevo, depende de las propiedades estructurales de los β -glucanos.

65 En un aspecto, esta divulgación describe una composición que incluye, en general, un componente β -glucano y un componente anticuerpo que específicamente se une al β -glucano.

El componente β -glucano puede incluir cualquier forma adecuada de β -glucano o cualquier combinación de dos o más formas de β -glucano. Los β -glucanos adecuados y la preparación de β -glucanos adecuados de sus fuentes naturales se describen en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente en EE UU No. US2008/0103112 A1. El β -glucano puede derivar de una levadura tal como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. En ciertas formas de realización específicas, el β -glucano puede ser, o derivar de, $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa, también denominado en el presente documento PGG (IMPRIME PGG, Biothera, Inc., Eagan, MN), una forma muy purificada y bien caracterizada de β -glucano derivado de levadura. El resumen de investigación Antonysamy et al. del International Symposium The Neutrophile in Immunity, Quebec, Canadá, 9-12 de junio, 2012 describe la unión diferencial de IMPRIME PGG a neutrófilos y discute el uso potencial de esta unión diferencial como un biomarcador predictivo para inmunoterapia contra el cáncer. Por tanto, el componente β -glucano puede incluir, por ejemplo, un β -glucano modificado y/o derivatizado tal como los descritos en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US12/36795. El componente β -glucano puede incluir, por ejemplo, un β -glucano particulado-soluble o una preparación de β -glucano particulado-soluble, cada uno de los cuales se describe en, por ejemplo, la patente en EE UU No. 7.981.447.

El componente anticuerpo de la composición puede incluir cualquier preparación de anticuerpos que específicamente se una al componente β -glucano de la composición. Como usa en el presente documento, "específico" y variaciones del mismo se refiere a que tiene una afinidad diferencial o no general (es decir, no específica), en cualquier grado, para una diana particular. Por tanto, el componente anticuerpo puede incluir una preparación de anticuerpo policlonal (por ejemplo, derivada de suero), una preparación de anticuerpo monoclonal, o cualquier fragmento de anticuerpo tal como la porción Fc. Los anticuerpos monoclonales ejemplares que se unen específicamente a β -glucano incluyen, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales identificados como BfD I, BfD II, BfD III y/o BfD IV (Biothera, Inc., Eagan, MN), cada uno de los cuales se describe en la patente en EE UU No. 6.294.321.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, la porción Fc) conjugado al componente β -glucano puede ser cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo adecuado que se pueda enlazar al componente β -glucano.

El componente β -glucano, el componente anticuerpo, y/o la combinación de ambos componentes se puede formular en una composición junto con un "soporte". Como se usa en el presente documento, "soporte" incluye cualquier solvente, medio de dispersión, vehículo, recubrimiento, diluyente, agente antibacteriano y/o agente antifúngico, agente isotónico, agente que retrasa la absorción, tampón, solución soporte, suspensión, coloide y similares. El uso de tales medios y/o agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el β -glucano o el anticuerpo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

Mediante "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con el β -glucano y/o el anticuerpo sin producir ningún efecto biológico indeseable o interaccionar de una manera dañina con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en que está contenido.

El componente β -glucano, el componente anticuerpo, y/o la combinación de ambos componentes se puede formular en una composición farmacéutica. El componente β -glucano de la composición y el componente anticuerpo de la composición se pueden proporcionar en una única formulación. El componente β -glucano y el componente anticuerpo se pueden proporcionar en formulaciones separadas. La composición se puede formular en una variedad y/o una pluralidad de formas adaptadas a una o más rutas preferidas de administración. Por tanto, una composición se puede administrar a través de 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, o una parte de la misma, se puede administrar a una superficie mucosa, tal como por administración a, por ejemplo, la mucosa nasal o respiratoria (por ejemplo, por spray o aerosol). Una composición, o una parte de la misma, también se puede administrar a través de una liberación sostenida o retrasada.

Una formulación se puede presentar de forma conveniente en forma farmacéutica unitaria y se puede preparar por métodos conocidos en la técnica de la farmacia. Los métodos de preparar una composición con un soporte farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de poner el β -glucano y/o el anticuerpo en asociación con un soporte que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, una formulación se puede preparar asociando de forma uniforme y/o estrecha el compuesto activo con un soporte líquido, un soporte sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en las formulaciones deseadas.

El componente β -glucano, el componente anticuerpo, y/o la combinación de ambos componentes se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada incluyendo, pero no limitado a, una solución, una suspensión, una emulsión, un spray, un aerosol, o cualquier forma de mezcla. La composición se puede administrar en formulación con cualquier excipiente, soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la formulación se puede

administrar en una forma farmacéutica tópica convencional tal como, por ejemplo, una crema, una pomada, una formulación en aerosol, un espray no 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 penetración de la piel, un colorante, una fragancia, un saborizante, un hidratante, un espesante, y similares.

En otro aspecto, la divulgación describe un método que en general incluye coadministrar a un sujeto, en cantidades eficaces entre sí, un β -glucano y una preparación de anticuerpo que se une específicamente al β -glucano. Como se usa en el presente documento, "coadministrado" se refiere a dos o más componentes de una combinación administrados de modo que los efectos terapéuticos o profilácticos de la combinación puedan ser mayores que los efectos terapéuticos o profilácticos de cualquier componente administrado solo. Dos componentes se pueden coadministrar de forma simultánea o secuencial. Los componentes coadministrados de forma simultánea se pueden proporcionar 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 simultáneamente después de que ambos se administren. Independientemente de si los componentes se coadministran de forma simultánea o secuencial, los componentes se pueden coadministrar en un único sitio o en sitios diferentes. También como se usa en el presente documento, "una cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de β -glucano y anticuerpo que específicamente se une a β -glucano eficaz para aumentar la unión del β -glucano a células inmunitarias -por ejemplo, leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos, o neutrófilos- o para aumentar la producción de citoquinas y/o quimioquinas asociadas con la unión de β -glucanos -por ejemplo, producción de IL-8.

Los β -glucanos adecuados para uso en los métodos incluyen uno o más de los descritos como adecuados para uso como el componente β -glucano de las composiciones descritas anteriormente. Además, la preparación de anticuerpo puede incluir uno o más anticuerpos descritos como adecuados para uso como el componente anticuerpo de las composiciones descritas anteriormente.

La cantidad de β -glucano y anticuerpo eficaz para inducir uno o más de los efectos deseados puede variar dependiendo de varios factores incluyendo, pero no limitado a, el peso, estado físico, y/o edad del sujeto, y/o la vía de administración. Por tanto, la cantidad absoluta de β -glucano y anticuerpo que se une específicamente al β -glucano que se incluyen en una forma farmacéutica unitaria determinada puede variar mucho, y depende de factores tales como la especie, edad, peso y estado físico del sujeto, así como del método de administración. Según esto, no es práctico exponer en general la cantidad que constituye una cantidad de β -glucano y anticuerpo eficaz para todas las aplicaciones posibles. Los expertos en la materia, sin embargo, pueden determinar fácilmente la cantidad apropiada con la debida consideración a tales factores.

El método puede incluir administrar suficiente β -glucano para proporcionar una dosis de, por ejemplo, desde aproximadamente 100 ng/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg al sujeto, aunque en algunas formas de realización los métodos se pueden llevar a cabo administrando el β -glucano en una dosis fuera de este intervalo. El método puede incluir administrar suficiente β -glucano para proporcionar una dosis desde aproximadamente 10 μ g/kg hasta 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, aproximadamente 10 mg/kg. El método también puede incluir administrar suficiente β -glucano para proporcionar una dosis de 4 mg/kg.

Alternativamente, la dosis se puede calcular usando el peso corporal real obtenido justo antes del inicio de un curso de tratamiento. Para las dosis calculadas de esta manera, el área de superficie corporal (m^2) se calcula antes del inicio del curso de tratamiento usando el método de Dubois: $m^2 = (\text{kg de peso}^{0,425} \times \text{cm de altura}^{0,725}) \times 0,007184$. Por tanto, el método puede incluir administrar suficiente β -glucano para proporcionar una dosis de, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 mg/ m^2 hasta aproximadamente 10 mg/ m^2 .

El método puede incluir administrar suficiente anticuerpo que se une específicamente al β -glucano para proporcionar una dosis de, por ejemplo, desde aproximadamente 100 ng/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg al sujeto, aunque en algunos casos los métodos se pueden llevar a cabo administrando el anticuerpo en una dosis fuera de este intervalo. El método puede incluir administrar suficiente anticuerpo para proporcionar una dosis desde aproximadamente 10 μ g/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg al sujeto, por ejemplo, una dosis desde aproximadamente 100 μ g/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg. El anticuerpo que se une específicamente al β -glucano se puede administrar en forma de inmunoglobulina intravenosa (IGIV), un producto sanguíneo que contiene IgG polivalentes juntadas de muchos donantes (típicamente muchos cientos, incluso miles, de donantes y, por tanto, que contienen de forma natural anticuerpos anti- β -glucano). En tales casos, se puede administrar IGIV en una dosis desde aproximadamente 0,1 g/kg, hasta 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. En ciertos casos, se puede administrar IGIV para proporcionar una dosis desde aproximadamente 0,4 g/kg hasta aproximadamente 1,0 g/kg.

Alternativamente, la dosis se puede calcular usando el peso corporal real obtenido justo antes del inicio de un curso de tratamiento. Para las dosis calculadas de esta manera, el área de superficie corporal (m^2) se calcula antes del

inicio del curso de tratamiento usando el método de Dubois: $m^2 = (\text{kg de peso}^{0.425} \times \text{cm de altura}^{0.725}) \times 0,007184$. Por tanto, el método puede incluir administrar suficiente anticuerpo para proporcionar una dosis de, por ejemplo, desde aproximadamente 0,01 mg/m² hasta aproximadamente 10 mg/m².

5 El β -glucano y el anticuerpo se pueden coadministrar, por ejemplo, desde una dosis única o múltiples dosis a la semana, aunque en algunos casos el método se puede realizar coadministrando el β -glucano y el anticuerpo a una frecuencia fuera de este intervalo. El β -glucano y el anticuerpo se pueden administrar desde aproximadamente una vez al año hasta una vez a la semana.

10 Como se ha indicado anteriormente, los β -glucanos de levaduras se han evaluado extensamente para sus propiedades inmunoterapéuticas. Sin embargo, se descubrió que existen distintas poblaciones de individuos: una población muestra capacidad relativamente alta de unión de β -glucano a células inmunitarias innatas en sangre completa; otra población muestra capacidad relativamente baja de unión de β -glucano a células inmunitarias innatas en sangre completa. Esta observación fue totalmente inesperada basada en datos de modelos de ratón de inmunidad y estudios que implicaban células inmunitarias humanas aisladas. Muchos individuos muestran algún nivel de unión de β -glucano a células inmunitarias de exposición nativa, de bajo nivel a β -glucanos (por ejemplo, figura 1, “de novo”). Cuando se administra β -glucano exógeno, los “bajos unidores” muestran un aumento modesto en el porcentaje de células inmunitarias innatas que se unen a β -glucano, mientras que los “altos unidores” muestran un marcado aumento en el porcentaje de células inmunitarias innatas que se unen a β -glucano (figura 1, “+ PGG exógeno”). La figura 1 y la figura 2 muestran datos que reflejan la unión de β -glucano a leucocitos polimorfonucleares (PMN), y la figura 3 (monocitos) muestra que la unión diferencial se aplica también a otras poblaciones de células inmunitarias. Además, los “altos unidores” también tienden a producir más citoquinas y/o quimioquinas tal como, por ejemplo, IL-8, MCP, MIP-1, etc.

25 Como se usa en el presente documento, la categoría como un “alto unidor” se refiere a un individuo que muestra un porcentaje predeterminado de una población de células inmunitarias particular que se une a β -glucano proporcionado de forma exógena. La población de células inmunitarias usada para determinar si un individuo es un “alto unidor” o un “bajo unidor” puede ser, por ejemplo, leucocitos polimorfonucleares (PMN) o monocitos. Un individuo se puede considerar un “alto unidor” si al menos el 10% de los PMN o monocitos en una muestra de sangre del individuo se une a β -glucano proporcionado de forma exógena. Por tanto, un individuo puede ser un “alto unidor” si al menos el 10%, al menos el 12%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 15% o al menos el 40% de los PMN o monocitos en una muestra de sangre del individuo se une a β -glucano proporcionado de forma exógena. (Véase, por ejemplo, la figura 2 y la figura 3). En algunos casos, el β -glucano proporcionado de forma exógena puede incluir PGG proporcionado a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$. La categoría como un “bajo unidor” se refiere a un individuo que fracasa en mostrar categoría de “alto unidor”.

Además, los “altos unidores” puede mostrar mayores títulos de anticuerpos anti- β -glucano que los “bajos unidores” (figura 4). Un título de anticuerpo anti- β -glucano típico para un “alto unidor” 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 la figura 4). Títulos de anticuerpos anti- β -glucano típicamente se refiere a IgG. En algunos casos, sin embargo, la presencia de IgM puede compensar para un título de IgG menor para ayudar a establecer la categoría de “alto unidor”.

45 Se sabe que los β -glucanos se unen a dominios de tipo lectina en la región COOH terminal de la subunidad CD11b del receptor de complemento de leucocitos 3 (CR3; CD11b/CD18, integrina $\alpha\text{M}\beta 2$, Mac-1; refs. Thorton *et al.*, *J Immunol* 156:1235-46, Xia *et al.*, *J Immunol* 162:2281-90). Los β -glucanos pueden sensibilizar CR3 de neutrófilos, macrófagos y células citolíticas naturales para citotoxicidad contra tumores opsonizados con iC3b. La ocupación dual de CR3 de leucocitos por el ligando de dominio I iC3b y el ligando del dominio de tipo lectina β -glucano puede producir la desgranulación y respuestas citotóxicas (Li *et al.*, *J Immunol* 177:1661-9; Tsikitis *et al.*, *J Immunol* 173:1284-91). Por tanto, se podría sospechar que los individuos “bajos unidores” podrían poseer títulos naturales mayores de anticuerpos anti- β -glucano que pueden perturbar la unión entre β -glucano y CR3.

55 Sin embargo, encontramos exactamente lo contrario. Los “altos unidores” mostraron títulos mayores de anticuerpos anti- β -glucano que los “bajos unidores” (Fig. 4). Por tanto, títulos mayores de anticuerpos anti- β -glucano se asocian con unión aumentada de β -glucano a CR3 en células inmunitarias.

Además, el efecto es transferible. El suero de un “alto unidor” puede aumentar la unión de β -glucano a células inmunitarias (por ejemplo, PMN) de un “bajo unidor” (Fig. 5). Cantidades crecientes de anticuerpo monoclonal anti- β -glucano también pueden aumentar la unión de β -glucano a células inmunitarias (por ejemplo, PMN) en el suero de un “bajo unidor” (Fig. 6). Además, la inmunoglobulina intravenosa, un producto sanguíneo que contiene IgG polivalente juntada de muchos donantes (típicamente muchos cientos, incluso miles, de donantes) y títulos anti- β -glucano naturales altos, también puede aumentar la unión de β -glucano a células inmunitarias (por ejemplo, PMN) en el suero de un “bajo unidor” (Fig. 7).

65 El efecto también es demostrable *in vivo*. Un sujeto con cáncer colorrectal metastásico recurrente se mostró como un “bajo unidor” durante cinco ciclos de terapia que incluía administración de β -glucano. El sujeto mostró unión de β -

glucano a <5% de los PMN y monocitos y un título de anticuerpos anti- β -glucano en la parte inferior del 10% de la curva de distribución para individuos sanos (de 1:1.600 a 1:3.200). El sujeto fue tratado múltiples veces con inmunoglobulina intravenosa (IGIV) (0,4 g/kg-1 g/kg). Se obtuvieron muestras pre- y post-tratamiento antes y después del segundo tratamiento. La figura 8 muestra que el sujeto mostró una baja capacidad para unir β -glucano en PMN y monocitos en las muestras pretratamiento (Figura 8, pre-infusión ciclo 7), pero tuvo un aumento significativo en la capacidad de unir β -glucano en las muestras de post-tratamiento de IGIV (Figura 8, post-infusión ciclo 7). En la muestra post-tratamiento, el título de anticuerpos anti- β -glucano del sujeto también aumentó a 1:25.600, demostrando la transferencia de anticuerpos anti- β -glucano con el tratamiento de IGIV.

Además, en un estudio multicentro, aleatorizado, abierto, de dos brazos, 795 sujetos con cáncer colorrectal recurrente/progresivo después de al menos dos tratamientos quimioterapéuticos previos se dividieron en un brazo control y un brazo de investigación. Los sujetos en el brazo control recibieron tratamiento con cetuximab. Los sujetos en el brazo de investigación recibieron tratamiento con cetuximab + PGG β -glucano 4 mg/kg. La figura 9 muestra que mientras los sujetos que recibieron β -glucano como parte de su inmunoterapia permanecieron en terapia durante un periodo medio más largo que los sujetos que recibieron solo cetuximab, el efecto fue máximo en esos sujetos que eran "altos unidores". En este contexto, la duración de la terapia es una indicación de éxito de la terapia de modo que un tiempo de terapia más largo indica un desenlace terapéutico positivo mientras que una duración más corta de la terapia indica peores desenlaces. Por tanto, hay una consecuencia clínica a la categoría de "alto unidor" frente a la categoría de "bajo unidor".

Por tanto, en otro aspecto, esta divulgación describe inmunoterapia que incluye administrar a un sujeto β -glucano coadministrado con un anticuerpo que se une específicamente a β -glucano y, además, un anticuerpo anti-tumor. Como se usa en el presente documento, anticuerpo "anti-tumor" se refiere a un anticuerpo que específicamente se une a células neoplásicas, independientemente de si las células neoplásicas forman un tumor sólido o incluyen células leucémicas o linfólicas. El β -glucano y el anticuerpo que se une específicamente a β -glucano se pueden administrar como se ha descrito en detalle anteriormente. El anticuerpo anti-tumor puede ser cualquier anticuerpo anti-tumor adecuado administrado como indica el fabricante o el profesional sanitario. En este contexto, coadministrar el β -glucano y la preparación de anticuerpo puede aumentar la eficacia de la inmunoterapia. Por ejemplo, PGG β -glucano ha demostrado actividad preclínica contra una variedad de tipos de cáncer cuando se administra en combinación con anticuerpos monoclonales (Acm) anti-tumor. Los tipos ejemplares de cáncer y sus Acm anti-tumor asociados incluyen, por ejemplo, linfoma de células T (anti-MUC, anti-GD2), linfoma no de Hodgkin (rituximab), leucemia linfocítica crónica (rituximab), carcinoma de pulmón (anti-MUC1), adenocarcinoma de mama (anti-MMTV), carcinoma ovárico (bevacizumab), carcinoma de pulmón no microcítico (bevacizumab, cetuximab), cáncer colorrectal (cetuximab), y carcinoma pancreático (cetuximab, anti-MUC1). Para algunos sujetos, el efecto inmunoestimulador de PGG β -glucano se puede aumentar coadministrando un anticuerpo que se une específicamente al β -glucano.

Se puede producir una conversión similar de categoría de "bajo unidor" a "alto unidor" administrando al sujeto una composición que incluye una fracción β -glucano conjugada a cualquier anticuerpo o una parte de un anticuerpo. La figura 10 muestra datos que ilustran unión de PGG relativamente baja por los PMN en sangre completa (Imp Ref, segundo panel) que cambia a categoría de alta unión conjugando el PGG a cualquier anticuerpo anti-tumor BTH1704 (anti-MUC1, patente en EE UU No. 6.204.366, Biothera, Inc., Eagan, MN, tercer panel) o ERBITUX (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN, cuarto panel). La figura 11 también ilustra la unión de PGG relativamente baja por PMN en sangre entera (Imp Ref, segundo panel) que cambia a categoría de alta unión conjugando el PGG a inmunoglobulina intravenosa (IGIV, Biolegend, San Diego, CA).

Por tanto, en otro aspecto, esta divulgación describe inmunoterapia que incluye administrar a un sujeto una composición que incluye una fracción β -glucano conjugada a un anticuerpo, un anticuerpo terapéutico, un anticuerpo anti-tumor, o un fragmento de anticuerpo tal como la parte Fc de un anticuerpo. PGG modificado y/o derivatizado, incluyendo conjugados de PGG de una fracción PGG y un anticuerpo como se describe en la solicitud Internacional de patente No. PCT/US12/36795, que también se puede aplicar a conjugados de fragmentos de anticuerpos. La fracción PGG puede ser, o derivar de, un glucano β -1,3/1,6. En este contexto, "derivado de" reconoce que un conjugado se puede preparar necesariamente creando un enlace covalente que sustituye uno o más átomos del PGG β -glucano. Como se usa en el presente documento, "derivado de un β -1,3/1,6 glucano" se refiere a una porción del PGG β -glucano que permanece como parte de un conjugado después de sustituir uno o más átomos del PGG para formar el enlace covalente del conjugado.

El anticuerpo terapéutico puede ser cualquier anticuerpo terapéutico capaz de combinarse con β -glucano para inmunoterapia. Por tanto, el anticuerpo terapéutico también puede incluir cualquiera de los anticuerpos anti-tumor - descritos anteriormente en relación con otros aspectos de esta divulgación- para proporcionar inmunoterapia contra varias formas de cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "y/o" significa uno o todos de los elementos enumerados o una combinación de cualesquiera dos o más de los elementos enumerados; los términos "comprende" y variaciones del mismo no tienen significado limitante donde estos términos aparecen en la descripción y reivindicaciones; a menos que se especifique de otra manera, "un", "una", "el", "la", y "al menos uno/a" se usan de forma intercambiable y

significan uno o más de uno; y las enumeraciones de intervalos numéricos por puntos finales incluyen todos los números incluidos en ese intervalo (por ejemplo, de 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).

5 Para cualquier método divulgado en el presente documento que incluye etapas discretas, las etapas se pueden realizar en cualquier orden factible. Y, según sea apropiado, cualquier combinación de dos o más etapas se puede realizar simultáneamente.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales

15 Imprime PGG (Biothera, Inc., Eagan, MN) se suministró como una formulación de β -glucano soluble, sin conservantes 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.

20 *Preparación de muestras*

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

30 *Suero y plasma.* La sangre completa se procesó a suero o plasma por recogida en tubos Vacutainer® (BD Biosciences; San Jose, CA) con tubos con separador de suero (tapa roja) o heparina sódica (tapa verde). Los tubos se mezclaron bien, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se centrifugaron a 2000 rpm (~1150 x g) durante 10 minutos. El sobrenadante (suero o plasma) se transfirió después a un tubo cónico de almacenamiento de policarbonato nuevo.

Método de ELISA anti-BG

35 Se usó un método de ELISA preliminar modificado del método de anti- β -glucano de mono (Noss et al., 2012 *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 157:98-108) para ensayar las muestras de sueros humanos. Se recubrieron placas de unión universales de Costar con 50 μ l de β -glucano a 1 μ g/ml β -glucano purificado diluido en agua purificada y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La placa recubierta se expuso después a luz ultravioleta de alta intensidad a $>1500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ durante cinco minutos a temperatura ambiente y se colocó en un horno de aire forzado a 50°C hasta que se secó antes de una segunda exposición a luz ultravioleta a $>1500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ durante cinco minutos a temperatura ambiente. La placa se bloqueó después con una solución al 0,5% de seroalbúmina bovina durante >30 minutos antes de lavar con tampón de lavado (solución salina tamponado con fosfato [PBS] con Tween-20 al 0,05%). Las muestras de suero humanas se diluyeron en tampón de lavado se añadieron a la placa y posteriormente se diluyeron en serie en tampón de lavado en la placa. Las muestras de prueba diluidas 1:400 se pipetearon en la placa de prueba con siete diluciones 1:2 en serie adicionales (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 β -glucano unido a la placa. Después de la incubación los pocillos se lavaron con tampón de lavado y un anticuerpo secundario marcado con enzima (anti-IgG humano de cabra purificado por afinidad conjugado a peroxidasa de rábano, específico de Fc gamma) se incubó en los pocillos para unirse con la IgG humana unida al antígeno β -glucano. El anticuerpo secundario se dejó incubar durante 30 minutos antes de lavar con tampón de lavado. Después de eliminar todo el tampón de lavado de los pocillos un sustrato de peroxidasa se incubó en los pocillos y el desarrollo de color se extinguió con ácido fosfórico ~1 M a los cinco minutos del desarrollo de color. La densidad óptica (DO) a 450 nm se midió usando un lector de placa de microtitulación.

55 *Determinación del título de Ac anti- β -glucano*

Las DO resultantes de pocillos replicados se promediaron y se restó el fondo de ensayo medio. La mayor dilución que daba un DO ajustada al fondo mayor que o igual a 0,100 se consideró el título de las muestras y se expresó como el inverso de esa dilución. Para la definición de rendimiento del ensayo se asignó un valor al suero de referencia estándar y se construyó una curva de referencia en cada placa de ensayo. Por ejemplo, una muestra de prueba que daba una DO ajustada a fondo de 0,100 a una dilución de 1:12.800 se consideró que tenía un título de 12.800. Cuando las muestras se ensayaron múltiples veces y la media de sus títulos estaba entre los niveles del título 1:2 en serie desde 1:400 el siguiente nivel de título más bajo se describió como su título. Por ejemplo, el suero de un donante de cuatro donaciones se ensayó en cinco ensayos separados dando un título medio de 28.160; se describió que su título era 25.600.

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

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

Unión de PGG a células de sangre completa (SC)

Se hicieron alícuotas de cien microlitros de SC de donantes sanos en tubos de un separador celular activado por fluorescencia (FACS) de poliestireno de 5 ml. Estas muestras de SC se estimularon con Imprime PGG (10 μ g/ml o 100 μ g/ml) o tampón citrato, el vehículo control. Los tubos de FACS que contenían las muestras se cubrieron laxamente con las correspondientes tapas y se incubaron durante 30 minutos o dos horas, a 37°C en un incubador humidificado (CO₂ al 5%).

Tabla 1. Mezcla de anticuerpos usada para teñir muestras de sangre completa

Anticuerpo	Empresa; Clon #	Dilución o concentración final	Para la identificación de:
Anti-CD15	Biologend; W6D3	0,2 μ g/ml	neutrófilos
Anti-CD19	Biologend; HIB19	0,63 μ g/ml	células B
Anti-CD14	Biologend; HCD14	5 μ g/ml	monocitos
Anti-CD14	Invitrogen; TùK4	1:50	monocitos
Anti-CD3	Biologend; HIT3a	0,25 μ g/ml	células T
Anti-CD45	Biologend; HI30	0,25 μ g/ml	células hematopoyéticas excluyendo eritrocitos y plaquetas
F(ab') ₂ de cabra anti-IgM de ratón	Jackson Immunolab	5 μ g/ml	anticuerpo anti- β -glucano de ratón

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

Después de la incubación, todas las muestras se lavaron añadiendo 2 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1x (DPBS) y se centrifugaron a 1500-1700 rpm a 4°C durante cinco minutos. Después de dos rondas de lavados y aspiraciones, se mezclaron 5 μ l del anticuerpo anti- β -glucano BfD IV (~100 μ g/ml) en cada tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este anticuerpo primario se lavó dos veces con DPBS 1x como se ha descrito anteriormente y una mezcla de anticuerpos que contenía el anticuerpo secundario, así como los marcadores de superficie celular específicos (tabla 1) se añadió y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron 2 ml de solución de lisado BD 1x (BD Biosciences; San Jose, CA) a cada muestra y se mezcló suavemente con el vortex. Después de un periodo de incubación de una hora a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 1500-1700 rpm a 4°C durante cinco minutos. La solución de lisado BD se aspiró y las células se lavaron una vez con DPBS 1x y se aspiró como se ha descrito anteriormente. Para la fijación, se añadieron 300-400 μ l de paraformaldehído al 1% a cada muestra. Las muestras se adquirieron en el LSR II (BD Biosciences; San Jose, CA) a las 20 horas de la fijación. Los datos se analizaron usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

Ejemplo 2

Materiales

Imprime PGG (Biothera, Inc., Eagan, MN) se suministró como una formulación de β -glucano soluble, sin conservantes 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 (SC)

Se obtuvo SC de voluntarios sanos que habían proporcionado consentimiento informado antes de la donación (New England Institutional Review Board, Blood Donation Protocol 07-124). La sangre se recogió en un Vacutainer® que contenía 158 unidades USP de heparina sódica liofilizada (BD Biosciences; San Jose, CA). El suero se recogió en un Vacutainer® que contenía activador de coagulación basado en trombina (BD Biosciences; San Jose, CA).
 5 Aproximadamente 20 minutos después de la recogida, el vial se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero se recogió de este vial y se almacenó a 4°C hasta su uso en 8 horas o a -80°C para uso después de 8 horas.

El ensayo de unión en sangre completa se realizó incubando muestras de sangre completa con Imprime PGG durante 30 minutos o dos horas a 37°C en un incubador humidificado. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1x (DPBS), BfD IV, un anticuerpo anti-β-glucano de ratón, se añadió e incubó con la SC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de más rondas de lavado, se añadió una mezcla de anticuerpos que incluía un anticuerpo de detección anti-ratón de cabra y anticuerpos hacia moléculas de superficie y se incubó 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 FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).
 15

Estudios de cruce de SC y suero

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

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

Ejemplo 3

30 Se obtuvo sangre completa reciente de voluntarios sanos que habían proporcionado consentimiento informado antes de la donación. La sangre se recogió en un Vacutainer® que contenía 158 unidades USP de heparina sódica liofilizada (BD Biosciences; San Jose, CA). Se hicieron alícuotas de 100 µl de sangre completa de donantes sanos en tubos de FACS de poliestireno de 5 ml. Las muestras se estimularon con el vehículo control, o estándar de referencia PGG, o conjugado PGG-Muc 1 (Imp-BTH1704), conjugado PGG-Erbitux (10µg/ml) o conjugado PGG-IGIV. Se prepararon los conjugados PGG-anticuerpo anti-tumor como se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US12/36795.
 35

40 Los tubos que contenían las muestras se cubrieron laxamente con parafilm y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un incubador humidificado (CO₂ al 5%). Después de la incubación, todas las muestras se lavaron dos veces con 2 ml de DPBS 1x y se centrifugaron a 1500-1700 rpm a 4°C durante cinco minutos. Después de la aspiración, 5 µl del anticuerpo anti-β-glucano BfD IV (Biothera, Inc., Eagan, MN; Patente en EE UU No. 6.294.321), se mezclaron en cada tubo y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Este anticuerpo se lavó dos veces y se añadió una mezcla de anticuerpos que contenía el Ac secundario anti-IgM de ratón de cabra conjugado a FITC (Southern Biotech; Birmingham, AL), así como los marcadores de superficie celular específicos CD15, CD14, CD19, CD3 y CD45 (Biolegend, San Diego, CA) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron 2 ml de solución de lisis BD 1x (BD Biosciences; San Jose, CA) a cada muestra y se mezcló con el vortex. Después de incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos las muestras se centrifugaron como se ha descrito anteriormente y el precipitado se lavó con 2 ml de DPBS 1x. Las células se fijaron con 300 µl de paraformaldehído al 1% y se adquirieron en el LSR II (BD Biosciences; San Jose, CA). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Las células se evaluaron para su capacidad para unir PGG comparando la intensidad de fluorescencia mediana (IFM) de las células teñidas con BfD IV y el porcentaje de células positivas para BfD IV relativo al del grupo control tratado con vehículo.
 45
 50

55 Puntos ejemplares

También se describen los siguientes puntos.

60 Punto 1. Una composición que comprende: un componente β-glucano soluble; y un componente anticuerpo que se une específicamente al β-glucano soluble.

Punto 2. La composición del punto 1 en donde el β-glucano soluble deriva de levadura.

65 Punto 3. La composición del punto 1 o del punto 2 en donde el β-glucano soluble comprende un β-1,3/1,6 glucano.

- Punto 4. La composición de cualquier punto precedente en donde el β -glucano soluble comprende $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa.
- 5 Punto 5. La composición de cualquier punto precedente en donde el componente anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble.
- Punto 6. La composición del punto 5 en donde el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.
- 10 Punto 7. La composición de cualquier punto precedente en donde el componente β -glucano soluble y el componente anticuerpo se proporcionan en una única formulación.
- Punto 8. La composición de cualquier punto precedente en donde el componente β -glucano soluble y el componente anticuerpo se proporcionan en formulaciones separadas.
- 15 Punto 9. La composición de cualquier punto precedente que comprende además un anticuerpo-anti-tumor.
- Punto 10. Un método que comprende coadministrar a un sujeto un β -glucano soluble y una preparación de anticuerpo o componente anticuerpo que se une específicamente al β -glucano soluble.
- 20 Punto 11. Un método de aumentar la respuesta de un sujeto a inmunoterapia de β -glucano soluble, el método comprende coadministrar al sujeto una composición que comprende un β -glucano soluble y una preparación de anticuerpo que se une específicamente al β -glucano soluble.
- 25 Punto 12. El método del punto 11 que comprende además identificar el sujeto como un bajo unidor de β -glucano.
- Punto 13. El método de cualquiera de los puntos 10-12 en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran simultáneamente.
- Punto 14. El método de cualquiera de los puntos 10-12 en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran en tiempos diferentes.
- 30 Punto 15. El método de cualquiera de los puntos 10-12 en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran en sitios diferentes.
- 35 Punto 16. El método de cualquiera de los puntos 10-15 en donde el β -glucano soluble deriva de levadura.
- Punto 17. El método de cualquiera de los puntos 10-16 en donde el β -glucano soluble comprende un β -1,3/1,6 glucano.
- 40 Punto 18. El método de cualquiera de los puntos 10-17 en donde el β -glucano soluble comprende $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa.
- Punto 19. El método de cualquiera de los puntos 10-18 en donde el componente anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble.
- 45 Punto 20. El método del punto 19 en donde el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.
- Punto 21. Un método de aumentar la respuesta de un sujeto a inmunoterapia de β -glucano soluble, el método comprende coadministrar al sujeto una composición que comprende una fracción β -glucano soluble conjugado a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
- 50 Punto 22. El método del punto 21 que comprende además identificar el sujeto como un bajo unidor de β -glucano.
- Punto 23. El método del punto 21 o el punto 22 en donde la fracción β -glucano soluble deriva de levadura.
- 55 Punto 24. El método de los puntos 21-23 en donde la fracción β -glucano comprende, o deriva de, un β -1,3/1,6 glucano.
- Punto 25. El método de cualquiera de los puntos 21-24 en donde la fracción β -glucano comprende, o deriva de, $\beta(1,6)$ -[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- $\beta(1,3)$ -D-glucopiranososa.
- 60 Punto 26. El método de cualquiera de los puntos 21-25 en donde el anticuerpo comprende un anticuerpo terapéutico.
- 65 Punto 27. El método de cualquiera de los puntos 21-26 y que comprende además administrar un anticuerpo anti-tumor.

Punto 28. El método del punto 27 en donde el anticuerpo anti-tumor específicamente se une a células leucémicas o linfómicas.

5 Punto 29. El método del punto 27 en donde el anticuerpo anti-tumor específicamente se une a células de tumor sólido.

Punto 30. Un método de tratar un tumor que comprende coadministrar a un sujeto que tiene un tumor una composición que comprende:

- 10 un β -glucano soluble;
una preparación de anticuerpo que se une específicamente al β -glucano soluble; y
una preparación de anticuerpo anti-tumor.

15 Punto 31. El método del punto 30 y que comprende además identificar el sujeto como un bajo unidor de β -glucano soluble.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - 5 un componente β -glucano soluble derivado de levadura compuesto de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con enlaces β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6); y
 - 10 un componente anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble; y un anticuerpo anti-tumor.
2. La composición de la reivindicación 1 en donde el componente β -glucano soluble y el componente anticuerpo se proporcionan en una única formulación o en formulaciones separadas.
- 15 3. Una composición que comprende (i) un β -glucano soluble derivado de levadura compuesto de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con enlaces β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6), (ii) una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble, y (iii) un anticuerpo anti-tumor para su uso en aumentar la respuesta de un sujeto a inmunoterapia de β -glucano soluble, en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran.
- 20 4. La composición para su uso de la reivindicación 3 en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran simultáneamente, en tiempos diferentes, o en sitios diferentes.
- 25 5. La composición para su uso según la reivindicación 3 en donde el anticuerpo anti-tumor específicamente se une a células leucémicas o linfólicas; o se une a células de tumor sólido.
6. La composición de cualquier reivindicación precedente, o la composición para su uso de cualquier reivindicación precedente en donde el β -glucano soluble comprende β (1,6)-[poli-(1,3)-D-glucopiranosil]-poli- β (1,3)-D-glucopiranososa.
- 30 7. Una composición que comprende:
 - 35 un β -glucano soluble derivado de levadura compuesto de monómeros de glucosa organizados como un esqueleto de glucopiranososa con enlaces β -(1,3) con ramas periódicas de glucopiranososa β -(1,3) unidas al esqueleto a través de un enlace glucosídico β -(1,6);
 - 40 una preparación de anticuerpo que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al β -glucano soluble; y una preparación de anticuerpo anti-tumor para su uso en tratar un tumor en un sujeto, en donde el β -glucano soluble y la preparación de anticuerpo se coadministran.
8. La composición de cualquier reivindicación precedente, o la composición para su uso de cualquier reivindicación precedente en donde el anticuerpo monoclonal comprende BfD I, BfD II, BfD III o BfD IV.
- 45 9. La composición para su uso de cualquier reivindicación precedente, en donde el sujeto se ha identificado como un bajo unidor de β -glucano, en donde un bajo unidor es un sujeto, en donde menos del 10% de los leucocitos polimorfonucleares o monocitos en una muestra de sangre del sujeto se unen a β -glucano proporcionado de forma exógena o es un sujeto que tiene un título de anticuerpo anti- β -glucano de menos de 25.000.
- 50

Figura 1

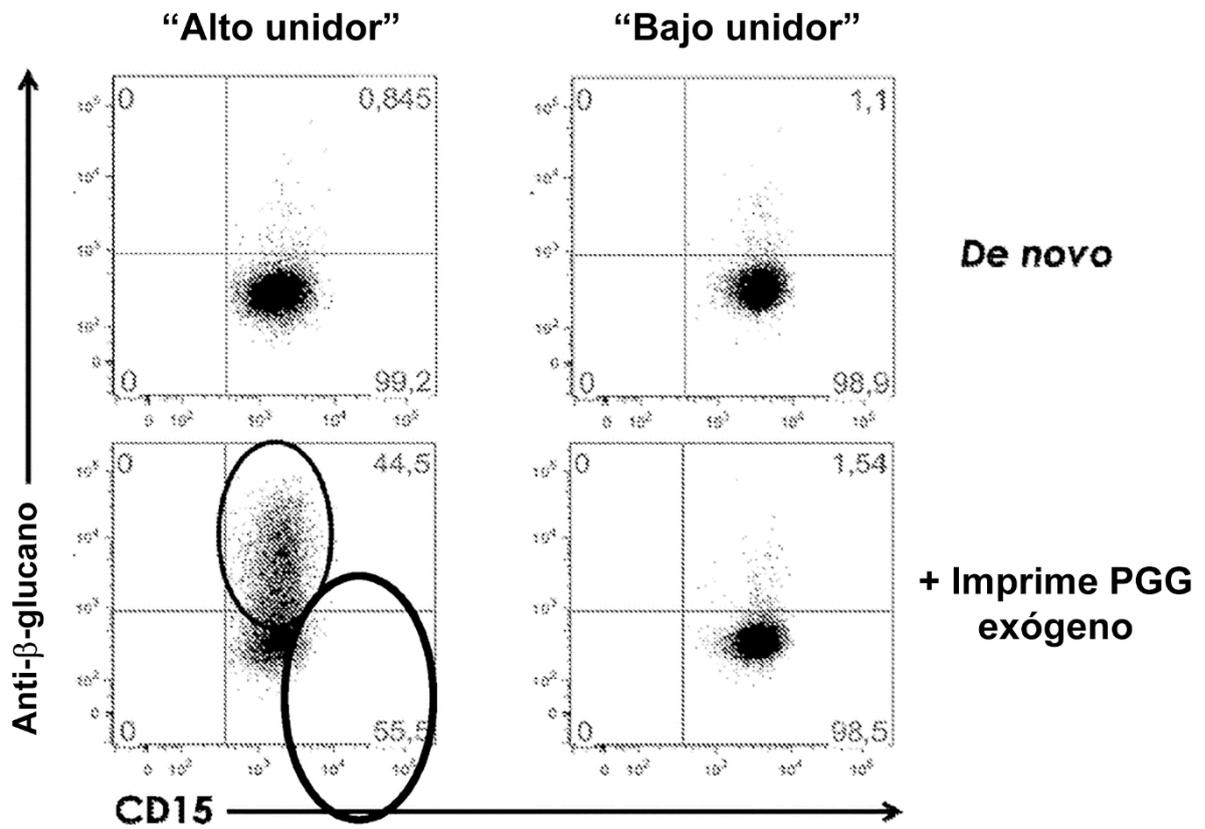


Figura 2

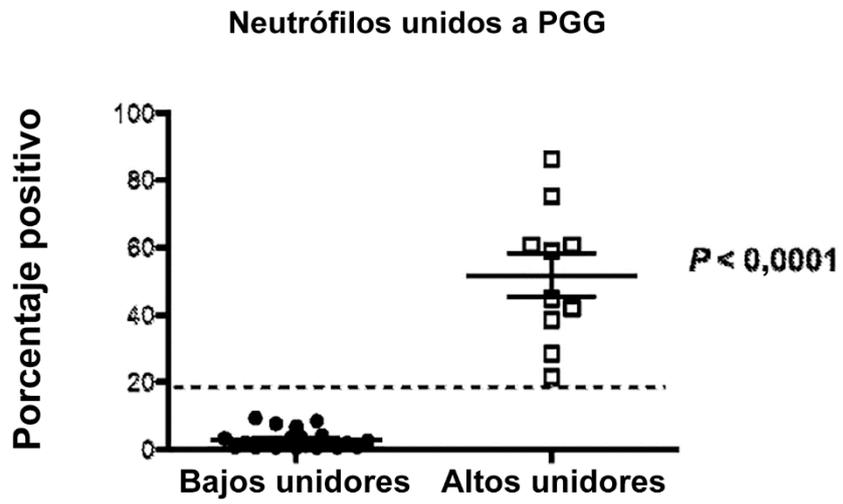


Figura 3

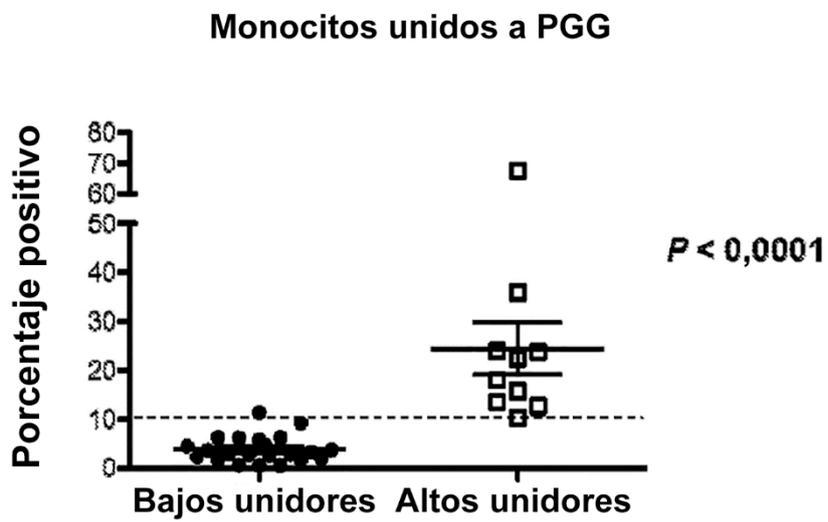


Figura 4

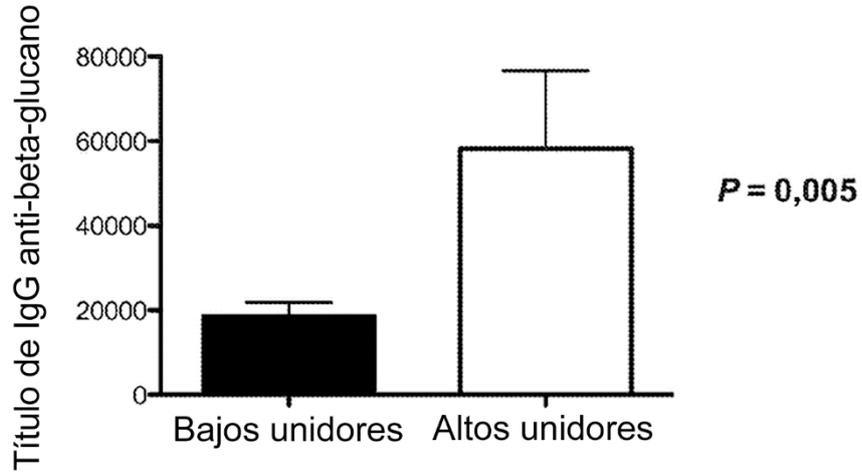


Figura 5

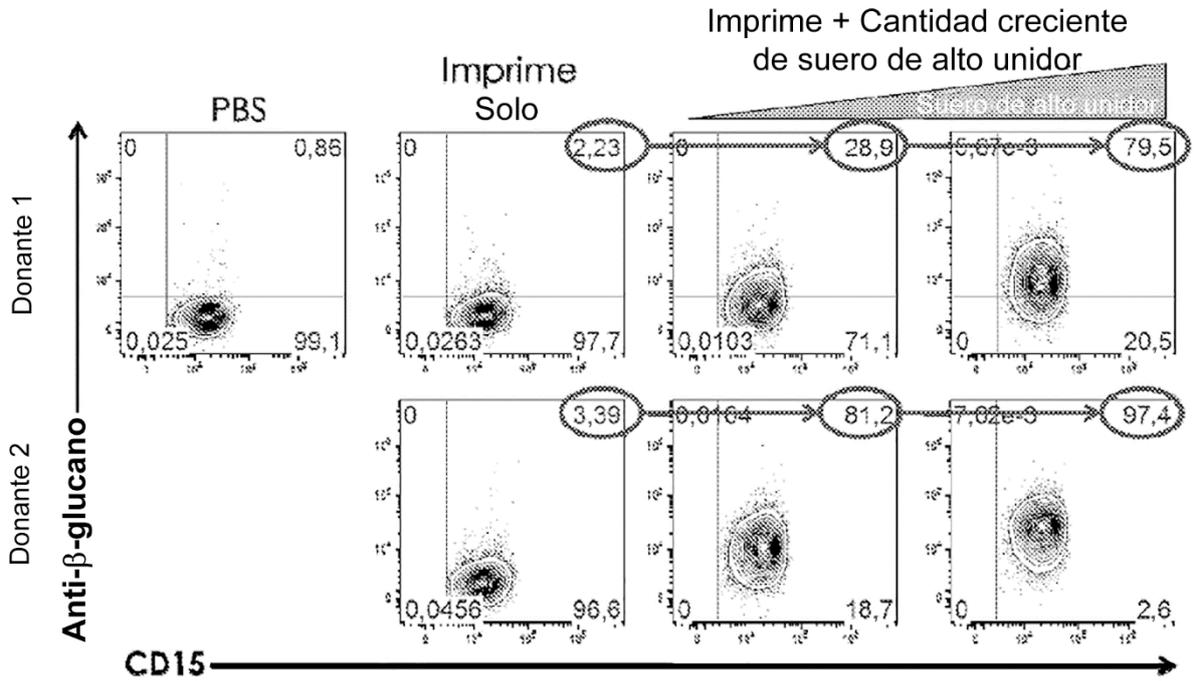


Figura 6

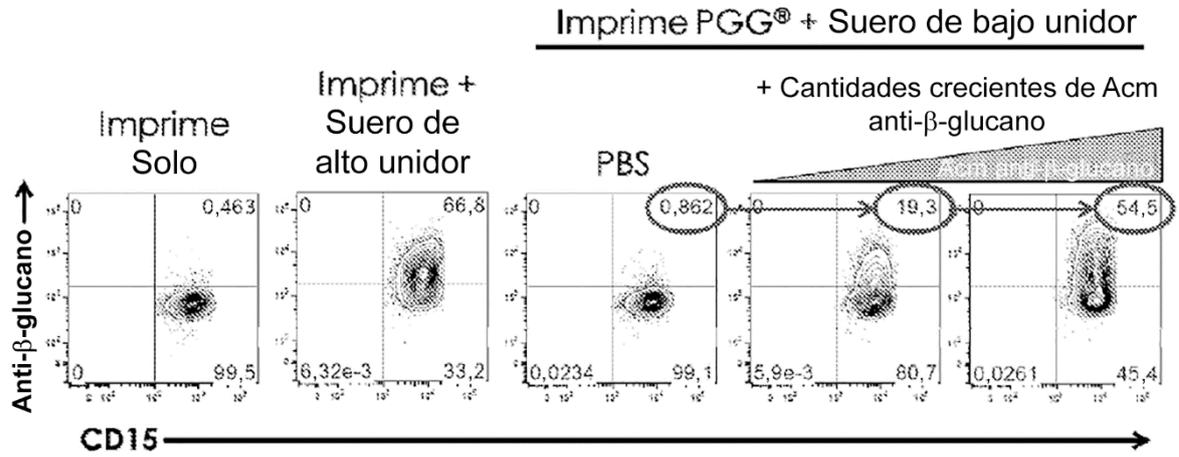


Figura 7

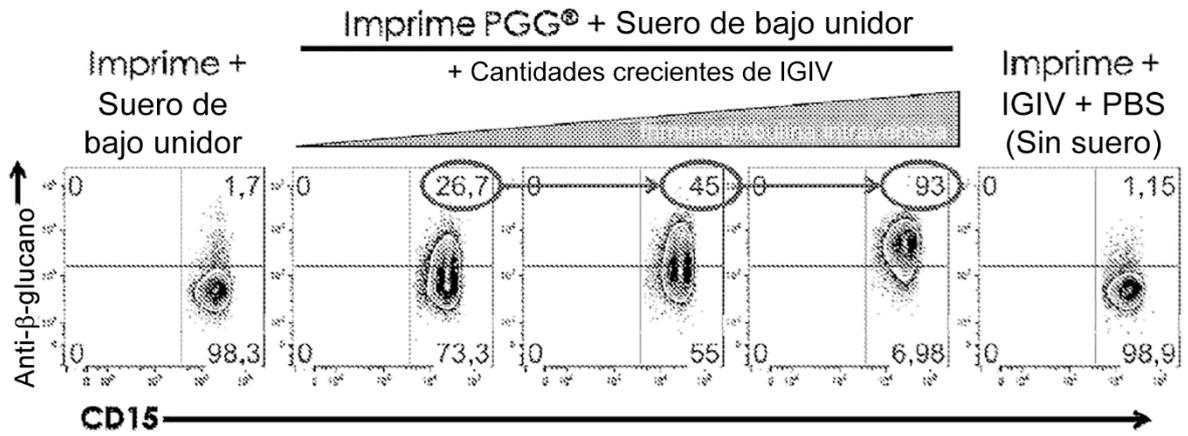


Figura 8

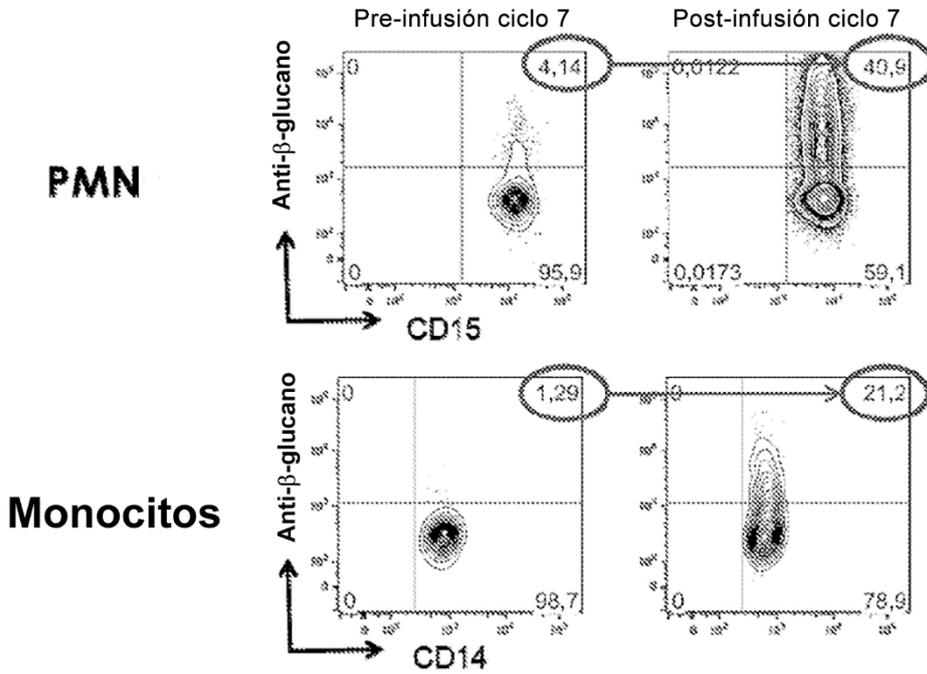


Figura 9

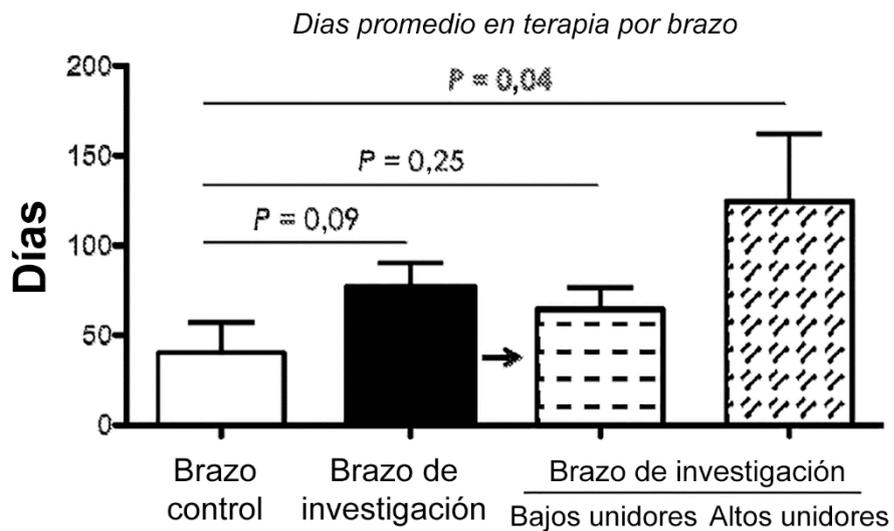


Figura 10

Unión de conjugados de Imp PMN en SC de BU

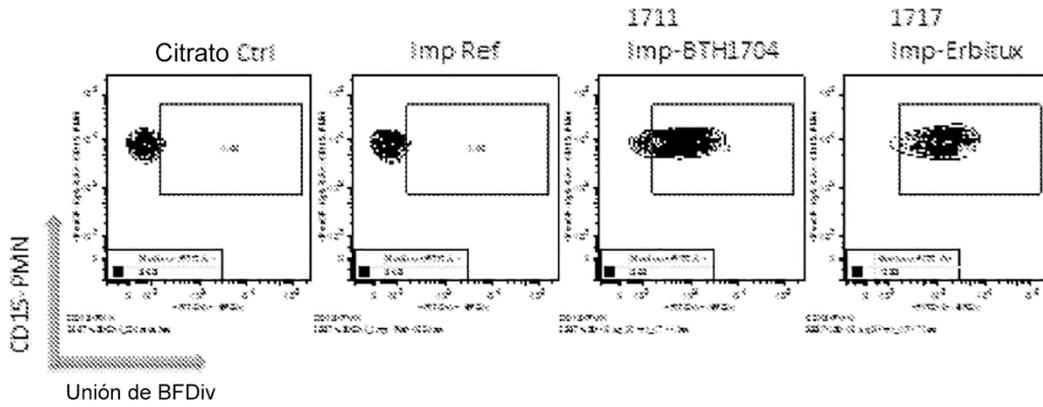


Figura 11

